



HAL
open science

Copolymères à base de polycaprolactones greffées par des chitooligosaccharides : vers des nanogels bioactifs et biostimulables

Alexandre Guerry

► To cite this version:

Alexandre Guerry. Copolymères à base de polycaprolactones greffées par des chitooligosaccharides : vers des nanogels bioactifs et biostimulables. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV042 . tel-00848249

HAL Id: tel-00848249

<https://theses.hal.science/tel-00848249>

Submitted on 25 Jul 2013

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie Organique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Alexandre GUERRY

Thèse dirigée par **Sylvain COTTAZ** et **Etienne FLEURY**
codirigée par **Sami HALILA** et **Julien BERNARD**

préparée au sein du **Centre de Recherches sur les
Macromolécules Végétales et de l'Institut National des
Sciences Appliquées de Lyon**
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Synthèse de chitooligosaccharide- grafted-polycaprolactone par chimie «click» : vers des nanogels bioactifs et biostimulables

Thèse soutenue publiquement le **30 novembre 2012**,
devant le jury composé de :

M. Denis WOUESSIDJWE

Professeur, DPM, Grenoble, Examinateur

M. Thierry BENVENU

Professeur, ENSCR, Rennes, Rapporteur

M. Philippe LECOMTE

Chargé de recherches, CERM, Liège, Rapporteur

M. Sylvain COTTAZ

Professeur, CERMAV, Grenoble, Directeur de thèse

M. Etienne FLEURY

Professeur, INSA, Lyon, Directeur de thèse

M. Sami HALILA

Chargé de recherches, CERMAV, Grenoble, Co-Directeur de thèse

M. Julien BERNARD

Chargé de recherches, INSA, Lyon, Co-Directeur de thèse

Mme. Patricia FOREST

Directrice scientifique, Biom'Up, Lyon, Invitée

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /

Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP



A mes parents

« Je crois beaucoup en la chance, et je constate que plus je travaille plus elle me sourit »

Thomas Jefferson

Remerciements

Voici le moment où je tiens à remercier l'ensemble des personnes que j'ai eu le plaisir de fréquenter pendant ces trois dernières années.

Je suis très sensible à l'honneur que m'ont fait Monsieur Thierry Benvegno, professeur à l'école nationale supérieure de chimie de Rennes (ENSCR), et Monsieur Philippe Leconte, chargé de recherche au centre d'études et de recherche sur les macromolécules (CERM) de Liège en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail et Monsieur Denis Wouessidjewe, professeur des universités au département de pharmacochimie moléculaire (DPM) de Grenoble d'avoir présidé ma soutenance. Je leur adresse mes plus sincères remerciements.

Je remercie également Madame Patricia Forest, directrice générale déléguée et directrice scientifique de Biom'Up, qui a acceptée de faire partie du jury de cette thèse.

Je suis reconnaissant envers Monsieur Sylvain Cottaz, professeur des universités au centre de recherches sur les macromolécules végétales (CERMAV) de Grenoble et Monsieur Etienne Fleury, professeur des universités à l'institut national des sciences appliquées (INSA) de Lyon d'avoir dirigé cette thèse. Vos avis tranchés ainsi que vos commentaires m'ont été d'une grande aide.

Je souhaite aussi remercier Monsieur Julien Bernard, chargé de recherche à l'INSA de Lyon, de m'avoir permis d'appréhender de manière théorique et expérimentale la science des polymères et d'avoir pris le temps de répondre à l'ensemble de mes questions. Un grand merci pour ces nombreux encouragements qui m'ont permis finalement de synthétiser mes premiers polymères.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur Sami Halila, chargé de recherche au CERMAV, pour m'avoir éveillé à la glycochimie durant mon stage de master et de m'avoir permis ensuite d'accéder à cette thèse. Je suis particulièrement reconnaissant de toutes les connaissances qu'il a su m'inculquer.

Je remercie aussi Monsieur Rédouane Borsali, directeur de recherche, de m'avoir accueilli au sein du CERMAV. Je tiens également à exprimer ma gratitude à Sébastien Fort, chef de l'équipe chimie et biotechnologie des oligosaccharides (CBO) qui m'a permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions. Je tiens aussi à lui dire merci pour l'amitié dont il fait preuve à mon égard.

Je souhaite aussi remercier Mademoiselle Isabelle Jeacomine pour m'avoir épaulé durant les analyses RMN et surtout pour les expériences DOSY. Je n'ai malheureusement pas eu le temps de profiter au mieux des nouveaux spectromètres.

Je tiens à remercier l'équipe du plateau de spectrométrie de masse pour l'ensemble des analyses MALDI et ESI, en particulier Monsieur Bernard Brasme pour nos discussions scientifiques et son regard pertinent sur cette technique, ainsi que Madame Stéphanie Boulanger pour son sourire, sa gentillesse, sa bonne humeur et son accueil.

Un immense merci à Mademoiselle Amandine Durant Terasson pour les observations de microscopie électronique. Je dois admettre que le MET correspond à la technique la plus obscure et la plus difficile expérimentalement que j'ai eu à affronter durant cette thèse. Merci Amandine d'avoir fait preuve d'une immense patience.

Je veux aussi à transmettre mes remerciements les plus chaleureux au Dr Christophe Travelet pour les analyses en diffusion de lumière, mais aussi pour sa gentillesse. Invité d'honneur de chacun de nos pots et instigateur de la fameuse galette des rois républicaine, je lui transmets mes plus sincères amitiés.

Je suis reconnaissant auprès des membres de mon comité de suivi de thèse Madame Sandrine Py et Monsieur Rédouane Borsali pour avoir apporté leurs visions extérieures sur l'ensemble du sujet.

Un grand merci à l'ensemble des permanents du groupe CBO : Hugues Driguez pour ces conseils avisés, Sylvie Armand pour sa gentillesse et pour m'avoir permis de renouer un peu avec la biologie durant mon stage de M2, Bernard Priem pour m'avoir donné faim en parlant de nourriture mexicaine et de bière artisanale, Aurélie Bouchet qui m'a toujours accueilli dans son bureau pour écouter mes plaintes, me conseiller ou tout simplement parler. Je profite de ces quelques lignes aussi pour remercier Nicolas Spinelli qui m'a fait découvrir le monde de la recherche, et Sébastien Fort pour sa ténacité à me trouver toujours de nouveaux surnoms. Je tiens à m'excuser auprès de William Helbert et Claire Boisset que j'ai rencontrés durant ma période de rédaction, période de sociabilité restreinte, je souhaite leurs dire que je ne mets en réalité que très rarement un casque sur les oreilles.

Il me reste à remercier ceux qui furent particulièrement présent autour de moi pendant ces trois ans. Pour commencer je tiens encore à exprimer ma gratitude à Sami qui m'a vraiment pris sous son aile pendant près de 4 ans, sa porte toujours ouverte pour des

discussions professionnelles, d'intenses brainstormings scientifiques mais aussi pour simplement parler de tout. J'ai vraiment eu immense plaisir à travailler avec toi. Je pense que si j'ai vécu cette thèse de manière « presque » sereine, c'est en grande partie grâce à toi. Je me souviendrai toujours de ces quelques chansons qui t'enflammaient à la paillasse, de tes métaphores, mais surtout de l'amitié que tu as eue à mon égard. Et pour tout cela je te dis un très grand merci. J'espère sincèrement que nos chemins se recroiseront.

Je veux aussi à saluer la patience de mes colocataires de bureau : Patricia qui en plus de me réparer lors de mes fréquents accidents en vélo, me remontait le moral à coup de gâteau au chocolat et à la banane, Stéphanie qui a toujours fait preuve d'une diplomatie étonnante essentiellement envers les fréquents coups de téléphone issus du couloir. Anika Tchitchi, je te promets deux choses : j'essayerai à l'avenir de ne plus envahir le bureau de mes voisins et de ne plus me moquer de ton accent allemand. Je n'oublie pas non plus, Samuel qui est rentré au Brésil en laissant une énorme place vide et qui fut un camarade exemplaire. Je me souviens aussi que bien avant ça, j'ai partagé ce bureau avec Cédric, qui possède maintenant le surnom de Kiki jusqu'en Belgique. Je tiens aussi à remercier Marine-Océane ma première stagiaire : je te souhaite le meilleur pour la suite et te remercie de ton aide.

Je tiens vraiment à exprimer mon amitié la plus sincère à Cony pour son Alemoa Braba attitude ainsi qu'à Rénato pour ses mots rares mais toujours justes. Tu as su apprécier le petit bonhomme en mousse et j'attends toujours ton solo de kazou. Je n'oublie pas non-plus Rémi, qui gardera longtemps j'espère le surnom de Gunter. Je pense aussi à Emeline, toujours prête à tomber dans mes pièges pour me faire plaisir, quitte à parfois se faire des bleus. J'imagine que Marine ne va pas regretter mon jeu favori : la faire rougir. J'ai aussi une pensée pour Laurine qui a toujours été d'une gentillesse infinie, à l'origine de bien de fou rire, je tiens à lui dire qu'elle va me manquer. Je tiens aussi à remercier André et Soraia pour leurs amitiés et leurs présences aussi bien au labo 318 qu'à la résidence Matisse. J'ai aussi une pensée pour Ludovic, Tinaig, Maud (et le chatglier) ainsi qu'Hélène, vous m'avez tous beaucoup apporté. Et pour finir, Nathalie, je te remercie pour ta bonne humeur, tes coups de folie, tes hésitations, ton énergie... et surtout de ton soutien dans les moments difficiles. Grâce à toi, mes longues heures de paillasse m'ont paru beaucoup plus courtes. Merci pour les randonnées dans le brouillard, les passages cloutés de Prague, les sushis au pesto, le pinocchio de Lille, le rouge du phénomène, les morsures de boîte aux lettres, tes raccourcis.... Tu vas me manquer.

Je pense aussi à tous mes amis Brésiliens : Elizandra, Talita (et ses baskets), Reinaldo, Carina, Alexandre, Carlos, Andréa, Samia, Clayton, Edson et Samira....

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des thésards, post-docs et des CDD du CERMAV en particulier Matthieu, Axel, Antoine B, Antoine D, Pan, Bruno, Firras, Landry, Jimmy, Gaelle, Anne-Laure, Elise...

Je souhaite aussi dire merci à l'ensemble des membres de l'équipe IMP de INSA de Lyon et en particulier : Elise et sa connaissance absolue des loisirs créatifs, Nicolas Laforet pour m'avoir enseigné que le bonheur était dans la décroissance, Marie-Laure, Zeng Min, Arthur, Céline et Nicolas D. pour avoir mis en évidence que les lunettes de sécurité étaient plus importantes que la blouse.

Je veux également dire merci à mes amis proches qui m'ont toujours soutenu et qui ont su accepter mon manque de disponibilité pendant ces trois dernières années: Jérôme, Mélanie, Angélique, Albin, Mickael, Sébastien, Anthony, Pierre, Fred, Jennyfer et bien sûr Emilie.

Je pense aussi à tous les étudiants de ma promotion qui m'ont encouragé dans cette aventure : Romaric (il y aurait tant à dire), Amélie, Kevin, Tibault, Mariam, Milou, Els, Sandrine...

Il me reste à remercier mes parents, ma sœur, ma famille toujours présente. Ces derniers temps ont été mouvementés... allons maintenant vers plus de sérénité. Merci pour votre soutien depuis 27 ans.

Parce que vous êtes nombreux à m'avoir soutenu tout au long de cette aventure, je ne pourrai pas tous vous citer mais soyez assurés de ma sincère reconnaissance.

A vous tous MERCI

Sommaire

Introduction Générale	1
I Etude Bibliographique	5
<i>I.1 Les nanogels à usage biomédical</i>	9
I.1.1 Des hydrogels aux nanogels	9
I.1.2 Nanogels et structure des polymères.....	11
I.1.3 Encapsulation des principes actifs par les nanogels.....	12
I.1.4 Nanogels : un outil de vectorisation pour les principes actifs.....	13
I.1.4.1 De la circulation générale vers la cible.....	13
I.1.4.2 Relargage contrôlé du principe actif dans l'espace	15
I.1.4.3 Libération contrôlée du principe actif dans le temps	17
I.1.5 Conclusion	17
<i>I.2 Chitine et chitosane</i>	18
I.2.1 Généralités	18
I.2.2 Obtention de la chitine et du chitosane	19
I.2.2.1 Extraction de la chitine	20
I.2.2.2 Désacétylation chimique : de la chitine au chitosane.....	20
I.2.3 Obtention d'oligomères de chitine et chitosane	22
I.2.3.1 Dépolymérisation de la chitine	22
I.2.3.2 Obtention par glycosylation.....	25
I.2.3.3 Biocompatibilité et biodégradabilité	27
I.2.3.4 Bioactivités.....	28
I.2.3.4.a Activité antitumorale	28
I.2.3.4.b Activité antimicrobienne	28
I.2.3.4.c Propriétés analgésiques	29
I.2.3.4.d Propriétés hémostatiques.....	30
I.2.3.4.e Mucoadhésion	30
I.2.3.4.f Ingénierie tissulaire.....	31
I.2.4 Conclusion	31
<i>I.3 La Poly(ε-caprolactone)</i>	32
I.3.1 PCL : Un polymère biocompatible	33
I.3.2 Dégradabilité des PCL <i>in vivo</i>	34
I.3.3 Synthèse des PCL par polycondensation	35
I.3.4 Synthèse des PCL <i>via</i> polymérisation par ouverture de cycle	36
I.3.4.1 Synthèse des monomères d'εCL	36
I.3.4.2 Les différents mécanismes de polymérisation par ROP.....	37

I.3.4.2.a	Polymérisation par ouverture de cycle cationique	37
I.3.4.2.b	<i>Polymérisation par ouverture de cycle anionique</i>	38
I.3.4.2.c	Polymérisation par activation du monomère	42
I.3.4.3	Réactions secondaires.....	43
I.4	<i>Copolymères et nanogels composés de chitooligosaccharides et de PCL : Etat de l'art</i>	44
I.4.1	Nanogels à base de copolymères à bloc.....	44
I.4.2	Nanogels à base de copolymères greffés de type « from »	48
I.4.3	Nanogels à base de copolymères greffés de type « onto ».....	51
I.4.3.1	Chitine et chitosane greffés par des PCL.....	51
I.4.3.2	PCL greffés par des chitines ou des chitosanes.....	52
I.4.3.2.a	Modification latérale des PCL	53
I.4.3.2.b	Modification en position anomère des COs.....	57
I.5	<i>Conclusion</i>	59
II	Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane	67
II.1	<i>Stratégie de chimie « click »</i>	70
II.1.1	Réactions radicalaires thiol-ène et thiol-yne.....	70
II.1.2	Cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par du cuivre I (CuAAC)	71
II.2	<i>Fonctionnalisation d'un composé modèle : le tétra-N,N^{II},N^{III},N^{IV}-acétyl-chitopentaose (CO-V(N))</i>	71
II.2.1	Caractérisation du CO-V(N)	72
II.2.2	Fonctionnalisation du CO-V(N) par un groupement alcène	75
II.2.3	Fonctionnalisation du CO-V(N) par un groupement alcyne	78
II.2.3.1	Fonctionnalisation du CO-V(N) par amination réductrice	79
II.2.3.2	Fonctionnalisation du CO-V(N) par amination réductrice organocatalysée	83
II.2.4	Valorisation du conjugué CO-V(N) dans un autre contexte	88
II.2.5	Conclusion	90
II.3	<i>Fonctionnalisation d'un chitosane commercial (COs)</i>	90
II.3.1	Caractérisation du COs commercial	90
II.3.2	Fonctionnalisation du COs par un groupement alcyne	92
II.3.3	Fonctionnalisation du COs par la 4-propargyloxyaniline	94
II.3.4	Conclusion	99
II.4	<i>Conclusion</i>	99
III	Synthèse et caractérisation des copolymères poly(αN₃ϵCL-co-ϵCL)	103
III.1	<i>Homopolymérisation de l'ϵCL</i>	106
III.1.1	Amorceur à base d'étain et d'aluminium	106

III.1.2	Choix de l'amorceur pour la polymérisation de l' ϵ CL.....	107
III.1.2.1	Monomère d' ϵ CL.....	108
III.1.2.2	Amorçage par l' $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$	109
III.1.2.3	Amorçage par le DSDOP.....	113
III.1.3	Conclusion	115
III.2	<i>Copolymérisation des ϵCL et αClϵCL</i>	116
III.2.1	Synthèse de l' α Cl ϵ CL.....	116
III.2.2	Synthèse de la poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL).....	118
III.2.2.1	Synthèse de la poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL) à 5% en α Cl ϵ CL	120
III.2.2.1	Synthèse de la poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL) à 20% en α Cl ϵ CL	123
III.2.3	Conclusion	124
III.3	<i>Obtention de la poly(αN₃ϵCL-co-ϵCL)</i>	124
III.4	<i>Conclusion</i>	128
IV	Nanogels et encapsulation	131
IV.1	<i>Synthèse des poly(αN₃ϵCL-co-ϵCL)-g-CO-V(N) par CuAAC</i>	134
IV.2	<i>Synthèse de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) modèle par CuAAC</i>	135
IV.3	<i>Synthèse de la PCL¹⁰⁰N₃^{5%}-g-CO-V(N) modèle par CuAAC</i>	138
IV.3.1	Conclusion	138
IV.4	<i>Synthèse des poly(αN₃ϵCL-co-ϵCL)-g-COs par CuAAC</i>	139
IV.4.1	Synthèse des PCL ⁵⁰ N ₃ ^{5%} -g-COs, PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{5%} -g-COs et PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{5%} -g-COs.....	139
IV.4.2	Synthèse des PCL ⁵⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs, PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs et PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs.....	140
IV.4.3	Conclusion	143
IV.5	<i>Formation des nanoparticules</i>	144
IV.5.1	Nanoparticules à base de PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-CO-V(N) modèle.....	144
IV.5.1.1	Obtention de nanoparticule par dissolution directe.....	144
IV.5.1.2	Obtention de nanoparticules par la méthode des co-solvants.....	148
IV.5.1.3	Conclusion.....	149
IV.5.2	Nanoparticules à base de PCL ⁵⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs, PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs et PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	150
IV.5.2.1	Obtention de nanoparticules par la méthode des co-solvants.....	150
IV.5.2.2	Obtention des nanoparticules par dissolution directe	151
IV.5.2.3	Conclusion.....	154
IV.6	<i>Influence de la force ionique et du pH</i>	154
IV.6.1	Taille des nanoparticules de PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs en fonction de la force ionique	155
IV.6.2	Taille des NP de PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs en fonction du pH.....	156

IV.6.3	Conclusion	157
IV.7	<i>Réticulation des nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs</i>	158
IV.7.1	Synthèse de l'agent réticulant	158
IV.7.2	Réticulation des nanoparticules	159
IV.7.3	Taille des nanoparticules réticulées en fonction de la force ionique	162
IV.7.4	Conclusion	164
IV.8	<i>Encapsulation de la DOX dans les nanoparticules</i>	164
IV.8.1	Tests préliminaires d'encapsulation de doxorubicine	165
IV.8.2	Encapsulation de la DOX dans les nanoparticules, et réticulation	166
IV.8.3	Conclusion	167
IV.9	<i>Relargage de la DOX par les nanoparticules</i>	168
IV.10	<i>Conclusion</i>	170
V	Conclusion et perspectives	173
VI	Partie expérimentale	177
VI.1	<i>Méthodes Générales</i>	180
VI.1.1	Solvants et réactifs.....	180
VI.1.2	Chromatographie.....	180
VI.2	<i>Méthodes de caractérisation des molécules</i>	181
VI.2.1	Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	181
VI.2.2	Spectrométrie de masse (SM ESI ⁺ & SM MALDI-TOF)	181
VI.2.3	Spectroscopie infrarouge (IR)	181
VI.2.4	Spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis)	182
VI.2.5	Chromatographie d'exclusion stérique (CES)	182
VI.2.6	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	182
VI.2.7	Microscopie électronique à transmission (MET)	182
VI.2.8	Spectroscopie de fluorescence	183
VI.3	<i>Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane</i>	183
VI.3.1	Caractérisations préliminaires du CO-V(N).....	183
VI.3.2	Modifications chimiques de l'oligomère de chitine CO-V(N).....	184
VI.3.3	Caractérisations préliminaires du mélange d'oligomère de chitosane (COs)	187
VI.3.4	Modifications chimiques du COs	188
VI.4	<i>Polymérisation</i>	190
VI.4.1	Homopolymérisation de l'ε-caprolactone	190
VI.4.2	Copolymérisation de l'ε-caprolactone et de l'α-chloro-ε-caprolactone.....	193

VI.4.3	Obtention des poly(α N ₃ ϵ CL-co- ϵ CL)	197
VI.5	Synthèse des copolymères greffés PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-CO-V(N) et poly(α N ₃ ϵ CL-co- ϵ CL)-g-COs	200
VI.5.1	Synthèse de la PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-CO-V(N)	200
VI.5.2	Synthèse des poly(α N ₃ ϵ CL-co- ϵ CL)-g-COs.....	201
VI.6	<i>Nanogels et encapsulation</i>	202
VI.6.1	Formation des nanoparticules par la méthode des co-solvants.....	202
VI.6.2	Formation des nanoparticules par dissolution directe	203
VI.6.3	Réticulation des nanoparticules de PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs.....	203
VI.6.4	Encapsulation de la doxorubicine dans les nanoparticules de PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	204
VI.6.5	Mesure du relargage.....	205

Liste des abréviations

Réactifs

CuI,P(OEt) ₃	Complexe de iodure de cuivre (I) et de triéthylphosphite
DABITC	4-Diméthylaminoazobenzène-4'-isothiocyanate
DMAP :	4-Diméthylaminopyridine
DMC	Chlorure de 2-chloro-1,3-diméthylimidazolium
DSDOP	2,2-dibutyl-2-stanna-1,3-dioxépane
mCPBA	Acide 3-chloroperbenzoïque
N ₃ -EDNAS	<i>N</i> -[[<i>(</i> azidoacétyle <i>)</i> amino]éthyl]-5-naphtylamine-1-sulfonate de sodium

Solvants

ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
DCM	Dichlorométhane
DMAc	Diméthylacétamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMF	Diméthylformamide
EP	Ether de pétrole
MeOH	Méthanol
THF	Tétrahydrofurane

Saccharides

CO-V(<i>N</i>)	Tétra- <i>N,N^{II},N^{III},N^{IV}</i> -acétyl-chitopentaose
CO-X(per <i>N</i> Ac)	Oligomères de chitine ou chitosane per- <i>N</i> -acétylé de DP = X
COs	Oligomères de chitosane
DA	Degré d'acétylation
GlcN	Glucosamine
GlcNAc	<i>N</i> -Acétyl-Glucosamine
MCE	Esters de Cellulose Mixés (Mixed Cellulose Esters)

Monomères et Polymères

αClεCL	α-chloro-ε-caprolactone
αN ₃ εCL	α-azido-ε-caprolactone
εCL	ε-caprolactone ou 2-oxepanone
DP	Degré de polymérisation
MPEG	Méthyl poly(Ethylène)Glycol
M _w	Masse molaire moyenne en poids
PA	Principe actif
PCL / Poly(εCL)	Poly(ε-Caprolactone)
PEEP	Poly(EthylEthylènePhosphate)
PEG	Poly(Ethylène)Glycol
PEI	Poly(ÉthylèneImine)
PHB	Poly(β-hydroxybutyrate)
PLA	Poly(Acide Lactique)

Liste des Abréviations

PLGA	Poly(Acide Lactique- <i>co</i> -Glycolique)
PMA	Poly(MéthylAcrylate)
PTFE	Poly(TétraFluoroEthylène)
ROP	Polymérisation par ouverture de cycle (Ring opening polymerisation)

Technique de caractérisation

CCM	Chromatographie sur couche mince
CES	Chromatographie d'exclusion stérique
COSY	Spectroscopie RMN de corrélation homonucléaire proton/proton (Correlation spectroscopy)
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DOSY	Mesure du coefficient de diffusion par spectroscopie RMN (Diffusion order spectroscopy)
ESI ⁺	Ionisation par électronébuliseur (Electrospray ionisation)
FRET	Transfert d'énergie par résonance de Forster (Forster resonance energy transfert)
IR	Infrarouge
HMQC	Spectroscopie RMN de corrélation hétéronucléaire proton/carbone (Heteronuclear multiple quantum coherence)
HPLC	Chromatographie liquide haute performance (High performance liquid chromatography)
MALDI-TOF	Source d'ionisation laser assisté par une matrice - analyseur du temps de vol (Matrix-assisted laser desorption and ionisation – Time of flight)
MEB	Microscopie électronique à Balayage
MET	Microscopie électronique à Transmission
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMN 2D	Résonance magnétique nucléaire à deux dimensions
SM	Spectrométrie de masse
UV-vis	Ultraviolet-Visible

Equation

η	Rendement molaire
η_m	Rendement massique
$\eta_{\text{substitution}} \text{ (RMN)}$	Rendement de la substitution de la poly($\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL-}co\text{-}\epsilon\text{CL}$) en poly($\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-}co\text{-}\epsilon\text{CL}$)
DA (RMN)	Degré d'acétylation moyen déterminée par RMN ^1H
$\text{DP}_{n,\text{Exp}} \text{ (RMN)}$	Degré de polymérisation moyen en nombre expérimental déterminé par RMN ^1H
$\text{DP}_{n,\text{Th}}$	Degré de polymérisation moyen en nombre théorique
$I_p \text{ (CES)}$	Dispersité déterminée par CES
$F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} \text{ (RMN)}$	Fraction molaire en $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ déterminée par RMN ^1H
$F_{\epsilon\text{Cl}\epsilon\text{CL}} \text{ (RMN)}$	Fraction molaire en $\epsilon\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ déterminée par RMN ^1H
$F_{\text{CO-V}(N)} \text{ (RMN)}$	Fraction molaire en CO-V(N) par rapport aux résidus $\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}$ et ϵCL de la PCL déterminée par RMN ^1H
$F_{\text{COs}} \text{ (RMN)}$	Fraction molaire en COs par rapport aux résidus $\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}$ et ϵCL de la PCL déterminée par RMN ^1H

Liste des Abréviations

$M_{n,Exp}$ (CES)	Masse molaire de la poly(ϵ CL) expérimentale déterminée par CES en $g.mol^{-1}$
$M_{n,Th}$	Masse molaire théorique en $g.mol^{-1}$
R_h (DLS)	Rayon hydrodynamique observée en DLS en nm
$T_{encapsulation}$	Taux d'encapsulation
x	Taux de conversion
x (RMN)	Taux de conversion déterminé par RMN 1H

Divers

δ	Déplacement chimique en ppm
-co-	copolymérisé avec
-g-	greffé sur
AR	Amination Réductrice
CuAAC	Cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par du cuivre I (Copper (I) azide alkyne cycloaddition)
DOX	Doxorubicine
DOX-HCl	Doxorubicine sous forme de sel d'hydrochlorure
d	Doublet
dd	Double doublet
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
éq	Equivalent
GSH	Glutathion
m	Multiplet
MHKS	Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada
PA	Principe actif
PBS	Tampon phosphate (Phosphate buffer saline)
ppm	Partie par million
q	Quadruplet
rpm	Rotation par minute
s	Singulet
t	Triplet
T_g	Température de transition vitreuse
UDP	Uridine diphosphate

INTRODUCTION GENERALE

Les principes actifs chimiothérapeutiques (PA), essentiellement anticancéreux, sont souvent toxiques, présentent des effets secondaires importants, et ont une solubilité limitée dans les milieux physiologiques en raison de leur forte hydrophobie. Le secteur de la santé recherche des stratégies innovantes pour pallier à ces problèmes, parmi celles-ci, la vectorisation des principes actifs par des nanoparticules. Grâce à ces dernières, il est possible d'incorporer, maintenir, protéger, transporter et contrôler la libération des molécules médicamenteuses, même très hydrophobes. Cette voie innovante permet de contrôler la pharmacocinétique en encapsulant les PA dans des nanoparticules capables de contrôler leur distribution et leur libération dans l'organisme. Certaines nanoparticules comme les nanogels, qui sont des particules nanométriques constituées par des chaînes macromoléculaires, sont particulièrement adaptés pour répondre à cette problématique.

L'objectif de ce projet est de synthétiser des nanogels permettant la vectorisation et la libération contrôlée de PA anticancéreux. Ces nouveaux transporteurs moléculaires seront caractérisés par la nature des matériaux biocompatibles qui les constituent ainsi que par un contrôle de la structure finale. Par notre approche, il sera possible de préserver les fonctions chimiques utiles pour les propriétés biologiques du nanogel ainsi que d'incorporer des fonctions répondant à un stimulus physiologique.

Pour ce faire, nous proposons de développer de nouveaux copolymères amphiphiles hybrides composés de polyesters et d'oligosaccharides dont les paramètres structuraux (masse molaire, fonctionnalisation...) seront parfaitement maîtrisés. Ces copolymères seront composés d'un squelette hydrophobe à base de poly(ϵ -caprolactone) sur lequel des chitooligosaccharides hydrophiles seront greffés latéralement. Le couplage sera réalisé *via* une chimie « click » entre des chitooligosaccharides fonctionnalisés par une fonction alcyne et une chaîne de poly(ϵ -caprolactone) porteuse de fonctions azide latérales. La taille ainsi que le taux de fonctionnalisation des différentes PCL seront parfaitement maîtrisés lors de leurs synthèses réalisées par polymérisation par ouverture de cycle. De plus, afin de conserver les propriétés biologiques des chitooligosaccharides, les fonctions amine libres devront rester intactes.

Les copolymères amphiphiles obtenus seront placés en milieu aqueux et s'auto-assembleront en emprisonnant des principes actifs en solution. La micelle ainsi chargée sera stabilisée par un agent de réticulation biostimulable. Par ce biais, la libération du principe actif au niveau de la cible sera associée à une coupure spécifique des ponts de réticulation.

Les copolymères résiduels seront dégradés puis assimilés ou éliminés par l'organisme (Figure 1).

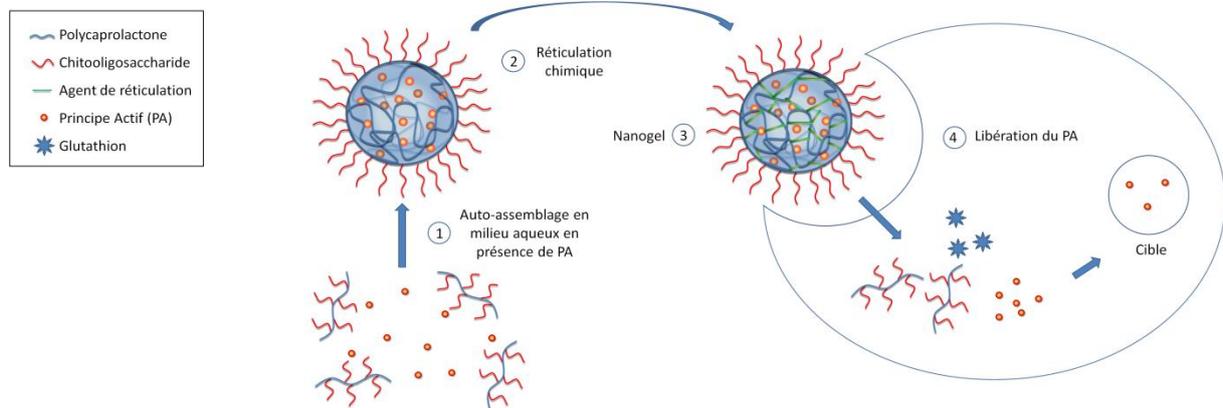


Figure 1 : Stratégie de vectorisation

Dans ce cadre de travail, une collaboration a été mise en place entre l'équipe « Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides » du CERMAV spécialiste de la chimie des oligosaccharides et l'équipe « Ingénierie des Matériaux Polymères » de l'INSA de Lyon réputée dans le domaine de l'ingénierie des polymères. De plus, Biom'Up, une entreprise spécialiste des implants chirurgicaux biosourcés à base de collagène d'origine animal, nommé Biom'Up est associée au projet, essentiellement pour leurs expertises dans les matériaux à usage biomédical. Ils ont pour objectif de développer de nouvelles matières premières de sources naturelles, afin de s'abstenir des problèmes sanitaires liés à l'utilisation de collagène d'origine animal. Le chitosane et la chitine font partie de leur choix potentiel.

Dans un premier temps, l'étude bibliographique s'intéressera aux différents éléments constituant notre nanogel, à savoir, la chitine et le chitosane, et la poly(ϵ -caprolactone) (PCL). Nous étudierons plus particulièrement leurs méthodes d'obtention, et leurs relations structures/propriétés. Cette première partie s'achèvera sur une étude de l'état de l'art des différents copolymères et nanogels existants à base de PCL et/ou d'oligomères de chitine et de chitosane.

La partie consacrée aux résultats et discussions sera divisée en trois chapitres. Le premier chapitre traitera de la fonctionnalisation des oligosaccharides, le second chapitre exposera la synthèse des PCL modifiées et finalement le troisième chapitre s'intéressera à l'obtention des nanogels ainsi que leurs caractérisations physico-chimiques.

I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Sommaire

I.1	<i>Les nanogels à usage biomédical</i>	9
I.1.1	Des hydrogels aux nanogels	9
I.1.2	Nanogels et structure des polymères	11
I.1.3	Encapsulation des principes actifs par les nanogels	12
I.1.4	Nanogels : un outil de vectorisation pour les principes actifs	13
I.1.4.1	De la circulation générale vers la cible	13
I.1.4.2	Relargage contrôlé du principe actif dans l'espace	15
I.1.4.3	Libération contrôlée du principe actif dans le temps	17
I.1.5	Conclusion	17
I.2	<i>Chitine et chitosane</i>	18
I.2.1	Généralités	18
I.2.2	Obtention de la chitine et du chitosane	19
I.2.2.1	Extraction de la chitine	20
I.2.2.2	Désacétylation chimique : de la chitine au chitosane	20
I.2.3	Obtention d'oligomères de chitine et chitosane	22
I.2.3.1	Dépolymérisation de la chitine	22
I.2.3.2	Obtention par glycosylation	25
I.2.3.3	Biocompatibilité et biodégradabilité	27
I.2.3.4	Bioactivités	28
I.2.3.4.a	Activité antitumorale	28
I.2.3.4.b	Activité antimicrobienne	28
I.2.3.4.c	Propriétés analgésiques	29
I.2.3.4.d	Propriétés hémostatiques	30
I.2.3.4.e	Mucoadhésion	30
I.2.3.4.f	Ingénierie tissulaire	31
I.2.4	Conclusion	31
I.3	<i>La Poly(ϵ-caprolactone)</i>	32
I.3.1	PCL : Un polymère biocompatible	33
I.3.2	Dégradabilité des PCL <i>in vivo</i>	34
I.3.3	Synthèse des PCL par polycondensation	35
I.3.4	Synthèse des PCL <i>via</i> polymérisation par ouverture de cycle	36
I.3.4.1	Synthèse des monomères d' ϵ CL	36
I.3.4.2	Les différents mécanismes de polymérisation par ROP	37
I.3.4.2.a	Polymérisation par ouverture de cycle cationique	37
I.3.4.2.b	<i>Polymérisation par ouverture de cycle anionique</i>	38
I.3.4.2.c	Polymérisation par activation du monomère	42

I – Etude Bibliographique

I.3.4.3	Réactions secondaires	43
<i>I.4</i>	<i>Copolymères et nanogels composés de chitooligosaccharides et de PCL : Etat de l'art</i>	<i>44</i>
I.4.1	Nanogels à base de copolymères à bloc	44
I.4.2	Nanogels à base de copolymères greffés de type « from »	48
I.4.3	Nanogels à base de copolymères greffés de type « onto »	51
I.4.3.1	Chitine et chitosane greffés par des PCL	51
I.4.3.2	PCL greffés par des chitines ou des chitosanes	52
I.4.3.2.a	Modification latérale des PCL	53
I.4.3.2.b	Modification en position anomère des COs	57
<i>I.5</i>	<i>Conclusion</i>	<i>59</i>

Dans une première partie, cette étude bibliographique présente les nanogels appliqués aux usages médicaux en décrivant leurs structures et morphologies ainsi que l'encapsulation, la vectorisation et le relargage des principes actifs (PA). La deuxième partie s'intéresse aux polysaccharides utilisés par la suite : le chitosane et la chitine. Les propriétés physiques, chimiques et biologiques y sont décrites ainsi que les voies d'obtention des oligomères. De même, la troisième partie traite des propriétés des PCL et de leur voie de synthèse. Pour finir, la dernière partie fait l'état de l'art des copolymères à base de chitine/chitosane et/ou de PCL.

I.1 Les nanogels à usage biomédical

Les nanogels à usage biomédical sont des réseaux macromoléculaires à l'échelle nanométrique. Dans le cas d'applications médicales, ces gels sont très hydratés, (jusqu'à 90% en masse) et s'opposent aux particules classiques (Poly(acide lactique), Poly(acide lactique-co- acide glycolique), Poly(ϵ -caprolactone)...) qui ont des capacités d'absorption limitée (5 à 10% en masse).^[1] Ils possèdent une grande surface spécifique favorisant les phénomènes de multivalence et un cœur composé d'un réseau favorisant l'incorporation de PA. Dans le cadre de ce projet de thèse, c'est l'incorporation, la vectorisation et la libération de PA par les nanogels qui nous intéressent particulièrement.

Les premiers gels hydrophiles, précurseurs des nanogels, à usage biomédical ont été introduits par Wichterle *et al.*^[2] au début des années 1960. Depuis, beaucoup de projets et d'études ont permis de développer et d'étendre le potentiel des hydrogels mais aussi des nanogels comme nous le verrons au cours de ce chapitre.

I.1.1 Des hydrogels aux nanogels

Par définition, on considère que les hydrogels sont des polymères ou des copolymères hydrophiles organisés dans l'espace, qui ont la capacité d'absorber une grande quantité d'eau ou de fluide physiologique tout en maintenant leur structure interne. La structure des hydrogels est gérée par des interactions intermoléculaires chimiques ou physiques indispensables à la stabilité du système. Ces interactions empêchent la dissolution des chaînes de polymère en milieu aqueux.^[3]

La pénétration de l'eau dans les espaces libres entre les chaînes du polymère entraîne son gonflement. L'expansion volumétrique de l'hydrogel est contrôlée par la compatibilité du solvant avec le polymère, la différence de pression osmotique entre le solvant et le cœur de

l'objet, ainsi que l'élasticité de l'hydrogel. Le gonflement et donc la taille des hydrogels est modulé par deux facteurs principaux : la structure même du polymère (structure chimique, degré de réticulation ou densité de charge dans le cas d'un nanogel chargé) et les caractéristiques du solvant (pH, force ionique...).^[4]

L'affinité des hydrogels avec les solvants tels que l'eau est aussi influencée par la présence de groupements hydrophiles comme les alcools, les amine primaires et secondaires, ou les acides sulfoniques.^[5-7] La présence de ce type de groupements au sein de l'hydrogel influence fortement le degré d'hydratation de la structure comme l'ont décrit Flory *et al.*^[8-9] dans les années 1940 dans le cadre de polymères et de structures en réseaux.

D'un point de vue général, les hydrogels peuvent être classés selon différents critères incluant la nature des chaînes (neutres ou ioniques), les propriétés structurales et mécaniques du polymère, la composition chimique (homo ou copolymérisation), la structure physique du réseau (amorphe, semi-cristallin ou cristallin), la présence de liaisons hydrogène, la formation de structures supramoléculaires et hydrocolloïdales, et la réponse aux conditions physiologiques (pH, force ionique, température, potentiel redox).^[1] Les principaux polymères naturels et synthétiques utilisés seuls ou combinés sont présentés ci-dessous (Tableau I.1).

Polymères Naturels et Dérivés	
Polymères Anioniques	Acide hyaluronique, Alginate, Pectine, Carraghénane, Chondroïtine sulfate, Dextrane sulfate
Polymères Cationiques	Chitosane, Polylysine
Polymères Amphiphiles	Collagène, Carboxyméthylchitine, Fibrine
Polymères Neutres	Dextrane, Agarose, Pullulane
Polymères Synthétiques	
Polyesters	PLA, PCL, PHB
Autres Polymères	Polyacrylate, PEI, PEG

Tableau I.1: Présentation des principaux polymères formant des hydrogels

Il peut être intéressant d'utiliser un mélange entre des polymères synthétiques et des biopolymères. Les hydrogels d'origine naturelle, comme les biopolymères présentent l'avantage d'être non-toxiques, biocompatibles et de posséder de nombreuses propriétés biologiques d'intérêt. De ce fait, ce sont des candidats particulièrement intéressants pour réaliser des systèmes à visée biomédicale, comme pour l'encapsulation et la libération de principes actifs. Les structures parfaitement définies des polymères synthétiques utilisés dans les hydrogels, permettent de prévoir et de moduler de manière extrêmement précise les

cinétiques de dégradation ou les propriétés mécaniques, et par conséquent d'observer des interactions avec les différents partenaires biologiques parfaitement reproductibles. Les polymères synthétiques permettent également de conférer une certaine hydrophobie à des domaines du nanogel facilitant l'encapsulation des principes actifs, généralement hydrophobes.

Ainsi, le mélange de polymères synthétiques et naturels permet d'obtenir des effets de synergie et donc des propriétés complémentaires. Les propriétés physico-chimiques obtenues peuvent être orientées pour faciliter la formation de nanogels.

I.1.2 Nanogels et structure des polymères

Généralement, les nanogels sont considérés comme une structuration particulière des hydrogels. Ils correspondent à une forme dispersée en solution des nanogels. Ils peuvent être obtenus par auto-assemblage par agrégation de macromolécules, qui les composent, généralement des polymères.^[4] Cette agrégation intervient grâce à l'interaction de polymères hydrophiles capable d'interaction hydrophobe ou électrostatique et/ou la formation de liaisons hydrogènes les uns avec les autres. Les nanogels peuvent aussi être formés par microémulsion inverse (de type eau/huile) en présence de surfactant.^[10] Dans ce milieu en présence d'un surfactant, il est en effet possible de former des petites particules d'eau de taille facilement contrôlable. Les nanogels sont formés au sein de ces particules, puis réticulés afin de stabiliser leurs structures. Après élimination du surfactant ainsi que du solvant organique, les nanogels sont mis en solution dans l'eau. De manière analogue, dans des microémulsions normales (de type huile/eau) en présence de surfactant, il est possible de polymériser de monomères solubles en phase aqueuse. Les macromolécules polymérisées en suspension autour du solvant organique sont réticulées. Après élimination du solvant organique, les nanogels sont dispersés dans l'eau.^[11]

Les nanogels pour la vectorisation de PA doivent avoir une taille comprise entre 10 et 500 nm.^[12] Cette appellation a été donnée par Vinogradov *et al.*^[13] pour la première fois en 1999 pour décrire des particules de 80 nm de diamètre de Poly(éthylèneimine) (PEI) ponté par des poly(éthylèneglycol) (PEG). (Figure I.1).

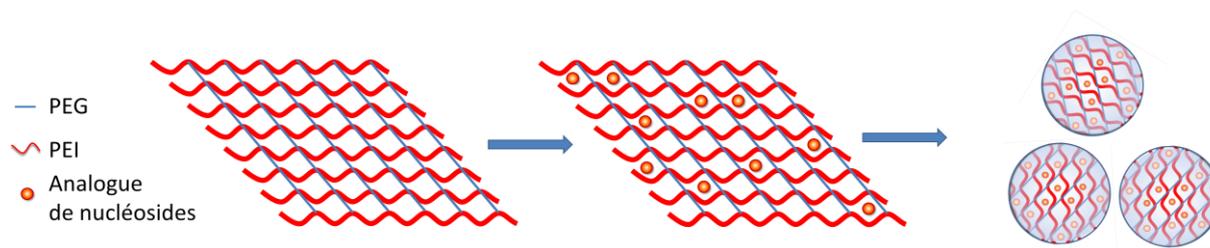


Figure I.1 : Formation de nanogel composé de PEI réticulé par des PEG encapsulant des anticancéreux

Ces particules furent étudiées pour le transport d'oligonucléotides dans des stratégies antisens, permettant d'inhiber spécifiquement l'expression de gènes. Depuis, des nanogels ont été obtenus à partir de larges gammes de polymères et de copolymères.

I.1.3 Encapsulation des principes actifs par les nanogels

L'une des principales limitations dans l'utilisation d'un PA provient de la faible biodisponibilité inhérente à des facteurs comme une mauvaise solubilité, la vitesse de dissolution, leur instabilité chimique, ou leur incapacité à franchir les barrières biologiques. De plus, certains agents thérapeutiques d'origine naturelle, par exemple, sont très instables dans les conditions physiologiques. C'est le cas des oligonucléotides détruits par les nucléases ou les peptides détruits par les protéases, naturellement présentes chez l'Homme. Piéger les principes actifs dans des nanogels peut permettre de répondre à ces différents inconvénients, en protégeant les principes actifs de la circulation générale vers la cible thérapeutique.

Les principes actifs peuvent être emprisonnés dans les nanogels suivant plusieurs principes. La première approche est d'encapsuler physiquement le principe actif dans le nanogel, comme l'encapsulation directe d'insuline dans des particules de cholestérol fonctionnalisées par du pullulane.^[14] De même, des nanogels d'acide hyaluronique réticulés par des ponts disulfure sont capable d'enfermer des ARN interférants.^[15]

La seconde approche utilise des principes actifs chargés qui peuvent interagir directement avec des polymères chargés de manière opposée. Ainsi des nanogels de Poly(β -aminoester)-g-PEG sont capables de créer des liaisons ioniques avec le *cis*-platine, et cela augmente l'encapsulation du principe actif (Figure I.2).^[16]

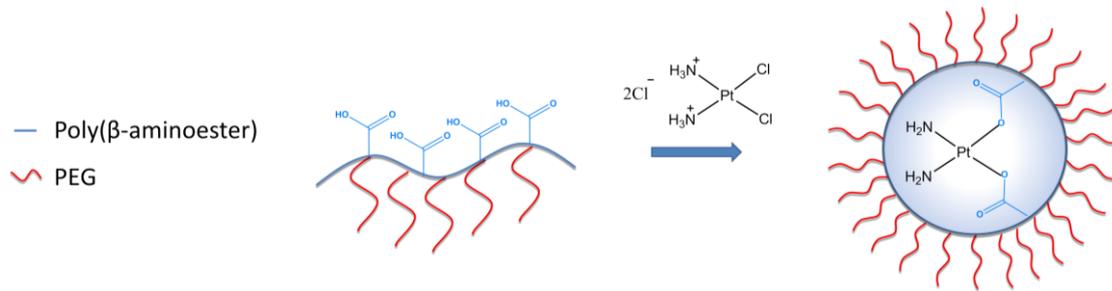


Figure I.2 : Interaction du *cis*-platine avec des nanogels composés de poly(β -aminoester)-*g*-PEG

Une approche particulièrement efficace pour augmenter de manière significative la capacité d'encapsulation des nanogels est d'avoir un système où l'assemblage de la particule est amorcé directement par le principe actif. Par exemple, l'ajout d'oligonucléotides dans une solution de PEG-*g*-PEI, permet d'initier la formation de particules formées de polyélectrolytes. Au cours du temps la neutralisation des charges du PEI par les oligonucléotides se traduit par une diminution de la taille des particules.^[13]

I.1.4 Nanogels : un outil de vectorisation pour les principes actifs

Les nanogels ont donc la capacité d'encapsuler des molécules bioactives. Ainsi des applications dans des domaines tels que l'ingénierie tissulaire, le diagnostic et la vectorisation de principes actifs sont envisagés. Cette dernière application, nous intéresse particulièrement dans le cadre de ce projet.

En effet, les dimensions des nanogels permettent d'envisager leur injection par voie intraveineuse. Contrairement à la voie orale ; ce mode d'admission permet d'éviter la première filtration hépatique, qui éliminerait une grande partie des nanoparticules. Les nanogels peuvent alors se disperser dans l'ensemble du corps. L'absorption, l'accumulation, ou la destruction éventuelle de ces nanogels dans ou à proximité directe des cibles thérapeutiques en font des outils de vectorisation de principes actifs efficaces.

I.1.4.1 De la circulation générale vers la cible

Après injection, les nanogels se dispersent dans l'ensemble du corps. La seconde étape est la libération contrôlée du PA.

Idéalement, les nanogels doivent être capables de libérer le principe actif au niveau de la cible thérapeutique. Pour cela, le nanogel doit pouvoir se déplacer dans la circulation générale

vers la cible thérapeutique, sans interagir avec les protéines, ni être reconnu par le système immunitaire et ni être phagocyté. C'est pourquoi, l'extérieur de la nanoparticule est constitué de composés hydrophiles inertes pour limiter les réactions immunitaires et les interactions non spécifiques avec les différentes protéines. Cela favorise la dispersion des nanogels dans l'organisme, augmente leur durée de vie et donc assure une bonne vectorisation de la molécule thérapeutique vers sa cible. L'accumulation passive des nanogels à proximité de certains tissus, essentiellement cancéreux, est améliorée. En effet, les tissus cancéreux ont une perméabilité et des capacités de rétention supérieures aux tissus sains (effet EPR : Enhanced Permeability and Retention Effect). Ceci est causé essentiellement par la forte vascularisation favorisant l'influx des nanogels, ainsi que la faible capacité d'élimination de ce type de tissus. Ces deux facteurs favorisent les dépôts locaux très importants. Cette faculté d'accumulation rend l'utilisation de nanogels particulièrement appropriée à la vectorisation d'anticancéreux.^[17-18]

Deux mécanismes de distribution existent. Le premier est la dispersion passive du nanogel dans l'organisme. Le second envisage la dispersion puis l'accumulation contrôlée du principe actif à proximité de la cible par reconnaissance ou adressage spécifique.

Pour obtenir un ciblage actif et une internalisation précise, les nanogels peuvent être recouverts par des marqueurs ou des récepteurs biologiques permettant la reconnaissance et l'internalisation du nanogel dans des cellules cibles.^[19] De tel nanogels intelligents permettent une précision accrue de la zone de délivrance du principe actif, ainsi qu'une diminution drastique des effets secondaires.

Sahoo *et al.*^[20] ont encapsulé du taxol, un anticancéreux, dans des nanoparticules de Poly(Acide Lactique-*co*-Glycolique) (PLGA) de 110 nm de diamètre formant naturellement un réseau stable et dont la surface est recouverte de transferrine. Cette protéine du sérum est un transporteur responsable de l'entrée du fer dans les cellules, après reconnaissance par des récepteurs spécifiques, elle est internalisée par endocytose. Les cellules cancéreuses surexpriment fortement ces récepteurs à transferrines. Par ce biais, les nanoparticules conjuguées à cette protéine sont capables de délivrer spécifiquement le taxol dans les cellules cancéreuses (Figure I.3).

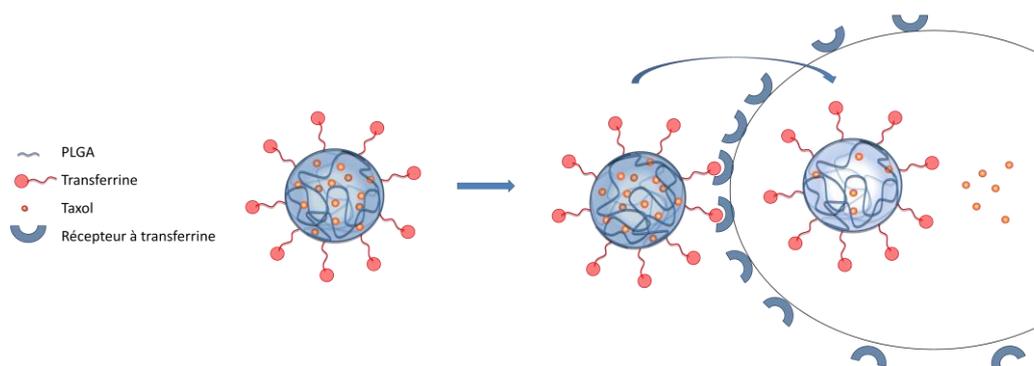


Figure I.3 : Interaction de nanogel de PLGA recouvert de transferrine avec des cellules cancéreuses

Des exemples similaires existent. La fonctionnalisation des particules par certains glycanes interagissant avec des protéines réceptrices spécifiques, les lectines, surexprimées par les cellules cancéreuses permet un adressage efficace.^[21] De la même manière, les cellules cancéreuses surexpriment aussi des récepteurs à l'acide folique, la fonctionnalisation de nanogels par de l'acide folique permet de sélectionner les cellules cancéreuses.^[22]

Une fois les nanoparticules au niveau de la cible thérapeutique, il faut que le PA soit libéré hors du nanogel, c'est l'étape de relargage.

I.1.4.2 Relargage contrôlé du principe actif dans l'espace

L'action bénéfique des molécules thérapeutiques peut être contrebalancée par des effets secondaires indésirables.^[23] Effectivement, les principes actifs agissent au niveau de la cible thérapeutique mais ils se dispersent aussi au sein de l'organisme, en ayant parfois des interactions non-spécifiques avec d'autres sites biologiques, générant des effets secondaires. Contrôler le transport et la libération du principe actif au niveau de sa cible permet d'augmenter les effets thérapeutiques et de réduire les effets secondaires. Par ce biais, le seuil thérapeutique est atteint avec des doses injectées nettement inférieures. C'est l'un des enjeux les plus importants de la vectorisation.

La libération du principe actif peut être déclenchée par l'interaction directe du nanogel au niveau de la cible. Par exemple, dans le cas de nanogel de PEG-co-PEI, Vinogradov *et al.*^[24] ont montré que l'interaction directe entre des PEI branché chargés positivement et la membrane cellulaire chargée négativement de cellules cancéreuses permet de libérer des principes actifs chargés négativement. Dans ce cas précis, ce sont des analogues de nucléosides 5'-triphosphates, utilisés comme anticancéreux qui sont libérés puis internalisés (Figure I.1).

Une seconde approche, plus répandue, est d'insérer des structures hydrolysables ou des liaisons qui peuvent être détruites dans le nanogel. Ces liaisons doivent être altérées en fonction des stimuli associés à la cible. La déstructuration du nanogel permet de faciliter le relargage des principes actifs au niveau de la cible (Figure I.4).

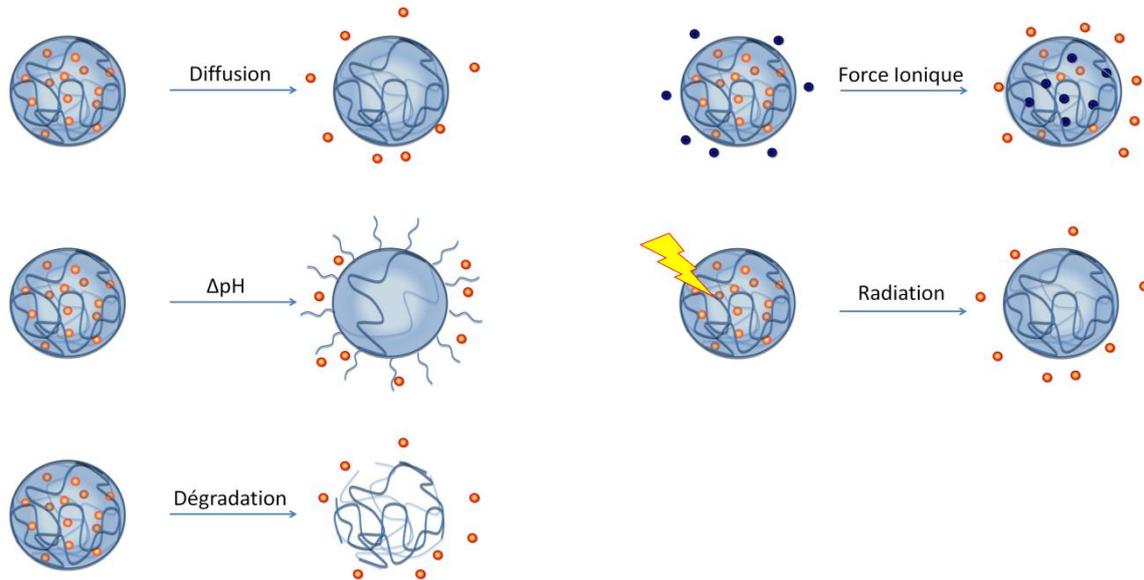


Figure I.4 : Contrôle de la libération de principes actifs des nanogels en fonction de différents stimuli

Fréchet *et al.*^[25] ont réalisé un nanogel dégradé à base de polyacrylamide réticulé par des groupements acétal sensibles aux acides pour la vectorisation d'acides nucléiques. Ces groupements sont plutôt stables à pH physiologique ($t_{1/2}=24\text{H}$) mais sont rapidement hydrolysés dans les milieux plus acides comme les endosomes ($t_{1/2}=5\text{min}$).

Matyjaszewski *et al.*^[26] ont utilisé un procédé similaire en insérant des ponts disulfure dans un nanogel biodégradable composé de poly(oligo(éthylèneoxyde)monométhylméthacrylate) (Poly(OEOMA)) de 240 nm de diamètre (Figure I.5). Ce nanogel contient de la doxorubicine (DOX), un anticancéreux. Ces groupements disulfure sont stables dans le milieu extracellulaire, mais sont réduits par un tripeptide présent naturellement dans le milieu intracellulaire : le glutathion (GSH). Cette approche permet un relargage sélectif entre les milieux intracellulaire (riche en GSH) et extracellulaire (pauvre en GSH). Des tests de vectorisation ont été réalisés à l'aide de ce système et ont montré que la libération était faible dans le milieu extracellulaire et que le nanogel se dégradait rapidement en milieux intracellulaire. La sélectivité liée à la présence de glutathion est encore augmentée dans le cas

des cellules cancéreuses. En effet, ces dernières présentent un taux de glutathion bien plus élevé que les cellules saines

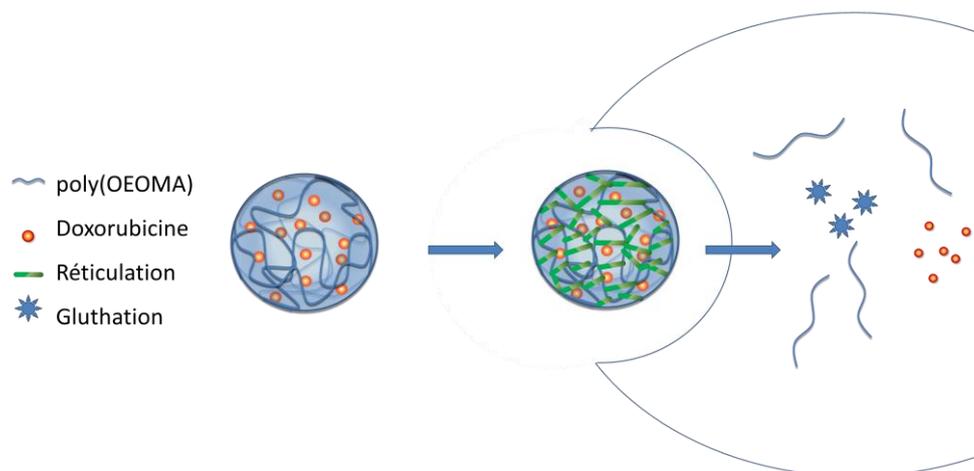


Figure I.5 : Libération contrôlée de DOX par des nanogels de poly(OEOMA) réticulé par des ponts disulfure

I.1.4.3 Libération contrôlée du principe actif dans le temps

Certains principes actifs utilisés dans le cadre de traitement nécessitent de faible dose au niveau de la cible, mais avec une concentration constante dans le temps. C'est le cas des neuroleptiques par exemple.^[27] L'utilisation de nanogels ayant un temps de demi-vie contrôlée dans l'organisme permet de libérer progressivement la molécule thérapeutique. Cette libération contrôlée dans le temps permet de diminuer le temps entre deux prises de médicament. Cette stratégie diminue le nombre de prises, permet de conserver un seuil thérapeutique constant sur une plus longue période et de diminuer l'élimination prématurée du principe actif.

I.1.5 Conclusion

Les nanogels sont une forme galénique particulièrement intéressante. Cette approche permet le contrôle de la libération du principe actif dans le temps et dans l'espace. Ce sont des paramètres décisifs pour diminuer les effets secondaires, diminuer la quantité de médicament admis et augmenter la biodisponibilité du médicament. Cependant, la mise en œuvre de stratégie de vectorisation par nanogel est encore difficile à mettre en œuvre, coûteuse, et le recul sur la dégradation, l'accumulation ou la dispersion des nanogels sur le long terme n'est pas encore suffisant. Une attention particulière doit donc être apportée au choix des matériaux employés pour garantir la biocompatibilité. C'est pourquoi beaucoup de biopolymères sont

actuellement testés pour former des nanogels biocompatibles, c'est le cas de la chitine et du chitosane.

I.2 Chitine et chitosane

La chitine est le second biopolymère le plus abondant dans la biomasse après la cellulose. Tout comme la cellulose pour les végétaux, la chitine possède un rôle structural important chez les arthropodes. En effet, la chitine est l'un des constituants majoritaires de la carapace des crustacés ainsi que de la cuticule des insectes. C'est un polymère composé de motifs de 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucose reliés entre eux par des liaisons osidiques $\beta(1-4)$ (Schéma I.1).^[28]

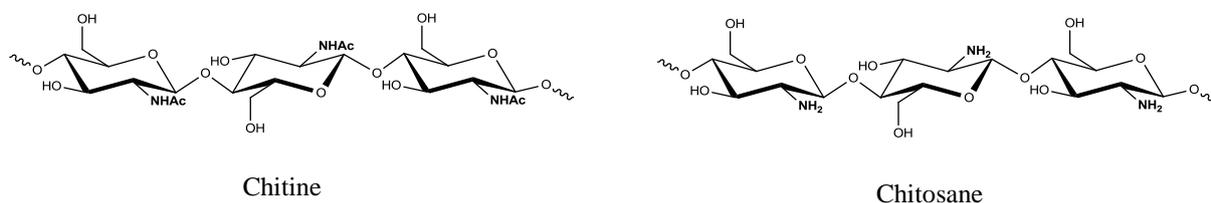


Schéma I.1 : Structure de la chitine et du chitosane

I.2.1 Généralités

La première extraction de la chitine a été réalisée à partir de la paroi cellulaire de certains champignons microscopiques en 1811 par un chimiste français : Henri Braconnot qui l'a nommée fungina.^[29] En 1823, Auguste Odier isole le même type de résidu insoluble dans l'eau et le baptise chitine.^[30] En 1859, une chitine modifiée soluble en phase aqueuse est obtenue par traitement à la potasse concentrée à haute température par Charles Rouget.^[31] En 1894, ce produit reçoit le nom encore employé aujourd'hui de chitosane par Félix Hoppe-Seyler.^[32]

De nos jours, le chitosane est facilement obtenu à partir de carapaces de crabe et de crevette par désacétylation des fonctions amine. Cette réaction est rarement totale, c'est pourquoi le chitosane est parfois considéré comme un copolymère composé de motifs glucosamine (majoritaires) et de motifs *N*-acétyl-glucosamine (minoritaires).

Généralement, en terme de nomenclature, on parle de chitine quand plus de la moitié des motifs sont des *N*-acétyl-glucosamines et on définit le chitosane comme étant l'homologue désacétylé de la chitine. A cause de leurs origines naturelles, chitine et chitosane ne peuvent pas être définis par une structure unique mais plutôt comme une famille de polymères

présentant une grande variabilité dans leurs propriétés chimiques, physico-chimiques et biologiques.^[33]

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes cationiques d'origine naturelle, du fait de ses amine libres protonables (pK_a apparent de l'ordre de 6,3 à 6,5).^[34-35] Cela se traduit par une différence de solubilité. La chitine est insoluble dans l'eau et dans la majorité des solvants organiques tandis que le chitosane est soluble dans des solutions aqueuses faiblement acides telles que l'acide acétique ou l'acide formique. Cette solubilité s'explique par la protonation des amine libres des résidus glucosamine augmentant l'affinité pour les solvants polaires.^[35]

Les voies d'obtention de la chitine et du chitosane permettent d'obtenir une large gamme de polymères et d'oligomères de masse molaire et de degré d'acétylation variable. Cela se traduit par d'importantes différences dans les propriétés chimiques, physico-chimiques ou biologiques

I.2.2 Obtention de la chitine et du chitosane

Généralement la chitine est isolée à partir d'organismes marins, essentiellement les crustacés. Sous sa forme brute, la chitine peut présenter différents polymorphismes (Figure I.6). La forme la plus courante et la plus étudiée est la forme α mais il existe aussi une forme β et une forme γ .

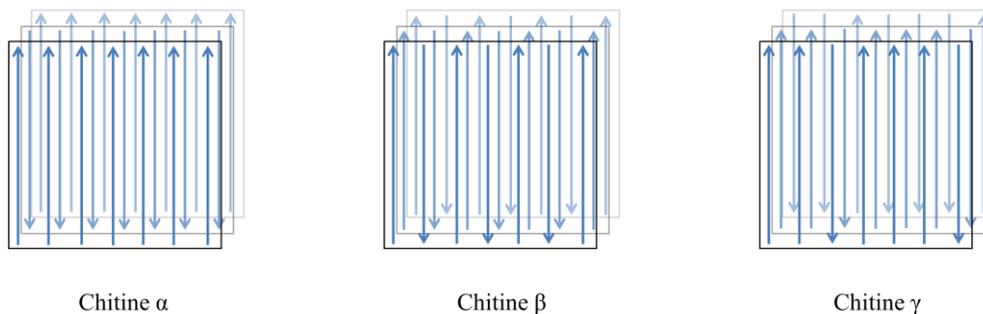


Figure I.6 : Organisations et morphologies de la chitine chez les invertébrés

La chitine α est répandue chez les crustacés alors que la forme β est produite par les calmars. La chitine α est organisée en feuillets et en couches dont les chaînes de polysaccharide sont orientées dans la même direction et dans le même sens. La chitine β est aussi caractérisée par une direction identique mais par une alternance du sens des chaînes. Les feuillets de forme β sont parallèles les uns avec les autres, alors qu'ils sont antiparallèles dans la forme α . La forme γ semble être un mélange des organisations α et β . Très peu d'études se

sont intéressées à cette dernière. Mais il semble qu'il s'agirait d'un mélange de forme α et β plus qu'une forme à part entière.^[36-37]

Les filières agroalimentaires produisent beaucoup de déchets lors du conditionnement des crustacés. Ainsi les carapaces sont valorisées *via* des processus d'extraction et de purification afin d'obtenir de la chitine.

I.2.2.1 Extraction de la chitine

Quelle que soit la morphologie ou la source, la chitine est toujours associée à d'autres molécules dans la carapace des crustacés. Celle-ci est composée de 30 à 40 % de protéines, 30 à 50 % de carbonate de calcium et de 20 à 30 % de chitine. Elle contient également des pigments comme des caroténoïdes. Ces proportions sont variables en fonction de l'espèce ainsi que de la saison.

La chitine est extraite de la carapace par une série de traitement chimique : La première est un traitement en condition acide forte pour dissoudre le carbonate de calcium, ensuite une extraction en milieu basique permet d'éliminer les protéines (Figure I.7). Une étape de dépigmentation est réalisée pour obtenir un produit décoloré. Ce produit brut peut être ensuite utilisé tel quel, dépolymérisé pour obtenir des oligomères de plus faible masse ou encore désacétylé pour obtenir du chitosane.^[38]

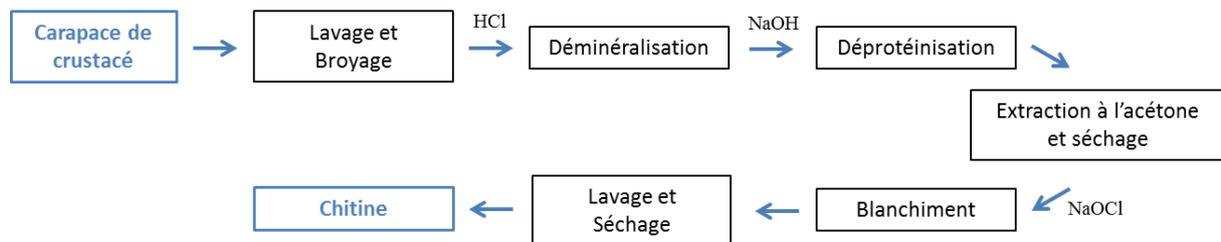


Figure I.7: Etapes d'extraction de la chitine de la carapace d'insecte

I.2.2.2 Désacétylation chimique : de la chitine au chitosane

De manière générale, deux méthodes sont utilisées pour préparer du chitosane à partir de la chitine : la désacétylation de la chitine brute en phase hétérogène et la désacétylation de la chitine prétraitée en phase homogène sous pression réduite et en milieu aqueux (Figure I.8).

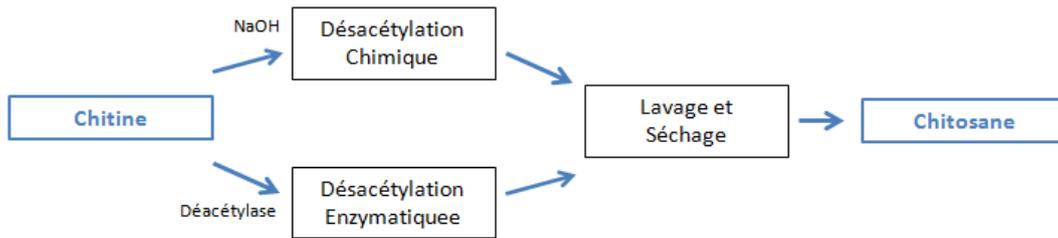


Figure I.8: Etapes de désacétylation de la chitine

Le chitosane est obtenu par désacétylation des groupements acétamide de la chitine. Classiquement, cette opération est réalisée par hydrolyse en milieu basique à haute température (100°C) pour obtenir des degrés d'acétylation inférieurs à 30 %, on parle alors de chitosane. Ces conditions sont variables en fonction du degré d'acétylation désiré, des prétraitements et de l'origine de la chitine. La taille des particules ainsi que la densité de la chitine influence aussi la cinétique et le résultat final de la désacétylation.^[36]

La désacétylation en phase hétérogène, utilisée majoritairement dans l'industrie, modifie uniquement les zones amorphes plus accessibles de la chitine, et laisse intactes les régions cristallines de la chitine. Elle est caractérisée par des conditions drastiques : des solutions alcalines très concentrées (hydroxyde de potassium ou de sodium à 30 à 50 %, p/v), des températures élevées (100°C) et des cinétiques lentes (variable de 1 à 80 jours).^[36]

Alternativement, la désacétylation en phase homogène de chitine de plus faible DP prétraîtée, permet de se placer dans des conditions plus modérées correspondant à des solutions basiques moins concentrées (13 % p/v) et à des températures moins élevées (25 à 40°C) sur des cinétiques plus courtes (12 à 24 H).^[36]

En pratique, dans les deux cas, le degré d'acétylation après un seul traitement est de l'ordre de 15 à 25 %.^[36]

Dans le vivant, de nombreux organismes utilisent des enzymes capables de désacétyler la chitine. Ces chitine-désacétylases ont été isolées chez de nombreux organismes comme des champignons tels que *Mucor rouxii*,^[39] *Aspergillus nidulans*,^[40] *Colletotrichum lindemuthianum*,^[41] et *Azorhizobium caulinodans*.^[42] Cette approche de désacétylation par voie enzymatique est cependant fortement limitée par l'insolubilité de la chitine dans l'eau.

I.2.3 Obtention d'oligomères de chitine et chitosane

I.2.3.1 Dépolymérisation de la chitine

Les polymères de hautes masses molaires de chitine et de chitosane issus des carapaces des crustacés sont bon marché et facilement accessibles. Pour obtenir des oligomères, deux stratégies de dépolymérisation sont adoptées: la dépolymérisation chimique et enzymatique.

La liaison glycosidique de la chitine ou du chitosane est sensible à l'hydrolyse en présence d'agents hydrolysant comme par exemple les acides, ce qui permet de réaliser leur hydrolyse de manière efficace, et ainsi de réduire la masse molaire des polymères.

La protonation de l'oxygène impliqué dans la liaison glycosidique permet l'hydrolyse de la liaison entre le carbone anomérique et l'oxygène exocyclique. Il y a alors apparition d'un sucre non-réducteur et d'un intermédiaire cationique oxocarbénium cyclique, qui s'hydrate ensuite pour donner le résidu réducteur (Schéma I.2). Le chitosane étant soluble en milieu acide, cette réaction se déroule en phase homogène tandis que dans le cas de la chitine, la réaction est en phase hétérogène.

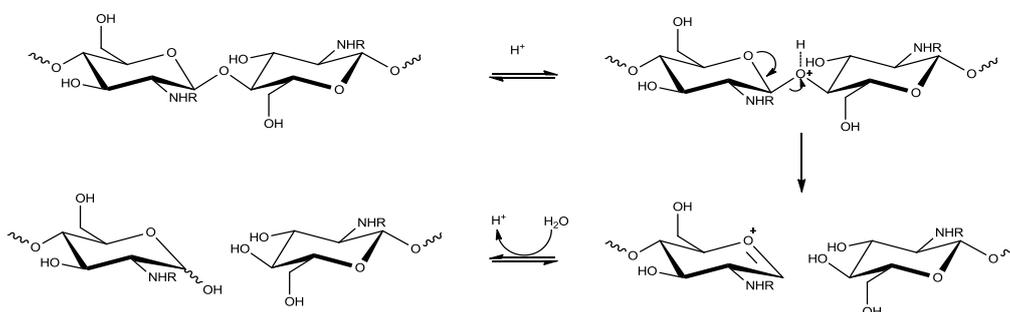


Schéma I.2: Hydrolyse de la chitine et du chitosane en milieu acide^[43]

Historiquement, la première hydrolyse chimique de ce type a été décrite par S. Horowitz *et al.*^[44] en 1957. Dans cette étude les auteurs ont montré que l'hydrolyse du chitosane dans l'acide chlorhydrique 4 M est proportionnelle au temps de réaction. La dégradation se fait de manière statistique pour tendre vers des faibles masses molaires et finalement aboutir à une hydrolyse totale (obtention de glucosamine). Domard *et al.*^[45] ont montré que la maîtrise du temps, de la température, de la concentration en acide, permet un contrôle relatif de la taille des oligomères obtenus.

Cette voie de dépolymérisation par action de l'acide chlorhydrique est facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. Cependant, les rendements sont faibles et les mélanges présentent une

dispersité importante. Ceci s'explique par les conditions dures qui peuvent altérer le cycle glycosidique des résidus glucosamine ou *N*-acétyl-glucosamine rendant la purification particulièrement délicate.

Pour pallier ces inconvénients, d'autres acides ont été testés comme les acides phosphorique,^[46] trichloracétique,^[47] ou formique.^[48]

La dépolymérisation de la chitine et du chitosane a également été effectuée par acétolyse. De meilleurs rendements ainsi qu'une meilleure reproductibilité des essais comparés à l'hydrolyse acide sont observés. Inaba *et al.*^[49] ont clivé la liaison glycosidique de la chitine par action conjointe d'anhydride acétique et d'acide sulfurique pour obtenir des oligosaccharides de chitine qui sont ensuite *O*-désacétylés en présence de méthanolate de sodium. Finalement des oligomères de chitines de faible DP sont obtenus (DP= 4, 5 et 6).

Il existe également des méthodes plus difficiles à mettre en œuvre mais présentant un meilleur contrôle. Cependant la difficulté de purification ou le nombre d'étape rend difficile leur application à plus grande échelles, c'est le cas de la désamination nitreuse^[50] ainsi que de la fluorohydrolyse.^[51-52]

L'approche enzymatique est une autre technique pour hydrolyser la chitine et le chitosane. Les hydrolases sont des enzymes capables d'hydrolyser les liaisons glycosidiques et leurs activités varient en fonction de la famille d'hydrolase utilisée ainsi que de la nature des substrats. Ainsi la nature des résidus de part et d'autre de la liaison glycosidique, définit quelle enzyme sera capable de cliver la liaison. Les liaisons glycosidiques des chitines et des chitosanes peuvent être de quatre types (Tableau I.2).

Résidu réducteur	Résidu non-réducteur	Type de liaison ^a
<i>N</i> -Acétylglucosamine	<i>N</i> -Acétylglucosamine	A-A
<i>N</i> -Acétylglucosamine	Glucosamine	A-D
Glucosamine	<i>N</i> -Acétylglucosamine	D-A
Glucosamine	Glucosamine	D-D

Tableau I.2 : Nature des liaisons glycosidiques de la chitine et du chitosane

a. Les résidus *N*-Acétylglucosamine et/ou Glucosamine au sein de la liaison glycosidique sont notés respectivement A et D.

En fonction de leur spécificité, les enzymes n'hydrolyseront qu'un type de liaison. Par exemple, les chitinases hydrolysent préférentiellement les liaisons de type A-A alors que les chitosanases hydrolysent plutôt les liaisons de type D-D.

Les chitinases hydrolysent de manière privilégiée les liaisons A-A sur les oligomères à haut degré d'acétylation. Les chitinases sont présentes naturellement chez la bactérie, les insectes, les champignons et les plantes, elles sont rares chez la plupart des mammifères sauf les bovins et les ovins. Les chitinases de bactéries et de champignons sont les plus couramment utilisées et permettent de dégrader la chitine en dimères, trimères ou en oligomères de faibles masses molaires. Ensuite, pour diminuer encore les masses molaires, la β -N-acétyl-glucosaminidase permet de libérer des unités N-acétyl-glucosamines.^[53] Les chitosanases hydrolysent les liaisons glycosidiques de type D-D à faible taux d'acétylation. Tout comme les chitinases, on la retrouve chez les bactéries, les champignons et les plantes.^[54] De même que les chitinases, l'activité des chitosanases est modulée par le taux d'acétylation du substrat dégradé.

On distingue généralement deux familles de chitinases et de chitosanases : les *endo* et les *exo*. Les *exo*-chitinases et les *exo*-chitosanases peuvent intervenir par les extrémités de la chaîne de chitine et de chitosane, ces enzymes libèrent généralement un monomère ou un dimère. Si l'hydrolyse de l'enzyme a lieu directement dans la chaîne, on parle alors d'*endo*-chitinases d'*endo*-chitosanase. On obtient alors des oligomères de faible masse molaire.

L'utilisation de ces enzymes est limitée à l'échelle industrielle par le fort coût de production des chitinases et chitosanases purifiées. Parfois d'autres enzymes moins chères sont utilisées, et détournée de leur fonction première comme des glycanases, des protéases ou des lipases, mais on considère que ces préparations sont contaminées par d'autres enzymes ayant une activité chitinase ou chitosanase.^[55] Les lysozymes se démarquent par leur facilité d'accès et par la variabilité de leur activité essentiellement modulé par leurs origines.^[56]

Dans le cadre de ce projet, les oligomères de chitosane commerciaux sont issus de la dépolymérisation enzymatique de chitosane purifié en continu par ultrafiltration. Cette technique a été mise au point par Kim *et al.*^[57] puis reprise à l'échelle industrielle par la société coréenne Kittolife qui le commercialise sous le nom de s-FACOS.

I.2.3.2 Obtention par glycosylation

L'approche de dépolymérisation chimique ou enzymatique, pour obtenir des oligosaccharides de chitine est largement utilisée car facile à mettre en place à une échelle industrielle. Cependant les produits issus de cette hydrolyse sont des mélanges de produits caractérisés par une dispersité importante des masses molaires finales et une microstructure variable. L'approche « bottom-up », permet d'obtenir des chitooligosaccharides *via* des briques moléculaires qui sont assemblées, s'opposant à la dépolymérisation qui utilise des chaînes existantes et qui les dégradent pour obtenir des oligomères.

L'utilisation d'un procédé de synthèse chimique pour condenser de manière contrôlée des résidus *N*-acétyl-glucosamines et glucosamines est longue et difficile. En effet, les étapes de protection, déprotection, activation, glycosylation et purification sont fastidieuses. Les faibles rendements obtenus limitent la production en termes d'échelle ainsi que la taille des oligomères qui ne dépassent jamais quelques unités.

Il existe en réalité peu d'exemple de synthèse chimique d'oligomères de chitine ou de chitosane. Kuyama *et al.*^[58] ont réalisé la synthèse totale d'un dodécamère de chitosane (DA=0%) à partir de monomère de glucosamine dont l'amine est protégée par un groupement phtalimide. De manière similaire, Aly *et al.*^[59] ont décrit une méthode pour synthétiser des tétramères et des hexamères, à partir de résidus glucosamine ayant un groupement amine protégé par groupement diméthylmaléoyl. Les oligomères de chitines sont obtenus par déprotection, puis acétylation des amine. L'équipe de Trombotto est arrivée à produire les quatre dimères possible contenant des résidus *N*-acétylglucosamine et/ou glucosamine via une synthèse multi-étape où les amine sont protégées par un *N*-trichloroacétyl et un *N*-benzyloxycarbonyl et les rendement globaux sont compris entre 40 et 60%.^[60]

La synthèse d'oligomères de chitine ou chitosane par voie chimioenzymatique permet de produire des structures avec un degré de polymérisation et d'acétylation contrôlés et une bonne maîtrise de la répartition des résidus *N*-acétylés et *N*-désacétylés. De plus cette stratégie évite d'avoir recours à de fastidieuses étapes de protection et de déprotection.

Les enzymes généralement utilisées sont des chitinases sauvages. Lors de l'hydrolyse de chitine ou de chitosane par des hydrolases, un intermédiaire de plus haute énergie de type oxazolinium se forme. L'enzyme effectue alors une polyaddition du résidu *N*-acétylglucosamine ou glucosamine par ouverture du cycle du monomère oxazolinium. C'est donc

un moyen efficace de réaliser des glycosylations.^[61] De plus, en utilisant des dimères ou des trimères sous forme oxazoline en position réductrice, il est facile de tendre vers des masses molaires élevées, avec un degré d'acétylation et une répartition des résidus acétylés contrôlés.^[62]

Cependant, le principal inconvénient de l'approche chimio-enzymatique, est que le produit de glycosylation est aussi un substrat pour l'enzyme. Ce qui a pour conséquence une hydrolyse des oligomères formés, et une diminution de la taille et du rendement. Pour résoudre ce problème, des enzymes mutantes sont utilisées. En modifiant le site catalytique des chitinases Michinari *et al.*^[62] ont réussi à diminuer fortement le caractère hydrolytique en appliquant le concept de glycosynthase décrit par Withers *et al.*^[63] Cependant, Cottaz *et al.*^[64] ont repris ce concept et démontré ses limitations.

L'usine cellulaire est une technologie qui s'oppose, comme la synthèse chimio-enzymatique, à la stratégie classique de dépolymérisation. Cette approche biotechnologique, permet d'obtenir un oligosaccharide unique grâce à la culture de bactéries recombinantes. Une connaissance parfaite du métabolisme des différents microorganismes permet de sélectionner des gènes, de contrôler leurs niveaux d'expression en les insérant dans des bactéries facilement transformables. Grâce à cela, le métabolisme de la bactérie est orienté vers la production d'un produit. Le contrôle du temps de culture est primordial pour obtenir l'oligomère désiré.^[42]

Dans le cadre, de ce travail, nous avons utilisé le tétra- $N^I, N^{II}, N^{III}, N^{IV}$ -acétyl-chitopentaose (CO-V(N)) qui a été obtenu par cette approche biotechnologique développée au laboratoire par Samain *et al.*^[42] (Schéma I.3).

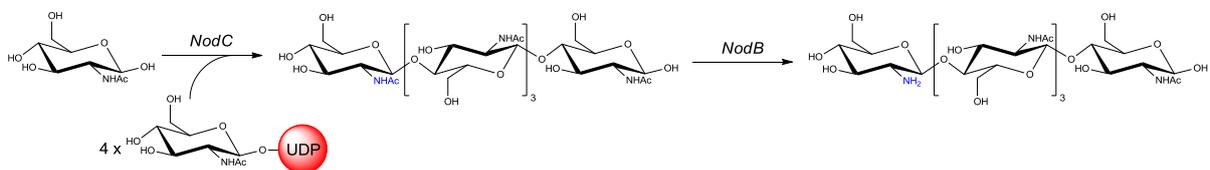


Schéma I.3 : Biosynthèse du CO-V(N) par glycosylation chez *E. coli*

Cet oligomère de chitine est obtenu *via* une culture cellulaire haute densité d'*Escherichia coli*. Ces bactéries recombinantes surexpriment en particulier deux gènes : *nodB* et *nodC*. Le gène *nodC* code pour une chitooligosaccharide synthase capable de polymériser des donneurs activés Uridine-diphosphate-*N*-acétyl-glucosamine (UDP-GlcNAc) jusqu'à obtenir majoritairement du chitopentaose tandis que *nodB* code pour une chitooligosaccharide

désacetylase connue pour désacétyler uniquement le résidu *N*-acétyl-glucosamine à l'extrémité non réductrice du pentamère. L'association de ces enzymes permet de produire une molécule unique de tétra-*N,N^{II},N^{III},N^{IV}*-acétyl-chitopentaose (CO-V(*N*)) avec un rendement de culture de l'ordre de 2,5 g.L⁻¹.

Cet oligomère a été initialement utilisé comme précurseur dans la synthèse de facteur de nodulation. De structure parfaitement connue, le CO-V(*N*) facilite la mise au point des conditions de synthèse et la caractérisation, moins délicate que dans le cadre de l'utilisation d'un mélange d'oligomères. Le CO-V(*N*) est développé au CERMAV à l'échelle du Laboratoire ce qui le rend accessible qu'en petite quantité. Pour cela, nous utiliserons le CO-V(*N*) comme un modèle permettant la mise en place des conditions de fonctionnalisation et facilitant la caractérisation des produits de synthèse.

La préparation des oligomères de chitine et chitosane par dépolymérisation ou glycosylation chimique ou enzymatique, permet d'avoir accès à une large gamme de structures relativement homogènes. L'exploration des différentes interactions qu'ils ont avec le vivant, a mis en évidence une bonne biocompatibilité ainsi que des activités biologiques variées.

I.2.3.3 Biocompatibilité et biodégradabilité

La chitine et le chitosane sont absents du métabolisme des mammifères mais peuvent être dégradés *in vivo* par l'action combinée de plusieurs hydrolases non-spécifiques telles que le lysozyme, la papaïne ou la pepsine. La dégradation entraîne la libération d'oligosaccharides de longueurs variables qui peuvent être incorporés dans les glycosaminoglycanes, dans les glycoprotéines selon différentes voies métaboliques, ou alors simplement excrétés.^[65-67]

La chitine et le chitosane présentent une bonne biocompatibilité mais leurs propriétés sont modulées par leurs origines, leurs méthodes de préparation et surtout par leurs degrés d'acétylation et leurs degrés de polymérisation.

Le chitosane montre une faible toxicité, similaire à celle du glucose. Une étude permettant d'évaluer la toxicité d'une exposition par voie orale aux chitoooligosaccharides a conclu que la dose létale (DL₅₀) chez les souris était supérieure à 10g/kg/jour.^[68] Le chitosane présente une meilleure cytocompatibilité *in vitro* que la chitine vis-à-vis de nombreux types de cellules (cellules cardiaques, endothéliales, épithéliales, fibroblastes). Cette biocompatibilité semble être reliée au degré d'acétylation des échantillons de chitosane testés. En effet dans les

conditions physiologiques (pH=7,4), la protonation des amine augmentent la charge cationique du glycopolymère (pKa=6,3-6,5), et ainsi l'interaction du chitosane avec les cellules chargées négativement augmentent aussi.^[69]

I.2.3.4 Bioactivités

Le monde de la santé et de la cosmétique s'intéresse de plus en plus aux dérivés de chitine et de chitosane en raison de leur origine naturelle, leur biocompatibilité, leur biodégradabilité, et de leur faible toxicité et surtout de leurs activités biologiques. Les propriétés biologiques les plus remarquables, sont les activités antitumorales et antimicrobiennes, les effets analgésiants et hémostatiques et les propriétés d'adhésion avec les muqueuses et les cellules.

I.2.3.4.a Activité antitumorale

Le chitosane a été décrit comme étant un inhibiteur de la croissance des cellules tumorales, grâce à un effet immunostimulant important. Cependant ces propriétés sont controversées.

Jeon et Kim^[70] ont montré que le chitosane présentait des propriétés antitumorales en condition *in vivo* et *in vitro*. Tsukada *et al.*^[71] ont utilisé des souris ayant assimilé par voie orale un chitosane de faibles masses molaires. Les rongeurs présentaient alors une résistance accrue vis-à-vis de cellules de foie cancéreuses de type Lewis. Le mécanisme hypothétique d'action consisterait en un effet immunostimulant important *via* la stimulation directe des lymphocytes T. Cela augmenterait l'immunosistance de l'hôte de manière non-spécifique aux cellules cancéreuses. Quant aux oligomères de plus hautes masses molaires les effets sont semblables, mais *via* un mécanisme différent : ils stimuleraient la production de lymphokines qui activent ensuite les lymphocytes .

Ueno *et al.*^[72] ont étudié les effets du chitosane sur la croissance et la formation de métastase. L'activation des macrophages par le chitosane semble diminuer le phénomène d'angiogénèse limitant la prolifération et l'invasion des tissus sains par les cellules cancéreuses.

I.2.3.4.b Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de la chitine et du chitosane, contre différents groupes de microorganismes comme les bactéries, les levures et les champignons, a largement été exploitée. Plusieurs mécanismes synergiques sont suggérés. Le premier émet l'hypothèse que l'interaction entre la membrane chargée négativement à la surface des cellules et le chitosane,

permet la formation d'une couche imperméable. Cela semble rendre impossible le passage de nutriment et de soluté au niveau de la membrane de la bactérie. Des études basées sur une observation au microscope électronique confirment que le site de fixation du chitosane est bien l'extérieur de la membrane des bactéries gram (-). L'effet d'imperméabilisation augmente avec la masse molaire du chitosane, ainsi qu'avec la diminution de son degré d'acétylation.^[73]

Un second mécanisme est à considérer : l'inhibition de la synthèse de protéine et d'ARN. En effet, l'imperméabilisation de la membrane extérieure des cellules n'est pas la seule modification de perméabilité observée. Le chitosane augmente la perméabilité de la membrane nucléaire. Liu *et al.*^[74] ont montré que des oligomères de chitosane de faibles masses molaires (5000-8000 g.mol⁻¹) présentent un effet antimicrobien important contrairement à des oligomères de plus hautes masses molaires. Dans ce cas, la masse molaire semble être le facteur majeur influençant l'activité antibactérienne du chitosane.

Une autre action du chitosane serait de chélater les métaux, les ions ainsi que certains nutriments indispensables. En les rendant indisponibles pour les microorganismes, les chitosanes inhiberaient fortement la croissance cellulaire.^[75]

Fang *et al.*^[76] décrivent que l'action antimicrobienne du chitosane sur des filaments de champignon est causée par l'atteinte directe et le dérèglement de la membrane plasmique des champignons.

I.2.3.4.c Propriétés analgésiques

Différents auteurs ont décrit que la chitine et le chitosane possédaient des effets analgésiques. Okamoto *et al.*^[77] ont étudié cette propriété dans le cas d'une douleur causée par l'injection intrapéritonéale d'acide acétique et ont proposé le mécanisme d'action suivant : Les zones inflammatoires sont caractérisées par un pH plus bas que le pH physiologique et les biopolymères ont la capacité d'absorber les protons libérés dans la zone inflammatoire. L'efficacité est importante quand les oligomères tendent vers des chitosanes de très faible degré d'acétylation.

Les dérivés de la chitine sont capables eux aussi de réduire la réaction inflammatoire mais de manière moindre que le chitosane. La quantité nécessaire est bien plus importante que dans le cas du chitosane, mais est moindre que l'estimation faite en cas d'action uniquement sur le pH de la zone enflammée. Cette observation met en évidence un second mécanisme. En effet,

il semblerait que la chitine possède la capacité d'absorber la bradykinine, un des médiateurs de la cascade métabolique responsable de la réaction inflammatoire et donc de la douleur.^[77]

I.2.3.4.d Propriétés hémostatiques

Il a été décrit que les chitosanes présentent *in vitro* une activité anticoagulante. Cette caractéristique semble provenir de l'interaction des charges positives du chitosane avec les membranes chargées négativement des érythrocytes. De manière logique, il a été aussi rapporté que le chitosane avait une plus grande efficacité que la chitine. La masse molaire du chitosane module aussi l'interaction et l'agglutination avec les globules rouges. En effet dans une étude, du chitosane solide et en solution, possédant des masses de 2000 à 400000 g.mol⁻¹ et un degré d'acétylation de l'ordre de 10% à 30% a été testé.^[33] Il a été démontré que le chitosane en solution (faible masse) et que le chitosane solide (haute masse) n'agissent pas de la même manière. En mélangeant des cellules sanguines avec le chitosane soluble, il y a agglutination et déformation des érythrocytes. Cet effet est d'autant plus important que le degré d'acétylation est faible, et il semblerait que la masse molaire du chitosane ait peu d'influence, tant que le polysaccharide reste soluble. Un second mode d'action du chitosane à l'état solide et à haut degré d'acétylation a été recensé. En effet, il lie alors plus spécifiquement les plaquettes et possède un effet anticoagulant plus important que le chitosane en solution.^[70, 78-79]

I.2.3.4.e Mucoadhésion

Plusieurs facteurs influencent la capacité de la chitine et du chitosane à interagir avec les muqueuses comme la nature physiologique de la zone à traiter ainsi que la nature physicochimique des polysaccharides. Les muqueuses sont composées de glycoprotéines possédant un fort pouvoir d'hydratation appelées mucines. Ces glycoprotéines sont très riches en charge négative dues à la présence importante en résidu d'acide sialique. Par exemple, dans le système digestif et plus précisément dans l'estomac, le chitosane est chargé positivement à cause de la nature acide du milieu, on peut donc observer une interaction électrostatique entre le chitosane et la paroi stomacale.^[33]

Plus généralement, l'interaction entre les mucines et le chitosane dépend de trois facteurs principaux : la nature polyanionique de la muqueuse reliée à la quantité d'acide sialique, la taille de l'oligomère de chitosane et son taux d'acétylation. Il a été montré que lorsque la masse molaire des oligosaccharides augmente, la pénétration de ceux-ci dans les muqueuses est plus importante et rend l'interaction avec les mucines plus forte. De même, la diminution

du degré d'acétylation, en augmentant les charges positives du chitosane présente le même effet.^[80-81]

I.2.3.4.f Ingénierie tissulaire

Depuis quelques années, l'industrie biomédicale cherche des matrices cellulaires en trois dimensions favorables au développement cellulaire. L'ensemble des propriétés citées précédemment dont l'activité antimicrobienne, la mucoadhésion, la faible toxicité, la biodégradabilité et surtout la biocompatibilité semblent promouvoir l'utilisation du chitosane dans le cadre de la régénération tissulaire.

Tigli *et al.*^[66] ont étudié l'influence du degré d'acétylation sur les propriétés structurales et biologiques de chitosane solide, obtenu par lyophilisation, utilisé comme support pour la culture cellulaire et l'ingénierie tissulaire. Il a été observé que du chitosane présentant un faible degré d'acétylation (inférieur de 15% à 25%) avait une structure et des pores de section hexagonale et de taille régulière. La régularité de la connexion des pores est plus faible pour du chitosane à très faible degré d'acétylation (inférieure à 15%). Il est connu que la microstructure des pores (taille des pores, forme et distribution) influence la prolifération et l'intrusion cellulaire.^[82] Des études de gonflement n'ont pas prouvé de relation entre la capacité à gonfler et le degré d'acétylation. D'autres auteurs ont montré que les faibles degrés d'acétylation favorisent l'adhésion cellulaire. La viabilité de fibroblastes sur des films de chitosane avec différents degrés d'acétylation a été évaluée, et il en découle que le nombre de fibroblaste augmente de manière importante avec la diminution du degré d'acétylation, surtout quand celui-ci est inférieur à 15%.

I.2.4 Conclusion

L'ensemble de ces caractéristiques physicochimiques et biologiques font de la chitine et du chitosane des candidats pour des applications biomédicales. Dans le cadre de ce projet, le choix de cette série de saccharide se justifie par la solubilité en phase aqueuse du chitosane ainsi que les différentes propriétés biologiques. Les chitooligosaccharides formeront le pôle hydrophile de notre système amphiphile pour permettre la formation d'hydrogels et de nanogels.

Le tétra- N,N^{II},N^{III},N^{IV} -acétyl-chitopentaose (CO-V(N)) modèle facilitera la mise au point et la caractérisation des premières molécules. Cependant, la faible quantité d'oligomères à notre disposition (10 g) ainsi que son coût de production ne nous permet pas d'envisager une

utilisation à plus grande échelle. Cette pourquoi, après la mise au point des conditions de synthèse, nous les transposerons ensuite à un mélange d'oligomères de chitosane d'origine commercial : le s-FACOS.^[57]

Une démarche similaire a été appliquée au choix du bloc hydrophobe afin de respecter le critère de biocompatibilité de notre système. Notre intérêt s'est particulièrement porté sur un polyester : la poly(ϵ -caprolactone)

I.3 La Poly(ϵ -caprolactone)

Au cours des dernières années, les polyesters aliphatiques ont fait l'objet d'un intérêt croissant du fait de leurs propriétés de biodégradabilité et de biocompatibilité. Ces deux caractéristiques justifient l'intérêt grandissant porté à ce type de polymère, et la recherche de nouvelles applications dans différents secteurs tels que le domaine biomédical. Certains sont déjà employés dans la fabrication de prothèse ou de fil de suture résorbable, comme le poly(lactide), le poly(glycolide) ou le poly(ϵ -caprolactone) (Tableau I.3).

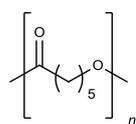
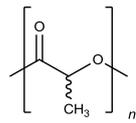
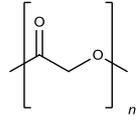
Nom du polyester	Abréviation	Structure du polymère
Poly(ϵ -caprolactone).	PCL	
D,L,Poly(lactide)	PLA	
Poly(glycolide)	PGA	

Tableau I.3 : Polymères usuels biodégradables et biocompatibles

La poly(ϵ -caprolactone) (PCL) est un polyester composé de motif acide 6-hydroxycaproïque. La poly(ϵ -caprolactone) a été synthétisée pour la première fois par Carothers *et al.*^[83] dans les années 30. Par la suite, la PCL est devenue rapidement un produit commercial, car elle était à l'époque l'un des rares polymères dégradables par les microorganismes.

La PCL est un polymère semicristallin, possédant une température de transition vitreuse (T_g) de -60°C et un point de fusion de l'ordre de 60°C.^[84] La PCL est soluble dans le chloroforme, le dichlorométhane, le benzène, le toluène, le 2-nitropropane ; peu soluble dans l'acétone, la butan-2-one, l'acétate d'éthyle, le diméthylformamide et l'acétonitrile, et insoluble dans les alcools, l'eau, l'éther de pétrole et dans le diéthyl éther.^[85] La différence de solubilité entre la PCL et les oligomères de chitines et le chitosanes permet de confirmer que c'est un bon couple pour former des molécules amphiphiles. Cependant, ces molécules hydrides doivent être biocompatibles.

I.3.1 PCL : Un polymère biocompatible

A l'origine, l'idée de biocompatibilité correspondait, à la capacité des matériaux à être utilisés pour une application biologique avec une réponse de l'hôte acceptable.^[86] De nos jours, la biocompatibilité implique de comprendre plus en profondeur l'interaction hôte/PCL ainsi que les différents mécanismes chimiques et biologiques qui sont impliqués. Les systèmes sont généralement évalués *in vitro*, via des tests de cytotoxicité sur des cultures cellulaires. Les tests *in vivo* s'intéressent particulièrement à l'observation histologique, pathologique et à la réponse immunogénique, carcinogénique et thrombogénique de l'hôte.

Des études histologiques *in vivo*, chez la souris et chez le rat, ayant été implanté par des PCL, via des injections en sous-cutanée ou en intramusculaire, ne montrent pas d'anomalie particulière comme des granulomes ou des zones enflammées. De plus, les produits de dégradation des PCL sont pris en charge par les macrophages. Cependant seulement quelques articles font l'état des conséquences à moyen terme (plus de deux ans). Ces derniers montrent que les PCL qui ne sont pas dégradées ont tendance à migrer vers les tissus conjonctifs, sans effet secondaire notable.^[87-88]

Malgré tout, des produits commerciaux composés totalement ou partiellement de PCL sont déjà employés dans le secteur biomédical. Ces applications déjà éprouvées permettent d'avoir un certain recul pour affirmer que la PCL est biocompatible. Par exemple des homopolymères de PCL sont déjà employés pour la fabrication de fil de suture résorbable sous le nom commercial de Capronor[®]. L'emploi de copolymère permet de moduler les applications de la PCL. Par exemple, le Neurolac[®], un copolymère de Poly(D-L-lactide-co-εCL), est utilisé comme support pour la régénération nerveuse. La PCL est à l'origine de matériaux composites. Mélangée avec des monomères de type diméthacrylate, sous le nom de Resilon[®],

il est employé pour réaliser des soins parodontaux. Des mélanges avec des polyuréthanes permettent de renforcer certains tissus conjonctifs comme les tendons, il est alors vendu sous le nom Artelon[®]. Un important volume de PCL est utilisé sous forme de copolymère poly(Lactide-*co*- ϵ CL) afin de réaliser des films de Mesofol[®] prévenant l'adhésion des plaies aux pansements.^[89]

I.3.2 Dégradabilité des PCL *in vivo*

Il est important de préciser qu'un polymère biocompatible n'est pas forcément biodégradable ou biorésorbable. Dans le cas d'un polymère non biodégradable, celui-ci peut être partiellement détruit mais non-éliminé et ainsi rester ou se déplacer dans le corps, loin du site d'action original. Par opposition, un polymère biodégradable, correspond à des structures qui sont totalement éliminées. Ces définitions des termes de biodégradabilité, biorésorbabilité et bioabsorbabilité s'appuient sur le travail de Vert *et al.*^[90]

Les PCL peuvent être biodégradées par des organismes exogènes à l'humain comme certains champignons et certaines bactéries, mais ne sont pas biodégradables dans les organismes des mammifères et des humains à cause de l'absence d'enzyme spécifique.^[91] Mais cela ne signifie pas qu'ils ne sont pas biorésorbables, mais plutôt que le processus est plus long. La dégradation est alors amorcée et propagée *via* une série de réactions d'hydrolyse. Il est connu que la dégradation des liens poly(α -hydroxy) a lieu soit en surface, soit dans la masse ou bien alors une dégradation dans la masse, auto-catalysée par la présence des produits de dégradation (Figure I.9).

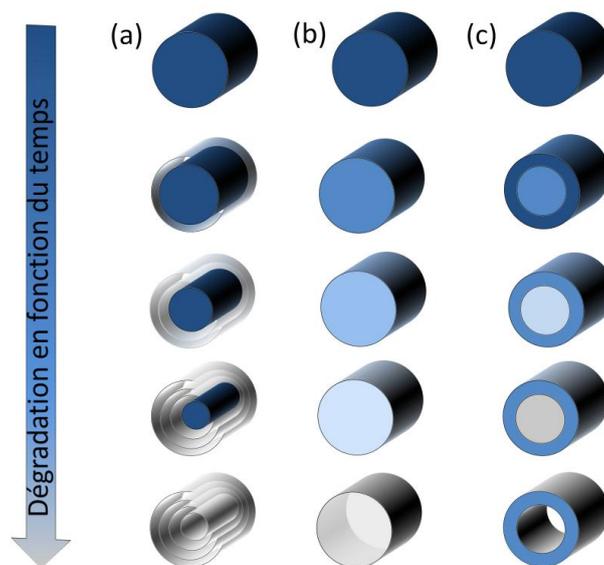


Figure I.9 : Les différents modes de dégradation des poly(ϵ -caprolactone) : dégradation en surface (a), dégradation en masse (b) et dégradation en masse auto-catalysée (c).

La dégradation de surface est liée à une hydrolyse de la PCL favorisée en périphérie. Cela est causé par une hydrolyse plus rapide des chaînes de la PCL disposées à l'extérieur que l'intrusion de l'eau à l'intérieur de la structure du polyester. La dégradation en masse a lieu quand l'eau est capable de pénétrer dans la masse du polymère, et ainsi dégrader le polymère par hydrolyse interne. Les oligomères et les monomères formés peuvent diffuser ensuite à travers le polymère ou rester à l'intérieur ce qui catalyse ainsi la dégradation. Il y a alors dégradation de l'intérieur vers l'extérieur.

La dégradation est de nature chimique et non enzymatique. La vitesse ainsi que le mode de dégradation sont influencés par la masse molaire, le type de polymère (homopolymère ou copolymère) ou encore par la cristallinité de la PCL. Les zones cristallines résistent particulièrement bien à l'hydrolyse alors que les zones amorphes sont beaucoup plus sensibles.

De plus, il est reconnu que greffer des chaînes hydrophiles sur la PCL ou de faire un prétraitement par des solutions basiques, comme de la potasse ou de la soude, permet de réduire son hydrophobicité et la quantité de zones cristallines et ainsi d'augmenter la vitesse de dégradation.^[92]

La nature hydrophobe, la biocompatibilité ainsi que les différentes propriétés citées précédemment, font de la PCL un polymère particulièrement étudié pour des applications d'ordre biomédical.

I.3.3 Synthèse des PCL par polycondensation

La PCL peut être obtenue par deux techniques différentes, la polycondensation (polymérisation par étape) ou la polymérisation par ouverture de cycle.

Cette voie est la première voie de synthèse explorée pour synthétiser les polyesters aliphatiques dont la PCL. Cette synthèse est réalisée par la polycondensation de l'acide 6-hydroxycaproïque (Schéma I.4).

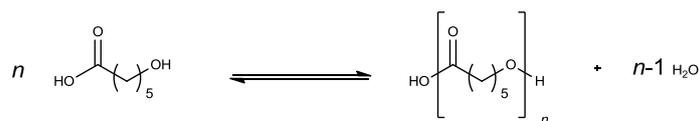


Schéma I.4 : Polycondensation de l'acide 6-hydroxycaproïque

Ce type de polymérisation possède de nombreux désavantages. La polyestérification est une réaction équilibrée. Par conséquent, pour atteindre des taux de conversion conséquents et générer des masses molaires élevées, il est nécessaire d'éliminer l'eau formée en cours de polymérisation. Ce type de réaction se déroule donc à température élevée et sur des temps de réaction longs, ce qui est favorable aux réactions indésirables comme la transestérification.

L'obtention de poly(ϵ -caprolactone) par la polycondensation d'éthyl-6-hydroxyhexanoate peut être réalisée par voie enzymatique plus douce. En effet, l'utilisation d'une lipase issue de *Pseudomonas* sp. permet d'avoir accès à une PCL de masse molaire moyenne de $5400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ après vingt jours à 45°C . Cependant la dispersité est de l'ordre de 2,3. L'utilisation de cette technique est donc fortement limitée par une cinétique très lente et les faibles masses molaires obtenues.^[93]

I.3.4 Synthèse des PCL *via* polymérisation par ouverture de cycle

La polymérisation par ouverture de cycle (ROP : Ring Opening Polymerization) de la 2-oxépanone, nommée plus couramment ϵ -caprolactone (ϵ CL), constitue la meilleure voie de synthèse pour l'obtention de PCL de dimensions et de propriétés définies. L'ouverture de monomère cyclique ϵ CL légèrement contraint permet de déclencher plus facilement la polymérisation (Schéma I.5).

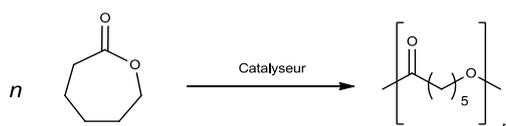


Schéma I.5 : Polymérisation par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone

Cette approche permet la synthèse de PCL de masse molaire élevée avec une dispersité mieux contrôlée. Cette voie de polymérisation s'oppose à la polycondensation par ses conditions beaucoup plus douces : température bien moins élevée et des cinétiques plus rapides.

I.3.4.1 Synthèse des monomères d' ϵ CL

Il existe plusieurs voies pour synthétiser le monomère cyclique ϵ CL. La plus utilisée est l'oxydation de la cyclohexanone par un peracide comme l'acide peracétique connue sous le

nom de réarrangement de Baeyer-Villiger. Cette synthèse s'est généralisée dans l'industrie (Schéma I.6). Ce procédé est utilisé par Solvay.^[94]

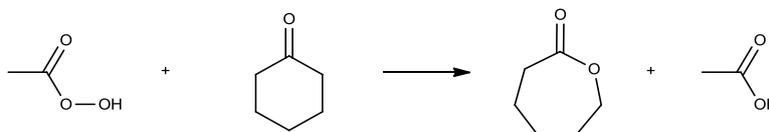


Schéma I.6 : Synthèse de l'ε-caprolactone à partir de la cyclohexanone

Il existe une seconde approche de synthèse plus originale mais peu exploitée. Certains organismes dont *Acinetobacter* sp. produisent de l'acide adipique à partir du cyclohexanol (Schéma I.7), via l'intermédiaire εCL et l'acide 6-hydroxycaproïque.^[95] Il est donc possible par ingénierie métabolique de produire les précurseurs des PCL.

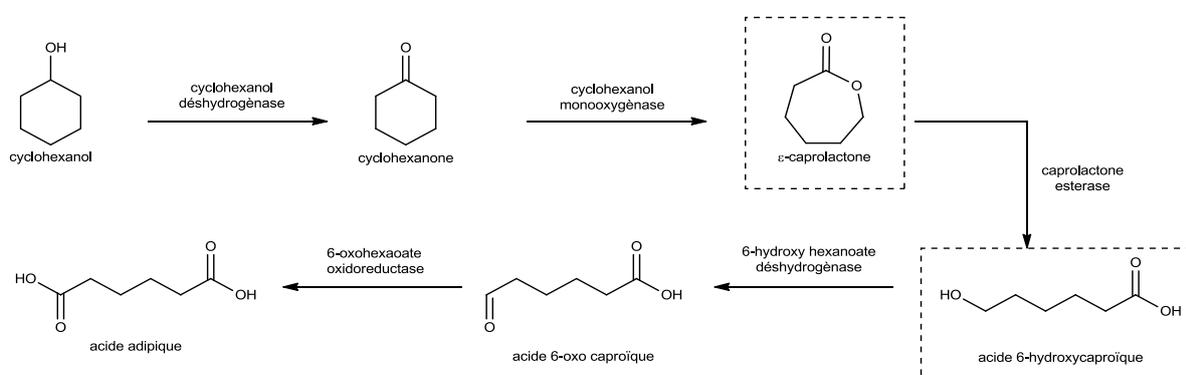


Schéma I.7 : Oxydation de la cyclohexanol en acide adipique par *Acinetobacter* sp.

Les monomères sont ensuite polymérisés en présence d'amorceur. Le choix de l'amorceur et les conditions de polymérisation influencent les mécanismes de la polymérisation.

I.3.4.2 Les différents mécanismes de polymérisation par ROP

Trois mécanismes principaux sont décrits dans la littérature pour expliquer la polymérisation par ouverture de cycle de εCL :

- Polymérisation par ouverture de cycle cationique
- Polymérisation par ouverture de cycle anionique
- Polymérisation par ouverture de cycle par activation du monomère

I.3.4.2.a Polymérisation par ouverture de cycle cationique

La polymérisation par ouverture de cycle cationique a lieu grâce à l'attaque de l'oxygène du groupement carbonyle du monomère par un cation (Schéma I.8). La réaction d'allongement de la chaîne est alors une réaction de substitution nucléophile de type 2.^[96]

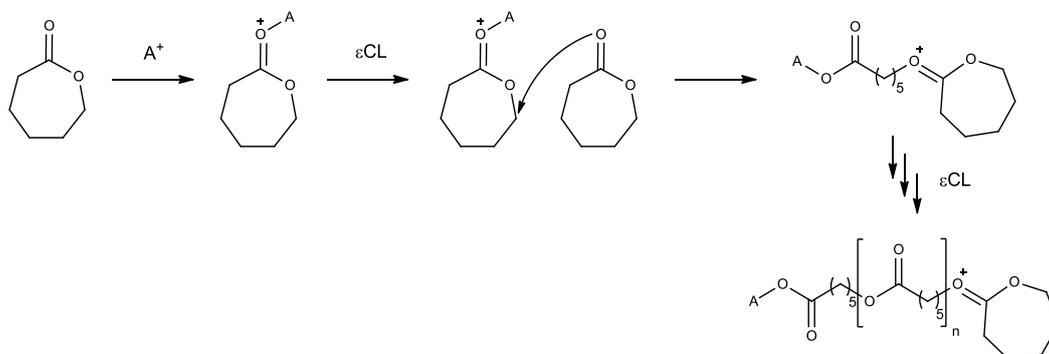


Schéma I.8 : Polymérisation par ouverture de cycle cationique

La polymérisation par ouverture de cycle cationique des lactones a déjà été décrite par l'équipe de Kricheldorf dans les années 1980 pour être activée par des acides de Lewis ou des agents alkylants comme le triflate de méthyle.^[97-100] Des travaux effectués par Hofman *et al.*^[96] ont aussi mis en évidence que des agents acylants catalysent la ROP.^[101] Cependant la polymérisation cationique est difficile à contrôler et donne accès à des polymères de faibles masses molaires.

I.3.4.2.b Polymérisation par ouverture de cycle anionique

La polymérisation par ouverture de cycle anionique tend vers la formation d'une espèce anionique attaquant le carbone du groupement carbonyle du monomère. Le monomère cyclique s'ouvre par rupture de la liaison carbonyle-oxygène et l'espèce active permettant l'élongation est un alcoolate (Schéma I.9). Le principal inconvénient de cette approche est la présence de réaction de transestérification. Cette réaction secondaire engendre des faibles masses molaires et des indices de dispersité élevés.^[102]

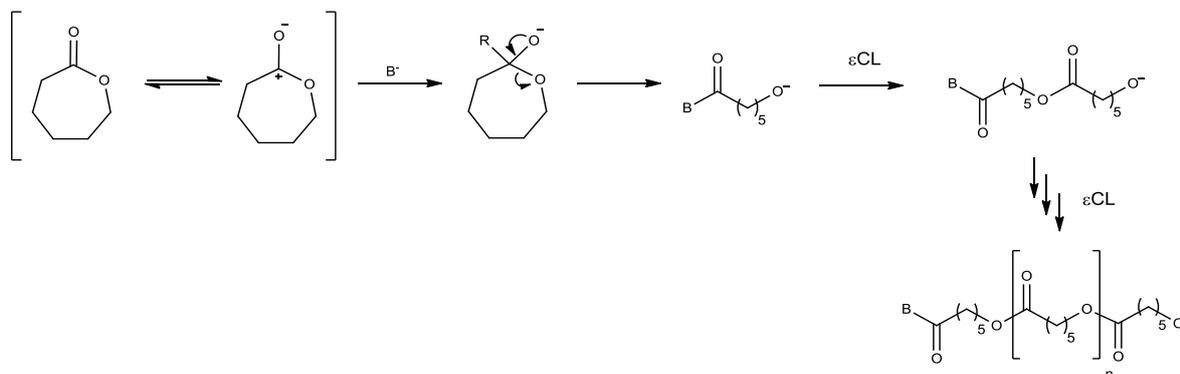
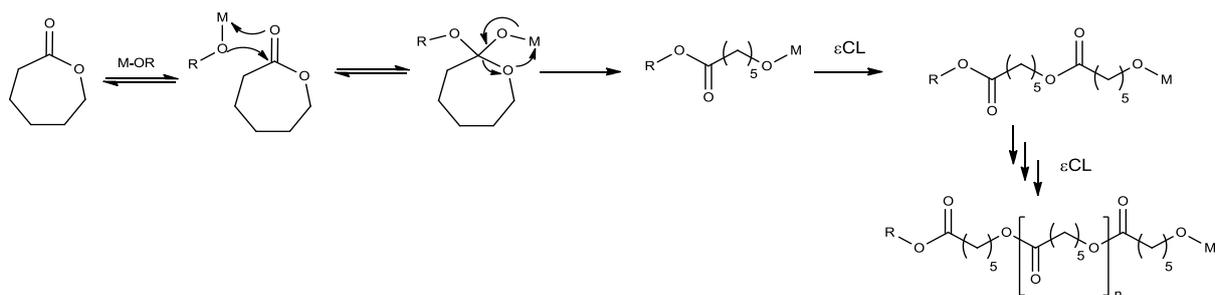


Schéma I.9 : Polymérisation par ouverture de cycle anionique

Des métaux alcalins : le lithium^[103], le sodium^[104], et le potassium^[105] ainsi que des métaux alcalino-terreux : essentiellement le calcium^[106] et le magnésium^[107] ont été déjà testés comme catalyseur de la ROP dans différents solvants. Ces espèces présentent une forte activité catalytique favorisant une polymérisation par voie anionique mais forment des polyesters avec une grande dispersité, significative de la présence de nombreuses transestérifications, rendant difficile la contrôle des propriétés des PCL.

D'autres catalyseurs métalliques contenant des métaux dits « pauvres » ont ensuite été testés, essentiellement des alcoolates à base d'aluminium et d'étain. Dans le cas de ces complexes métalliques, le mécanisme de la ROP est pseudo-anionique de type coordination puis insertion. L'amorceur, généralement un alcoolate métallique, se coordonne au groupement carboxyle du monomère puis rompt la liaison π carbone/oxygène, et s'insère simultanément dans la lactone au niveau de la liaison métal oxygène (Schéma I.10).^[96, 102]

**Schéma I.10 : Polymérisation par ouverture de cycle par activation et insertion (pseudo-anionique)**

Les alcoolates d'aluminium (III) permettent de minimiser les réactions secondaires de transestérification, d'obtenir des polymères de faible indice de dispersité et de taille contrôlée. Ils sont synthétisés par ajout d'un alcool en présence de triéthylaluminium.^[108] La modularité de ce type de synthèse permet de varier le type d'alcool utilisé, et ainsi choisir le groupement qui sera présent en bout de chaîne après polymérisation.

Le plus communément utilisé est le triisopropylate d'aluminium. Ce dérivé d'aluminium commercial obtenu par la mise en présence de triéthylaluminium en présence d'isopropanol (Schéma I.11), présente l'avantage de favoriser des taux de conversion proches de 100%. Il a été observé que contrairement à d'autres alcoolates de métaux, le triisopropylate d'aluminium induit peu de réactions de transestérification.^[109]

I – Etude Bibliographique

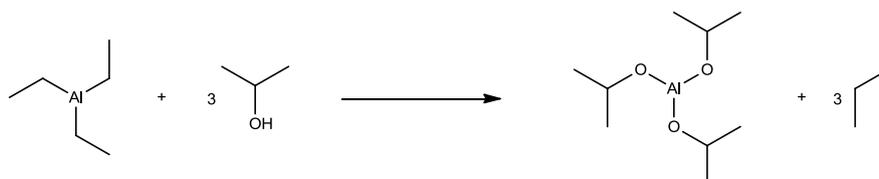


Schéma I.11 : Synthèse du triisopropylate d'aluminium

Pour réaliser des polymères de tailles parfaitement contrôlées, il faut pouvoir connaître parfaitement le nombre d'amorces disponibles par rapport à la quantité de monomère présent. Cependant le triisopropylate d'aluminium n'existe pas sous la forme d'une molécule unique mais sous la forme de trimère (A_3) ou de tétramère (A_4),^[110] ce qui influence le nombre d'alcoolates disponibles et rend donc le contrôle de la polymérisation difficile (Schéma I.12).

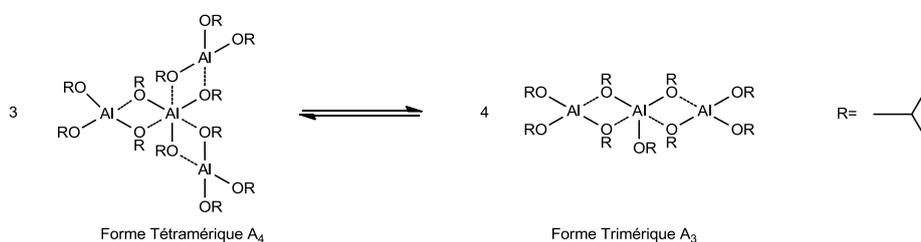


Schéma I.12 : Equilibre entre les formes tétramères A_4 et trimères A_3 du triisopropylate d'aluminium

Les trimères A_3 sont connus pour afficher un meilleur taux de conversion et une polymérisation plus rapide et contrôlée par rapport aux formes A_4 .^[111] Les formes A_3 sont très majoritairement présentes dans le triisopropylate d'aluminium fraîchement distillé, puis les formes A_4 apparaissent spontanément. Ce phénomène rend le contrôle des masses molaires moyennes difficiles.

De plus, le nombre d'alcoolates disponibles varie aussi en fonction de la température, il varie de 0,9 à 1,4 par triisopropylate d'aluminium quand la température varie de 0°C à 100°C dans le toluène. Cet effet est aussi modulé par la polarité du solvant.^[112]

La polymérisation par ouverture de cycle d' ϵ CL par le triisopropylate d'aluminium suit un mécanisme d'activation et insertion (Schéma I.13).

I – Etude Bibliographique

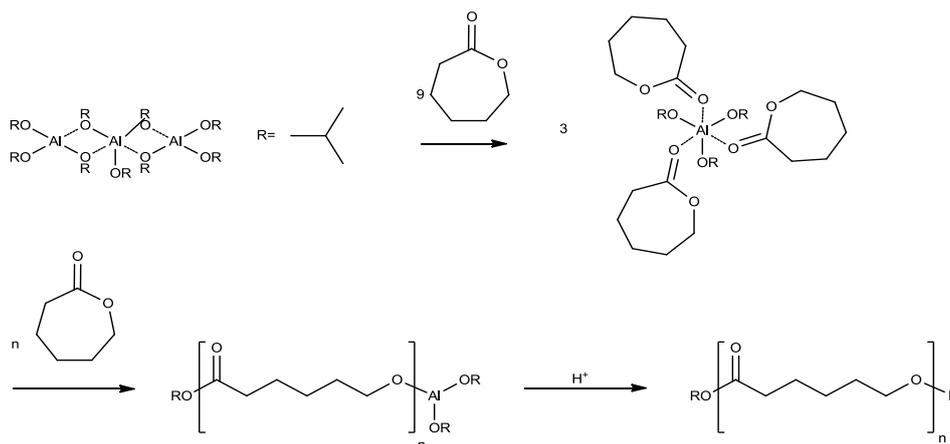


Schéma I.13 : Polymérisation par ouverture de cycle de l'ε-caprolactone par le triisopropylate d'aluminium

Néanmoins, la variabilité de la disponibilité des alcoolates et le fait que les dérivés d'aluminium ne soient pas autorisés par la FDA augmentent l'attrait des amorceurs à base d'autres métaux.

L'octanoate d'étain (II) est un amorceur admis par la Food and Drug Agency (FDA) contrairement aux dérivés d'alcoolate d'aluminium. Les dérivés de l'étain sont donc de bons candidats pour obtenir des polymères à usage biomédical. Cependant, ce type d'amorceur produit des polymères possédant des indices de dispersité généralement plus élevés qu'avec les alcoolates d'aluminium. Cette tendance est modulée selon l'alcoolate d'étain utilisé, les conditions influençant la vitesse d'amorçage (stœchiométrie, concentration, température...) et les réactions de transestérification. Cependant la polymérisation est encore contrôlée et la masse molaire peut toujours être prédite en fonction du rapport monomère/amorceur.

Parmi les dérivés d'alcoolates d'étain utilisés, on retrouve aussi le 2,2-dibutyl-2-stanna-1,3-dioxépane (DSDOP), un amorceur cyclique connu pour permettre dans des conditions contrôlées la synthèse de copolymères statistiques. Ce type d'amorceur n'est pas commercial mais peut être synthétisé facilement, comme décrit Kricheldorf *et al.*^[113], à partir de diméthoxydibutylétain (Schéma I.14).

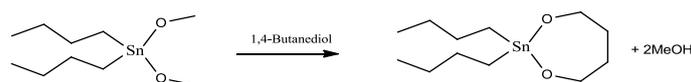


Schéma I.14 : Synthèse du DSDOP

Cet alcoolate permet aussi de réaliser la polymérisation dans des conditions plus douces que celles utilisées par l'emploi de l'octanoate d'étain et avec de meilleurs taux de

conversion.^[114-115] La polymérisation par ouverture de cycle d' ϵ CL par le DSDOP suit un mécanisme d'activation et insertion (Schéma I.15).

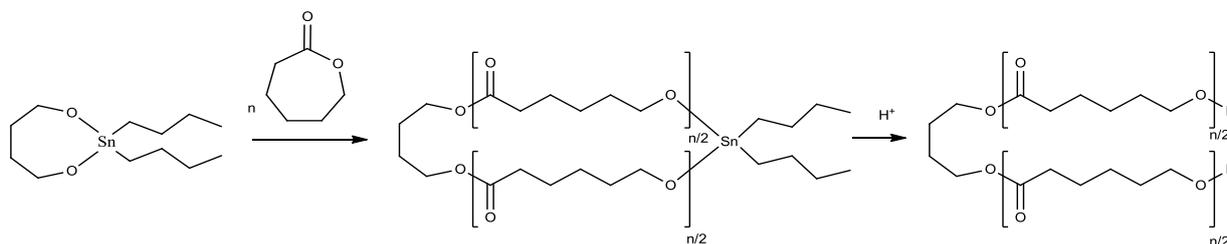


Schéma I.15 : Polymérisation par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone par le DSDOP

La chaîne de PCL s'allonge à partir des deux alcoolates issus du butanol. L'amorceur ne se trouve donc pas en bout de chaîne mais au centre. Les deux alcoolates reliés au cation métallique sont hydrolysés à la fin de l'allongement par ajout d'HCl. Les taux de conversion sont proches de 100%, la dispersité est de l'ordre de 1,5.

I.3.4.2.c Polymérisation par activation du monomère

L'activation du monomère par l'amorceur, engendre une espèce plus sensible à l'ouverture de cycle (Schéma I.16). Il s'en suit une attaque du monomère activé sur la chaîne en cours d'élongation.^[116]

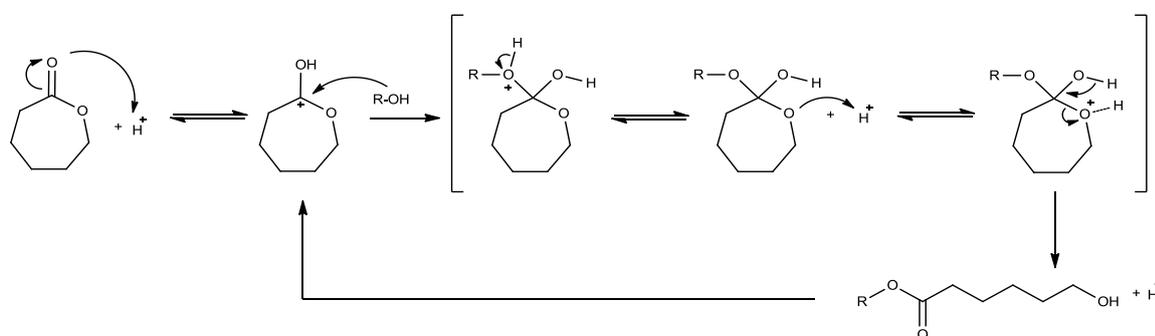


Schéma I.16 : Polymérisation par ouverture de cycle par activation du monomère

Ce type de mécanisme intervient par exemple dans le cas de l'utilisation d'acide fort en présence de solvants protiques (eau ou alcool). Basko *et al.*^[117] ont illustré ce fait en polymérisant de l' ϵ CL en présence d'isopropylalcool et d'acide trifluorométhanesulfonique. Susperregui *et al.*^[118] ont repris le même principe en utilisant de l'acide sulfonique en présence de méthanol.

Hedrick et ses collaborateurs réalise la ROP de l' ϵ CL par ajout d'une base azotée, généralement le 1,8-Diazabicycloundec-7-ène (DBU) active le monomère, puis en présence d'une molécule tierce qui amorce la polymérisation souvent un alcool ou une amine.^[119-120]

I.3.4.3 Réactions secondaires

Comme il a été décrit précédemment, il existe de nombreux amorceurs disponibles commercialement ou décrits dans la littérature : de nature anionique, cationique ou coordinatrice. Les amorceurs ioniques sont très réactifs mais sont à l'origine de réactions de transestérification intramoléculaire et/ou intermoléculaire indésirables.

Les réactions de transestérification intramoléculaires engendrent l'apparition de polymères cycliques de faible masse. Cela se traduit par une diminution de la masse moyenne en nombre du polyester (Schéma I.17).

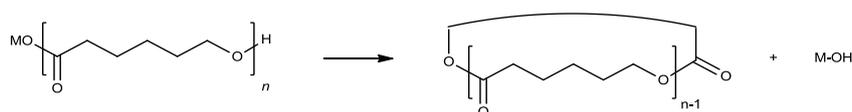


Schéma I.17 : Transestérification intramoléculaire

Les réactions de transestérification intermoléculaire se traduisent par un réarrangement aléatoire des chaînes. Cette réaction parasite augmente fortement l'indice de dispersité (Schéma I.18).

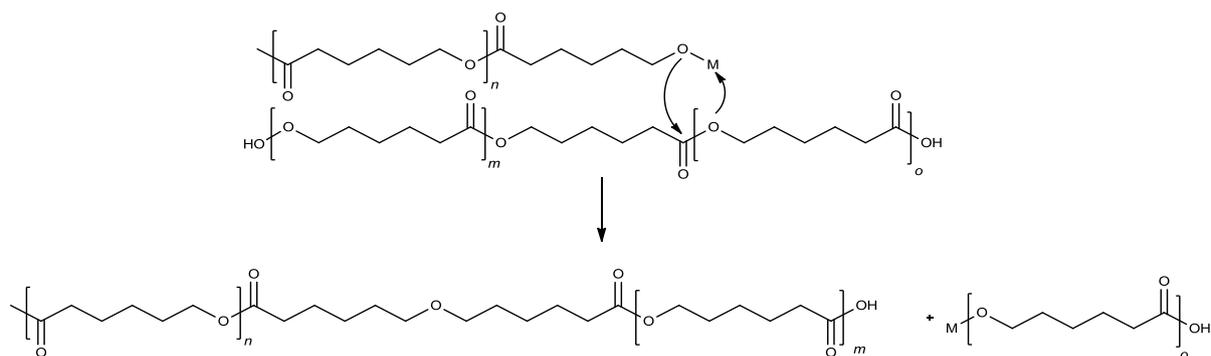


Schéma I.18 : Transestérification intermoléculaire

Pour réduire le risque de réaction secondaire, il est préconisé de maîtriser parfaitement les cinétiques de polymérisation et d'utiliser des amorceurs moins nucléophiles.^[121] Les alcoolates sont des nucléophiles modérés, moins réactifs et donc limitant les phénomènes de transestérification, ils permettent ainsi un meilleur contrôle de la dispersité et du degré de polymérisation.^[122] La ROP de l' ϵ CL peut être amorcée par des alcoolates possédant des

contres ions métalliques. Ces cations possèdent des orbitales *d* favorisant la ROP. Les alcoolates de métaux de transitions présentent les qualités essentielles pour réaliser une polymérisation contrôlée. La polymérisation avec des amorceurs d'alcoolates métalliques de l' ϵ CL se fait par un mécanisme de polymérisation par ouverture de cycle par coordination insertion.

I.4 Copolymères et nanogels composés de chitooligosaccharides et de PCL : Etat de l'art

L'association entre les chitosanes/chitines et les PCL permet d'obtenir des composés amphiphiles parfaitement biocompatibles. Ces molécules hybrides ont déjà donné lieu à plusieurs études dans le but de créer des fibres, des films poreux ou encore des nanoparticules. Ce sont ces dernière études qui nous intéresserons tout particulièrement.

Il existe différents types de copolymères synthétisés à partir de polysaccharides et qui peuvent aboutir à la formation de structure organisée en phase aqueuse. Ces structures varient en fonction du positionnement et du nombre des liaisons covalentes entre les polymères glycosidiques (chitooligosaccharides) et synthétiques (PCL).

Il a été décrit précédemment que les structures de polymères les plus aptes à donner des nanoparticules ou des nanovésicules étaient les copolymères à bloc et greffés. Dans le cadre de ce travail, la structure greffée semble la plus appropriée. En effet, la présence de groupements latéraux chitosanes, permet d'envisager un effet de multivalence augmentant les interactions biologiques avec le vivant. Cependant à notre connaissance, il n'existe pas d'exemples de copolymères de PCL greffés par du chitosane. Cet état de l'art décrira brièvement les études majeures en accord avec ce projet, à partir de copolymère à bloc, et s'appuiera ensuite sur différentes études réalisées sur des systèmes chitosane/chitine et PCL greffés ensemble.

I.4.1 Nanogels à base de copolymères à bloc

Tang *et al.*^[123] utilisent un copolymère à bloc biocompatible capable de se désagréger spécifiquement au niveau des cellules cancéreuses permettant la vectorisation de principe actif de manière spécifique. Ils décrivent des copolymères à bloc composés de PCL et de Poly(éthyléthylène phosphate) (PEEP) reliés par un pont disulfure qui en solution forment des micelles ayant un diamètre de 90 nm (Figure I.10).

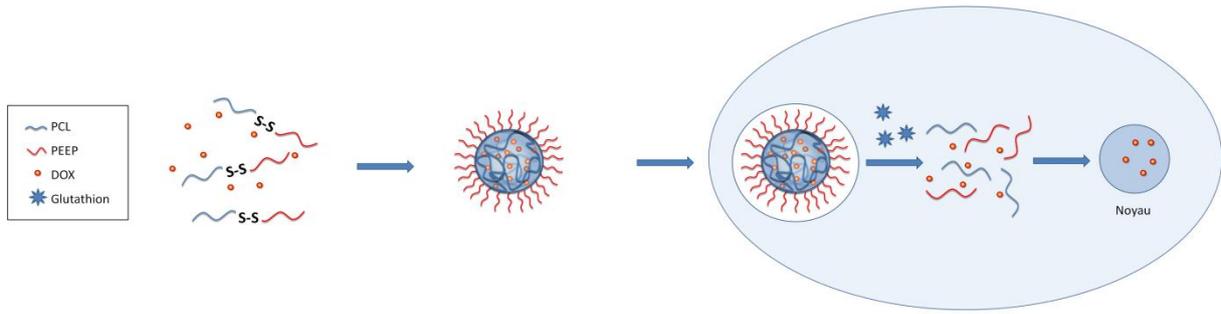


Figure I.10 : Stratégie générale de la vectorisation de doxorubicine

Le milieu intracellulaire et le milieu proche de cellules cancéreuses présentent un fort taux de glutathion. Ce tripeptide contenant des fonctions thiol capables de réduire les ponts disulfure. L'utilisation des copolymères à bloc amphiphiles capables de former des micelles dont la structure est maintenue par des ponts disulfure, permet la destruction des nanoparticules à proximité directe des cellules cancéreuses et de libérer de manière localisée un agent thérapeutique.

Le copolymère PCL-SS-PEEP est synthétisé *via* une réaction de couplage entre le groupement thiol à l'extrémité de la PCL avec un groupement pyridyldisulfure inséré à l'extrémité du PEEP (Schéma I.19). La polymérisation de ϵ CL est amorcée par du 2-(2,4-dinitrophénylthio)éthanol en présence de dioctylétain pour obtenir le précurseur PCL-DNP, qui est ensuite déprotégé *in situ* par du mercaptoéthanol pour obtenir le thiol associé et donc le synthon PCL-SH. De même, le PEEP-Py est synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle par du éthyléthylène phosphate amorcé par du 2-(2-pyridyldithio)-éthanol et du $\text{Sn}(\text{Oct}_2)$.

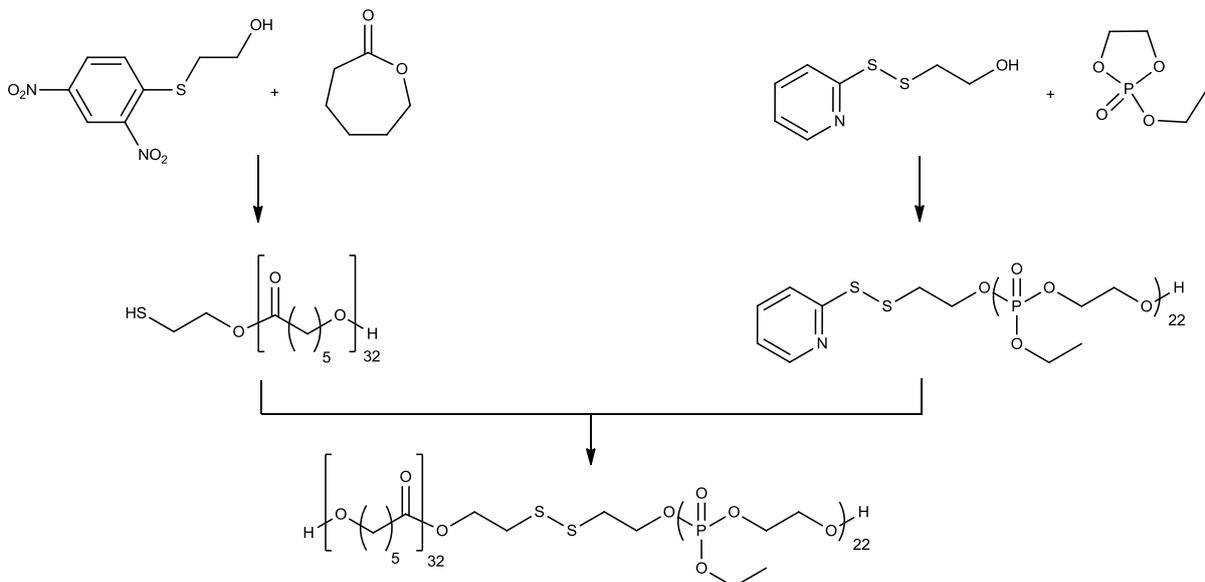


Schéma I.19 : Stratégie de synthèse et de couplage du copolymère PCL-SS-PEEP

Le copolymère PCL-SS-PEEP s'auto-assemble en milieu aqueux. La doxorubicine est une molécule anticancéreuse d'origine fongique capable d'inhiber la réplication des cellules en division rapide. L'auto-assemblage en présence de doxorubicine permet d'incorporer la molécule thérapeutique dans la nanoparticule (Figure I.11).

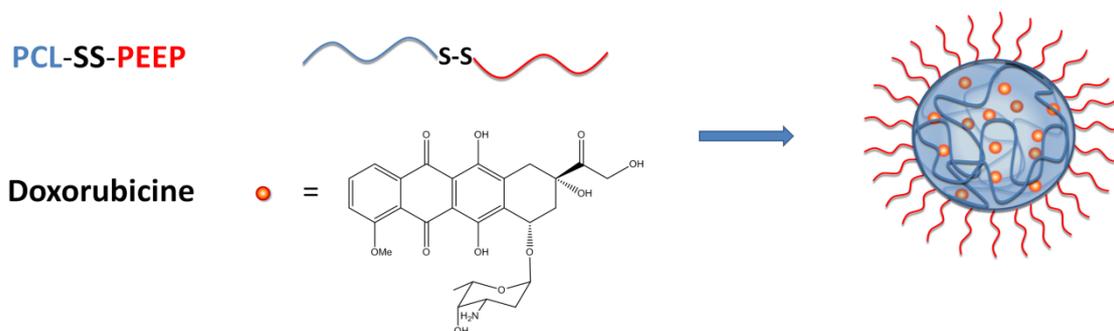


Figure I.11 : Encapsulation de la doxorubicine dans le nanogel PCL-SS-PEEP

Pour démontrer que le glutathion est capable de réduire les ponts disulfure permettant la cohésion du copolymère, des micelles contenant de la doxorubicine sont placées en présence de glutathion à 10 mM. Après une dizaine de minutes, la taille des particules a augmenté de 90 nm à 1000 nm. Cette variation de taille importante est causée par la présence de microparticules et d'un phénomène important de précipitation, témoignant bien de la dégradation des copolymères. Parallèlement, la libération de la doxorubicine est observée par un suivi fluorimétrique. Après 100 H à une concentration de 10 mM en glutathion, la totalité de l'agent est libéré tandis que dans les mêmes conditions sans glutathion, on observe uniquement 40% de relargage. Ceci démontre qu'il existe bien une sélectivité du relargage

Pour moduler un peu plus les propriétés des polymères à bloc, Li *et al.*^[124] ont réalisé des polymères tribloc composés d'un copolymère MPEG/PCL/Chitosane. Le chitosane a été choisi dans cette étude pour sa capacité à interagir avec les cellules et à favoriser la perméabilité cellulaire. Du MPEG commercial amorce la polymérisation de l' ϵ CL en présence de Sn(Oct)₂. Le copolymère ainsi obtenu est fonctionnalisé à l'extrémité de la PCL par du chitosane de faible masse molaire *via* une réaction radicalaire. Cette réaction radicalaire amorcée par du persulfate de potassium, a aussi servi à diminuer la masse molaire du chitosane (Schéma I.20).

I – Etude Bibliographique

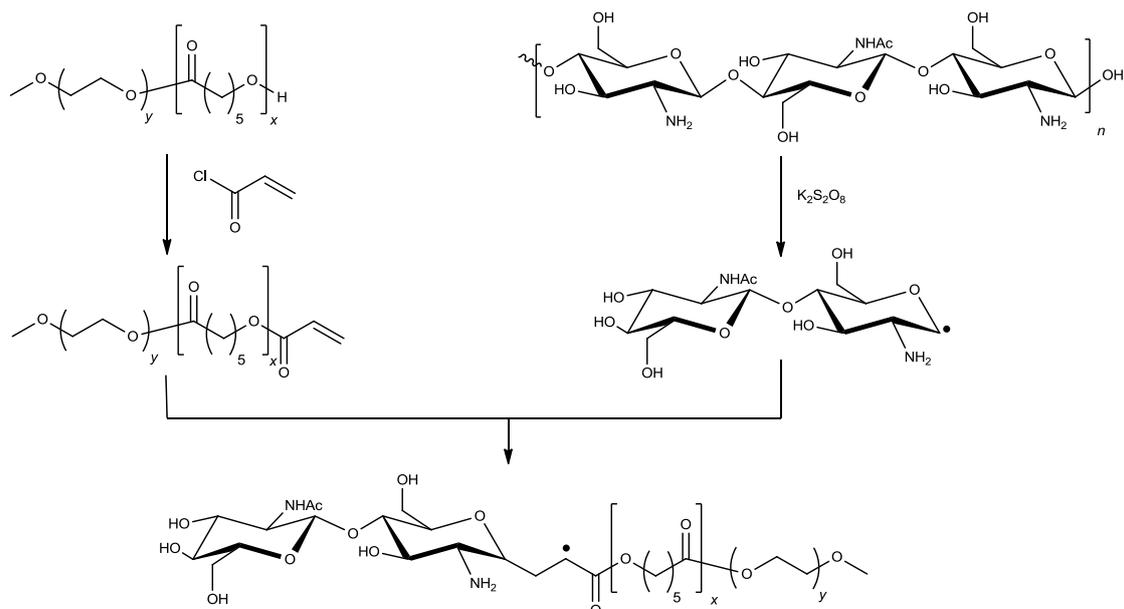


Schéma I.20 : Stratégie de synthèse du copolymère chitosane-co-PCL/MPEG

Le degré de substitution du chitosane par le PCL/MPEG déterminé par RMN est de l'ordre de 1,23%. Ce taux de substitution faible est dû à une importante différence de solubilité entre le chitosane et le dibloc synthétique.

Les micelles obtenues sont composées d'un cœur hydrophobe composé de PCL et d'une couronne hydrophile constituée de MPEG neutre et de chitosane partiellement chargé en fonction du pH.

La protonation des groupements amine du chitosane en milieu acide (pH=2), augmente la répulsion entre les chaînes polycationiques, on observe alors des particules de 40 nm. A pH légèrement acide (pH=5), les chaînes de chitosane sont moins protonées et la répulsion est moindre, on observe alors l'agrégation des micelles *via* la formation de liaisons hydrogène entre les MPEG, la taille observée des particules étant de l'ordre de 70 nm. A pH neutre (pH=7) les chaînes de chitosane très peu chargées interagissent directement avec les MPEG. Les interactions MPEG/Chitosane diminuent fortement l'hydrophilie de la nanoparticule, la turbidité de la solution augmente alors, à cause de l'agglomération prononcée des nanoparticules liées par des interactions hydrophobes. Au-delà ce pH, on observe même la précipitation des particules (Figure I.12).

Feng *et al.*^[126] ont envisagé la même stratégie avec du chitosane (DA = 20%). La polymérisation de la PCL est amorcée par les amine primaires en présence de DMAP. Les oligomères formés sont encore majoritairement des tétramères et la substitution des amine est totale.

Jayakumar *et al.*^[127] ont synthétisé des hydrogels de type copolymère chitine-g-PCL de manière similaire. Cependant, le fort taux d'acétylation (DA = 73%) devrait favoriser l'amorçage de la polymérisation sur le second site le plus nucléophile en présence : les alcool primaires. De plus, au vue, du DA, on peut estimer que les fonctions alcool primaires sont quatre fois plus nombreux que les amine des résidus glucosamines, favorisant d'autant plus l'amorçage sur ces derniers (Schéma I.22).Après polymérisation, le copolymère présente une large gamme de solubilité puisqu'il est aussi bien soluble dans l'eau que dans le toluène. Cette approche semble tout à fait attrayante, cependant, le contrôle de la structure finale n'est pas total. La substitution ne s'effectue pas uniquement sur les alcools primaires mais aussi partiellement sur les amine libres et les alcools secondaires. Ce type de stratégie ne permet d'obtenir de structure contrôlée dans le cas de la chitine et encore moins dans le cas du chitosane.

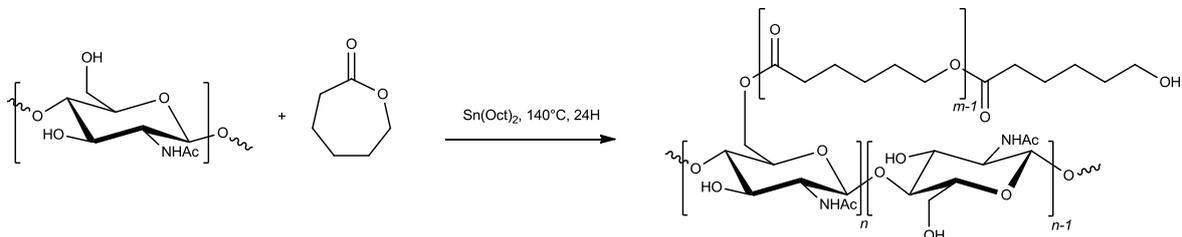


Schéma I.22: Stratégie de synthèse du copolymère chitosane-g-PCL

Pour pallier ce problème, Duan *et al.*^[128] ont développé une approche qui consiste à rendre inactive les amine des résidus glucosamine du chitosane et ainsi fonctionnaliser préférentiellement les fonctions hydroxyles par des oligomères de PCL. Cette inactivation est réalisée par l'emploi d'acide méthylsulfonique qui a pour effet de protoner les amine. Son rôle est double puisqu'il sert également de catalyseur de la polymérisation de la PCL. Après la polymérisation, une dernière étape de neutralisation en milieu basique est nécessaire (Schéma I.23).

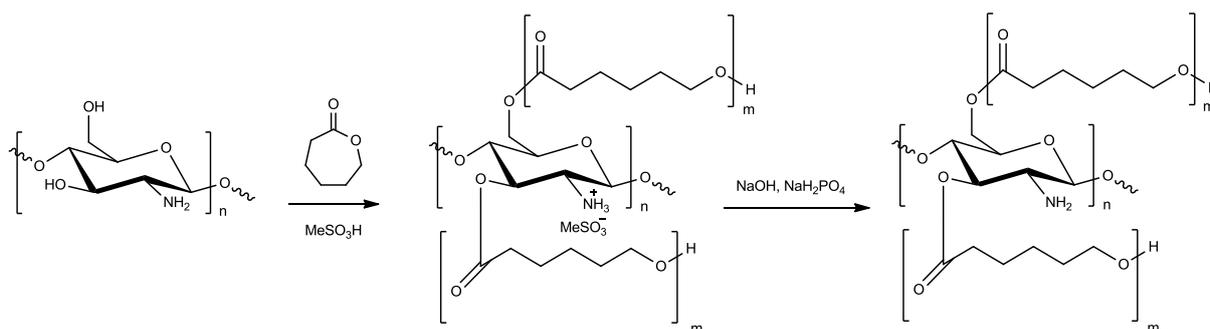


Schéma I.23 : Stratégie de synthèse du chitosane-g-PCL

Cette protection par l'acide méthylsulfonique demeure partielle. Le dosage des amine montre que lorsque le ratio ϵ CL/chitosane augmente de 6/1 à 24/1, la concentration en amine diminue d'un facteur 5. Par la suite, le copolymère est mis en solution et forme spontanément des micelles de chitosane-g-PCL.^[129] La dispersité des copolymères induite par la PCL, engendre une hétérogénéité en taille très importante des nanoparticules.

Dans le même esprit, Liu *et al.*^[130] ont pris parti de protéger les groupements amine par des groupements phtalimides (Schéma I.24).

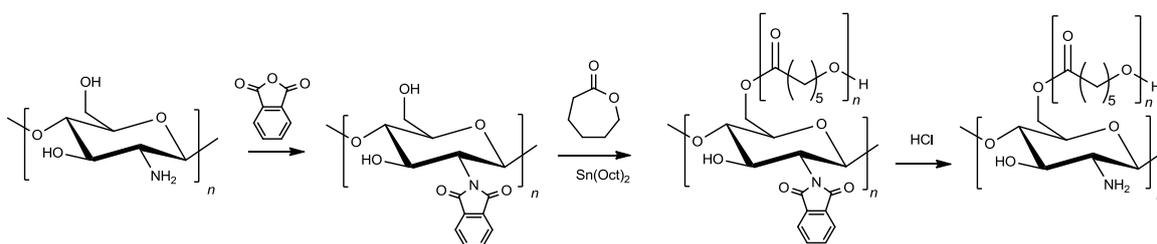


Schéma I.24 : Stratégie de synthèse du chitosane-g-PCL

Ainsi la polymérisation se fait de manière sélective et sur l'alcool primaire. Une dernière étape de déprotection sélective du phtalimide est réalisée en présence d'hydrazine. Ce type d'approche reste une nouvelle fois limitée par un manque de contrôle sur les étapes de protection/déprotection mais aussi au niveau des sites de substitution par la PCL.

Les stratégies précédemment décrites pour atteindre les copolymères chitosane-g-poly(ϵ CL) reposent toutes sur la fonctionnalisation/polymérisation directe du chitosane par des oligomères de PCL. On peut retenir comme principaux inconvénients : un degré de polymérisation de la PCL relativement faible, une dispersité élevée et un contrôle moyen de l'architecture moléculaire. Ces paramètres influent directement sur les propriétés physico-chimiques du copolymère, sur la reproductibilité des résultats mais aussi sur une

caractérisation structurale rendue plus difficile. En conclusion, les copolymères de type chitosane-*g*-PCL obtenus par la méthode du greffage « from » n'est pas le meilleur moyen pour obtenir des systèmes macromoléculaires homogènes et aux propriétés contrôlées. De plus par cette méthode, il n'est pas pour obtenir des copolymères de type de type PCL-*g*-chitosane.

I.4.3 Nanogels à base de copolymères greffés de type « onto »

Pour obtenir les deux types de copolymères, à savoir, PCL-*g*-chitosane et chitosane-*g*-PCL, la méthode de greffage « onto » implique de greffer des chaînes de PCL sur une chaîne de chitine ou de chitosane et inversement. La littérature est riche en synthèse de copolymère PCL greffée sur du chitosane, par contre les exemples de chitosane greffée sur des PCL sont plus rares.

I.4.3.1 Chitine et chitosane greffés par des PCL

Il existe plusieurs exemples d'oligomères de chitine et de chitosane greffés par des PCL *via* les amine primaires. Généralement, le couplage est réalisé à l'aide d'une liaison amide. Il est en effet plutôt adapté de faire réagir les amine du chitosane avec le groupement carboxylique de PCL modifiées.^[131-133]

Dans cet esprit, Jing *et al.*^[131] ont décrit la synthèse du PCL-*g*-chitosane. L'originalité de leur approche provient de la protection des alcools primaires à l'aide de chlorure de trityle permettant de rendre le chitosane compatible avec les solvants organiques et facilitant ainsi le couplage avec la PCL (Schéma I.25).

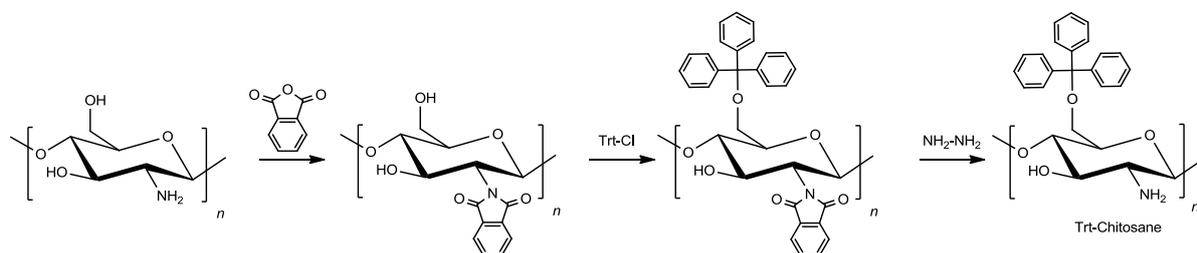


Schéma I.25 : Hydrophobisation du chitosane par tritylation des alcools primaires

L'εCL est polymérisé à partir de l'alcool benzylique avant le greffage, puis l'acide carboxylique terminal est activé à l'aide du 1,1'-carbonyldiimidazole (Schéma I.26). Par cette approche, les auteurs ont montré une meilleure efficacité et un bon contrôle du taux de greffage et ceci pour des chaînes latérales de PCL de taille relativement grande.

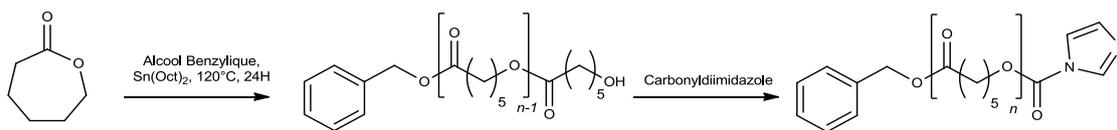


Schéma I.26 : préparation et activation du PCL

Toutefois, cette technique d'hydrophobisation préalable du chitosane nécessite plusieurs étapes de modifications chimiques (protections/déprotections sélectives, activation et couplage) (Schéma I.27) et de purifications. Les copolymères obtenus s'auto-assemblent en milieu aqueux, et forme des nanoparticules dont la taille observée en DLS et en MEB, varie en fonction de la concentration en copolymère et de la taille de la PCL greffée de 30 à 70 nm.

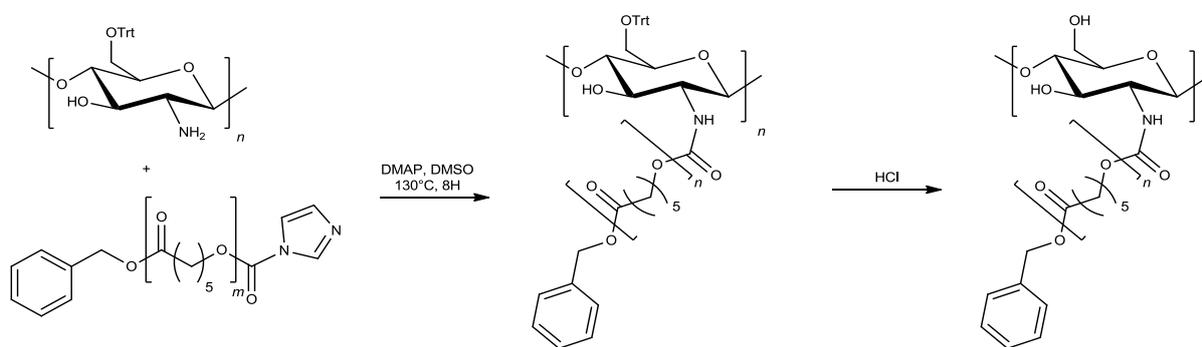


Schéma I.27 : Couplage entre le Trityle-Chitosane et le PCL

Le greffage de type « onto » permet de coupler des PCL pré-synthétisées sur des oligomères de chitosane ou de chitine. L'avantage cette approche permet d'avoir accès à un polymère de masse molaire maîtrisée et un indice de dispersité faible. De plus, ce polymère est plus facilement caractérisable que dans le cas d'un greffage « from » où il est lié à un saccharide. Cependant un greffage « onto » nécessite de modifier les PCL afin de le greffer dans un second temps sur le polysaccharide.

Bien que ce système PCL-*g*-chitosane permette d'obtenir des particules par auto-assemblage, notre intérêt se portera sur les exemples de greffage préservant les amine des chitosanes et chitines sur des PCL.

I.4.3.2 PCL greffés par des chitines ou des chitosanes

Une PCL contrairement à un polysaccharide, ne possède pas de groupements réactifs latéraux qui pourraient permettre de réaliser des réactions de couplage.

I.4.3.2.a Modification latérale des PCL

Pour introduire des fonctions réactives latéralement sur les PCL, l'approche la plus fréquente est de copolymériser de l' ϵ CL avec des monomères d' ϵ CL modifiés, généralement, par un groupement labile et facilement substituable, ou directement par un groupement fonctionnel. La littérature est riche en exemple de monomères modifiés mais seuls les monomères permettant d'insérer des fonctions utiles pour réaliser de la chimie « click » seront décrits.

La chimie « click » est un concept introduit par Sharpless en 2001^[134], qui fit un inventaire de réactions chimiques répondant à des critères précis, et qui permettent de réaliser facilement la conjugaison de deux molécules. Cette appellation chimie « click » regroupe un ensemble de réactions qui doivent :

- Etre modulables,
- Stéréosélectives,
- Insensibles à l'oxygène et à l'eau,
- Ne pas nécessiter de groupements protecteurs,
- Ne pas nécessiter de purification par chromatographie,
- Présenter des rendements élevés,
- Etre thermodynamiquement favorable,
- Ne pas générer de sous-produit, et si c'est le cas, ces derniers doivent être non toxiques et facilement éliminables,
- Former des liens stables en milieu physiologique.

De plus, il est recommandé que les réactions de chimie « click »:

- Se déroulent dans des conditions simples,
- Soient mise au point à partir de réactifs commerciaux et disponibles,
- Soient réalisables sans solvant, ou avec des solvants facilement éliminables,
- Fournissent des produits simples à isoler, sans purification par chromatographie.

Parmi, les réactions de chimie adaptées à ce projet, on retrouve deux types de réactions les réactions radicalaires thiol-ène et thiol-yne et la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen.

Les chimies « click » thiol-ène et thiol-yne sont des réactions radicalaires permettant la formation d'un lien thio-éther entre un groupement thiol et une fonction alcène ou alcyne

(Schéma I.28). Ces réactions ont l'avantage d'être induites par rayonnement et ainsi d'être particulièrement propres. De plus, elles ne nécessitent pas de catalyseur organique ou métallique ce qui est particulièrement intéressant pour des applications médicales, par exemple, ou ce type de résidu réactionnel sont à proscrire.

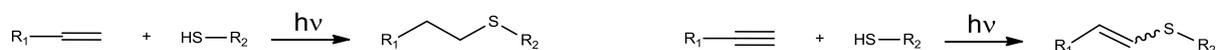


Schéma I.28 : Réaction thiol-ène et thiol-yne

A notre connaissance, la littérature ne contient pas d'exemple de monomères substitués par une fonction thiol. On retrouve par contre des monomères substitués par des fonctions alcène et alcyne, généralement utilisés dans un autre type de chimie « click » : la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen.

La cycloaddition de Huisgen permet la formation d'un cycle 1,2,3-triazole disubstitué par cycloaddition d'une fonction azide avec un groupement alcyne. La cyclisation se fait à une température élevée de l'ordre de 100°C, avec cinétiques de plusieurs jours, et engendre un mélange d'isomères 1,4 et 1,5. (Schéma I.29).^[135]

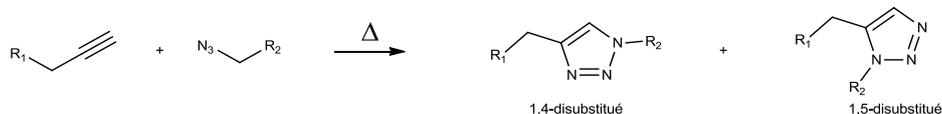


Schéma I.29: Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

L'introduction de cuivre (I), comme catalyseur a permis un essor de l'intérêt porté à cette réaction.^[136-137] En effet, le cuivre (I) permet de travailler à des températures beaucoup plus faibles, ou même à température ambiante. Ce catalyseur permet surtout de n'obtenir que l'isomère 1,4 (Schéma I.30). De plus, la chimie et les réactifs permettant d'accéder à des résidus alcyne et azide sont maîtrisés. Il existe énormément d'exemple dans la littérature^[138], utilisant la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par du cuivre (I) CuAAC, à un tel point que le concept de chimie « click » est souvent associé à cette réaction. Cette chimie est maîtrisée par le laboratoire, ce qui en fait une stratégie particulièrement attractive pour ce projet.

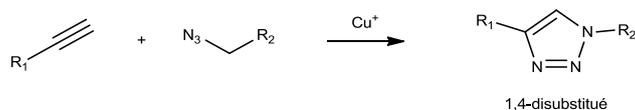


Schéma I.30: Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par du cuivre I (CuAAC)

Trois types de monomères modifiés d' ϵ CL substituées en α , ϵ ou γ par un groupement azide ou alcyne, compatibles avec la CuAAC sont décrits dans la littérature pour être facilement copolymérisables avec de ϵ CL (Schéma I.31).

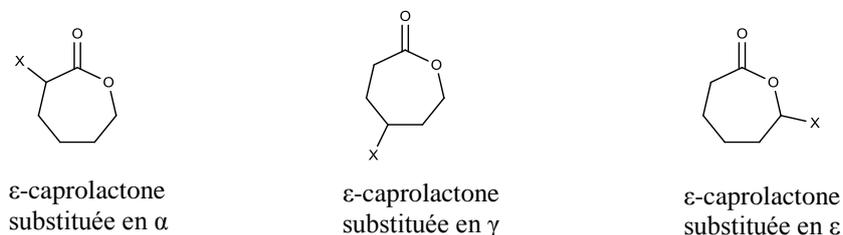


Schéma I.31 : Monomère modifié d' ϵ -caprolactone

L' ϵ CL modifiée en γ est obtenue à partir de l'ouverture de cycle du 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane par de bromure d'hydrogène, puis oxydation de l'alcool en cétone par du chloroformate de pyridium. Pour finir, la lactone est obtenue par oxydation de la cétone par de l'acide 3-chloroperbenzoïque (Schéma I.32), pour un rendement global de 50 %.^[139] Le groupement bromure final de la γ -bromo- ϵ -CL est facilement substituable avant ou après polymérisation, par une fonction azide.

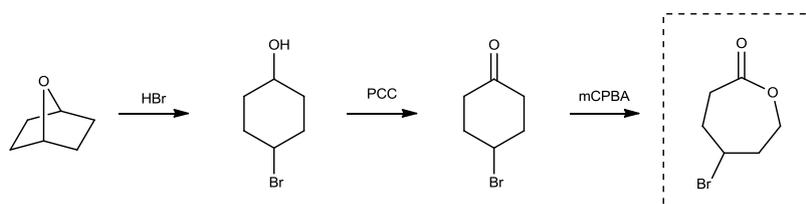


Schéma I.32 : ϵ -caprolactone substituée en γ

Les monomères γ substitués sont généralement plus difficiles à obtenir et les rendements sont plus faibles que les monomères α substitués, C'est pourquoi la littérature est plus riche en exemple d' ϵ CL substitué en α .

Les ϵ CL substituées en α , peuvent être obtenues en seulement une étape par oxydation au mCPBA d'une cyclohexanone substituée en α (Schéma I.33). Ainsi l' α -chloro- ϵ CL peut être obtenue par oxydation de l' α -chloro-cyclohexanone commerciale et le chlorure est facilement substituable avant ou après la polymérisation. De même, on retrouve des monomères substitués par des bromures ou des iodures en position α . Ces monomères d'halogénure peuvent être ensuite substitués par des fonctions azide avant ou après fonctionnalisation. De la même manière, une grande variété de monomères peut être obtenue directement par des

dérivés de cyclohexanone substituée en α . C'est le cas des ϵ CL substituées par des fonctions propargyle.^[139-143]

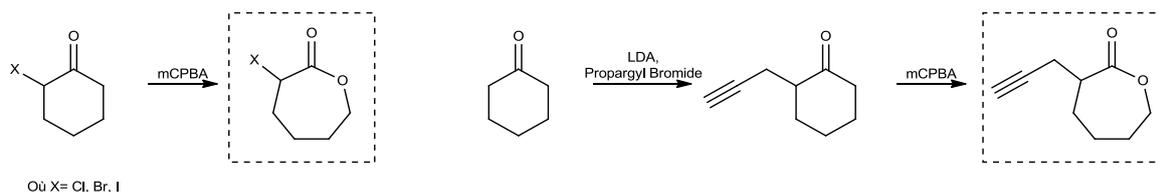


Schéma I.33 : ϵ -caprolactone substituée en α

Couramment, les dérivés en α sont privilégiés par rapport aux résidus en γ , car ils sont généralement plus simples à synthétiser et ceci à partir de produits commerciaux. De plus, en raison de l'effet inductif attracteur des substituants en α , en particulier dans le cas des α -halogénure d' ϵ CL, la lactone s'ouvre plus facilement, et donc la polymérisation est plus facile. Les conditions de polymérisation sont identiques à celles décrites par l'homopolymérisation de l' ϵ CL.

Jazkewitsch *et al.*^[141] ont fonctionnalisé la PCL avec des groupements alcyne et ont utilisé les dérivés azide comme greffons. La PCL modifiée est obtenue par copolymérisation d'un mélange d' α -propargyl- ϵ CL et d' ϵ -propargyl- ϵ CL en présence d' ϵ CL. (Schéma I.34). Les monomères fonctionnalisés sont un mélange d'isomères non-séparables obtenus par oxydation au mCPBA du 2-prop-2-ynyl-cyclohexanone. Cependant la copolymérisation avec de ϵ CL permet d'obtenir une PCL substituée en α ou en ϵ par des groupements propargyle.

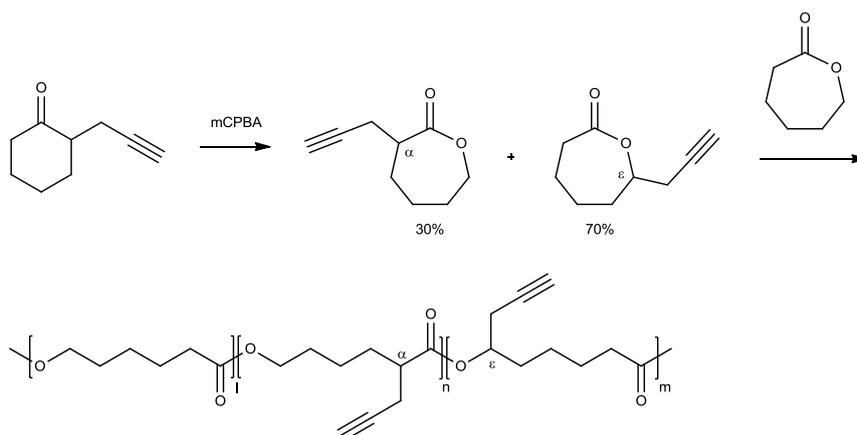


Schéma I.34 : Synthèse de la PCL fonctionnalisée par des groupements alcyne

Cependant la voie la plus simple, la plus employée et la plus contrôlable pour obtenir des PCL greffées est d'utiliser des poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL) obtenue par copolymérisation de l' ϵ CL

et de l' α -azido- ϵ CL (Schéma I.35). Ainsi *via* la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, il est possible de greffer une grande variété de macromolécules pourvues d'une fonction alcyne.

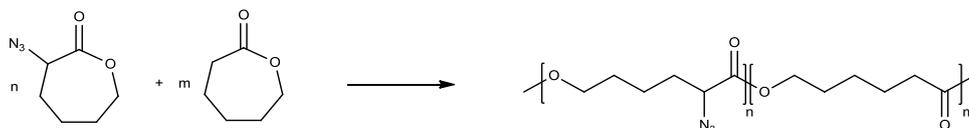


Schéma I.35 : Synthèse de la PCL fonctionnalisée par des groupements azide

Via cette stratégie, Riva *et al.*^[144] ont synthétisé une série de poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL) et qui ont été ensuite greffées par cycloaddition de Huisgen à de nombreux substituants. Ceux-ci de natures différentes : aromatiques, aliphatiques, chargées ou neutres, montrent que cette technique est utilisable pour beaucoup de molécules de faibles tailles.

Freichels *et al.*^[145] ont synthétisé des poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL) de masse de 17000 g.mol⁻¹ avec une fraction molaire en α N₃ ϵ CL de 1,3, 2,0 et 3,4%. Ces PCL sont ensuite greffées par chimie « click » avec des α -acétal-PEG- ω -alcyne. La micellisation des copolymères est alors observée. Les groupes acétal du copolymère greffé sont ensuite déprotégés, laissant place à des fonctions aldéhyde. Ces derniers sont ensuite utilisés pour fixer des monomères de mannose, capable de reconnaître les cellules dendritiques et les macrophages.

Guillerm *et al.*^[143] ont synthétisé sur un squelette de poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL) de masse de 10000 g.mol⁻¹ et 19000 g.mol⁻¹ de fraction molaire en fonction azide, respectivement de 24% et 48%. De la poly(oxazoline), un polymère hydrophile, fonctionnalisée par leur extrémité par une fonction alcyne est greffée par cycloaddition de Huisgen. Le copolymère greffé ainsi obtenu forme des particules de 35 à 40 nm en phase aqueuse.

I.4.3.2.b Modification en position anomère des COs

Afin de préserver les amine de la chitine et du chitosane tout en contrôlant le taux de substitution, la stratégie la plus appropriée consiste à fonctionnaliser leur extrémité réductrice, appelé aussi la position anomère. Cette dernière, de par sa fonction hémiacétalique est considérée comme un aldéhyde masqué. Différentes techniques de conjugaisons directes en position anomère existent. Dans cette partie, par homologie avec la description de la fonctionnalisation des PCL, nous nous intéresserons uniquement au moyen d'insérer directement des fonctions azide ou alcyne en position anomère.

Parmi celles-ci, on trouve la formation d'hydrazone, de thiazolidine, d'oxime, ceto-hydrazone, l'insertion d'azide, de γ -lactame (Schéma I.36). Dans cette partie, nous nous

focaliserons sur les données de la littérature relatant la fonctionnalisation directe de *N*-acétylglucosamine.^[146]

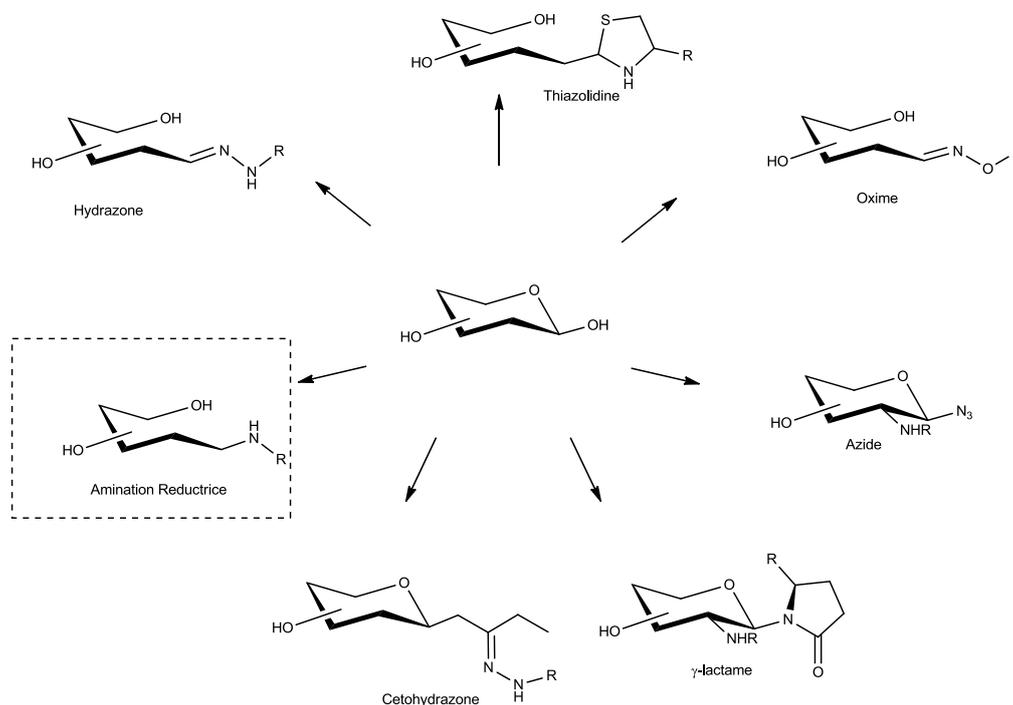


Schéma I.36 : Conjugaisons en position anomérique

La fonctionnalisation de l'extrémité anomère *via* la formation de lactame sur un résidu *N*-acétylglucosamine montre un rendement inférieur à 15%.^[147] L'utilisation d'oxime est plus efficace mais est extrêmement sensible à tout contaminant type aldéhyde ou cétone de l'environnement, ce qui complique son usage et réduit fortement les rendements. De plus, ce type de lien est réversible et sensible à l'hydrolyse acide, tout comme les hydrazones.^[148-149] L'utilisation de chlorure de 2-chloro-1,3-diméthylimidazolium (DMC) pour insérer un groupement azide en position anomère est incompatible avec les oligosaccharides comportant une fonction carboxylique ou aminé et nécessite une grande quantité de sels et de bases compliquant ainsi la purification du produit final.^[150]

La stratégie d'amination réductrice est déjà très largement utilisée pour réaliser des glycoconjugués avec des protéines^[151-152], des fluorophores^[153-154] ou des petites molécules organiques^[155], avec un large choix de solvants et de réducteurs.^[156] De plus, elle n'introduit pas de nouveau centre stéréogène. L'amination réductrice est facilement adaptable à l'échelle préparative et applicable à des oligomères chargés.^[157] Notons toutefois qu'elle ne préserve pas le cycle pyranique de l'extrémité réductrice. L'oligomère ainsi fonctionnalisé perd virtuellement un monomère.

I.5 Conclusion

D'après cette étude bibliographique, il est avéré que les PCL ainsi que les COs sont des polymères biocompatibles. De plus, les COs présentent un large panel d'activités biologiques, ce qui augmente l'intérêt porté aux polysaccharides. Cela confirme que ce couple est un bon candidat pour réaliser des nanoparticules pour la vectorisation de PA.

La littérature contient de nombreux exemples de COs greffés par des PCL, cependant les approches de greffage de type « from » ne garantissent pas un bon contrôle de la taille des greffons de PCL et induisent une dispersité trop élevée. Le couplage de type « onto » permet un meilleur contrôle de la taille des PCL, mais le site de couplage sur les COs n'est pas très bien contrôlé, et ne préserve que partiellement les amine primaires. A notre connaissance, il n'existe pas d'exemple de PCL greffées par des COs

Parmi les essais de vectorisation et de relargage spécifique, l'utilisation du gradient de concentration de GSH entre des cellules cancéreuses et des cellules saines est un bon stimulus pour réaliser un relargage spécifique des molécules anticancéreuses. L'insertion de ponts disulfure sensibles au GSH dans le nanogel permet d'exploiter cette caractéristique.

A partir de ces constats, ce projet a consisté à développer une structure originale afin de créer des nanogels : un copolymère PCL-g-COs par un couplage de type « onto ». Lors de la synthèse, la taille de la chaîne de PCL ainsi que le taux de substitution latérale en fonction azide ont été maîtrisés. Les COs couplés latéralement au polyester par chimie « click », ont été fonctionnalisés en position anomère par un groupement alcyne, afin de préserver les amine libres garantes de l'activité biologique. Les PCL-g-COs ont ensuite formé des particules qui ont été stabilisées par un agent réticulant comportant des liaisons disulfure. Des tests d'encapsulation de PA et de libération d'un principe anticancéreux ont ensuite été effectués.

Références bibliographiques

- [1] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1638-1649.
- [2] D. L. O. Wichterle, *Nature* **1960**, *185*, 117–118.
- [3] K. Raemdonck, J. Demeester, S. De Smedt, *Soft Matter* **2009**, *5*, 707-715.
- [4] A. V. Kabanov, S. V. Vinogradov, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 5418-5429.
- [5] A. S. Hoffman, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 3-12.
- [6] S. V. Vinogradov, T. K. Bronich, A. V. Kabanov, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 135-147.
- [7] M. M. Yallapu, M. Jaggi, S. C. Chauhan, *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 457-463.
- [8] P. J. Flory, *Journal of Chemical Physics* **1950**, *18*, 108–111.
- [9] J. R. P.J. Flory, *Journal of Chemical Physics* **1943**, *11*, 521-526.
- [10] Y. L. Khmelnsky, I. N. Neverova, A. V. Gedrovich, V. A. Polyakov, A. V. Levashov, K. Martinek, *European Journal of Biochemistry* **1992**, *210*, 751-757.
- [11] C. Donini, D. N. Robinson, P. Colombo, F. Giordano, N. A. Peppas, *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, *245*, 83-91.
- [12] P. Lemieux, S. V. Vinogradov, C. L. Gebhart, N. Guerin, G. Paradis, H. K. Nguyen, B. Ochiatti, Y. G. Suzdaltseva, E. V. Bartakova, T. K. Bronich, Y. St-Pierre, V. Y. Alakhov, A. V. Kabanov, *Journal of Drug Targeting* **2000**, *8*, 91-105.
- [13] S. Vinogradov, E. Batrakova, A. Kabanov, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *16*, 291-304.
- [14] K. Akiyoshi, S. Kobayashi, S. Shichibe, D. Mix, M. Baudys, S. W. Kim, J. Sunamoto, *Journal of Controlled Release* **1998**, *54*, 313-320.
- [15] H. Lee, H. Mok, S. Lee, Y.-K. Oh, T. G. Park, *Journal of Controlled Release* **2007**, *119*, 245-252.
- [16] W. Jin, P. Xu, Y. Zhan, Y. Shen, E. A. Van Kirk, B. Alexander, W. J. Murdoch, L. Liu, D. D. Isaak, *Drug Delivery* **2007**, *14*, 279-286.
- [17] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, D. M. Shin, *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*, 1310-1316.
- [18] H. Maeda, in *Advances in Enzyme Regulation, Vol 41, Vol. 41* (Ed.: G. Weber), Pergamon-Elsevier Science Ltd, Oxford, **2001**, pp. 189-207.
- [19] J.-H. Ryu, S. Bickerton, J. Zhuang, S. Thayumanavan, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1515–1522.
- [20] S. K. Sahoo, V. Labhasetwar, *Molecular Pharmaceutics* **2005**, *2*, 373-383.
- [21] L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. Anderson, S. Hesselwood, P. J. Julyan, R. Poyner, J. Doran, A. M. Young, S. Burtles, D. J. Kerr, I. I. I. C. Canc Res Campaign Phase, *Journal of Clinical Oncology* **2002**, *20*, 1668-1676.
- [22] Y. K. Kim, J. Y. Choi, M. K. Yoo, H. L. Jiang, R. Arote, Y. H. Je, M. H. Cho, C. S. Cho, *Journal of Biotechnology* **2007**, *131*, 353-361.
- [23] S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, M. Amiji, *Journal of Controlled Release* **2008**, *126*, 187-204.
- [24] S. V. Vinogradov, E. Kohli, A. D. Zeman, *Molecular Pharmaceutics* **2005**, *2*, 449-461.

I – Etude Bibliographique

- [25] S. L. Goh, N. Murthy, M. Xu, J. M. J. Fréchet, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 467-474.
- [26] J. K. Oh, D. J. Siegwart, H.-i. Lee, G. Sherwood, L. Peteanu, J. O. Hollinger, K. Kataoka, K. Matyjaszewski, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 5939-5945.
- [27] J.-C. Leroux, E. Allémann, F. De Jaeghere, E. Doelker, R. Gurny, *Journal of Controlled Release* **1996**, *39*, 339-350.
- [28] M. Kumar, *Reactive & Functional Polymers* **2000**, *46*, 1-27.
- [29] C. Becq, P. Labrude, *Revue d'histoire de la pharmacie* **2003**, 61-78.
- [30] A. Odier, in *Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes (Lu dans la séance du 17 Août 1821 de la société d'Histoire Naturelle)*, Edition J. Tatsu, **1823**, pp. 1-16.
- [31] C. Rouget, *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* **1859**, *48*, 792-795.
- [32] F. Hoppe-Seyler, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1894**, *27*, 3329-3331.
- [33] I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Panos, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, *Current Chemical Biology* **2009**, *3*, 203-230.
- [34] T. Wang, M. Turhan, S. Gunasekaran, *Polymer International* **2004**, *53*, 911-918.
- [35] M. Rinaudo, G. Pavlov, J. Desbrières, *Polymer* **1999**, *40*, 7029-7032.
- [36] B. Wolfram, S. John, C. Brian, in *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, CRC Press, **2010**, pp. 11-23.
- [37] N. Nitar, F. Tetsuya, T. Hiroshi, in *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, CRC Press, **2010**, pp. 3-10.
- [38] N. Acosta, C. Jimenez, V. Borau, A. Heras, *Biomass & Bioenergy* **1993**, *5*, 145-153.
- [39] D. Kafetzopoulos, A. Martinou, V. Bouriotis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, *90*, 2564-2568.
- [40] C. Alfonso, O. M. Nuero, F. Santamaría, F. Reyes, *Current Microbiology* **1995**, *30*, 49-54.
- [41] I. Tsigos, V. Bouriotis, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 26286-26291.
- [42] E. Samain, S. Drouillard, A. Heyraud, H. Driguez, R. A. Geremia, *Carbohydrate Research* **1997**, *302*, 35-42.
- [43] K. M. Varum, M. H. Ottoy, O. Smidsrod, *Carbohydrate Polymers* **2001**, *46*, 89-98.
- [44] S. T. Horowitz, S. Roseman, H. J. Blumenthal, *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79*, 5046-5049.
- [45] A. Domard, N. Cartier, *International Journal of Biological Macromolecules* **1989**, *11*, 297-302.
- [46] P. R. Austin, C. J. Brine, J. E. Castle, J. P. Zikakis, *Science* **1981**, *212*, 749-753.
- [47] S. Kataoka, T. Ando, *Kobunshi Ronbunshu* **1979**, *36*, 175-181.
- [48] R. Yamaguchi, Y. Arai, T. Itoh, *Agricultural and Biological Chemistry* **1982**, *46*, 2379-2381.
- [49] T. Inaba, T. Ohgushi, Y. Iga, E. Hasegawa, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1984**, *32*, 1597-1603.

- [50] G. G. Allan, M. Peyron, *Carbohydrate Research* **1995**, 277, 257-272.
- [51] C. Bosso, J. Defaye, A. Domard, A. Gadelle, *Carbohydrate Research* **1986**, 156, 57-68.
- [52] J. Defaye, A. Gadelle, C. Pedersen, *Carbohydrate Research* **1994**, 261, 267-277.
- [53] Y. J. Jeon, F. Shahidi, S. K. Kim, *Food Reviews International* **2000**, 16, 159-176.
- [54] D. Somashekar, R. Joseph, *Bioresource Technology* **1996**, 55, 35-45.
- [55] J. Li, Y. Du, J. Yang, T. Feng, A. Li, P. Chen, *Polymer Degradation and Stability* **2005**, 87, 441-448.
- [56] H. Lin, H. Y. Wang, C. H. Xue, M. Ye, *Enzyme and Microbial Technology* **2002**, 31, 588-592.
- [57] Y. J. Jeon, S. K. Kim, *Carbohydrate Polymers* **2000**, 41, 133-141.
- [58] H. Kuyama, Y. Nakahara, T. Nukada, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydrate Research* **1993**, 243, 1-7.
- [59] M. R. E. Aly, E. S. I. Ibrahim, E. S. H. El Ashry, R. R. Schmidt, *Carbohydrate Research* **2001**, 331, 129-142.
- [60] N. Barroca-Aubry, A. Pernet-Poil-Chevrier, A. Domard, S. Trombotto, *Carbohydrate Research* **2010**, 345, 1685-1697.
- [61] M. Ohmae, S. Fujikawa, H. Ochiai, S. Kobayashi, *Journal of Polymer Science Part A - Polymer Chemistry* **2006**, 44, 5014-5027.
- [62] K. Michinari, K. Atsushi, S. Shin-Ichiro, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2007**, 19, 165-180.
- [63] L. F. Mackenzie, Q. P. Wang, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 5583-5584.
- [64] E. A. Martinez, H. Boer, A. Koivula, E. Samain, H. Driguez, S. Armand, S. Cottaz, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, 74, 89-96.
- [65] S. H. Pangburn, P. V. Trescony, J. Heller, *Biomaterials* **1982**, 3, 105-108.
- [66] E. Khor, L. Y. Lim, *Biomaterials* **2003**, 24, 2339-2349.
- [67] K. Tomihata, Y. Ikada, *Biomaterials* **1997**, 18, 567-575.
- [68] C. Qin, J. Gao, L. Wang, L. Zeng, Y. Liu, *Food and Chemical Toxicology* **2006**, 44, 855-861.
- [69] C. Chatelet, O. Damour, A. Domard, *Biomaterials* **2001**, 22, 261-268.
- [70] S. K. Kim, N. Rajapakse, *Carbohydrate Polymers* **2005**, 62, 357-368.
- [71] K. Tsukada, T. Matsumoto, K. Aizawa, A. Tokoro, R.-s. Naruse, S. Suzuki, M. Suzuki, *Cancer Science* **1990**, 81, 259-265.
- [72] H. Ueno, T. Mori, T. Fujinaga, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 52, 105-115.
- [73] I. M. Helander, E. L. Nurmiäho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller, *International Journal of Food Microbiology* **2001**, 71, 235-244.
- [74] X. F. Liu, Y. L. Guan, D. Z. Yang, Z. Li, K. De Yao, *Journal of Applied Polymer Science* **2001**, 79, 1324-1335.

I – Etude Bibliographique

- [75] S. Roller, N. Covill, *International Journal of Food Microbiology* **1999**, 47, 67-77.
- [76] S. W. Fang, C. F. Li, D. Y. C. Shih, *Journal of Food Protection* **1994**, 57, 136-140.
- [77] Y. Okamoto, K. Kawakami, K. Miyatake, M. Morimoto, Y. Shigemasa, S. Minami, *Carbohydrate Polymers* **2002**, 49, 249-252.
- [78] P. R. Klokkevold, H. Fukayama, E. C. Sung, C. N. Bertolami, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **1999**, 57, 49-52.
- [79] J. Yang, F. Tian, Z. Wang, Q. Wang, Y.-J. Zeng, S.-Q. Chen, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2008**, 84B, 131-137.
- [80] C. M. Lehr, J. A. Bouwstra, E. H. Schacht, H. E. Junginger, *International Journal of Pharmaceutics* **1992**, 78, 43-48.
- [81] M. Roldo, M. Hornof, P. Caliceti, A. Bernkop-Schnurch, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 57, 115-121.
- [82] R. S. Tigli, A. Karakecili, M. Guemesderelioglu, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2007**, 18, 1665-1674.
- [83] F. J. v. Natta, J. W. Hill, W. H. Carothers, *Journal of the American Chemical Society* **1934**, 56, 455-457.
- [84] T. Hayashi, *Progress in Polymer Science* **1994**, 19, 663-702.
- [85] O. Coulembier, P. Degée, J. L. Hedrick, P. Dubois, *Progress in Polymer Science* **2006**, 31, 723-747.
- [86] D. Williams, *Medical device technology* **2003**, 14, 10-13.
- [87] M. F. Meek, K. Jansen, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2009**, 89A, 734-738.
- [88] C. X. F. Lam, D. W. Hutmacher, J.-T. Schantz, M. A. Woodruff, S. H. Teoh, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2009**, 90A, 906-919.
- [89] M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher, *Progress in Polymer Science* **2010**, 35, 1217-1256.
- [90] M. Vert, S. M. Li, G. Spenlehauer, P. Guerin, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1992**, 3, 432-446.
- [91] M. Vert, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2009**, 20, 437-446.
- [92] C. X. F. Lam, S. H. Teoh, D. W. Hutmacher, *Polymer International* **2007**, 56, 718-728.
- [93] H. Dong, H. D. Wang, S. G. Cao, J. C. Shen, *Biotechnology Letters* **1998**, 20, 905-908.
- [94] M. C. Rocca, G. Carr, A. B. Lambert, D. J. Macquerrie, J. H. Clark, in *US Patent, Vol. 6,531,615*, **2003**, p. B2.
- [95] S. M. Thomas, R. DiCosimo, V. Nagarajan, *Trends in Biotechnology* **2002**, 20, 238-242.
- [96] K. M. Stridsberg, M. Ryner, A. C. Albertsson, in *Degradable Aliphatic Polyesters, Vol. 157*, Edition Albertsson A. C., **2002**, pp. 41-65.
- [97] H. R. Kricheldorf, R. Dunsing, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1986**, 187, 1611-1625.

I – Etude Bibliographique

- [98] H. R. Kricheldorf, J. M. Jonte, R. Dunsing, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1986**, *187*, 771-785.
- [99] H. R. Kricheldorf, R. Dunsing, A. Serra, *Macromolecules* **1987**, *20*, 2050-2057.
- [100] H. R. Kricheldorf, I. Kreiser, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1987**, *188*, 1861-1873.
- [101] A. Hofman, R. Szymanski, S. Slomkowski, S. Penczek, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1984**, *185*, 655-667.
- [102] A. Khanna, Y. S. Sudha, S. Pillai, S. S. Rath, *Journal of Molecular Modeling* **2008**, *14*, 367-374.
- [103] X. Deng, M. Yuan, C. Xiong, X. Li, *Journal of Applied Polymer Science* **1999**, *73*, 1401-1408.
- [104] M. L. Yuan, C. D. Xiong, X. M. Deng, *Journal of Applied Polymer Science* **1998**, *67*, 1273-1276.
- [105] A. F. Mingotaud, F. Dargelas, F. Cansell, *Macromolecular Symposia* **2000**, *153*, 77-86.
- [106] G. Z. Rong, M. X. Deng, C. Deng, Z. H. Tang, L. H. Piao, X. S. Chen, X. B. Jing, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1800-1804.
- [107] L. F. Sanchez-Barba, A. Garces, M. Fajardo, C. Alonso-Moreno, J. Fernandez-Baeza, A. Otero, A. Antinolo, J. Tejada, A. Lara-Sanchez, M. I. Lopez-Solera, *Organometallics* **2007**, *26*, 6403-6411.
- [108] I. Barakat, P. Dubois, C. Grandfils, R. Jérôme, *Journal of Polymer Science Part A - Polymer Chemistry* **1996**, *34*, 497-502.
- [109] H. R. Kricheldorf, M. Berl, N. Scharnagl, *Macromolecules* **1988**, *21*, 286-293.
- [110] N. Ropson, P. Dubois, R. Jérôme, P. Teyssie, *Macromolecules* **1994**, *27*, 5950-5956.
- [111] A. Duda, S. Penczek, *Macromolecules* **1995**, *28*, 5981-5992.
- [112] C. Jacobs, P. Dubois, R. Jérôme, P. Teyssie, *Macromolecules* **1991**, *24*, 3027-3034.
- [113] H. R. Kricheldorf, S. Eggerstedt, *Macromolecular Chemistry and Physics* **1998**, *199*, 283-290.
- [114] S. Chatti, H. R. Kricheldorf, *Journal of Macromolecular Science Part A - Pure and Applied Chemistry* **2006**, *43*, 967-975.
- [115] H. Li, R. Riva, R. Jérôme, P. Lecomte, *Macromolecules* **2007**, *40*, 824-831.
- [116] M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, H. B. Lee, *Macromolecular Rapid Communications* **2005**, *26*, 643-648.
- [117] M. Basko, P. Kubisa, *Journal of Polymer Science Part A - Polymer Chemistry* **2006**, *44*, 7071-7081.
- [118] N. Susperregui, D. Delcroix, B. Martin-Vaca, D. Bourissou, L. Maron, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 6581-6587.
- [119] E. A. Appel, V. Y. Lee, T. T. Nguyen, M. McNeil, F. Nederberg, J. L. Hedrick, W. C. Swope, J. E. Rice, R. D. Miller, J. Sly, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 6163-6165.
- [120] H. Kim, J. V. Olsson, J. L. Hedrick, R. M. Waymouth, *ACS Macro Letters* **2012**, *1*, 845-847.
- [121] P. Dubois, N. Ropson, R. Jérôme, P. Teyssie, *Macromolecules* **1996**, *29*, 1965-1975.
- [122] N. Ropson, P. Dubois, R. Jérôme, P. Teyssie, *Macromolecules* **1995**, *28*, 7589-7598.

- [123] L.-Y. Tang, Y.-C. Wang, Y. Li, J.-Z. Du, J. Wang, *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 1095-1099.
- [124] X. Li, X. Kong, S. Shi, X. Wang, Y. Gu, G. Guo, Y. Mao, F. Luo, X. Zhao, Y. Wei, Z. Qian, *Soft Materials* **2010**, *8*, 320-337.
- [125] S. Detchprohm, K. Aoi, M. Okada, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2001**, *202*, 3560-3570.
- [126] H. Feng, C. M. Dong, *Journal of Polymer Science Part A - Polymer Chemistry* **2006**, *44*, 5353-5361.
- [127] R. Jayakumar, H. Tamura, *International Journal of Biological Macromolecules* **2008**, *43*, 32-36.
- [128] K. Duan, H. Chen, J. Huang, J. Yu, S. Liu, D. Wang, Y. Li, *Carbohydrate Polymers* **2010**, *80*, 498-503.
- [129] K. Duan, X. Zhang, X. Tang, J. Yu, S. Liu, D. Wang, Y. Li, J. Huang, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2010**, *76*, 475-482.
- [130] L. Liu, Y. S. Wang, X. F. Shen, Y. Fang, *Biopolymers* **2005**, *78*, 163-170.
- [131] H. J. Yu, W. S. Wang, X. S. Chen, C. Deng, X. B. Jing, *Biopolymers* **2006**, *83*, 233-242.
- [132] S. Zhao, M. K. Lee, J. Lee, *Journal of Macromolecular Science Part A - Pure and Applied Chemistry* **2010**, *47*, 580-587.
- [133] L. Liu, Y. Li, H. Liu, Y. Fang, *European Polymer Journal* **2004**, *40*, 2739-2744.
- [134] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 2004--2021.
- [135] R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2*, 633-645.
- [136] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [137] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [138] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2952-3015.
- [139] R. Riva, L. Chafaqi, R. Jérôme, P. Lecomte, *Arkivoc* **2007**, 292-306.
- [140] T. F. Al-Azemi, A. A. Mohamod, *Polymer* **2011**, *52*, 5431-5438.
- [141] O. Jazkewitsch, A. Mondrzyk, R. Staffel, H. Ritter, *Macromolecules* **2011**, *44*, 1365-1371.
- [142] S. El Habnoui, S. Blanquer, V. Darcos, J. Coudane, *Journal of Polymer Science Part A - Polymer Chemistry* **2009**, *47*, 6104-6115.
- [143] B. Guillerm, V. Darcos, V. Lapinte, S. Monge, J. Coudane, J.-J. Robin, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 2879-2881.
- [144] R. Riva, S. Schmeits, C. Jérôme, R. Jérôme, P. Lecomte, *Macromolecules* **2007**, *40*, 796-803.
- [145] H. Freichels, D. Alaimo, R. Auzély-Velty, C. Jérôme, *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 1740-1752.
- [146] N. P. J. Price, M. J. Bowman, S. Le Gall, M. A. Berhow, D. F. Kendra, P. Lerouge, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 2893-2899.
- [147] S. Cottaz, B. Brasme, H. Driguez, *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267*, 5593-5600.

I – Etude Bibliographique

- [148] J. M. Langenhan, N. R. Peters, I. A. Guzei, M. Hoffmann, J. S. Thorson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 12305-12310.
- [149] J. Kalia, R. T. Raines, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 7523-7526.
- [150] T. Tanaka, H. Nagai, M. Noguchi, A. Kobayashi, S.-i. Shoda, *Chemical Communications* **2009**, 3378-3379.
- [151] R. Roy, E. Katzenellenbogen, H. J. Jennings, *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **1984**, *62*, 270-275.
- [152] J. C. Gildersleeve, O. Oyelaran, J. T. Simpson, B. Allred, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 1485-1490.
- [153] S. Hase, T. Ikenaka, Y. Matsushima, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1978**, *85*, 257-263.
- [154] K.-B. Lee, A. Al-Hakim, D. Loganathan, R. J. Linhardt, *Carbohydrate Research* **1991**, *214*, 155-168.
- [155] S. Broberg, A. Broberg, J. Ø. Duus, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14*, 1801-1805.
- [156] C. Jimenez-Castells, B. Torre, D. Andreu, R. Gutierrez-Gallego, *Glycoconjugate Journal* **2008**, *25*, 879-887.
- [157] K. K. Upadhyay, J. F. Le Meins, A. Misra, P. Voisin, V. Bouchaud, E. Ibarboure, C. Schatz, S. Lecommandoux, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2802-2808.

II MODIFICATIONS CHIMIQUES D'OLIGOMERES DE CHITINE ET DE CHITOSANE

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

Sommaire

<i>II.1</i>	<i>Stratégie de chimie « click »</i>	70
II.1.1	Réactions radicalaires thiol-ène et thiol-yne	70
II.1.2	Cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par du cuivre I (CuAAC)	71
<i>II.2</i>	<i>Fonctionnalisation d'un composé modèle : le tétra-N,N^{II},N^{III},N^{IV}-acétyl-chitopentaose (CO-V(N))</i>	71
II.2.1	Caractérisation du CO-V(N)	72
II.2.2	Fonctionnalisation du CO-V(N) par un groupement alcène	75
II.2.3	Fonctionnalisation du CO-V(N) par un groupement alcyne	78
II.2.3.1	Fonctionnalisation du CO-V(N) par amination réductrice	79
II.2.3.2	Fonctionnalisation du CO-V(N) par amination réductrice organocatalysée	83
II.2.4	Valorisation du conjugué CO-V(N) dans un autre contexte	88
II.2.5	Conclusion	90
<i>II.3</i>	<i>Fonctionnalisation d'un chitosane commercial (COs)</i>	90
II.3.1	Caractérisation du COs commercial	90
II.3.2	Fonctionnalisation du COs par un groupement alcyne	92
II.3.3	Fonctionnalisation du COs par la 4-propargyloxyaniline	94
II.3.4	Conclusion	99
<i>II.4</i>	<i>Conclusion</i>	99

Ce travail a pour but de synthétiser des nanogels auto-assemblés constitués de chaînes de PCL fonctionnalisées latéralement par des oligomères de chitine et de chitosane. La PCL hydrophobe servira de charpente aux chitooligosaccharides hydrophiles greffés par chimie « click ». Le choix de la stratégie de greffage va déterminer le type de fonctionnalisation à réaliser sur les oligomères de polysaccharides et sur les PCL.

II.1 Stratégie de chimie « click »

Les nombreux avantages de la chimie « click » ont déjà été développés dans la partie bibliographique. Dans le cadre de cette synthèse, la chimie « click » essentiellement la CuAAC et les réactions radicalaires thiol-ène et thiol-yne, permettent de greffer la PCL par des oligosaccharides de chitine et de chitosane.

II.1.1 Réactions radicalaires thiol-ène et thiol-yne

Dans le cadre d'une stratégie thiol-ène, les oligomères de chitine et de chitosane peuvent être fonctionnalisés en position anomère par une fonction alcène ou par une fonction thiol. Le laboratoire possède déjà une grande expérience dans la fonctionnalisation directe d'oligosaccharide par de l'allylamine ou de la propargylamine.^[158-159] La stratégie sera donc basée sur des oligomères de chitine et de chitosane modifiés en position anomère par un groupement alcène. Ce choix, impose de synthétiser des PCL portant des fonctions thiol latérales (Figure II.1).

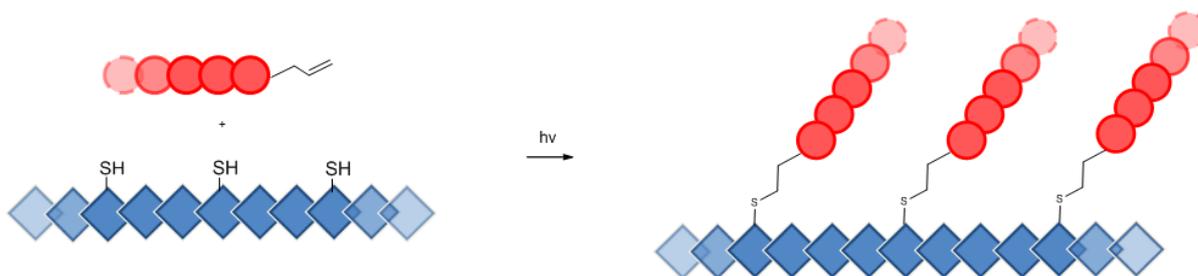


Figure II.1: Stratégie de couplage entre les oligosaccharides et la PCL par chimie click thiol-ène

Par analogie, la stratégie thiol-yne nécessitera un oligosaccharide portant un groupement alcyne qui sera fixé par réaction radicalaire sur une chaîne de PCL présentant des fonctions thiol (Figure II.2). De plus, ce choix de fonctionnalisation des oligomères de chitine et de chitosane par des groupes alcyne leur permet d'être aussi employés dans la cycloaddition de Huisgen (Figure II.3).

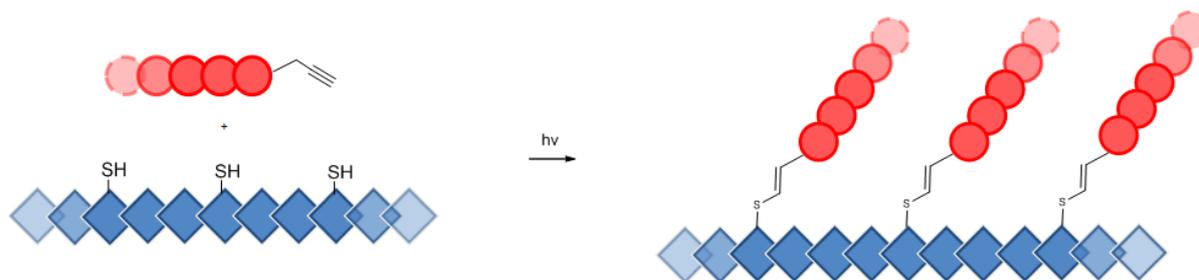


Figure II.2: Stratégie de couplage entre les oligosaccharides et la PCL par chimie click thiol-yne

II.1.2 Cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par du cuivre I (CuAAC)

Les oligosaccharides peuvent être fonctionnalisés soit par une fonction azide ou par une fonction alcyne pour pouvoir être utilisés en chimie «click» CuAAC. De même que précédemment, du fait de l'expérience du laboratoire, la modification directe en position anomère des oligomères de chitine et de chitosane par une fonction alcyne est le meilleur choix. De plus, les PCL greffées latéralement par des groupes azide sont parfaitement décrits dans la littérature.^[144]

La stratégie sera donc orientée vers la fonctionnalisation des oligomères de chitine et de chitosane par un groupement alcyne et la fonctionnalisation des PCL par des fonctions azide (Figure II.3).

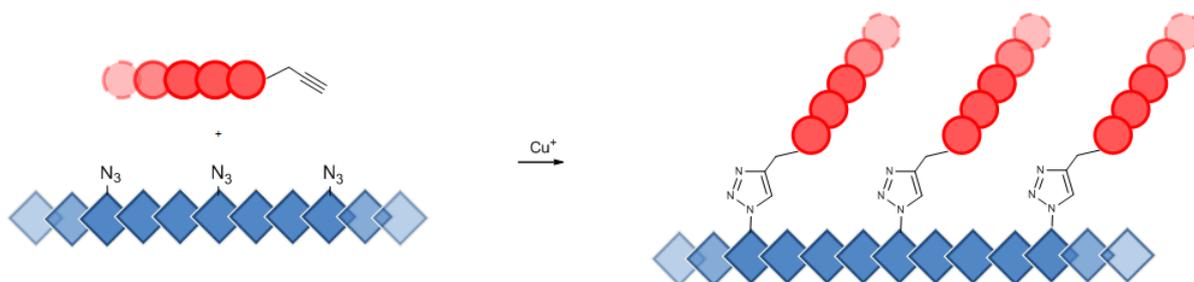


Figure II.3: Stratégie de couplage entre les oligosaccharides et la PCL par CuAAC

II.2 Fonctionnalisation d'un composé modèle : le tétra- $N,N^{\text{II}},N^{\text{III}},N^{\text{IV}}$ -acétyl-chitopentaose (CO-V(N))

Dans le cadre des chimies «click» citées, l'objectif est de synthétiser des dérivés d'oligomères de chitosane fonctionnalisés par un alcène ou par un alcyne. La chimie

employée devra être chimiosélective : elle doit préserver les amine libres ou acétylées des oligomères de chitine et chitosane, et être centrée sur la position anomère.

II.2.1 Caractérisation du CO-V(N)

Dans un premier temps, les conditions d'amination réductrice ont été mises au point en utilisant la structure parfaitement définie du tétra- $N,N^{\text{II}},N^{\text{III}},N^{\text{IV}}$ -acétyl-chitopentaose (CO-V(N)) (Schéma II.1) afin de faciliter d'une part l'étape de purification et d'autre part la caractérisation (RMN et SM).des oligomères. L'ensemble des tests de fonctionnalisation du chitopentaose a été réalisé à partir d'un échantillon unique de 10 g.

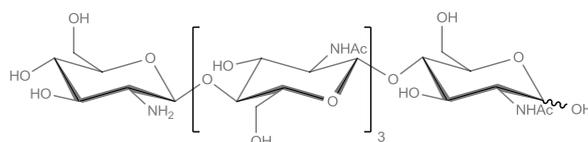


Schéma II.1: Structure du tétra- $N,N^{\text{II}},N^{\text{III}},N^{\text{IV}}$ -acétyl-chitopentaose CO-V(N)

Une caractérisation préliminaire du CO-V(N) a été réalisée par RMN ^1H (Figure II.4) et spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure II.5).

La RMN ^1H confirme la structure du tétra- $N,N^{\text{II}},N^{\text{III}},N^{\text{IV}}$ -acétyl-chitopentaose (Figure II.4).^[42] Le proton H-2^V à 2,84 ppm correspond bien à l'unique résidu glucosaminyle du CO-V(N), ce qui est en accord avec les 12 protons des acétate COCH_3 observés à 2,07 ppm.^b

b. Par convention, les carbones de chaque unité saccharidique sont numérotés en chiffre arabe de 1 à 6, du carbone anomère au carbone portant l'unique alcool primaire. Les protons présentent la même numérotation que le carbone associé. La numérotation en chiffre romain en exposant indique la position de l'unité saccharidique, sachant que l'unité à l'extrémité réductrice est numérotée I. Ainsi, le proton noté H-2^{III} correspond au proton 2 de la troisième unité saccharidique.

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

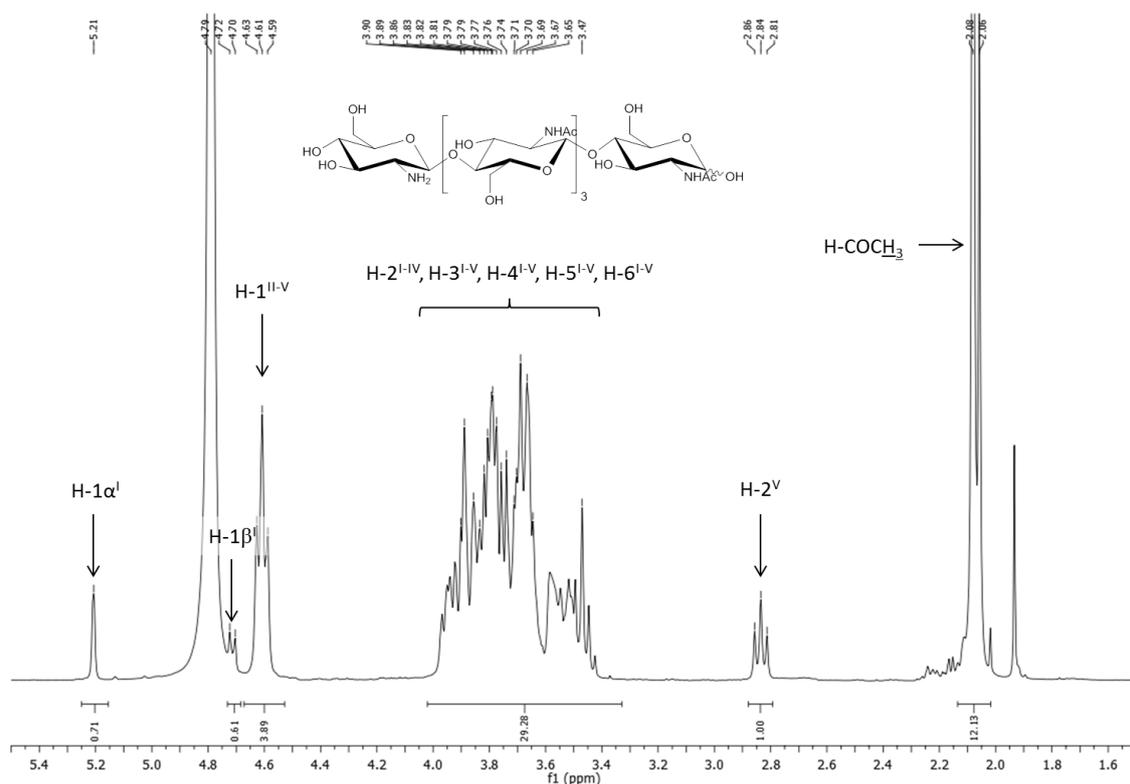


Figure II.4: RMN ^1H du CO-V(N) dans le D_2O

L'échantillon à notre disposition est analysé en SM MALDI-TOF et contient en majorité du tétra- $N,N^{\text{II}},N^{\text{III}},N^{\text{IV}}$ -acétyl-chitopentaose CO-V(N) de masse M (Masse désirée $[\text{M}+\text{H}]^+ = 992,40 \text{ g.mol}^{-1}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1014,39 \text{ g.mol}^{-1}$, $[\text{M}+\text{K}]^+ = 1030,41 \text{ g.mol}^{-1}$), et aussi, quelques traces de penta- $N,N^{\text{II}},N^{\text{III}},N^{\text{IV}},N^{\text{V}}$ -acétyl-chitopentaose noté CO-V(perNAC) de masse M' (Masse désirée $[\text{M}'+\text{Na}]^+ = 1056,42 \text{ g.mol}^{-1}$, $[\text{M}'+\text{K}]^+ = 1072,42 \text{ g.mol}^{-1}$): le dernier intermédiaire métabolique utilisé par *E. coli* dans le cadre de l'usine cellulaire (Figure II.5). Une grande partie du CO-V(perNAC) en excès est extraite de CO-V(N) par chromatographie d'échange d'ions.^[42]

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

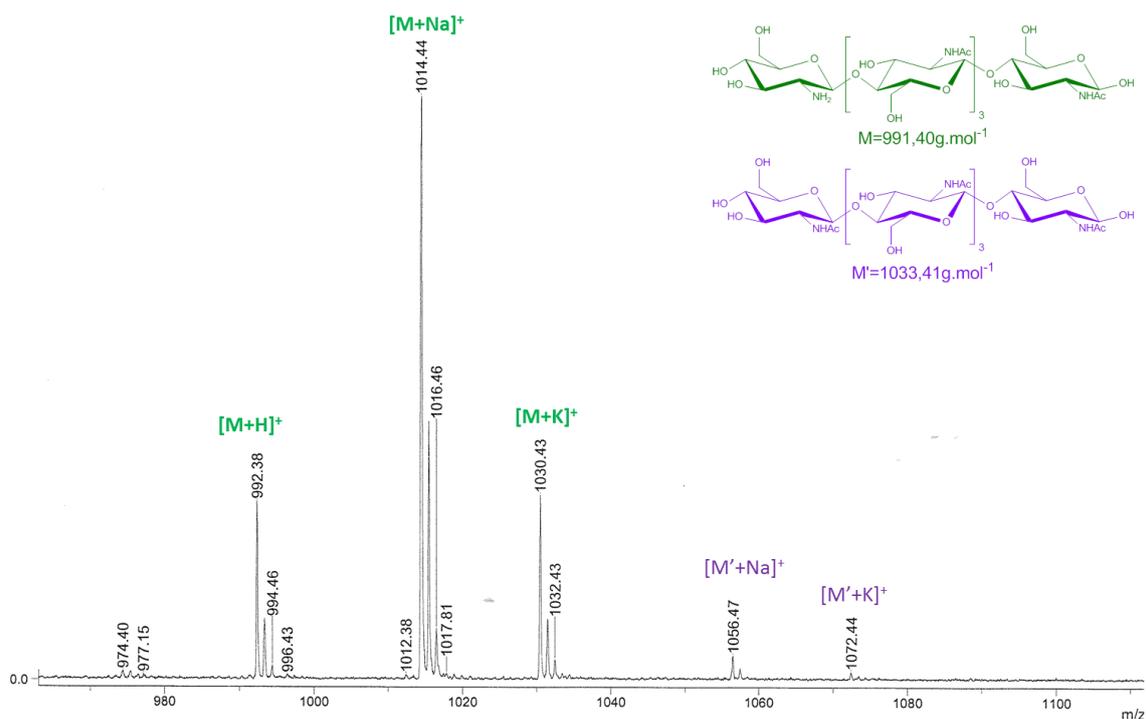


Figure II.5 : Spectre de masse MALDI-TOF du COV-(N)

Cependant une analyse en HPLC en phase inverse C_{18} ne permet pas de déceler les traces de CO-V(perNAc) (Figure II.6). Seuls les anomères α et β du CO-V(N) sont détectés. Le produit est donc considéré comme pur car les traces de CO-V(perNAc) détectées uniquement par SM MALDI-TOF ne sont pas détectées par d'autres techniques analytiques comme l'HPLC ou la RMN ^1H .

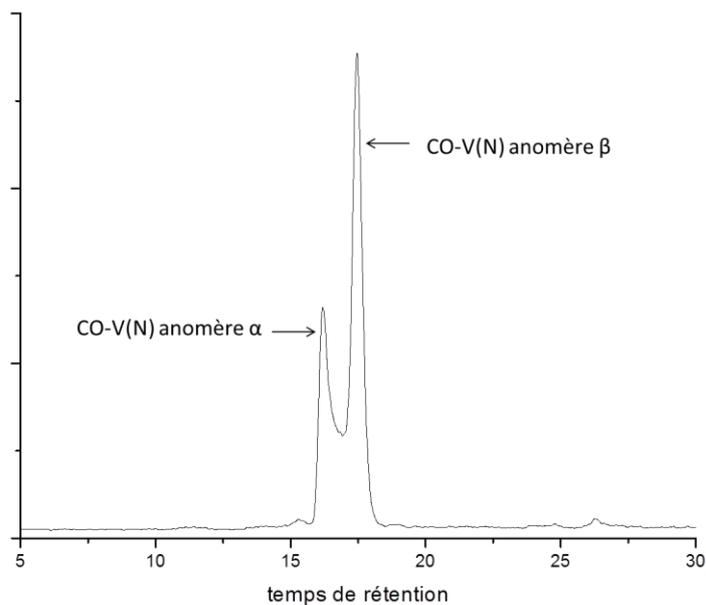


Figure II.6: Chromatogramme HPLC du CO-V(N)

Ce produit modèle à disposition est pur, et sa structure est parfaitement connue. L'étape suivante est la fonctionnalisation en position anomère du CO-V(N) par une fonction « clickable » par amination réductrice.

II.2.2 Fonctionnalisation du CO-V(N) par un groupement alcène

Les fonctionnalisations directes en position anomère (communément utilisées au sein de notre laboratoire) consistent à mettre en présence l'oligosaccharide (xyloglucooligosaccharide, cellobiose...) en présence d'un large excès d'allylamine ou de propargylamine pour former le *N*-glycosylamine.^[158-159] Cependant le produit formé est extrêmement sensible à l'hydrolyse, et doit par conséquent être *N*-acétylé pour générer une espèce stable (Schéma II.2). Cette stratégie est malheureusement incompatible avec les aminosaccharides utilisés dans le cadre de cette étude dans la mesure où la *N*-acétylation n'est pas chimiosélective.

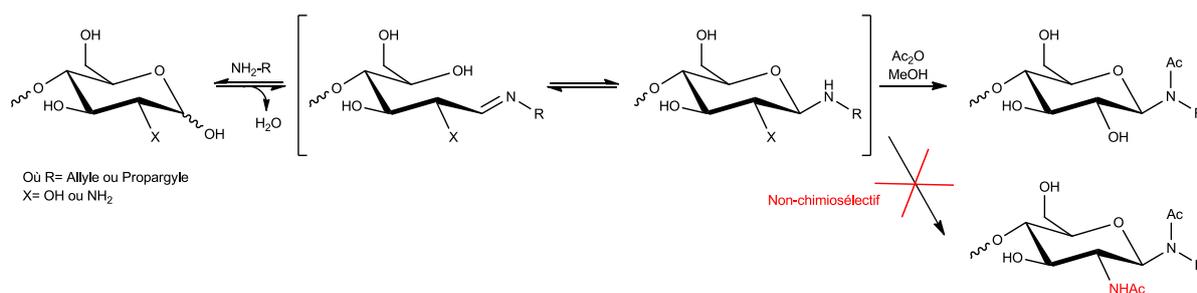


Schéma II.2 : Mécanisme de fonctionnalisation en position anomère par une amine aliphatique

Une autre option est l'amination réductrice qui permet de fonctionnaliser le sucre en position anomère par un donneur d'amine, comme l'allylamine ou la propargylamine. La position anomère est en équilibre entre forme ouverte (aldéhyde) et fermée (α ou β), c'est donc un site réactionnel privilégié. Cette réaction permet de condenser une amine substituée ou non, sur la fonction aldéhyde « masquée » située en position réductrice du sucre. Il y a attaque du groupement carbonyle par l'amine, puis déshydratation pour tendre vers la formation d'une imine. Cette perte de molécule d'eau est favorisée par des pH légèrement acides (pH=3-5) facilitant l'apparition de l'ion oxonium.^[160] L'iminium est ensuite réduit *in situ*, classiquement par un hydrure de bore, le plus commun étant le cyanoborohydrure de sodium (Schéma II.3). Ce réducteur est souvent utilisé pour les réactions d'amination réductrice des sucres car il est soluble et stable dans l'eau jusqu'à un pH=3. De plus, il est sélectif et réduit les fonctions imine de manière privilégiée par rapport aux fonctions aldéhyde.^[161]

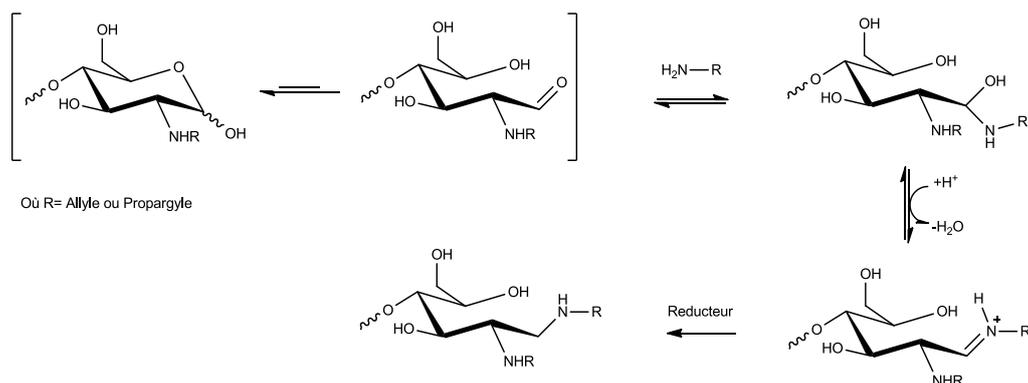


Schéma II.3: Mécanisme d'amination réductrice

Cette réaction est très commune mais son efficacité est très variable en fonction de la nature du saccharide ou du polysaccharide et du degré de polymérisation, et elle est généralement plus efficace pour les faibles degrés de polymérisation ou pour les monosaccharides. L'amination réductrice de sucres et de polysaccharides a fait l'objet d'un grand nombre de travaux mais de façon surprenante celle des chitines et des chitosanes n'est pas décrite dans la littérature. Ce constat trouve probablement son origine dans la faible réactivité générale de la position anomère de cette série de saccharides.^[162]

Le premier essai de fonctionnalisation du CO-V(N) par amination réductrice a été réalisé avec de l'allylamine (Schéma II.4), permettant d'insérer une fonction alcène.

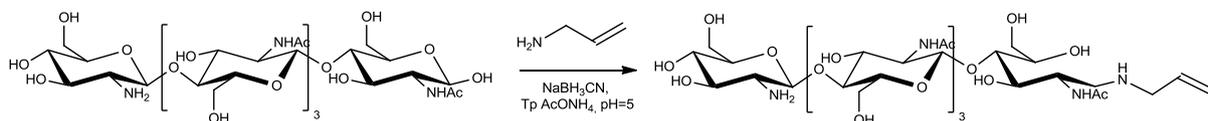


Schéma II.4: Amination réductrice du CO-V(N) par de l'allylamine

Le CO-V(N) a été mis en présence d'un large excès d'allylamine (100 éq) et de cyanoborohydrure de sodium (25 éq) à 50°C pendant 24 H. La réaction a été réalisée en milieu tamponné acétate de sodium, légèrement acide pour faciliter l'étape de déshydratation. Les sels du tampon sont facilement éliminés par dessalage et purification en sep-pack C₁₈, avec une élution de l'eau vers le MeOH.

Le spectre de masse ESI⁺ montre que le conjugué de allyle de CO-V(N) de masse M est formé (Masses observées $[M+2H]^{2+} = 517,3 \text{ g.mol}^{-1}$, $[M+H+Na]^{2+} = 528,2 \text{ g.mol}^{-1}$, $[M+2Na]^{2+} = 539,3 \text{ g.mol}^{-1}$, $[M+Na+K]^{2+} = 547,3 \text{ g.mol}^{-1}$, $[M+2K]^{2+} = 555,3 \text{ g.mol}^{-1}$, $[M+H]^+ = 1033,5 \text{ g.mol}^{-1}$, $[M+Na]^+ = 1055,2 \text{ g.mol}^{-1}$) mais que quelques sous-produits sont présents (Figure II.7). Il semble aussi que le produit forme naturellement beaucoup d'adduits

avec les cations H^+ , Na^+ et K^+ et des ions moléculaires monochargés et dichargés, ce qui rend difficile l'attribution complète des spectrogrammes de masse.

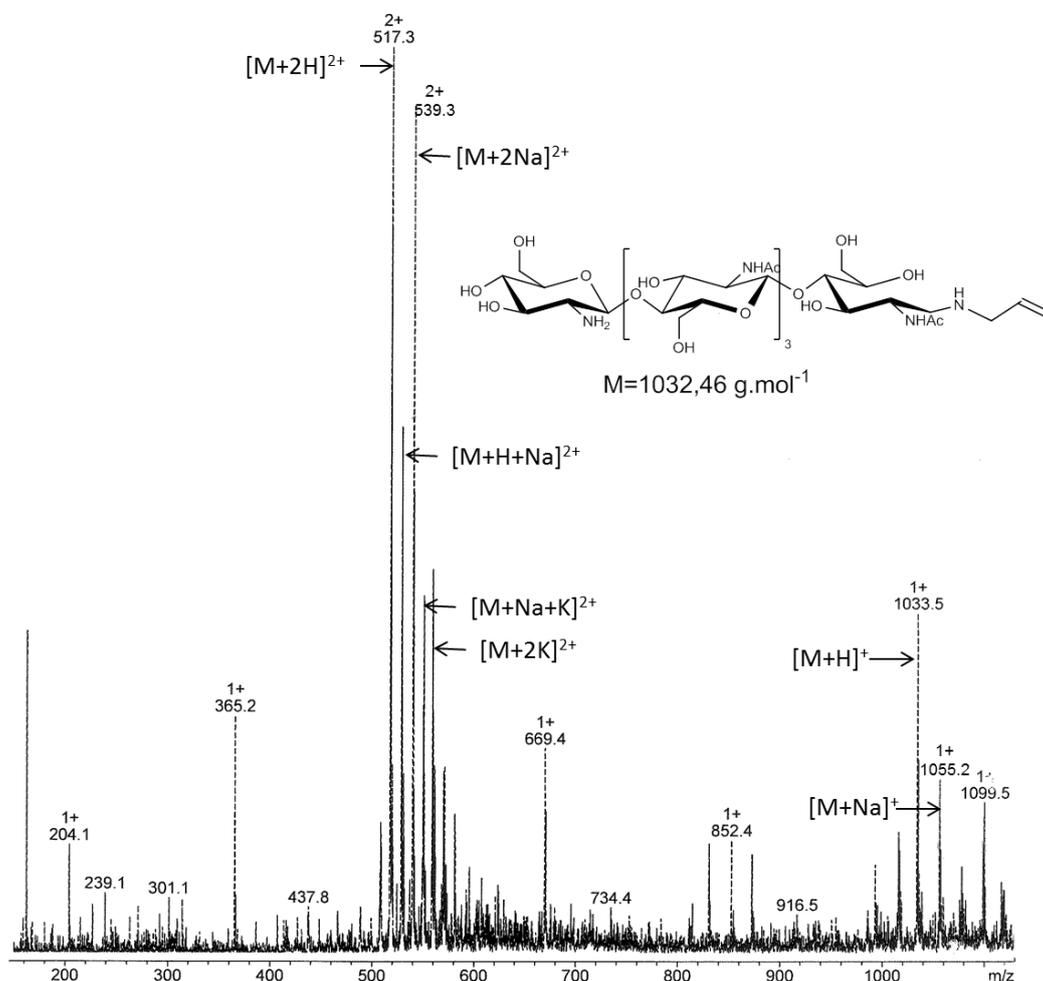


Figure II.7: Spectre de masse ESI⁺ du conjugué allyle de CO-V(N)

Le spectrogramme RMN ¹H de l'allyle de CO-V(N) montre la disparition des protons anomères H-1α¹ et H-1β¹ à 5,21 ppm et 4,72 ppm au profit de l'apparition des protons H-1a¹ et H-1b¹ à 3,09 ppm et 2,95 ppm. Les protons $-CH=$ à 5,90 ppm et $=CH_2$ à 5,35 ppm caractéristiques de l'allyle sont présents. L'ensemble de ces données confirme la structure du composé (Figure II.8).

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

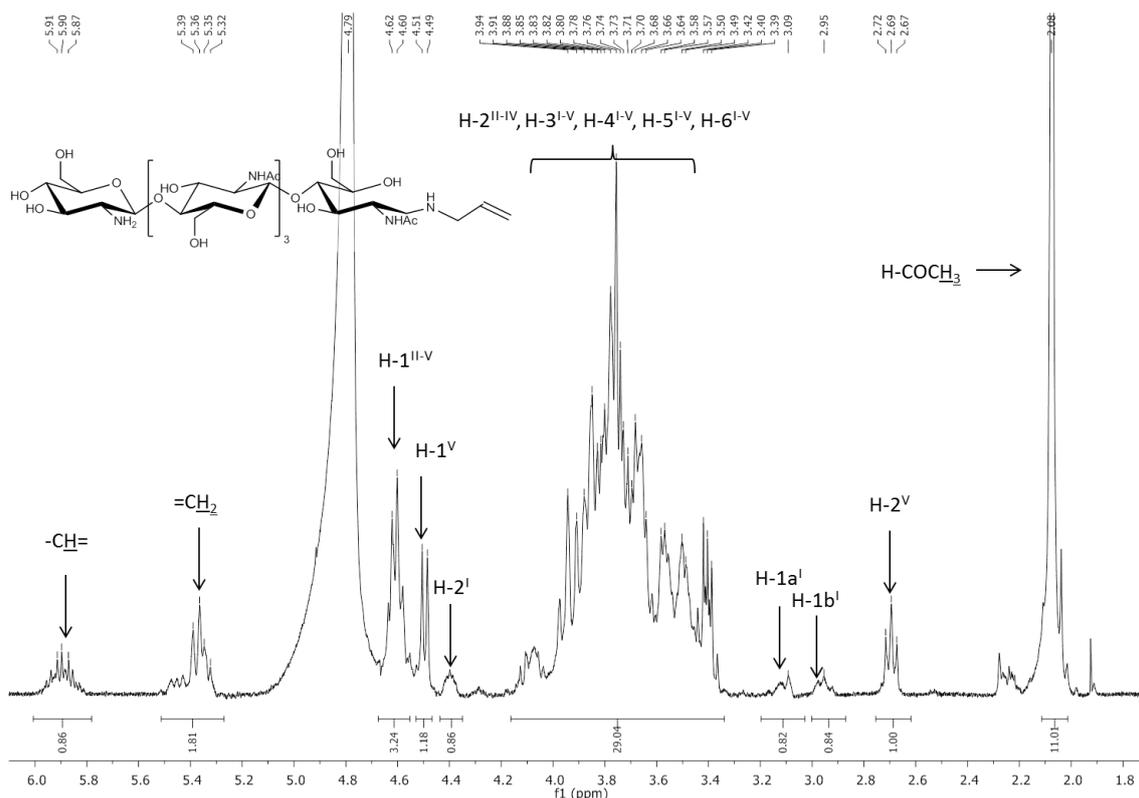


Figure II.8: RMN ^1H du conjugué allyle de CO-V(N) dans le D_2O

Ces conditions ont permis d'obtenir rapidement l'allyle de CO-V(N) mais avec une pureté non satisfaisante. Cependant, la stratégie thiol-ène ayant été par la suite mise de côté au profit de la stratégie CuAAC, chimie maîtrisée au laboratoire, cette première réaction d'amination réductrice a servi de base de travail pour synthétiser le dérivé propargyle de CO-V(N).

II.2.3 Fonctionnalisation du CO-V(N) par un groupement alcyne

La seconde stratégie de fonctionnalisation du CO-V(N) s'est intéressée à l'addition d'un groupement alcyne, permettant à la fois à ce résidu d'être employé dans les stratégies thiol-ène et thiol-yne mais surtout dans la stratégie CuAAC. (Schéma II.5).

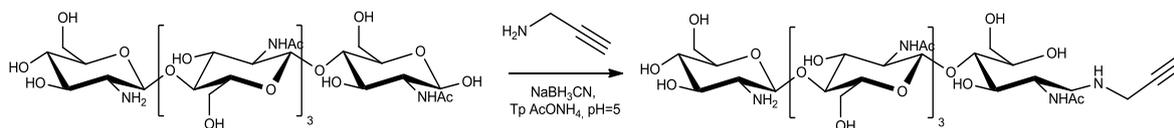


Schéma II.5: Amination réductrice du CO-V(N) par de la propargylamine

II.2.3.1 Fonctionnalisation du CO-V(N) par amination réductrice

Dans un premier temps, les conditions de fonctionnalisation du CO-V(N) par de l'allylamine ont été testées. Les mêmes conditions de temps, de température, et de stœchiométrie ont été expérimentées. Cependant, après un premier essai, une analyse en spectrométrie de masse et en RMN ^1H montre que ces conditions ne sont pas adaptées. Le nombre de produits secondaires est très important et rend difficile l'observation du conjugué propargyle de CO-V(N). Certaines espèces observées dans le brut réactionnel par spectrométrie de masse (Figure II.9) ont été spécifiquement suivies et comparées afin d'orienter l'optimisation de la réaction (nature des réactifs, stœchiométrie, température, temps de synthèse...). Ces espèces sont :

- Le conjugué propargyle de CO-V(N) de masse notée **M** (Masses observées $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1031,48 \text{ g.mol}^{-1}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1053,55 \text{ g.mol}^{-1}$, $[\text{M}+\text{K}]^+ = 1069,56 \text{ g.mol}^{-1}$),
- Le produit de réduction du CO-V(N) de masse notée **M'** (Masse observée $[\text{M}'+\text{Na}]^+ = 1015,51 \text{ g.mol}^{-1}$),
- Le CO-V(N) n'ayant pas réagi. de masse notée **M''** (Masse observée $[\text{M}''+\text{H}]^+ = 992,51 \text{ g.mol}^{-1}$).

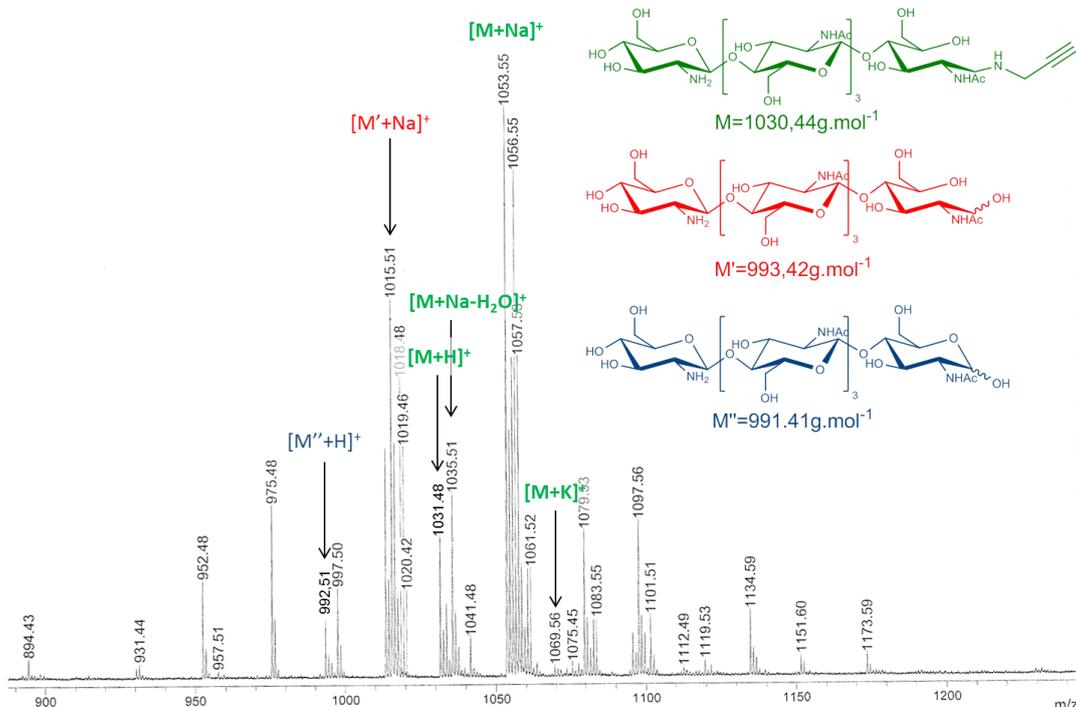


Figure II.9 : Spectre de masse MALDI-TOF d'un brut réactionnel

Durant les différentes optimisations présentées ci-dessous, seules les analyses SM ESI⁺ ou/et SM MALDI-TOF seront discutées de manière qualitative, permettant de valider la présence ou l'absence des espèces clés citées précédemment. Le produit n'a jamais été isolé pur et c'est pourquoi aucun rendement de fonctionnalisation et aucun spectres RMN ne sera présenté.

Pour optimiser les conditions de l'amination réductrice avec la propargylamine, l'influence du temps de réaction a tout d'abord été d'abord étudiée (Tableau II.1).

Essai	Stœchiométrie		Milieu réactionnel	Conditions	M	M'	M''
1	Propargylamine	100 éq	Tampon AcONa, pH=5, 50 mM	24 H à 50°C (Bain Marie)	-	+	+
	NaBH ₃ CN	25 éq					
2	Propargylamine	100 éq	Tampon AcONa, pH=5, 50 mM	48 H à 50°C (Bain Marie)	-	+	+
	NaBH ₃ CN	25 éq					
3	Propargylamine	100 éq	Tampon AcONa, pH=5, 50 mM	72 H à 50°C (Bain Marie)	+	+	+
	NaBH ₃ CN	25 éq					
4	Propargylamine	100 éq	Tampon AcONa,	96 H à 50°C	+	++	-
	NaBH₃CN	25 éq	pH=5, 50 mM	(Bain Marie)			
5	Propargylamine	100 éq	Tampon AcONa, pH=5, 50 mM	120 H à 50°C (Bain Marie)	+	++	-
	NaBH ₃ CN	25 éq					

(x) néant, (-) trace, (+) peu, (++) beaucoup

Tableau II.1: Optimisation des conditions d'amination réductrice du CO-V(N) par contrôle de la cinétique

L'avancement de la réaction a donc été estimé de manière qualitative en SM ESI⁺ et/ou SM MALDI-TOF. Les proportions de conjugué propargyle de CO-V(N) formé semblent augmenter au cours du temps, jusqu'à 4 jours de réaction. Cependant, les proportions de conjugué recherché restent faibles et une quantité très importante de sous-produits inconnus est générée en cours de réaction.

Nous avons ensuite étudié l'influence des rapports CO-V(N)/propargylamine/NaBH₃CN sur la réaction d'amination réductrice afin de limiter notamment la formation du produit de réduction du CO-V(N) de masse notée M' (Tableau II.2).

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

Essai	Stœchiométrie		Milieu réactionnel	Conditions	M	M'	M''
4	Propargylamine	100 éq	Tampon AcONa, pH=5, 50 mM	96 H à 50°C (Bain Marie)	+	++	-
	NaBH ₃ CN	25 éq					
6	Propargylamine	25 éq	Tampon AcONa, pH=5, 50 mM	96 H à 50°C (Bain Marie)	+	++	-
	NaBH ₃ CN	25 éq					
7	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONa, pH=5, 50 mM	96 H à 50°C (Bain Marie)	+	++	-
	NaBH ₃ CN	25 éq					
8	Propargylamine	25 éq	Tampon AcONa, pH=5, 50 mM	96 H à 50°C (Bain Marie)	+	+	-
	NaBH ₃ CN	5 éq					
9	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONa,	96 H à 50°C	+	+	-
	NaBH₃CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Bain Marie)			
10	Propargylamine	2 éq	Tampon AcONa, pH=5, 50 mM	96 H à 50°C (Bain Marie)	-	+	+
	NaBH ₃ CN	5 éq					
11	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONa, pH=5, 50 mM	96 H à 50°C (Bain Marie)	-	-	++
	NaBH ₃ CN	2 éq					

(x) néant, (-) trace, (+) peu, (++) beaucoup

Tableau II.2: Optimisation des conditions d'amination réductrice du CO-V(N) par modification de la stœchiométrie de l'amine et du réducteur

Une comparaison des spectres SM ESI⁺ obtenus dans les conditions indiquées dans le Tableau II.2 met qualitativement en évidence qu'une diminution des proportions de propargyle amine et de NaBH₃CN à 5 équivalents par rapport au CO-V(N) permet de réduire considérablement la présence du sous-produit de réduction de masse M' et d'accroître considérablement la présence du conjugué propargyle de CO-V(N) de masse M. En dessous de deux équivalents de propargylamine ou de NaBH₃CN, l'avancement de la réaction est très faible.

Un premier essai de purification a été réalisé sur le produit obtenu dans les conditions 9 (Tableau II.2). Une purification en chromatographie en phase inverse C₁₈ n'a pas permis d'isoler le produit pur notamment en raison d'une contamination par les sels d'acétate issus du tampon. Pour pallier ces problèmes de dessalage, le tampon acétate de sodium a ensuite été remplacé par l'acétate d'ammonium (Tableau II.3).

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

Essai	Stœchiométrie		Milieu réactionnel	Conditions	M	M'	M''
9	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONa,	96 H à 50°C	+	+	-
	NaBH ₃ CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Bain Marie)			
12	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH₄,	96 H à 50°C	+	+	-
	NaBH₃CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Bain Marie)			

(x) néant, (-) trace, (+) peu, (++) beaucoup

Tableau II.3: Optimisation des conditions d'amination réductrice du CO-V(N) par remplacement du tampon

L'acétate d'ammonium possède en effet la propriété d'être éliminable par une succession de co-évaporation avec de l'eau, facilitant la purification sur chromatographie en phase inverse C₁₈. Malgré tout, bien que les sels soient éliminés, le nombre de sous-produits reste encore trop important et empêche la purification.

Un dernier axe d'optimisation a été l'utilisation d'un réacteur microonde, afin d'éviter la formation de produits secondaires et aussi de réduire le temps de réaction en passant par des températures plus élevées (Tableau II.4). Une corrélation entre le temps de synthèse et la température décrit par David Rudge^[163] appliqué par un réacteur microonde, a permis d'établir un temps de réaction en fonction de la température choisie. Une augmentation de la température significative permet de réduire de manière importante le temps de réaction.

Essai	Stœchiométrie		Milieu réactionnel	Conditions	M	M'	M''
12	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH₄,	96 H à 50°C	+	+	-
	NaBH₃CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Bain Marie)			
13	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH ₄ ,	2 jours à 50°C	-	+	++
	NaBH ₃ CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Microonde)			
14	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH ₄ ,	30 min à 140°C	-	++	+
	NaBH ₃ CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Microonde)			
15	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH ₄ ,	15 min à 150°C	+	++	+
	NaBH ₃ CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Microonde)			
16	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH ₄ ,	7 min à 160°C	+	++	+
	NaBH ₃ CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Microonde)			
17	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH ₄ ,	7 min à 160°C	+	++	+
	NaBH ₃ CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Microonde)			
	Hydroquinone	0,25 éq					

(x) néant, (-) trace, (+) peu, (++) beaucoup

Tableau II.4: Optimisation des conditions d'amination réductrice du CO-V(N) par utilisation d'un réacteur microonde

Malheureusement, ce mode de chauffage est à l'origine d'une augmentation significative du nombre de sous-produit observé en SM ESI⁺ et SM MALDI-TOF. L'ajout d'hydroquinone pour stopper d'éventuelles réactions radicalaires générées par le réacteur, n'ont pas permis de limiter la formation de ces résidus non désirés.

Pour conclure, cette série de tests d'optimisation, suivie essentiellement par spectrométrie de masse, a permis de diminuer le nombre de sous-produits et d'augmenter la proportion en conjugué propargyle de CO-V(N). Malheureusement le composé alcyne pur n'a pas pu être isolé.

II.2.3.2 Fonctionnalisation du CO-V(N) par amination réductrice organocatalysée

La voie d'amination réductrice classique ayant donnée des résultats mitigés, une autre approche a été envisagée en se rapportant à la chimie des liens d'éther d'oxime. En effet, le mécanisme réactionnel de l'amination réductrice (Schéma II.3) est similaire au mécanisme conduisant à la formation des liens éther d'oxime (Schéma II.6). Cette dernière chimie résulte de la condensation d'une oxyamine sur un aldéhyde et non d'une amine sur un aldéhyde. La ressemblance des deux mécanismes, permet d'envisager l'utilisation d'aniline comme organocatalyseur, comme l'ont décrit Dirksen *et al.*^[164] dans le cas de la condensation d'une oxyamine sur un aldéhyde. Ils ont démontré que l'utilisation d'aniline permettait la formation d'un intermédiaire iminium anilique, favorisant la réaction de transimination avec une oxyamine. Dans notre cas, la propargylamine est bien moins nucléophile qu'une oxyamine, mais la formation du conjugué propargyle de CO-V(N) catalysée par de l'aniline est envisageable. En effet, un bon contrôle de la stœchiométrie permettrait de favoriser la transimination en limitant la formation de dérivé CO-V(N) fonctionnalisé par de l'aniline.

La force motrice de cette catalyse repose sur deux caractéristiques de l'aniline. L'aniline ($pK_a=4,62$ ^[165]) est moins basique que la propargylamine ($pK_a=8,2$ ^[166]). Dans les conditions expérimentales, l'aniline est donc contrairement à la propargylamine majoritairement sous sa forme déprotonnée et elle forme donc plus facilement l'intermédiaire iminium que la propargylamine.

Par ailleurs, le pK_a de l'intermédiaire iminium formé par l'aniline est deux unités sous le pK_a de l'amine correspondante soit $pK_a \approx 2,5$. Dans le cas de l'intermédiaire iminium formé par la propargylamine, le pK_a est compris entre 6 et 8.^[167] A pH=5, l'intermédiaire iminium anilique est plus représenté mais il est moins stable que son homologue propargylique.^[168] II

est alors supposé que cette espèce instable favorise un mécanisme de transimination avec la propargylamine, formant un intermédiaire iminium propargyle, plus stable et sous forme majoritairement protoné qui est ensuite réduit par le cyanoborohydrure de sodium.

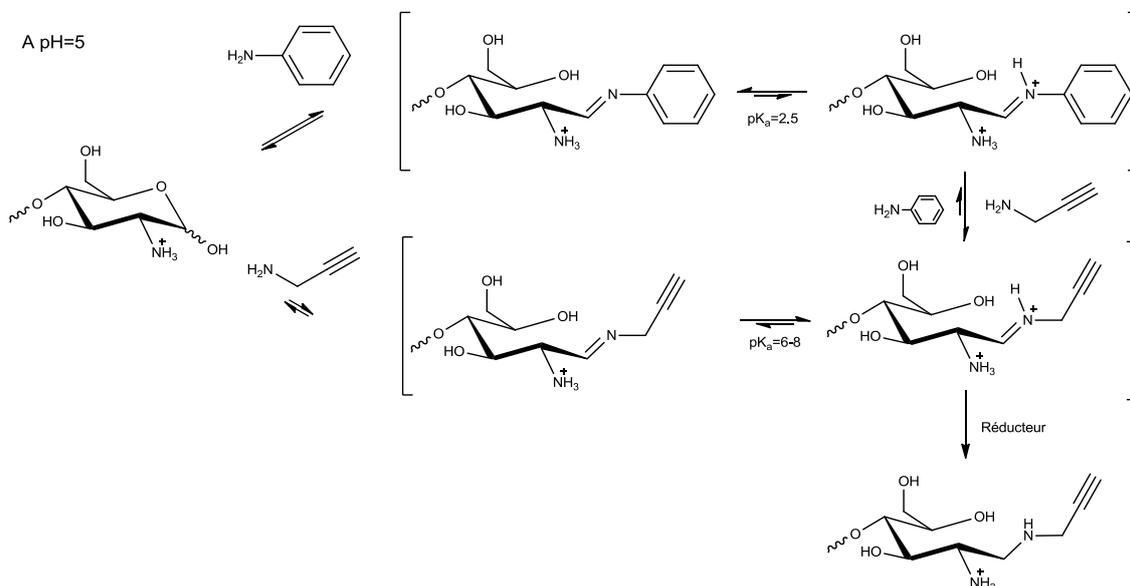


Schéma II.6 : Organocatalyse de l'amination réductrice par l'aniline^[164]

Différents essais sont réalisés en modulant la quantité d'aniline, ces conditions se basent sur l'ensemble des optimisations décrites précédemment (Tableau II.5).

Essai	Stœchiométrie		Milieu réactionnel	Conditions	M	M'	M''	M'''
12	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH ₄ ,	96 H à 50°C	+	+	-	0
	NaBH ₃ CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Bain Marie)				
13	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH ₄ ,	96H à 50°C	+	+	-	-
	NaBH ₃ CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Bain Marie)				
	Aniline	0,05 éq						
14	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH ₄ ,	96H à 50°C	+	-	-	-
	NaBH ₃ CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Bain Marie)				
	Aniline	0,25éq						
15	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH₄,	96H à 50°C	++	x	-	-
	NaBH₃CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Bain Marie)				
	Aniline	0,5 éq						
16	Propargylamine	5 éq	Tampon AcONH ₄ ,	96H à 50°C	+	x	-	++
	NaBH ₃ CN	5 éq	pH=5, 50 mM	(Bain Marie)				
	Aniline	1 éq						

(x) néant, (-) trace, (+) peu, (++) beaucoup

Tableau II.5: Optimisation des conditions d'amination réductrice du CO-V(N) par modification du tampon

Dans les conditions des essais 13, 14 et 15, les spectres de masse des bruts réactionnels sont fortement simplifiés par rapport à la réaction équivalente sans organocatalyse comme dans l'essai 12 (Tableau II.5). Le nombre de sous-produits diminue proportionnellement avec l'augmentation de la quantité d'aniline. Les conditions produisant le minimum de sous-produits sont obtenues avec 0,5 éq d'aniline. Toutefois il est important de noter l'apparition à cette concentration d'une nouvelle population correspondant au CO-V(N) fonctionnalisé par de l'aniline de masse M''' . Ce sous-produit confirme le mécanisme de catalyse par transimination, puisqu'il s'agit de l'intermédiaire iminium anilique qui n'a pas été substitué par de la propargylamine et qui a été ensuite réduit. La concentration critique à ne pas dépasser est de 0,5 éq.

L'analyse par spectrométrie de masse du brut réactionnel montre trois espèces (Figure II.10). Le produit désiré, le conjugué propargyle de CO-V(N) de masse M (Masses observées $[M+H]^+ = 1031,45 \text{ g.mol}^{-1}$, $[M+Na]^+ = 1053,51 \text{ g.mol}^{-1}$ et $[M+K]^+ = 1069,43 \text{ g.mol}^{-1}$) est présent ainsi que le dérivé anilique de masse M''' (Masses observées $[M'''+Na]^+ = 1091,55 \text{ g.mol}^{-1}$ et $[M'''+Na]^+ = 1107,56 \text{ g.mol}^{-1}$). Des traces du produit de départ (Masses observées $[M''+Na]^+ = 1013,54 \text{ g.mol}^{-1}$) sont présentes. Le nombre d'espèces a fortement diminué avec l'emploi de l'aniline comme organocatalyseur (Figure II.10).

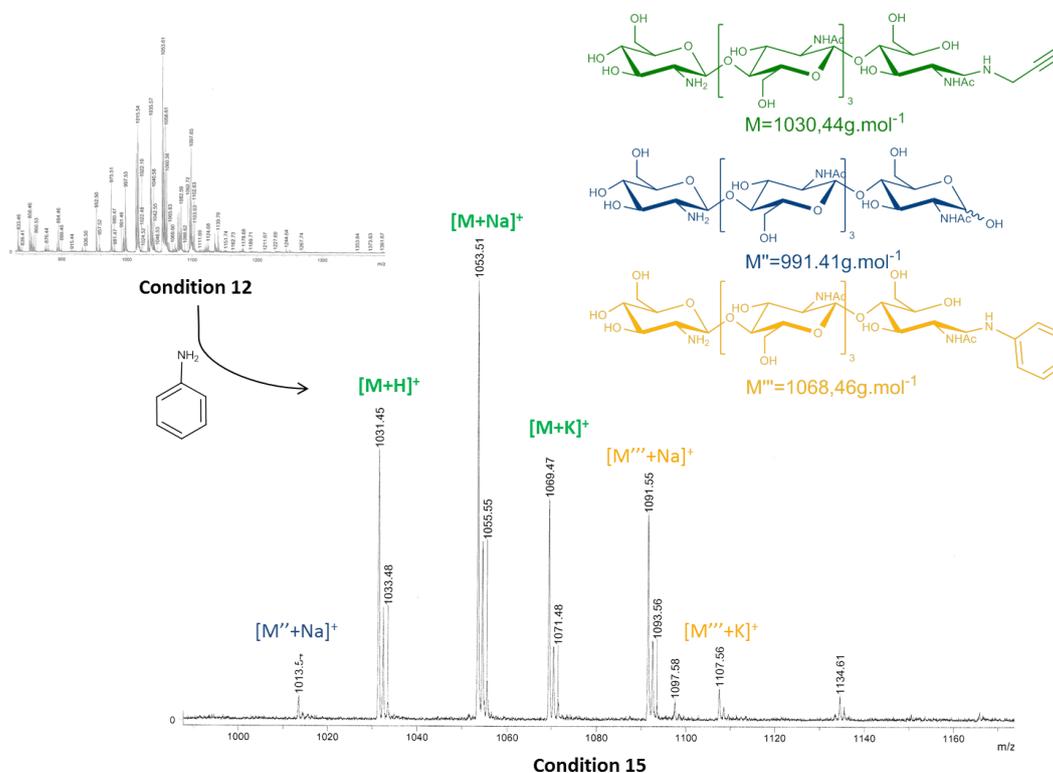


Figure II.10: Spectre de masse MALDI-TOF avec 0,5 éq en aniline du conjugué propargyle de CO-V(N)

La purification est ensuite facilement effectuée par chromatographie flash en phase inverse (Eau/ACN) pour obtenir le produit final avec un rendement de 70%. Le conjugué propargyle de CO-V(N) est ensuite caractérisé par RMN ^1H , RMN ^{13}C , SM MALDI-TOF et SM ESI $^+$.

Le spectrogramme RMN ^1H du propargyle de CO-V(N) confirme la disparition des protons anomères H-1 α^1 et H-1 β^1 à 5,21 ppm et 4,72 ppm et l'apparition des protons du méthylène H-1a 1 et H-1b 1 à 2,96 et 2,77 ppm intégrés chacun pour 1, confirme la réduction. Les protons du groupement propargyle $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv$ se situent dans le multiplet à 4,61 ppm et le proton $\equiv\text{CH}$ dans le massif compris entre 3,20 ppm et 3,95 ppm (Figure II.11).

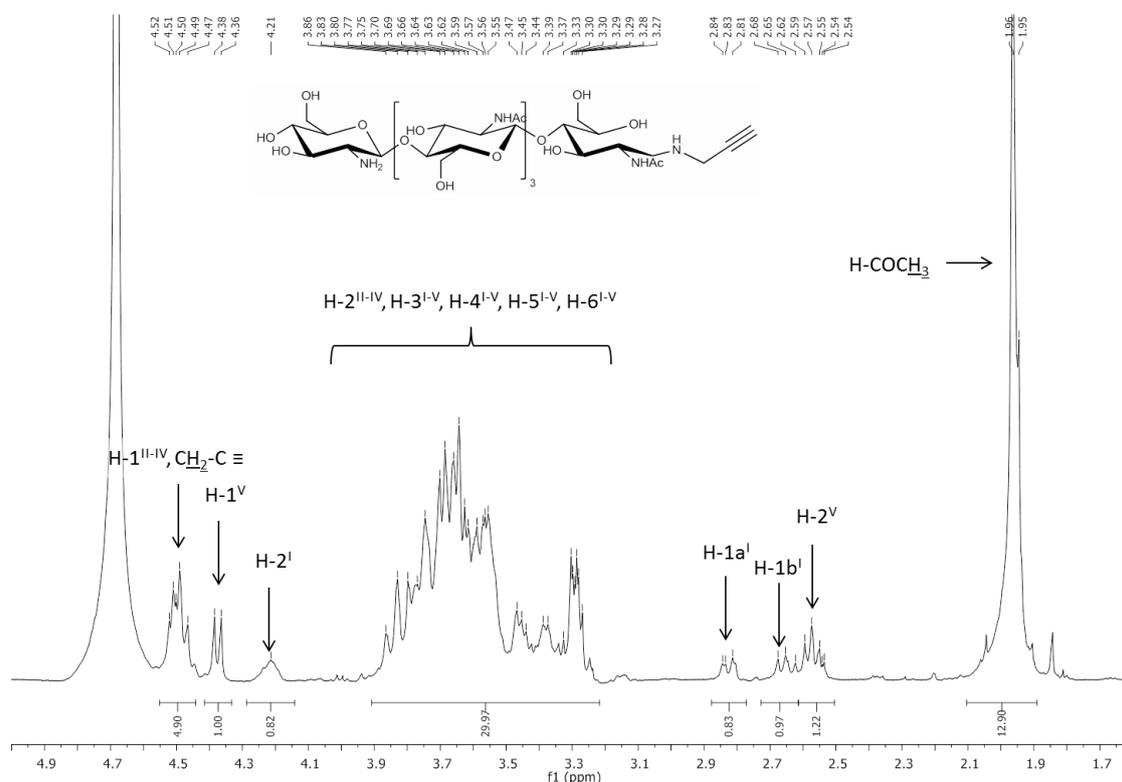


Figure II.11: RMN ^1H du conjugué propargyle de CO-V(N) dans le D_2O

Le couple de carbones à 69,9 ppm et 37,4 ppm montre la présence du groupement propargyle (Figure II.12). Le carbone quaternaire de ce groupement dont le déplacement chimique est généralement de l'ordre de 82 ppm n'apparaît pas en raison de son faible temps de relaxation.

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

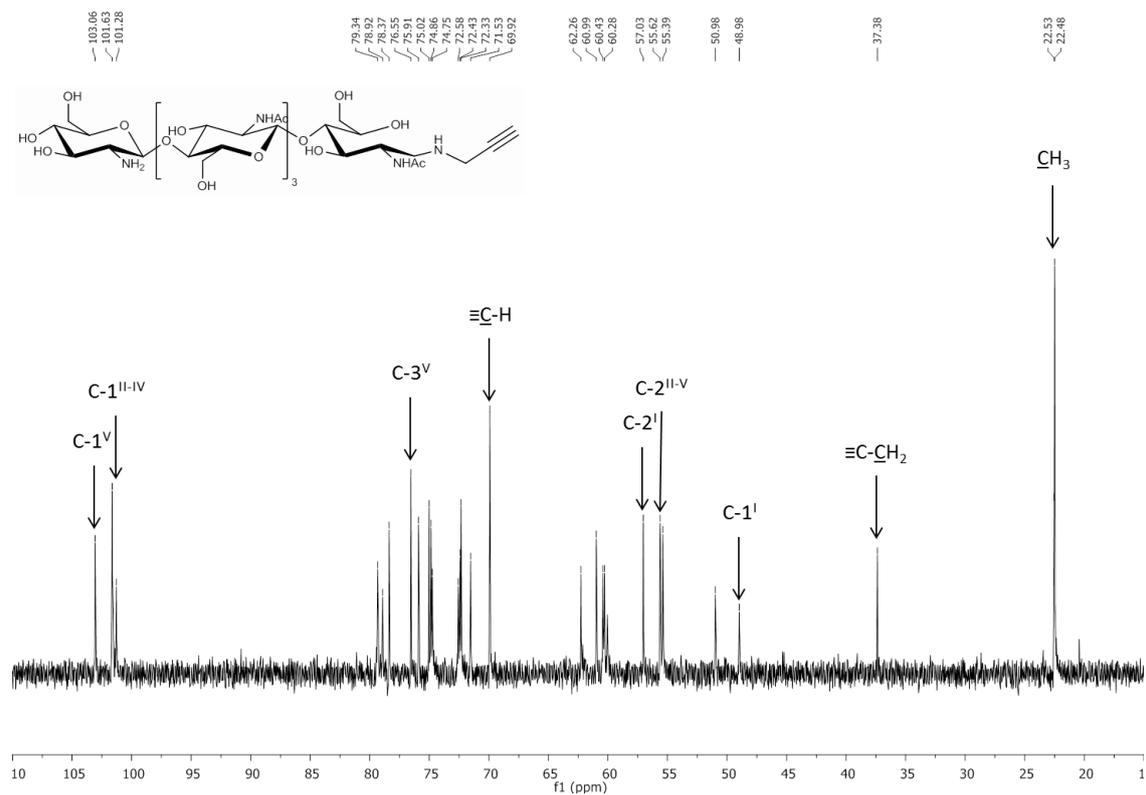


Figure II.12 : RMN ^{13}C du conjugué propargyle de CO-V(N) dans le D_2O

Les résultats en spectrométrie de masse SM MALDI-TOF ont permis d'observer un produit unique correspondant au conjugué propargyle de CO-V(N) (Figure II.13).

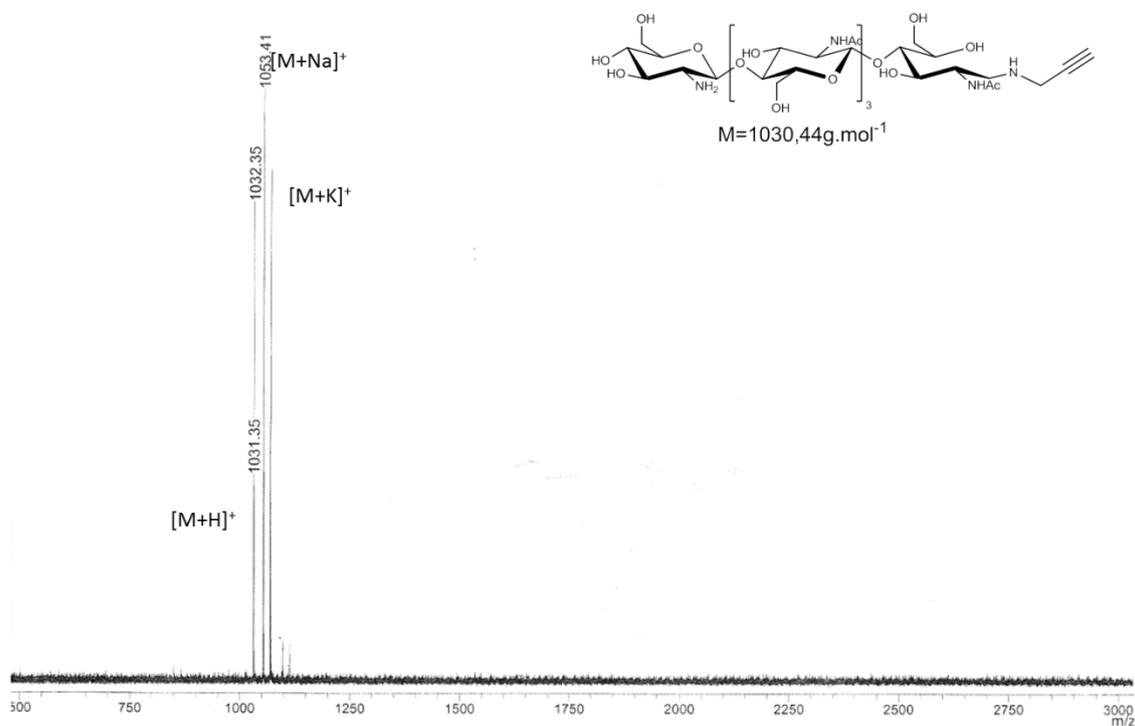


Figure II.13: Spectre de masse MALDI-TOF du conjugué propargyle de CO-V(N)

II.2.4 Valorisation du conjugué CO-V(N) dans un autre contexte

Parallèlement à ce projet de thèse, le dérivé propargyle de CO-V(N) s'est avéré être un bon substrat pour caractériser l'activité enzymatique des chitinases sur les oligomères de chitine. En particulier, il a été développé une sonde fluorescente FRET (Forster Resonance Energy Transfert) pour étudier spécifiquement des *endo*-chitinases capables d'hydrolyser les liaisons glycosidiques internes de la chitine.

Le principe de l'étude FRET est de fonctionnaliser un substrat par un fluorophore à une extrémité et un quencheur capable d'absorber la radiation du fluorophore à l'autre. Cette absorption a lieu uniquement si le couple fluorophore et quencheur est assez proche dans l'espace (moins de 10 nm).^[169] Dans le cas de la sonde FRET native, l'excitation du fluorophore ne permet pas d'observer d'émission. Après hydrolyse par voie enzymatique, le quencheur n'est plus capable d'absorber le rayonnement du fluorophore, et ce dernier peut alors être mesuré par fluorométrie. Il est alors facile d'en déduire l'activité de l'enzyme sur le substrat (Figure II.14).

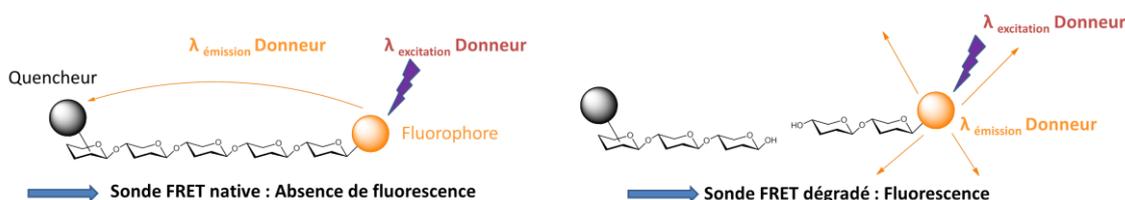


Figure II.14 : Principe de la sonde FRET

Le couple fluorophore/quencheur le plus couramment utilisé est le couple composé du *N*-[[[azidoacétyl)amino]éthyl]-5-naphtylamine-1-sulfonate de sodium (N₃-EDANS) et du 4-diméthylaminoazobenzène-4'-isothiocyanate (DABITC). Le fluorophore N₃-EDANS est excité à une longueur d'onde de 340 nm, il émet alors à 490 nm. Le DABITC est capable d'absorber totalement les émissions de l'EDANS car il possède un coefficient d'absorption molaire de 29000 L⁻¹.mol⁻¹.cm⁻¹ à 490 nm.^[147]

Le conjugué propargyle de CO-V(N) a été fonctionnalisé à son extrémité réductrice par CuAAC par le (N₃-EDANS) dans le DMF catalysée par CuSO₄ en présence d'ascorbate de sodium. L'extrémité non-réductrice a été fonctionnalisée *via* l'amine primaire par le DABITC (Schéma II.7).

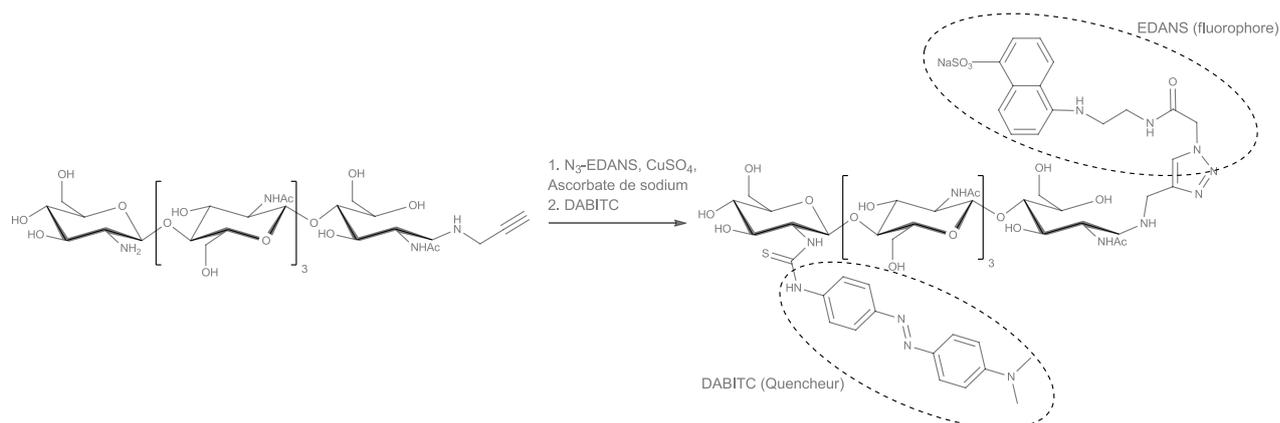


Schéma II.7 : Synthèse de la sonde FRET

Cette sonde FRET a été utilisée comme substrat pour une chitinase A1 issue de *Bacillus circulans*. A la suite de l'ajout de chitinase à une solution contenant le substrat FRET, la fluorescence à 490 nm a été mesurée en fonction du temps (Figure II.15).

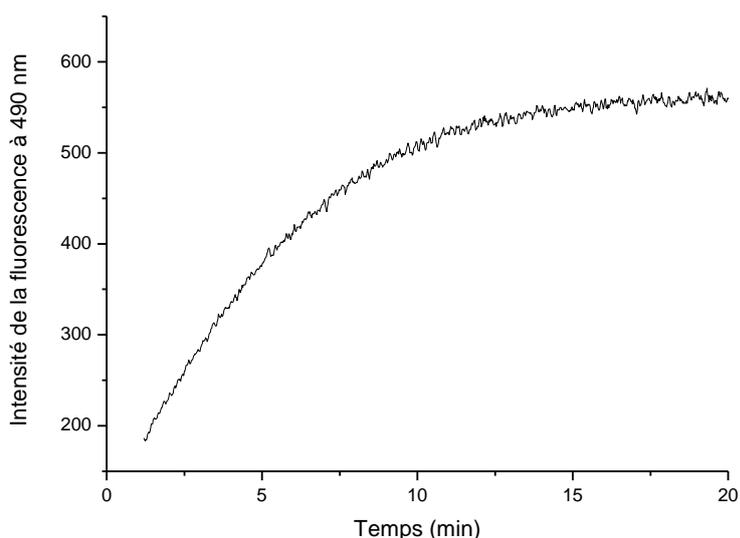


Figure II.15 : Fluorescence à 490 nm de la sonde FRET incubée en présence de chitinase A1 de *B. circulans*

L'apparition et l'augmentation de la fluorescence au cours du temps indique bien que la sonde FRET est reconnue et hydrolysée par la chitinase.

Par cette étude secondaire, nous avons montré que le conjugué propargyle de CO-V(N) pouvait être valorisé dans un autre contexte que celui de cette thèse. Il a été démontré que la chimie CuAAC pouvait être utilisée sur le conjugué. La reconnaissance du CO-V(N) par la chitinase, même après la modification des extrémités, ne semble pas modifier l'interaction oligosaccharides/enzyme. Ce travail a été d'ailleurs soumis à publication.

II.2.5 Conclusion

La fonctionnalisation du chitooligosaccharide CO-V(N) modèle par la propargylamine dans les conditions classiques d'amination réductrice n'a pas permis d'obtenir le conjugué propargyle et ceci même après de nombreuses étapes d'optimisation. Par la suite, nous avons mis en évidence l'efficacité de l'aniline comme organocatalyseur de la réaction d'amination réductrice. Grâce à cette stratégie, nous avons eu accès au conjugué propargyle de CO-V(N) utilisable en CuAAC. Ce dérivé a d'ailleurs été valorisé *via* une étape de CuAAC dans un travail parallèle pour synthétiser une sonde FRET. La synthèse de ce composé modèle, a permis d'acquérir une méthodologie de synthèse et de purification qu'il est intéressant de transposer à des mélanges de chitooligosaccharides commerciaux, disponibles en plus grande quantité.

II.3 Fonctionnalisation d'un chitosane commercial (COs)

Les oligomères de chitosane (COs), commercialisés sous le nom de s-FACOS, présentent l'avantage d'être déjà utilisés pour l'encapsulation d'agents anticancéreux comme le Paclitaxel[®].^[170] Ils sont parfaitement biocompatibles^[171-172] et leur activité biologique est parfaitement connue.^[173] Ces oligomères de chitosane obtenus par hydrolyse enzymatique de chitosane ont l'avantages de ne pas présenter de trace de solvant et de contenir peu de sel.^[174] La fonctionnalisation sera uniquement orientée vers l'obtention d'un COs fonctionnalisé par un groupement propargyle.

II.3.1 Caractérisation du COs commercial

De façon similaire à la méthodologie adoptée pour le CO-V(N), le mélange d'oligomères a tout d'abord été analysé par spectrométrie de masse. Avant d'être caractérisé par SM MALDI-TOF, le COs est préalablement per-*N*-acétylé par de l'anhydride acétique, pour

faciliter la désorption du COs de la matrice polaire DHB. L'ensemble des spectres SM MALDI-TOF des COs ont été réalisés après per-*N*-acétylation.^c

Le COs commercial est composé principalement d'oligomères de DP compris entre 2 et 6 centré sur un DP = 4 (Figure II.16).

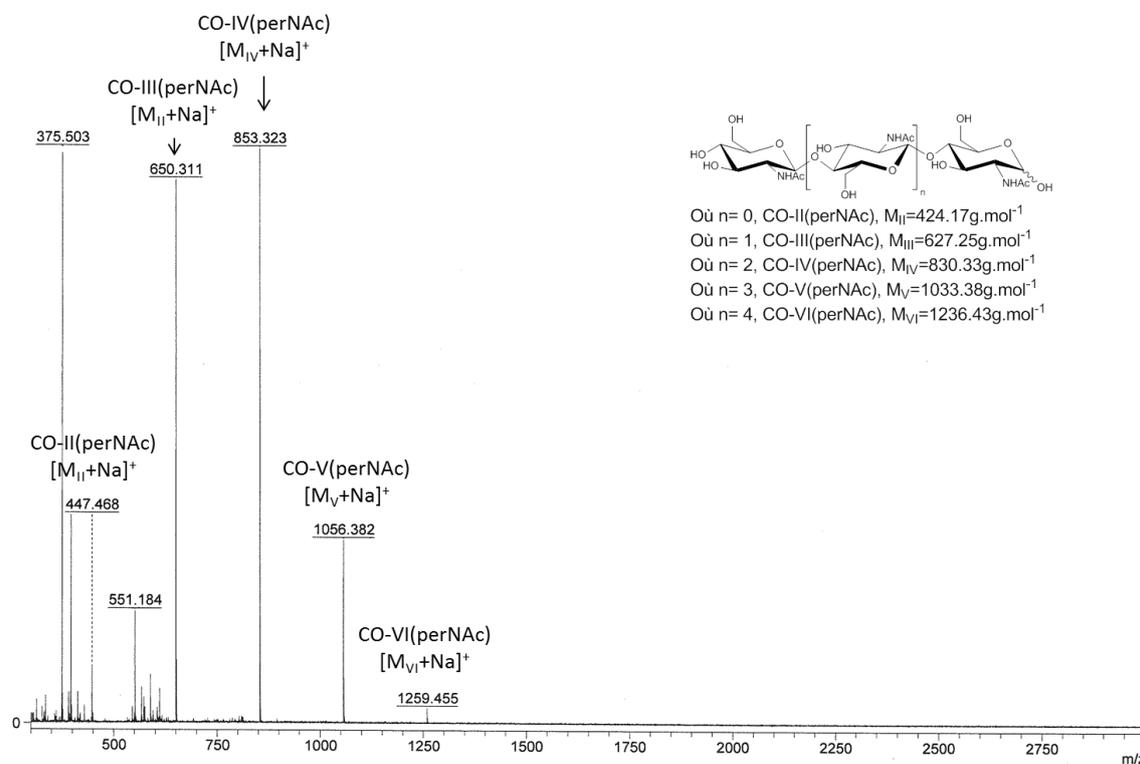


Figure II.16 : Spectre de masse MALDI-TOF du COs

Les protons H-1 α ^I à 5,32 ppm et H-1 β ^I à 4,70 ppm sont présents tant que la position anomère du résidu I n'a pas été réduite (Figure II.17).

c. Les COs seront notés COs-DP où le DP sera indiqué en chiffre romain ainsi les COs de DP = 4 seront notés COs-IV. Pour les analyses MALDI-TOF, les COs per-*N*-acétylés seront notés CO-DP(perNAc) ainsi les COs de DP = 4 per-*N*-acétylés seront notés CO-IV(perNAc).

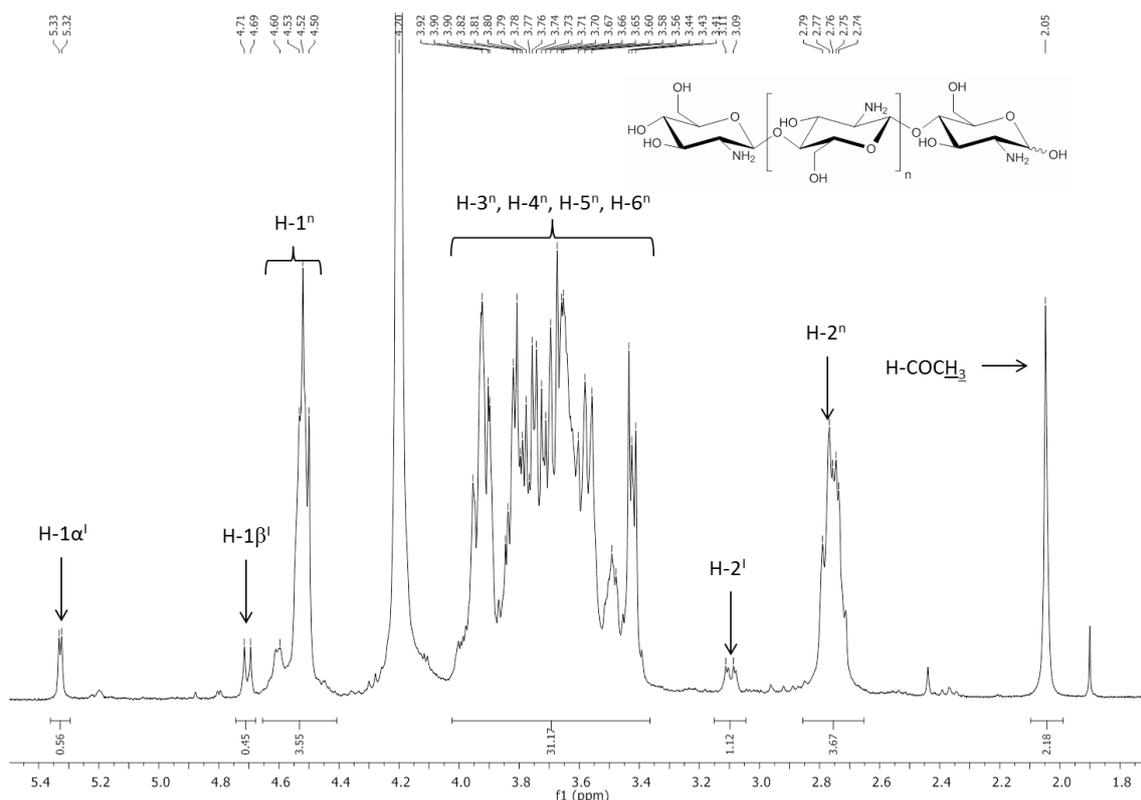


Figure II.17: RMN ^1H du COs commercial dans le D_2O

Un degré d'acétylation moyen DA (RMN) de 10 à 11% est calculé selon l'Équation II.1.

$$DA (RMN) = \frac{I_{\text{H-COCH}_3}/3}{(I_{\text{H-2}'} + I_{\text{H-2}^n})}$$

Avec - DA (RMN): Degré d'acétylation moyen déterminée par RMN.

- $I_{\text{H-2}'}$: intensité des multiplets correspondant aux protons $\text{H-2}'$.

- $I_{\text{H-2}^n}$: intensité des multiplets correspondant aux protons H-2^n .

- I_{COCH_3} : intensité des multiplets correspondant aux protons COCH_3 .

Équation II.1

II.3.2 Fonctionnalisation du COs par un groupement alcyne

L'objectif comme dans le cas du CO-V(N) est d'obtenir un produit fonctionnalisé en position anomère par de la propargylamine *via* une réaction d'amination réductrice. Comme précédemment avec le CO-V(N), les conditions d'amination réductrice classique sans organocatalyse n'ont pas permis d'observer la formation du propargyle de COs. L'utilisation d'amination réductrice en présence d'aniline a donc été de nouveau testée dans les conditions 13, 14 et 15 (Tableau II.5).

Le brut réactionnel a été analysé en SM MALDI-TOF. Cette analyse a montré une importante fraction de COs fonctionnalisés par de l'aniline et non par de la propargylamine. Le produit fonctionnalisé par de la propargylamine n'a pas été observé (Figure II.18).

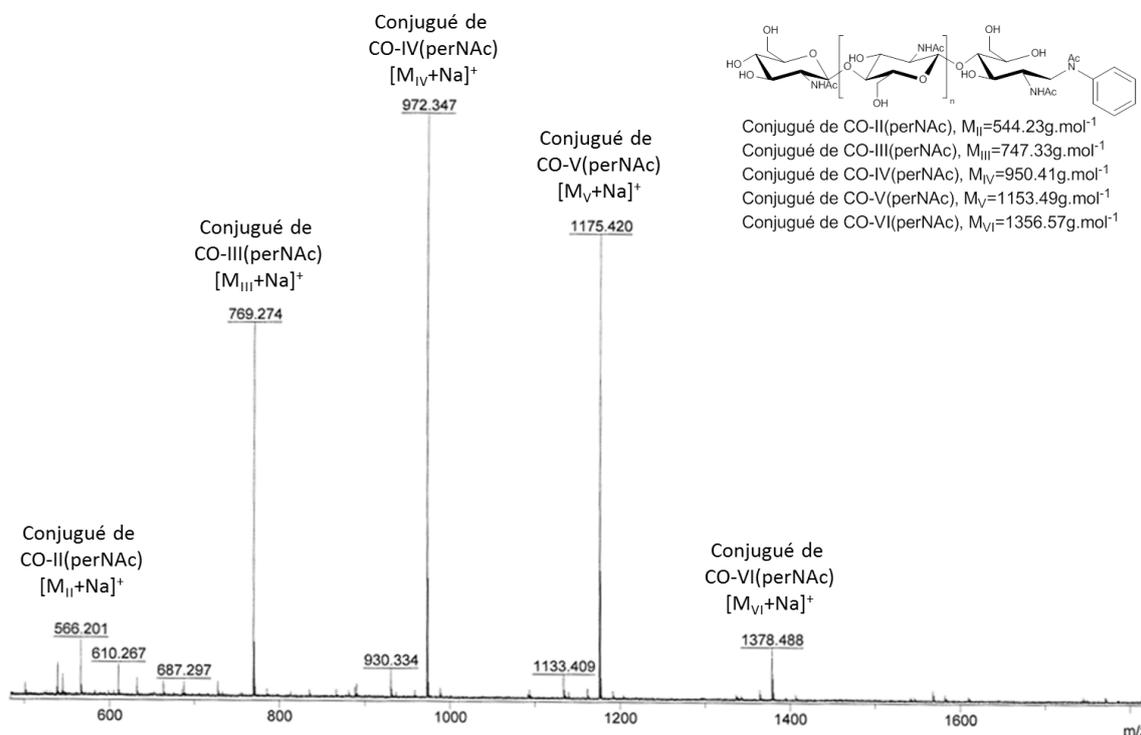


Figure II.18: Spectre de masse MALDI-TOF du COs fonctionnalisés par de l'aniline (conditions 15)

La RMN ^1H a confirmé cette tendance de l'aniline à fonctionnaliser les COs. De plus, il semblerait que lorsque la concentration en aniline augmente, la fonctionnalisation par celle-ci augmente de manière proportionnelle. Ce phénomène est indépendant de la concentration en propargylamine utilisée, cela met en évidence la difficulté à réaliser la réaction de transimination lorsque le substrat est du chitosane.

Beaudoin *et al.*^[162] ont déjà montré que la modification par amination réductrice des chitosanes était plus difficile que celle des chitines et que cette difficulté était encore exacerbée quand le DP des chaînes grandissait. Cette observation est à mettre en parallèle avec la difficulté de modifier les COs par rapport au CO-V(N). Dans notre cas, la réaction produit essentiellement un conjugué aniline de COs, ce qui peut laisser penser que la forme iminium anilique n'est pas suffisamment réactive pour permettre la transimination par la propargylamine. Il y a donc réduction de cet intermédiaire particulièrement stable par le cyanoborohydrure de sodium et formation du conjugué aniline de COs. La différence de réactivité provient certainement de la nature de l'extrémité réductrice. Le résidu anomérique

étant un résidu glucosamine dans le cas du COs, et non un résidu *N*-acétylglucosamine comme dans le cas du CO-V(*N*), c'est l'amine libre chargée dans les conditions expérimentales (pH=5) qui désactive la réaction d'amination réductrice. Le pK_a de l'aniline est de 4,6. L'aniline est donc majoritairement non chargée dans ces conditions, contrairement à la propargylamine qui a un pK_a de 8,2. La répulsion entre les charges du résidu glucosamine et celle de la propargylamine peut expliquer l'inactivation de la réaction de transimination.

II.3.3 Fonctionnalisation du COs par la 4-propargyloxyaniline

Suite à cette observation, une nouvelle stratégie a été élaborée consistant à utiliser un dérivé de l'aniline substitué par un groupement alcyne : la 4-propargyloxyaniline (Schéma II.8).

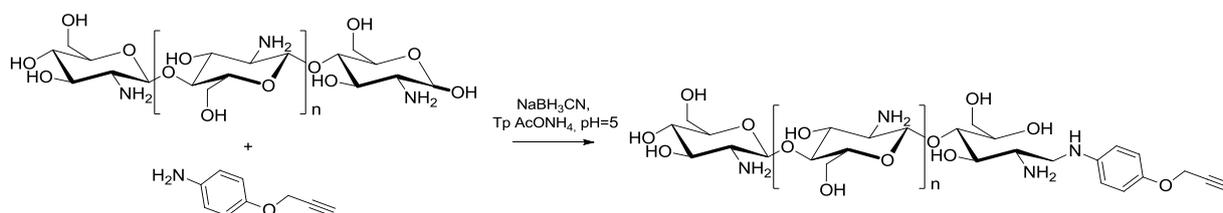


Schéma II.8: Stratégie de fonctionnalisation du COs par la 4-propargyloxyaniline

La 4-propargyloxyaniline a été synthétisée d'après les travaux de Meinhardt *et al.*^[175] (Schéma II.9).

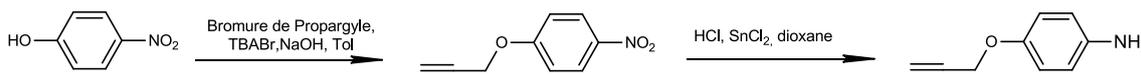


Schéma II.9: Synthèse du 4-propargyloxyaniline

Le paranitrophénol est étherifié par un groupement propargyle en milieu basique à l'aide de bromure de propargyle pour obtenir l'intermédiaire 4-nitrophenyl-propargyléther avec un rendement de 83%. L'intermédiaire est analysée par RMN ¹H (Figure II.19). La présence des protons du ≡C-CH₂ à 4,80 ppm et du ≡CH à 2,58 ppm indique que le propargyle a bien été introduit. Il est à noter que les protons aromatiques H-Ar⁵ et H-Ar³ à 8,20 ppm ainsi que les protons H-Ar² et H-Ar⁴ à 7,05 ppm dans une moindre mesure, sont particulièrement déblindés par la présence du groupement nitro en position 4.

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

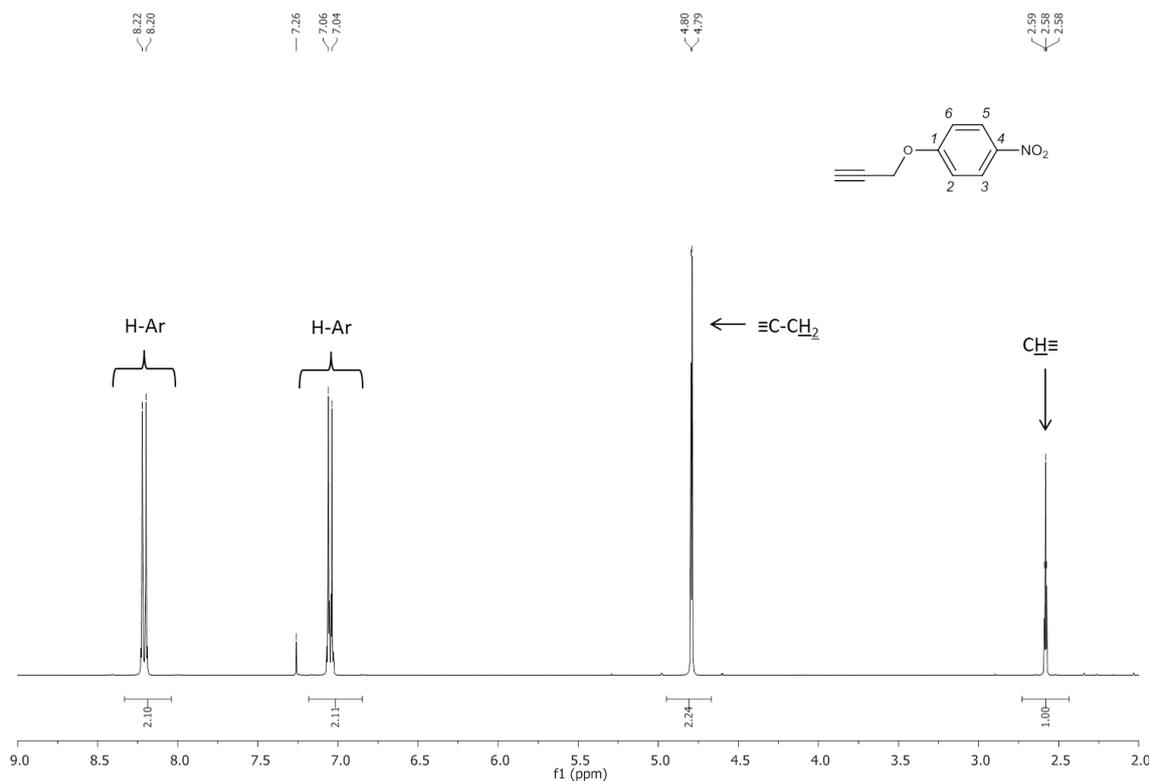


Figure II.19 : RMN ^1H du 4-nitrophenyl-propargyléther dans le CDCl_3

Puis le groupement nitro du 4-nitrophenyl-propargyléther est réduit par du chlorure d'étain (II) en présence d'acide hydrochlorique concentré. La 4-propargyloxyaniline est obtenue avec un rendement de 93% puis est analysée en RMN ^1H . Le déplacement des protons H-Ar⁵ et H-Ar³ de 8,20 ppm à 6,82 confirme que la fonction nitro a été réduite en amine, de plus la présence des protons du NH_2 intégrés pour deux protons, confirme que la réduction a été quantitative (Figure II.20).

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

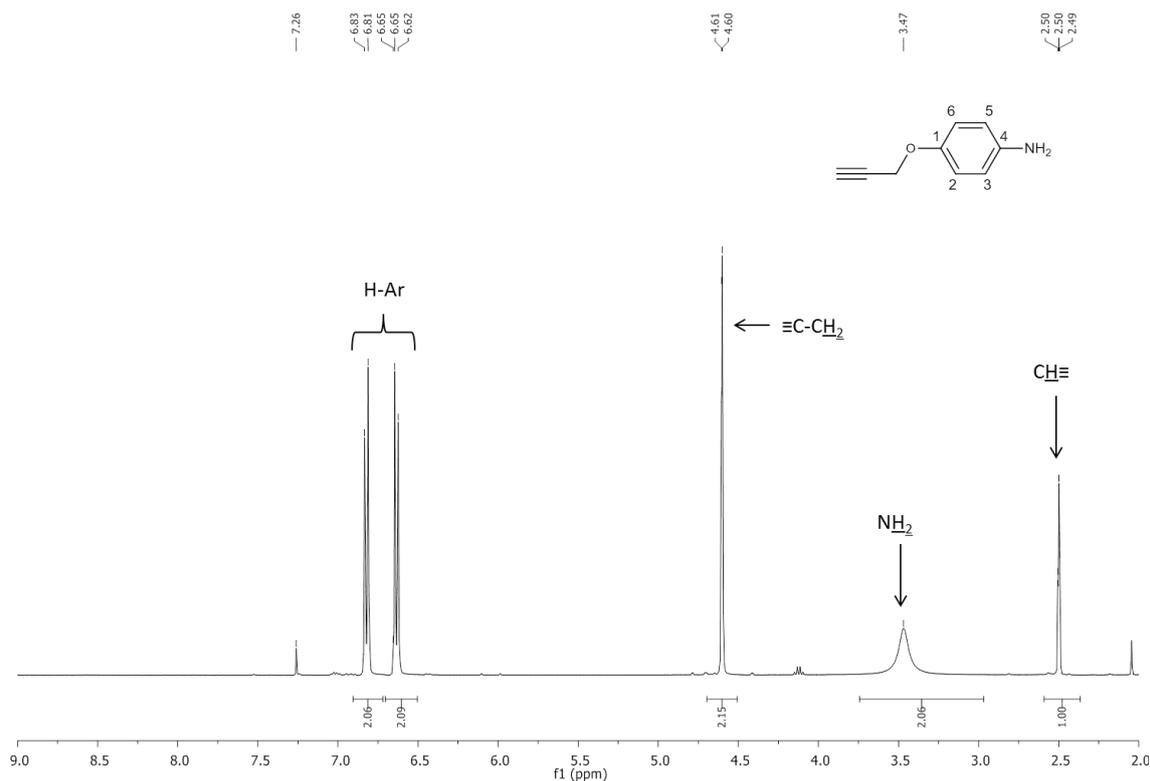


Figure II.20: RMN ^1H du 4-propargyloxyaniline dans le CDCl_3

La spectrométrie de masse ESI^+ confirme la structure du 4-propargyloxyaniline (Figure II.21).

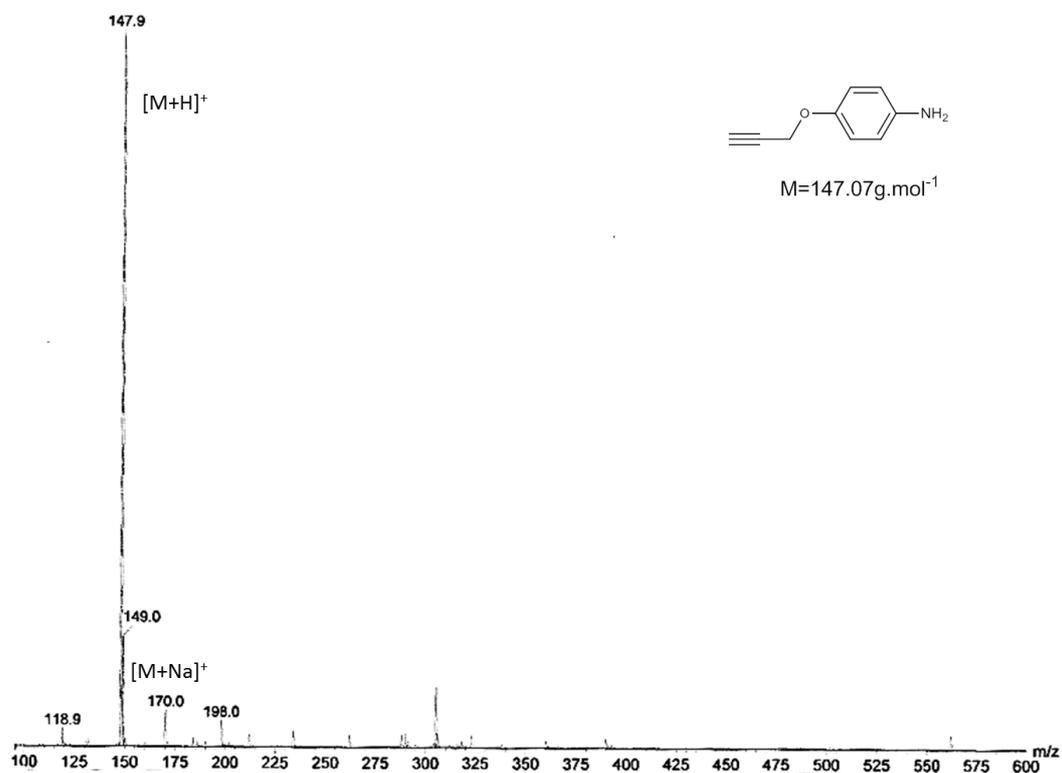


Figure II.21: Spectre de masse ESI^+ du 4-propargyloxyaniline

L'amination réductrice du COs commercial a ensuite été réalisée à l'aide du 4-propargyloxyaniline, en présence de NaBH_3CN dans un tampon acétate d'ammonium $\text{pH}=5$ / MeOH (5/1, v/v). Le produit a ensuite été purifié par chromatographie flash en phase inverse C_{18} . Le produit est obtenu avec un rendement de 71%.

Comme précédemment, le produit est per-*N*-acétylé avant analyse. La spectrométrie de masse confirme la substitution des différents oligomères par la 4-propargyloxyaniline. La distribution du DP est centrée sur un DP = 4 comme le COs commercial (Figure II.22).

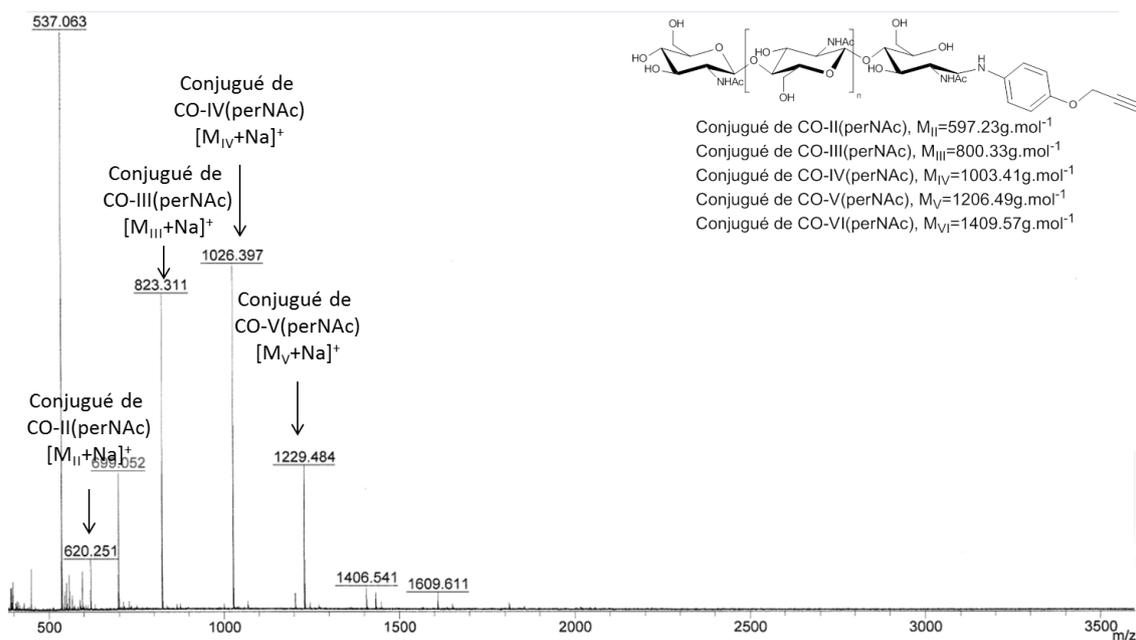


Figure II.22: Spectre de masse MALDI-TOF du conjugué 4-propargyloxyaniline de COs

Le proton du $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv$ à 4,65 ppm ainsi que le proton du $\equiv\text{CH}$ présent dans le massif entre 3,41 et 3,87 ppm indique que le groupement propargyle est présent, ce qui corrèle avec la disparition des protons anomères $\text{H}-1\alpha^I$ à 5,32 ppm et $\text{H}-1\beta^I$ à 4,70 ppm. La fonctionnalisation est confirmée par la présence du massif entre 6,72 ppm et 6,94 ppm qui correspond aux protons aromatiques du cycle anilique (Figure II.23).

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

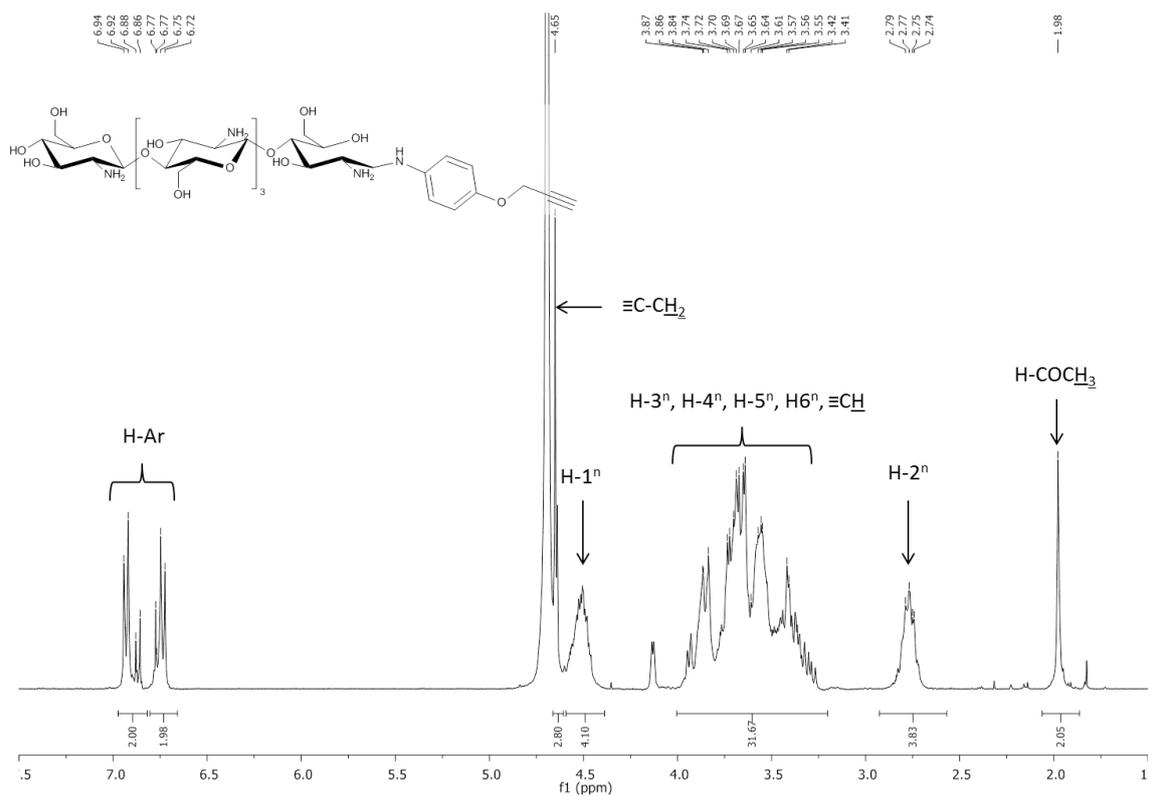


Figure II.23: RMN ^1H du 4-propargyloxyaniline de COs

La RMN ^{13}C montre un massif entre 115,56 ppm et 118,19 ppm qui correspond aux carbones du cycle aromatique. Le couple de carbone à 79,06 ppm et 44,40 ppm du propargyle sont particulièrement déblindés par la proximité du cycle aromatique. La RMN ^{13}C confirme le résultat de la RMN ^1H sur l'obtention du produit fonctionnalisé (Figure II.24).

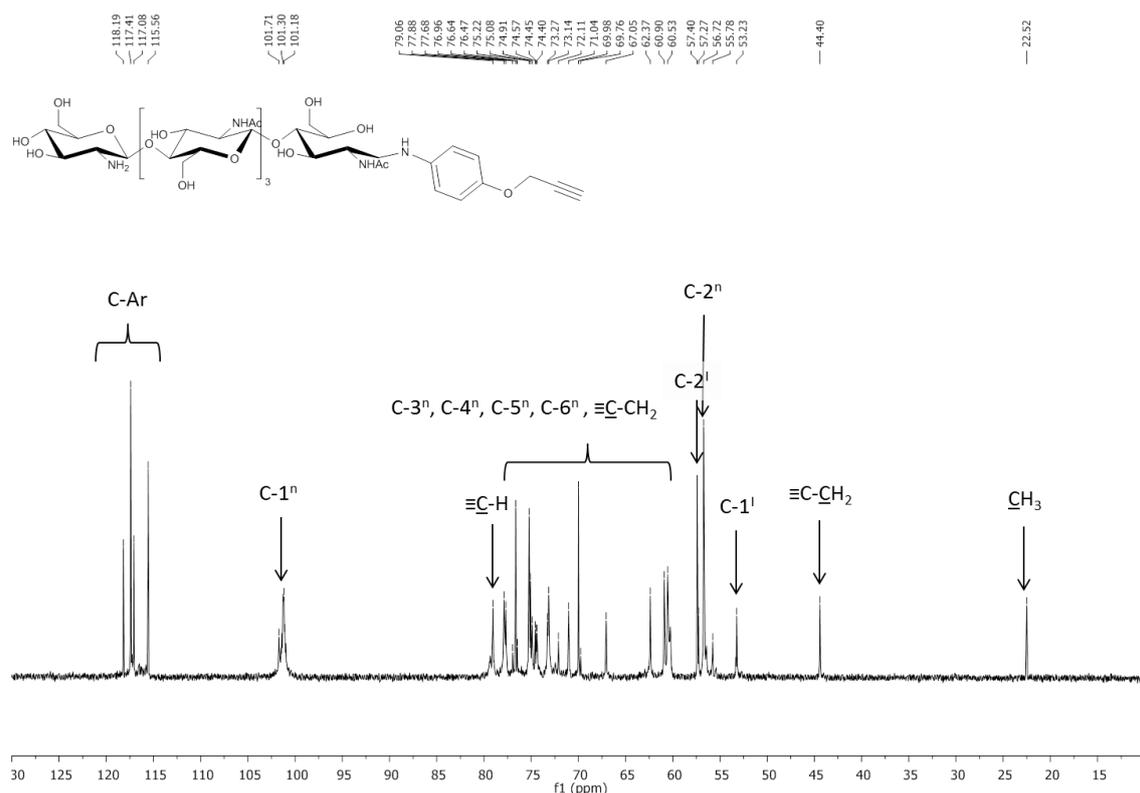


Figure II.24: RMN ^{13}C du conjugué 4-propargyloxyaniline de COs dans le D_2O

La présence du groupement aromatique assure une détection en UV à 254 nm, qui permet de séparer facilement le conjugué 4-propargyloxyaniline de COs du produit de départ et des sels de d'acétate d'ammonium et de bore. De plus, la présence de l'aglycone hydrophobe à l'extrémité réductrice de l'oligomère permet une meilleure rétention de la molécule fonctionnalisée sur la colonne C_{18} , et ainsi facilite sa purification.

II.3.4 Conclusion

L'amination réductrice organocatalysée par de l'aniline n'ayant pas donné de bon résultat sur le COs, une nouvelle stratégie consistant à utiliser la 4-propargyloxy

aniline pour fonctionnaliser la position anomère a été mise au point. Ainsi, nous avons pu avoir accès à des conjugués propargyle de COs d'origine commerciale en large quantité.

II.4 Conclusion

L'amination réductrice a permis d'accéder aux oligomères de chitine fonctionnalisés. Un premier composé modèle le CO-V(N) dont l'amination réductrice a été organocatalysée de

II – Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

manière novatrice par de l'aniline, et un second le COs greffé par un groupement propargyle *via* amination réductrice par de la 4-propargyloxyaniline.

Ces deux oligosaccharides seront ensuite greffés par chimie « click » CuAAC sur les chaînes de PCL fonctionnalisées latéralement par des groupements azide.

Références bibliographiques

- [42] E. Samain, S. Drouillard, A. Heyraud, H. Driguez, R. A. Geremia, *Carbohydrate Research* **1997**, *302*, 35-42.
- [144] R. Riva, S. Schmeits, C. Jérôme, R. Jérôme, P. Lecomte, *Macromolecules* **2007**, *40*, 796-803.
- [147] S. Cottaz, B. Brasme, H. Driguez, *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267*, 5593-5600.
- [158] S. Berson, D. Viet, S. Halila, H. Driguez, E. Fleury, T. Hamaide, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2008**, *209*, 1814-1825.
- [159] S. Halila, M. Manguian, S. Fort, S. Cottaz, T. Hamaide, E. Fleury, H. Driguez, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2008**, *209*, 1282-1290.
- [160] A. F. Abdel-Magid, K. G. Carson, B. D. Harris, C. A. Maryanoff, R. D. Shah, *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 3849-3862.
- [161] C. F. Lane, *Synthesis-Stuttgart* **1975**, 135-146.
- [162] M. E. Beaudoin, J. Gauthier, I. Boucher, K. C. Waldron, *Journal of Separation Science* **2005**, *28*, 1390-1398.
- [163] D. Rudge, in *Initiator 2.5 - Getting Started Guide*, Biotage ed., **2008**, p. 11.
- [164] A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 7581-7584.
- [165] M. B. Thygesen, H. Munch, J. Sauer, E. Clo, M. R. Jorgensen, O. Hindsgaul, K. J. Jensen, *Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 1752-1755.
- [166] D. D. Perrin, *IUPAC. Dissociation constants of Organic Bases in Aqueous Solution: Supplement 1972*, American Chemical Society ed., **1972**.
- [167] J. Favrot, C. Sandorfy, D. Vocelle, *Photochemistry and Photobiology* **1978**, *28*, 271-272.
- [168] E. H. Cordes, W. P. Jencks, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2843-2848.
- [169] V. Boyer, S. Fort, T. P. Frandsen, M. Schulein, S. Cottaz, H. Driguez, *Chemistry - A European Journal* **2002**, *8*, 1389-1394.
- [170] J.-W. Nah, T. R. Jung, M.-K. Jang, Y.-I. Jeong, in *Korean Patent*, S. Korea . Korea, **2006**, p. 23.
- [171] S. Y. Chae, M. K. Jang, J. W. Nah, *Journal of Controlled Release* **2005**, *102*, 383-394.
- [172] M. K. Jang, S. K. Kang, J. W. Nah, *Food Science and Biotechnology* **2006**, *15*, 937-941.
- [173] J. W. Nah, T. R. Jung, M. K. Jang, C. Y. Choi, W. S. Kim, B. G. Kong, Y. I. Jeong, H. P. Yang, J. T. Jang, in *Korean Patent*, S. Korea . **2003**, p. 37.
- [174] J. W. Nah, T. R. Jung, H.-J. Jeong, S. Y. Chae, C. Y. Choi, M. K. Jang, in *Korean Patent*, S. Korea . **2007**, p. 41.
- [175] T. Meinhardt, D. Lang, H. Dill, A. Krueger, *Advanced Functional Materials* **2011**, *21*, 494-500.

III SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES COPOLYMERES POLY(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL)

Sommaire

<i>III.1</i>	<i>Homopolymérisation de l'ϵCL</i>	<i>106</i>
III.1.1	Amorceur à base d'étain et d'aluminium	106
III.1.2	Choix de l'amorceur pour la polymérisation de l' ϵ CL	107
III.1.2.1	Monomère d' ϵ CL	108
III.1.2.2	Amorçage par l' $Al(OiPr)_3$	109
III.1.2.3	Amorçage par le DSDOP	113
III.1.3	Conclusion	115
<i>III.2</i>	<i>Copolymérisation des ϵCL et αClϵCL</i>	<i>116</i>
III.2.1	Synthèse de l' α Cl ϵ CL	116
III.2.2	Synthèse de la poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL)	118
III.2.2.1	Synthèse de la poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL) à 5% en α Cl ϵ CL	120
III.2.2.1	Synthèse de la poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL) à 20% en α Cl ϵ CL	123
III.2.3	Conclusion	124
<i>III.3</i>	<i>Obtention de la poly(αN₃ϵCL-co-ϵCL)</i>	<i>124</i>
<i>III.4</i>	<i>Conclusion</i>	<i>128</i>

Les oligomères de chitine et de chitosane dont la synthèse a été décrite dans la partie précédente, en particulier les dérivés alcyne, devront pouvoir se greffer par CuAAC latéralement sur une chaîne de poly(ϵ -caprolactone) modifiée par des fonctions azide. Cette partie traitera donc de la synthèse contrôlée et de la caractérisation de copolymères poly(α N₃ ϵ CL- *co*- ϵ CL).

La voie de synthèse des copolymères devra répondre à deux exigences : le contrôle du degré de polymérisation et celui du taux de greffage latéral en groupement azide. Pour cela, Riva *et al.*^[144] ont décrit une stratégie qui consiste en la copolymérisation de monomère ϵ CL et α Cl ϵ CL, puis substitution des atomes de chlore par un groupement azide, pour obtenir la poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL) désirée (Schéma III.1a). Cette méthode permet de contrôler la taille des chaînes et le degré de substitution latérale. De plus en modifiant chimiquement l' ϵ CL, il est possible par copolymérisation d'insérer une grande variété de groupements fonctionnels.

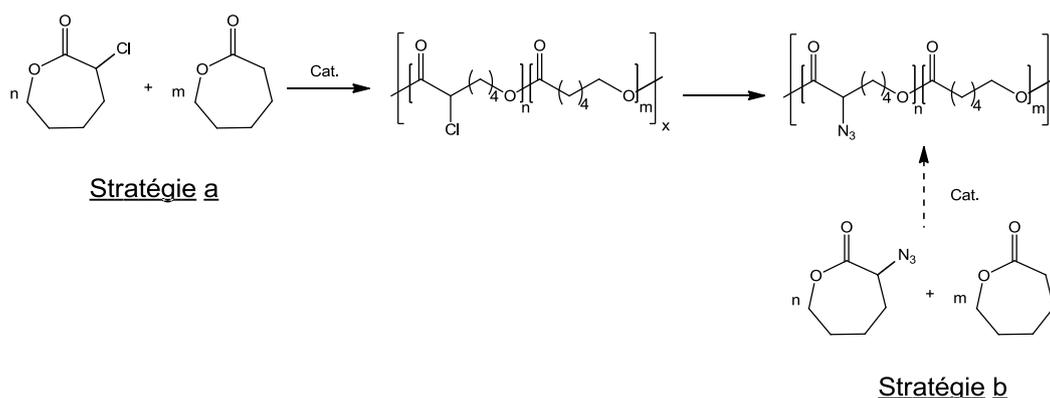


Schéma III.1 : Stratégie générale de synthèse de la poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)

Une seconde voie pourrait être envisagée *via* la copolymérisation directe de l' α N₃ ϵ CL avec l' ϵ CL (Schéma III.1b). Ce monomère a été synthétisé, par substitution directe des atomes de chlore par une fonction azide sur le monomère à l'aide d'azoture de sodium. Le monomère α N₃ ϵ CL ainsi obtenu s'est révélé instable. Cette stratégie n'a donc pas été suivie.

III.1 Homopolymérisation de l' ϵ CL

III.1.1 Amorceur à base d'étain et d'aluminium

Le choix de l'amorceur est essentiel pour contrôler la croissance de la chaîne polyester. Le

2,2-dibutyl-2-stanna-1,3dioxépane (DSDOP) est décrit dans la littérature comme permettant une polymérisation contrôlée de la ϵ CL avec un taux de conversion proche de

100%. Cet amorceur à base d'étain est autorisé par la FDA mais n'est pas commercial. La synthèse DSDOP a été décrite par Kricheldorf *et al.* en 1998.^[113]

Le DSDOP est synthétisé à partir du diméthylate de dibutylétain mis en présence avec du 1,4-butanediol (Schéma III.2). Le déplacement de l'équilibre des méthanolates vers le 1,4-butanediol est favorisé par l'effet chélate du diol et l'élimination du méthanol produit *in situ* sous vide dynamique. Pour connaître la quantité exacte de DSDOP actif, une série d'homopolymérisation de l' ϵ CL est réalisée.

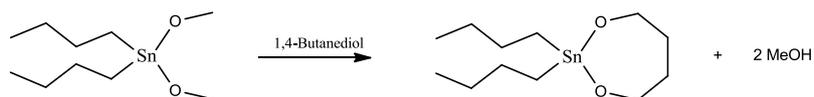


Schéma III.2 : Synthèse du 2-dibutyl-2-stanna-1,3dioxepane (DSDOP)

Le second amorceur testé est le triisopropylate d'aluminium $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$, produit commercial, particulièrement adapté à la polymérisation par ouverture de cycle de l' ϵ CL (Schéma III.3). DSDOP et l' $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$ ont été évalués sur l' ϵ CL afin de déterminer celui qui nous permettrait de contrôler au mieux le degré de polymérisation et le taux de conversion.

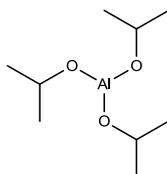


Schéma III.3 : Structure du triisopropylate d'aluminium

III.1.2 Choix de l'amorceur pour la polymérisation de l' ϵ CL

L'homopolymérisation par ouverture de cycle de l' ϵ CL est amorcée soit par l' $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$ commercial ou par le DSDOP synthétisé. Ces deux amorceurs sont décrits dans la littérature comme permettant d'obtenir des taux de conversion de 100%.^[113, 176-178] Ainsi les deux amorceurs devraient essentiellement se différencier par le degré de contrôle de l'homopolymérisation de l' ϵ CL.

L'objectif est de déterminer le meilleur amorceur. Pour cela, les deux amorceurs ont été testés lors de la synthèse de trois homopolymères poly(ϵ CL) de DP désirés 50, 100 et 200 correspondant respectivement aux masses molaires de 5700, 11400 et 22800 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Le DP est estimé théoriquement ($\text{DP}_{n,\text{Th}}$) en calculant le rapport molaire entre la quantité de monomère et d'amorceurs (Équation III.1).

$$DP_{Th} = \frac{n_{\epsilon CL}}{n_{amorceur}} \times x$$

Avec - $DP_{n,Th}$: degré de polymérisation théorique.

- $n_{\epsilon CL}$: quantité de ϵCL en mol.
- $n_{amorceur}$: quantité d'amorceur en mol.
- x : Taux de conversion.

Équation III.1

De même en faisant intervenir la masse molaire de l' ϵCL (114 g.mol⁻¹) et en négligeant les bouts de chaînes, la masse molaire théorique ($M_{n,Th}$) est définie (Équation III.2).

$$M_{n,Th} = DP_{Th} \times M_{\epsilon CL}$$

Avec - $M_{n,Th}$: masse molaire de la poly(ϵCL) théorique en g.mol⁻¹.

- $DP_{n,Th}$: degré de polymérisation théorique.
- $M_{\epsilon CL}$: masse molaire de ϵCL (114 g.mol⁻¹).

Équation III.2

III.1.2.1 Monomère d' ϵCL

La RMN ¹H de l' ϵCL commerciale est réalisée avant les tests d'homopolymérisation (Figure III.1).

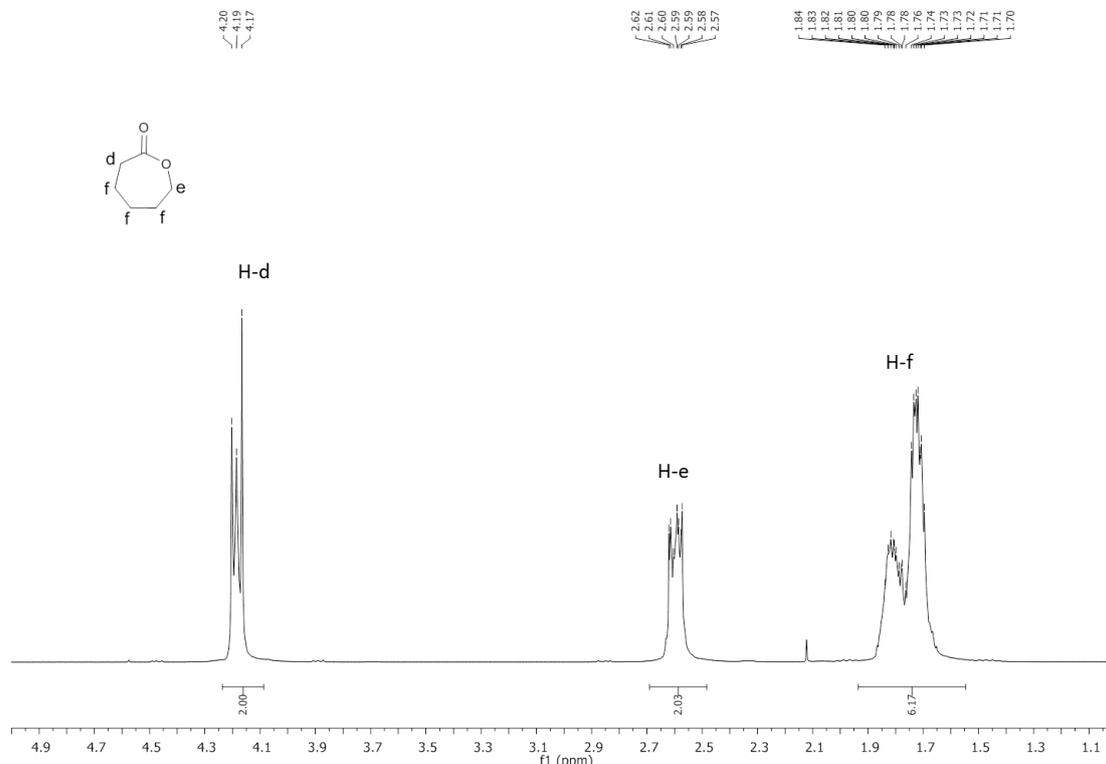


Figure III.1 : RMN ¹H de l' ϵCL commerciale dans le $CDCl_3$

Cette RMN ¹H permettra d'estimer le taux de conversion de la polymérisation de l' ϵ CL, en observant les signaux résiduels des protons H-e à 2,59 ppm correspondant $\underline{\text{CH}_2}$ -O du monomère. Il est à noter que les protons H-f qui correspondent aux 3 méthylènes $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ et $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ sont compris dans un unique massif entre 1,90 ppm et 1,60 ppm.^d

III.1.2.2 Amorçage par l' $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$

Comme cité précédemment, trois polymères PCL⁵⁰, PCL¹⁰⁰ et PCL²⁰⁰ sont synthétisés. Les quantités relatives d'amorceurs et de monomères sont facilement estimées (Équation III.1).^e

L'homopolymérisation par ouverture de cycle de ϵ CL est amorcée par de l' $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$ à 0°C dans le toluène fraîchement distillé et sous atmosphère inerte afin de garantir des conditions anhydres strictes, à 0°C (Schéma III.4). Après 6 heures de polymérisation, les bouts de chaîne activés par l'alcoolate d'aluminium sont hydrolysés par ajout d'acide hydrochlorique dilué. Les homopolymères sont purifiés par précipitation dans le *n*-heptane.

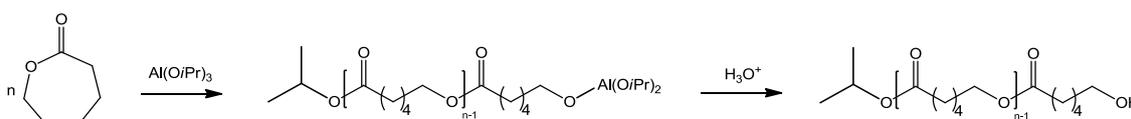


Schéma III.4 : Homopolymérisation de l' ϵ CL en présence d' $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$

Les trois polymères sont caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique (CES) (Figure III.2).

d. Par convention, les attributions des protons des monomères observées en RMN ¹H sont notées par des lettres minuscules alors que les protons des polymères sont notés par des lettres majuscules. La correspondance des lettres entre monomère et polymère est conservée.

e. Les PCL de DP 50, 100 et 200 seront notées respectivement PCL⁵⁰, PCL¹⁰⁰ et PCL²⁰⁰.

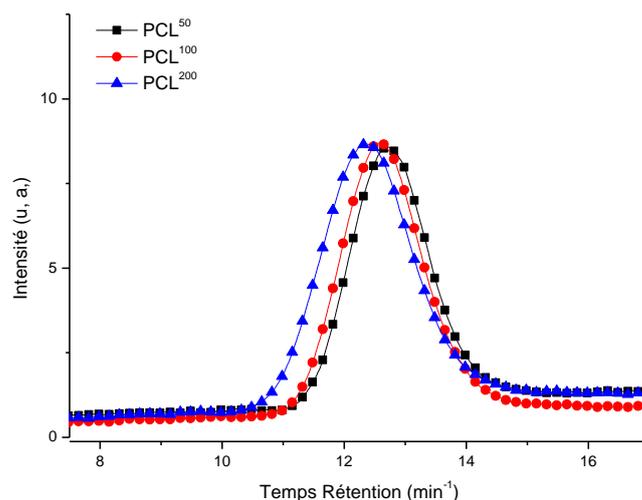


Figure III.2 : Profil CES des trois homopolymères PCL⁵⁰, PCL¹⁰⁰ et PCL²⁰⁰ synthétisés avec de l'Al(OiPr)₃

Comme le montre la figure ci-dessus, qui regroupe les chromatogrammes des trois polyesters. Avant précipitation, il n'y a pas de trace d'espèce de faible masse molaire correspondant au monomère attendu à 16,20 minutes. En revanche, les temps d'éluion sont différents et sont d'autant plus élevés que le DP_{n,Th} est faible (PCL²⁰⁰, PCL¹⁰⁰ et PCL⁵⁰). Le Tableau III.1 donnant les valeurs des masses molaires confirme cette tendance. De plus, la dispersité des trois homopolymères est comprise entre 1,3 et 1,4. Tous ces éléments pourraient indiquer que la polymérisation est contrôlée.

Pour le valider, les trois polymères ont également été analysés par RMN ¹H (Figure III.3).

III – Synthèse et caractérisation des copolymères poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL)

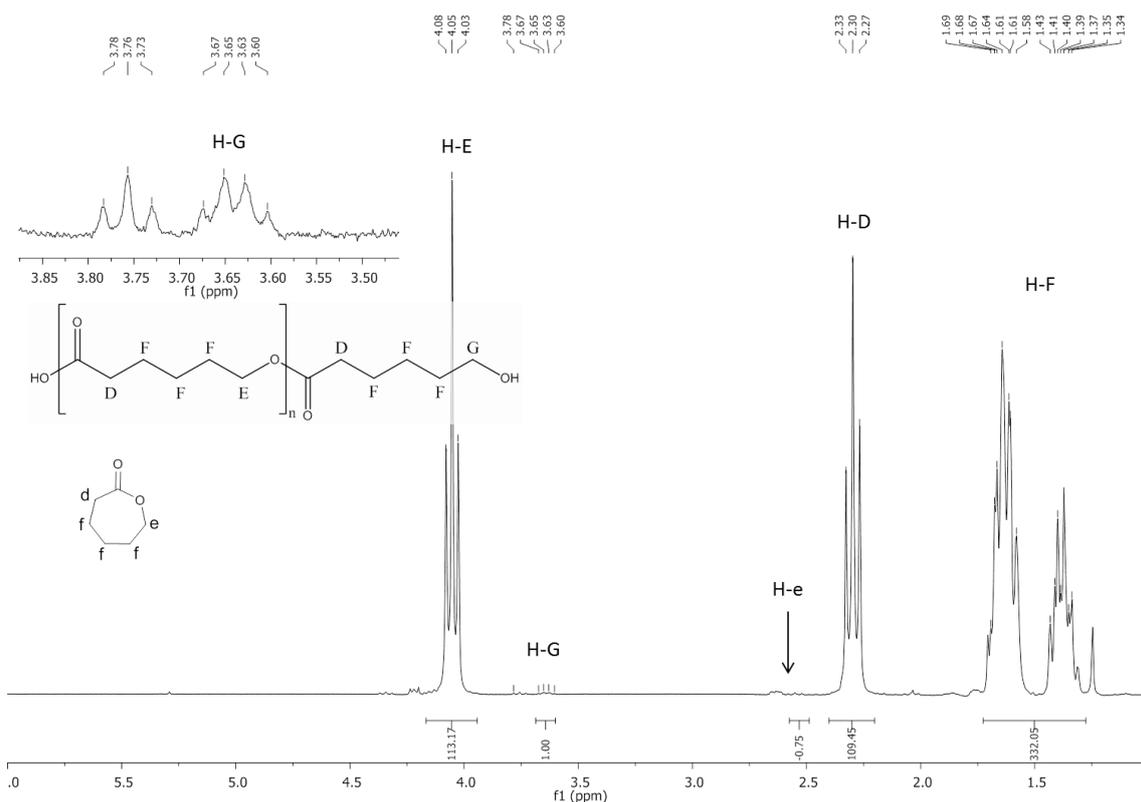


Figure III.3 : RMN ¹H de l'homopolymère de poly(ϵ CL) catalysé par de l' $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})$ avant purification dans le CDCl_3

La RMN du proton permet de calculer le taux de conversion du système ainsi que le degré de polymérisation expérimentale des polymères. Le taux de conversion (x (RMN)) est calculé en se rapportant au rapport des intensités entre les protons $\text{CH}_2\text{-O}$ à 2,55 ppm (H-e) de l' ϵ CL et les protons $\text{CH}_2\text{-O}$ à 2,30 ppm (H-E) de la poly(ϵ CL) (Équation III.3).

$$x \text{ (RMN)} = I_E / (I_E + I_e)$$

Avec - x (RMN) : Taux de conversion déterminé par RMN.

- I_E : intensité des multiplets correspondant aux protons $\text{CH}_2\text{-O}$ (H-E) de la poly(ϵ CL).

- I_e : intensité des multiplets correspondant aux protons $\text{CH}_2\text{-O}$ (H-e) de l' ϵ CL.

Équation III.3

Le signal H-e caractéristique des monomères d' ϵ CL possède l'intégrale très faible de 0,75 par rapport à l'intégrale du signal H-E de 113. Le taux de conversion observé est supérieur à 0,99.

Le degré de polymérisation moyen en nombre expérimental ($\text{DP}_{n,\text{Exp}}$) de la poly(ϵ CL) est calculé par RMN ¹H en comparant les intégrales des protons en bout de chaîne $\text{CH}_2\text{-OH}$ (G) à 3.63 ppm avec les intégrales des protons de cœur de chaînes $\text{CH}_2\text{-O}$ (E) à 2,30 ppm (Équation III.4).

$$DP_{n,Exp} (RMN) = I_E/I_G$$

Avec - $DP_{n,Exp} (RMN)$: degré de polymérisation moyen en nombre expérimental déterminé par RMN.
 - I_E : intensité des multiplets correspondant aux protons \underline{CH}_2 -O-CO (E) de la poly(ϵ CL).
 - I_G : intensité des multiplets correspondant aux protons \underline{CH}_2 -OH (G) de la poly(ϵ CL).

Équation III.4

Les résultats de la synthèse des trois homopolymères caractérisés en CES et en RMN ¹H sont illustrés dans le tableau ci-dessus (Tableau III.1).

Les masses molaires apparentes des homopolymères (calibration PS) obtenues en CES dans le DMF à 60°C ont été déterminées à l'aide d'une calibration poly(styrène) (PS). D'après la relation Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS)^[179-180] la viscosité d'un polymère linéaire dans un solvant donné peut être reliée à la masse molaire *via* les paramètres K et α de MHKS (Équation III.5).

$$[\eta] = KM^\alpha$$

Avec - $[\eta]$: viscosité intrinsèque de la solution contenant le polymère.
 - K et α : paramètres de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada.
 - M : Masse molaire en g.mol⁻¹.

Équation III.5

La PCL et le PS ont la même viscosité dans le DMF à 60°C, la masse molaire apparente en calibration PS peut être donc corrigée pour remonter à la masse réelle de la PCL (Équation III.6).

$$K_{PS}M_{PS}^{\alpha_{PS}} = K_{PCL}M_{PCL}^{\alpha_{PCL}}$$

Avec - K et α : paramètres de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada avec $K_{PCL} = 13,95 \times 10^{-5} \text{ dL.g}^{-1}$ et $\alpha_{PCL} = 0,786$ ^[181] et $K_{PS} = 14,1 \times 10^{-5} \text{ dL.g}^{-1}$ et $\alpha_{PS} = 0,70$ ^[182]
 - M : Masse molaire en g.mol⁻¹.

Équation III.6

De même, les dispersité de la PCL ont été calculés avec une calibration PS. Cependant, Guillaneuf *et al.*^[183] ont montré en 1998 que l' I_p est uniquement valable si les paramètres MHKS des deux polymères PS et PCL sont équivalents. Dans le cas de la PCL et du PS, les paramètres de MHKS sont sensiblement égaux avec $K_{PS} \approx K_{PCL}$ ^[181] et $\alpha_{PS} \approx \alpha_{PCL}$ ^[182]

$DP_{n,Th}$ ($M_{n,Th}$)	$DP_{n,Exp}$ (RMN)	x (RMN)	$M_{n,Exp}$ (CES) / $DP_{n,Exp}$ (CES)	I_p (CES)
50 (5700 g.mol⁻¹)	84	0,99	8700 / 76	1,3
100 (11400 g.mol⁻¹)	109	0,99	13200 / 116	1,3
200 (22800 g.mol⁻¹)	165	0,99	21000 / 184	1,4

Avec- $DP_{n,Th}$: degré de polymérisation moyen en nombre théorique.

- $M_{n,Th}$: masse molaire moyenne en nombre de la poly(ϵ CL) théorique en g.mol⁻¹.

- $DP_{n,Exp}$ (RMN) : degré de polymérisation moyen en nombre expérimental déterminé par RMN.

- x (RMN) : taux de conversion déterminé par RMN.

- $M_{n,Exp}$ (CES) : masse molaire moyenne en nombre corrigé de la poly(ϵ CL) expérimentale déterminée par CES dans du DMF, LiCl 10mM en (calibration avec des standard de polystyrène) en g.mol⁻¹.

- $DP_{n,Exp}$ (CES) : degré de polymérisation moyen en nombre expérimental déterminé par CES.

- I_p (CES) : dispersité déterminée par CES.

Tableau III.1 : Résultats des réactions d'homopolymérisations d' ϵ CL en présence d'Al(OiPr)₃

D'après les résultats de RMN ¹H, les taux de conversion sont proches de 1. Une très légère augmentation de la dispersité du système est observée quand les poly(ϵ CL) tendent vers des masses molaires élevées. De même, les masses molaires observées en CES et en RMN diffèrent de celles attendues. Ce résultat pourrait traduire des phénomènes de transestérification intermoléculaire, qui réduisent les masses molaires et augmentent l' I_p . La température est un paramètre important dans la polymérisation de l' ϵ CL par de l'Al(OiPr)₃. Le contrôle de la température à 0°C dans le toluène n'a pas permis d'obtenir un contrôle précis de la masse molaire des poly(ϵ CL) comme l'a décrit Kricheldorf *et al.*^[109] En effet, le nombre d'alcoolate disponible de l'Al(OiPr)₃ varie beaucoup en fonction de la température, quand celle-ci varie le nombre d'alcoolates disponibles change et modifie le rapport monomère/amorce et donc, diminue le contrôle sur les masses molaires. De plus, l'équilibre entre les formes trimères (A₃) et tétramères (A₄) de Al(OiPr)₃, module encore les capacités d'amorçage. Ceci se traduit par un contrôle moins précis de la polymérisation.

III.1.2.3 Amorçage par le DSDOP

L'homopolymérisation par ouverture de cycle de l' ϵ CL est amorcée par du DSDOP dans le toluène fraîchement distillé et sous atmosphère inerte à 40°C. Après 4 heures de polymérisation, les bouts de chaîne activés par l'alcoolate d'étain sont hydrolysés par ajout d'acide hydrochlorique dilué (Schéma III.5).

III – Synthèse et caractérisation des copolymères poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)

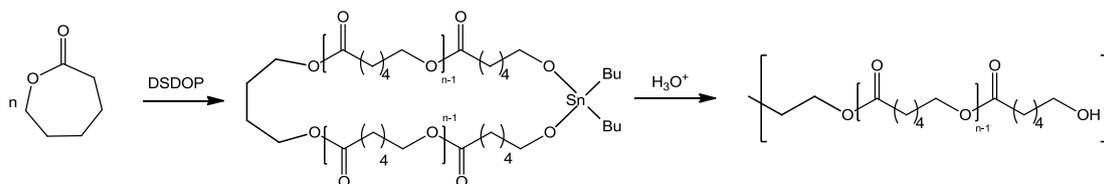


Schéma III.5 : Homopolymérisation de l'εCL en présence de DSDOP

L'unité 1,4-butanediol constituant le DSDOP est un diol permettant d'amorcer la polymérisation. L'allongement de la chaîne de poly(ϵ CL) est amorcé de façon identique par les deux extrémités alcool de la chaîne. Le diol se retrouve alors au centre de la chaîne poly(ϵ CL) finale avec théoriquement des segments dont le DP est égal à la moitié du DP_{n,Th}.

Comme précédemment, les taux de conversion observés des trois homopolymères en RMN sont totaux. La taille des chaînes est contrôlée, avec moins de 15% de variation entre le DP_{n,Th} et le DP_{n,Exp}.

Les trois polymères sont caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique (CES) (Figure III.4).

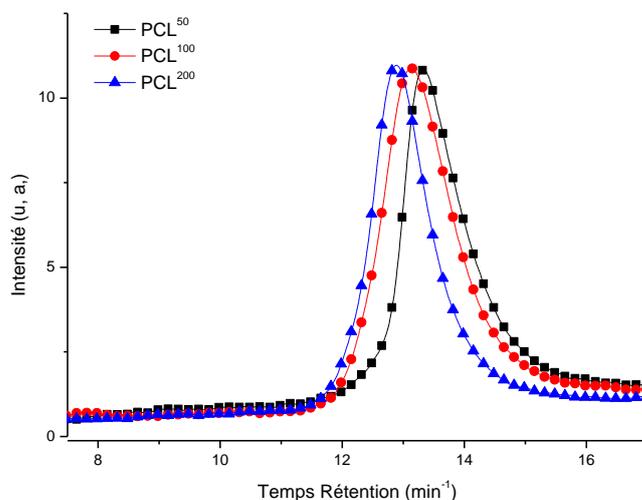


Figure III.4 : Profil CES des trois homopolymères PCL⁵⁰, PCL¹⁰⁰ et PCL²⁰⁰ synthétisés avec du DSDOP

Comme dans le cas de la synthèse des trois homopolymères synthétisé à l'aide de Al(OiPr)₃, la CES avant précipitation révèle l'absence de monomère résiduel. Les homopolymères sont aussi caractérisés par RMN ¹H. Comme précédemment les paramètres DP_{n,Exp} et M_{n,Exp} sont issus de ces deux techniques (Tableau III.2).

$DP_{n,Th}$ ($M_{n,Th}$)	$DP_{n,Exp}$ (RMN)	x (RMN)	$M_{n,Exp}$ (CES) / $DP_{n,Exp}$ (CES)	I_P (CES)
50 (5700 g.mol⁻¹)	49	0,99	6600 / 57	1,3
100 (11400 g.mol⁻¹)	111	0,99	12900 / 113	1,2
200 (22800 g.mol⁻¹)	225	0,99	26600 / 233	1,2

Avec - $DP_{n,Th}$: degré de polymérisation moyen en nombre théorique.

- $M_{n,Th}$: masse molaire moyenne en nombre de la poly(ϵ CL) théorique en g.mol⁻¹.

- $DP_{n,Exp}$ (RMN) : degré de polymérisation moyen en nombre expérimental déterminé par RMN.

- x (RMN) : taux de conversion déterminé par RMN.

- $M_{n,Exp}$ (CES) : masse molaire moyenne en nombre corrigé de la poly(ϵ CL) expérimentale déterminée par CES dans du DMF, LiCl 10mM (calibration avec des standard de polystyrène) en g.mol⁻¹.

- $DP_{n,Exp}$ (CES) : degré de polymérisation moyen en nombre expérimental déterminé par CES.

- I_P (CES) : dispersité déterminée par CES.

Tableau III.2 : Homopolymérisation de l' ϵ CL en présence de DSDOP

Pour les trois tailles, les chaînes présentent une dispersité de l'ordre de 1,2, plus étroite que lors de l'utilisation de l'Al(OiPr)₃. On peut en conclure que l'utilisation de DSDOP entraîne moins de réactions secondaires et donc permet un meilleur contrôle du degré de polymérisation et de la dispersité. De plus, le DSDOP est présent sous une unique forme contrairement à l'Al(OiPr)₃ ce qui permet un meilleur contrôle de la concentration en sites d'amorçage.

III.1.3 Conclusion

Les deux amorceurs présentent des résultats de polymérisation similaires bien que le DSDOP permette d'avoir des polymères avec une dispersité plus étroite. De plus, au vue des différents essais, le DSDOP permet d'accéder plus facilement à des homopolymères de masse molaire élevée. Pour finir, le DSDOP présente l'avantage d'être autorisé par la FDA et les autorités sanitaires européennes.

Finalement, l'amorceur qui semble présenter le plus d'avantage pour la synthèse de poly(ϵ CL) de DP 50, 100 et 200 est le DSDOP. Par un contrôle de la quantité d'amorceur par rapport à la quantité d' ϵ CL, il est facile d'obtenir des poly(ϵ CL) de tailles désirées. L'ensemble des copolymères poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) seront synthétisés en présence de cet alcoolate d'étain.

III.2 Copolymérisation des ϵ CL et α Cl ϵ CL

Le copolymère poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) est le précurseur du copolymère final poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL). Il est obtenu par copolymérisation en présence de DSDOP des monomères ϵ CL et α Cl ϵ CL. Ce dernier monomère n'est pas commercial et doit être synthétisé.

III.2.1 Synthèse de l' α Cl ϵ CL

La synthèse de l' α Cl ϵ CL est décrite par Lenoir *et al.*^[184] Elle consiste à réaliser l'oxydation de Baeyer-Villiger par le *m*CPBA de l' α -chloro-cyclohexanone, en trois jours et à température ambiante. Cette réaction tend vers la formation de deux isomères : l' α Cl ϵ CL et l' ϵ Cl ϵ CL (Schéma III.6).

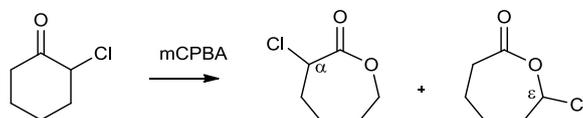


Schéma III.6 : Réarrangement de Baeyer-Villiger de l' α -chloro-cyclohexanone

La RMN ¹H du brut réactionnel montre bien la présence des deux isomères α Cl ϵ CL et ϵ Cl ϵ CL (Figure III.5).

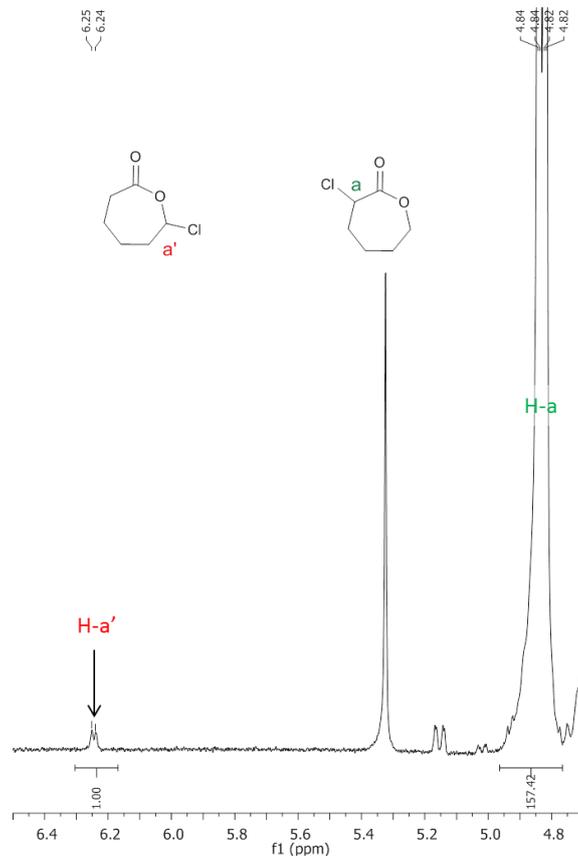


Figure III.5 : RMN ¹H du brut réactionnel contenant de l' α Cl ϵ CL et l' ϵ Cl ϵ CL

La fraction molaire de ces deux isomères peut être estimée par RMN ¹H en calculant le rapport de l'intensité des protons **H-a'** de l' ϵ Cl ϵ CL à 6,25 ppm et du signal des protons **H-a** de l' α Cl ϵ CL à 4,84 ppm (Équation III.7).

$$F_{\epsilon\text{Cl}\epsilon\text{CL}}(\text{RMN}) = \frac{I_{\text{H-a}'}}{I_{\text{H-a}'} + I_{\text{H-a}}}$$

Avec - $F_{\epsilon\text{Cl}\epsilon\text{CL}}(\text{RMN})$: fraction molaire en α Cl ϵ CL déterminée par RMN ¹H.

- $I_{\text{H-a}}$: intensité des multiplets correspondant aux protons $\text{CH}_2\text{-Cl}$ (H-a) de l' α Cl ϵ CL.

- $I_{\text{H-a}'}$: intensité des multiplets correspondant aux protons $\text{CH}_2\text{-Cl}$ (H-a') de l' ϵ Cl ϵ CL.

Équation III.7

La fraction molaire $F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}}$ dans le brut est estimée à 0,6%. Bien que la présence de l' ϵ Cl ϵ CL soit très minoritaire, il est important de l'éliminer intégralement. En effet, des réactions d'homopolymérisation d' α Cl ϵ CL contaminées par de l' ϵ Cl ϵ CL ont été réalisées et si la polymérisation a bien lieu celle-ci s'arrête spontanément avant que tous les monomères soient consommés. Lecomte *et al.*^[185] ont proposé comme explication que l'addition de l' ϵ Cl ϵ CL arrêterait la polymérisation, en oxydant l'alcoolate en bout de chaîne en aldéhyde via l'élimination du chlore (Schéma III.7).

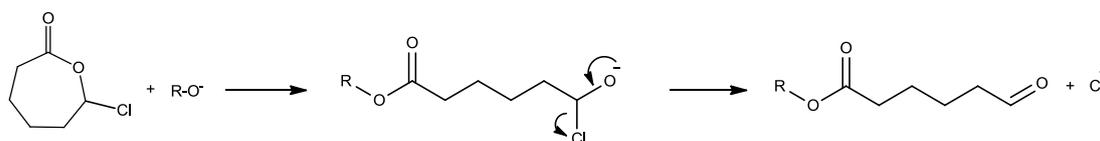


Schéma III.7 : Mécanisme de terminaison de la copolymérisation par l' ϵ Cl ϵ CL

Ces deux isomères sont donc séparés par distillation sous vide. L' ϵ Cl ϵ CL possède un point d'ébullition inférieur à celui de l' α Cl ϵ CL, il est facilement éliminé dans la fraction de tête. La RMN ¹H confirme la disparition totale des signaux à 6,2 ppm et donc l'élimination complète de l' ϵ Cl ϵ CL lors de la distillation. Parallèlement, le déplacement chimique du proton H-a à 4,8 ppm caractéristique du $\text{CH}_2\text{-Cl}$, indique la présence de l'atome de chlore en position α du produit recherché (Figure III.6).

III – Synthèse et caractérisation des copolymères poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)

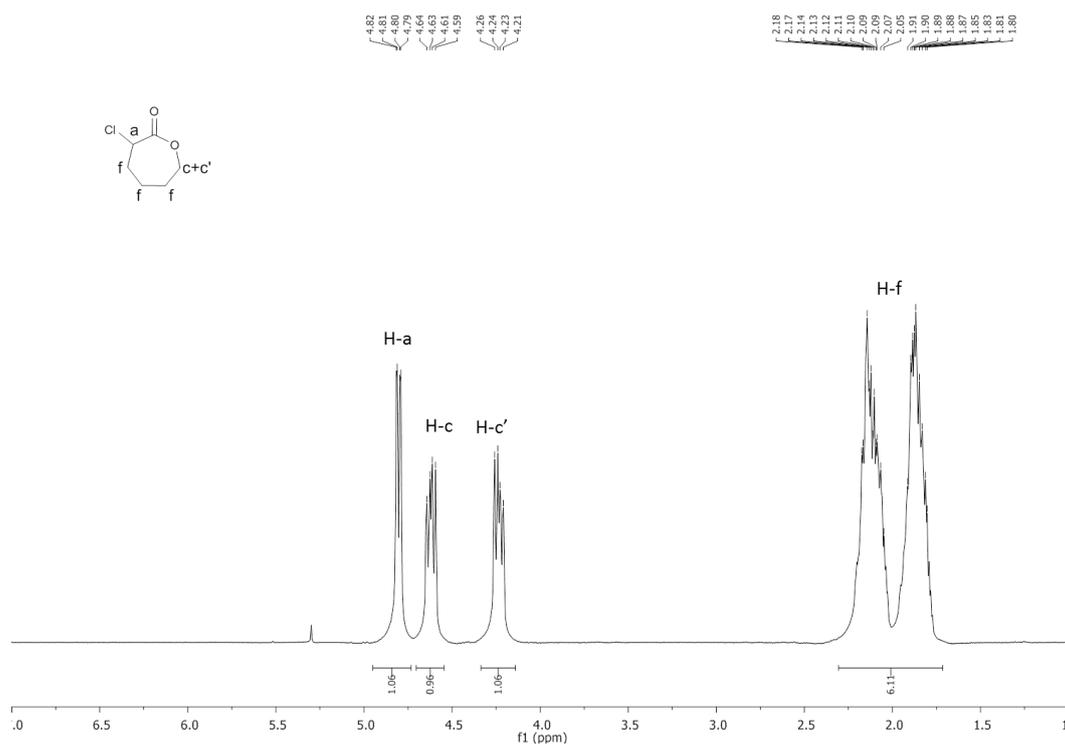


Figure III.6 : RMN ¹H de l' α Cl ϵ CL

Enfin la spectrométrie de masse ESI⁺ a permis d'observer un produit unique correspondant à l' α Cl ϵ CL (Figure III.7). Le produit est obtenu avec un rendement de 77%.

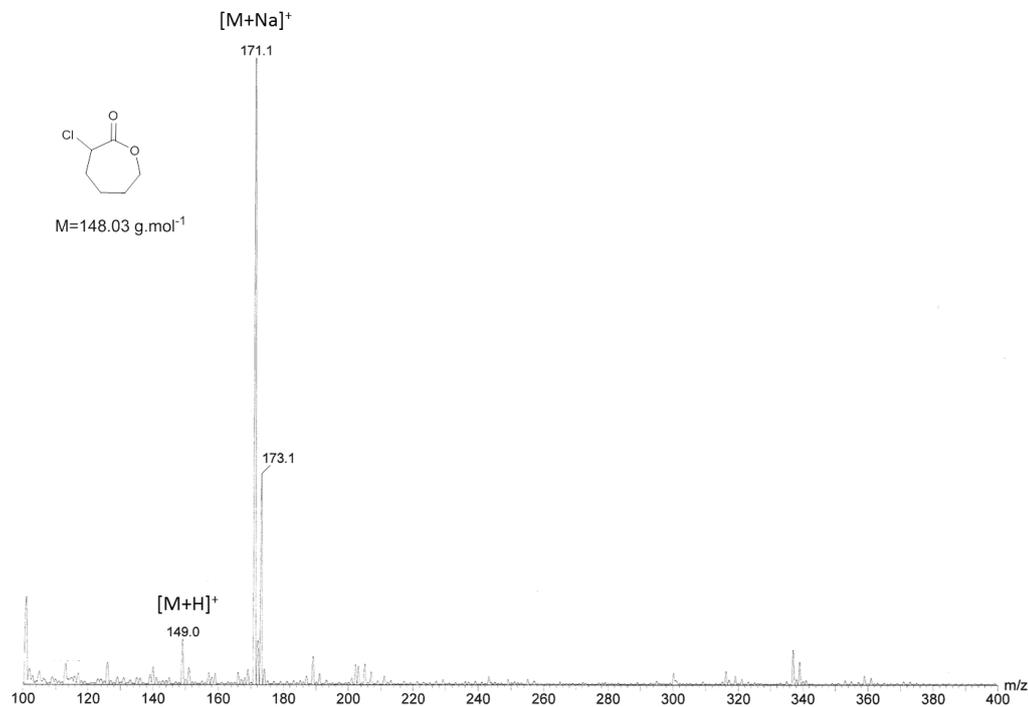


Figure III.7 : Spectre de masse ESI⁺ de l' α Cl ϵ CL

III.2.2 Synthèse de la poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL)

Le nombre d'atome de chlore est *a priori* contrôlé par la stœchiométrie initiale des deux monomères α Cl ϵ CL et ϵ CL. Comme précédemment, des lots de copolymère de DP 50, 100 et 200 ont été synthétisés. De plus, ces trois lots de copolymères seront déclinés en deux fractions molaires en α Cl ϵ CL ($F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}}$) de 5% et 20%. Le choix de ces fractions molaires est arbitraire. Avec $F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} = 20\%$, la masse de PCL approche la masse de CO-V(N) ou de COs, ce qui devrait conférer des propriétés amphiphiles aux copolymères greffée. Avec $F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} = 5\%$, l'importante variation de la masse relative entre la PCL et les oligosaccharides devrait permettre d'obtenir deux familles de copolymère greffée avec des propriétés différentes.

Le copolymère statistique poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) est synthétisé par copolymérisation de l' α Cl ϵ CL décrit précédemment et de l' ϵ CL commerciale dans le toluène, en présence de DSDOP, pendant 4 heures à 40°C (Schéma III.8). Puis, les bouts de chaîne activés par l'alcoolate d'étain sont hydrolysés par ajout d'acide hydrochlorique dilué. Les copolymères sont purifiés par précipitation dans le *n*-heptane.

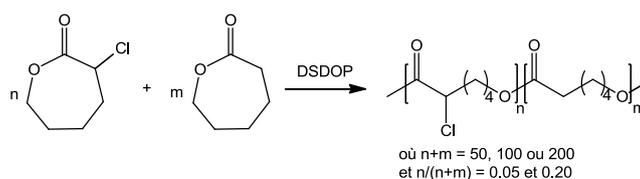


Schéma III.8 : Copolymérisation de l' α Cl ϵ CL et de l' ϵ CL par le DSDOP

En considérant que comme dans le cas des homopolymérisations, le taux de conversion est total ($x=1$), le DP théorique peut être déterminé (Équation III.8).

$$DP_{Th} = \frac{\left((n_{\epsilon CL} \times (1 - F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}})) + (n_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} \times F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}}) \right)}{n_{\text{amorceur}}} \times x$$

Avec - $DP_{n,Th}$: degré de polymérisation théorique.

- $n_{\epsilon CL}$: quantité de ϵ CL en mol.

- $n_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}}$: quantité de α Cl ϵ CL en mol.

- n_{amorceur} : quantité d'amorceur en mol.

- $F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}}$: fraction molaire théorique en α Cl ϵ CL de 5% ou 20%.

- x : Taux de conversion.

Équation III.8

En faisant intervenir la masse molaire de l' ϵ CL de 114 g.mol⁻¹ et de la masse molaire de l' α Cl ϵ CL de 148 g.mol⁻¹, on définit la masse molaire théorique (Équation III.9).

$$M_{n,Th} = DP_{Th} \times \left((M_{\epsilon CL} \times (1 - F_{\alpha Cl\epsilon CL})) + (M_{\alpha Cl\epsilon CL} \times F_{\alpha Cl\epsilon CL}) \right)$$

Avec - $M_{n,Th}$: Masse molaire théorique en g.mol⁻¹.

- $DP_{n,Th}$: degré de polymérisation théorique.

- $M_{\epsilon CL}$: Masse molaire de l' ϵ CL (114 g.mol⁻¹).

- $M_{\alpha Cl\epsilon CL}$: Masse molaire de l' α Cl ϵ CL (148 g.mol⁻¹).

- $F_{\alpha Cl\epsilon CL}$: fraction molaire théorique en α Cl ϵ CL de 5% ou 20%.

Équation III.9

Il est décrit que le monomère α Cl ϵ CL est plus réactif, vis-à-vis de la polymérisation par ouverture de cycle, que l' ϵ CL.^[184] En effet, la présence d'un groupement électroattracteur en α facilite l'ouverture de la lactone α Cl ϵ CL. Cependant la proportion d' α Cl ϵ CL ne dépassant pas 20%, le monomère ϵ CL est majoritaire, et ceci compense sa réactivité plus faible. On peut alors émettre l'hypothèse que le copolymère poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) est statistique.

III.2.2.1 Synthèse de la poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) à 5% en α Cl ϵ CL

Les copolymères avec $F_{\alpha Cl\epsilon CL} = 5\%$ sont caractérisés par RMN ¹H dans du CDCl₃ (Figure III.8).

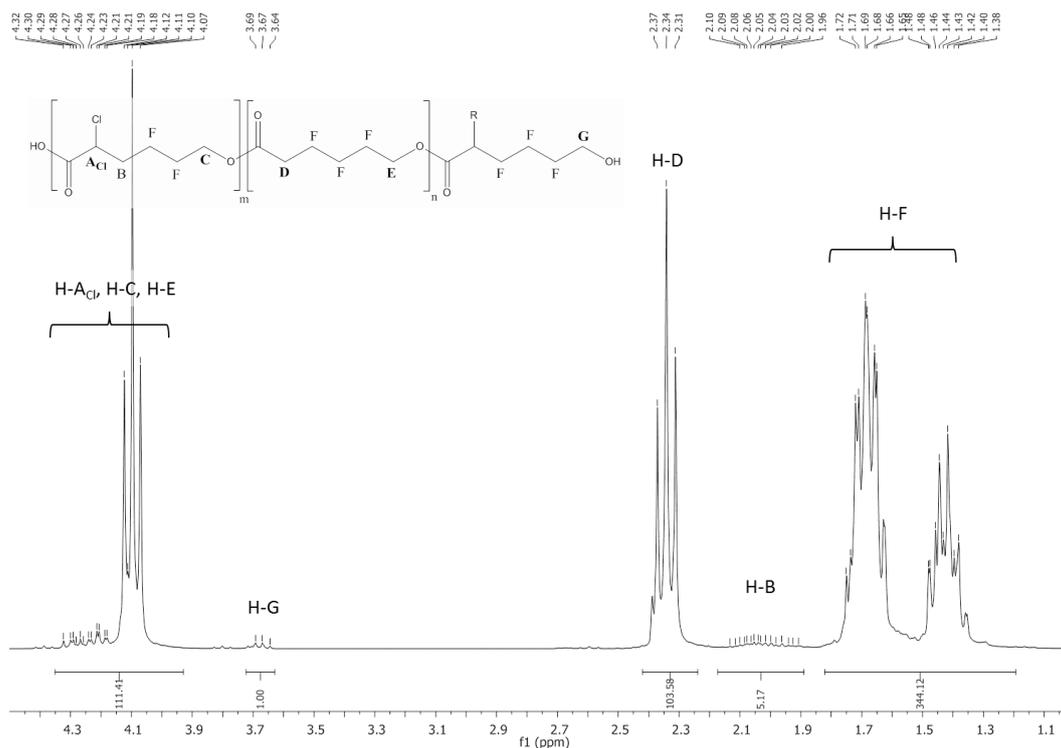


Figure III.8 : RMN ¹H du copolymère du PCL ¹⁰⁰N₃ ^{5%} catalysé par du DSDOP dans le CDCl₃^f

f. Les différents copolymères seront notés PCL^{DP}Cl^{F α Cl ϵ CL}, ainsi la poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) ayant un DP de 100 et une fraction molaire en α Cl ϵ CL de 20% sera notée PCL¹⁰⁰Cl^{20%}.

La fraction molaire en résidu α Cl ϵ CL est calculée en comparant les intégrales des multiplets situés entre 4,5 et 3,9 ppm correspondant aux protons $\underline{\text{CH}}\text{-Cl}$ (A_{Cl}), $\underline{\text{CH}}_2\text{-O}$ des résidus α Cl ϵ CL (C) et ϵ CL (E) et celle des multiplets à 2,3 ppm correspondant aux protons $\underline{\text{CH}}_2\text{-CO}$ (D) des résidus ϵ CL (Équation III.10).

$$F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}}(\text{RMN}) = \frac{(I_{A_{\text{Cl}CE}} - I_D)/3}{(I_{A_{\text{Cl}CE}} - I_D)/3 + I_D/2}$$

Avec - $F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}}(\text{RMN})$: fraction molaire en α Cl ϵ CL.

- $I_{A_{\text{Cl}CE}}$: intensité des multiplets correspondant aux protons $\underline{\text{CH}}\text{-Cl}$ (A_{Cl}) et $\underline{\text{CH}}_2\text{-O}$ des résidus α Cl ϵ CL (C) et ϵ CL (E).

- I_D : intensité des multiplets correspondant aux protons $\underline{\text{CH}}_2\text{-CO}$ (D) de l' ϵ CL.

Équation III.10

La masse molaire moyenne est calculée à partir des intégrales des signaux des protons de bouts de chaînes $\underline{\text{CH}}_2\text{-OH}$ (G) à 3,7 ppm avec les multiplets situés entre 4,5 et 3,9 ppm correspondant aux signaux des protons $\underline{\text{CH}}\text{-Cl}$ (A), $\underline{\text{CH}}_2\text{-O}$ (C) des résidus α Cl ϵ CL et ϵ CL (E) et les multiplets à 2,3 ppm correspondant aux signaux des protons $\underline{\text{CH}}_2\text{-CO}$ (D) des résidus ϵ CL (Équation III.11).

$$DP_{\text{exp}}(\text{RMN}) = \frac{(I_{ACE} - I_D)/3}{I_G/2} + \frac{I_D/2}{I_G/2}$$

Avec - $DP_{n,\text{exp}}(\text{RMN})$: degré de polymérisation déterminée par RMN.

- I_{ACE} : intensité des multiplets correspondant aux protons $\underline{\text{CH}}\text{-Cl}$ (A) et $\underline{\text{CH}}_2\text{-O}$ des résidus α Cl ϵ CL (C) et ϵ CL (E).

- I_D : intensité des multiplets correspondant aux protons $\underline{\text{CH}}_2\text{-CO}$ (D) des résidus ϵ CL.

- I_G : intensité des multiplets correspondant aux protons $\underline{\text{CH}}_2\text{-OH}$ (G) de la poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL).

Équation III.11

La fraction molaire en résidu α Cl ϵ CL ainsi que le degré de polymérisation déterminés par RMN pour les trois copolymères sont regroupés dans le Tableau III.3 avec les données observées en CES.

Comme dans le cas de l'homopolymérisation de l' ϵ CL par le DSDOP, la chromatographie d'exclusion stérique du brut ne montre pas la présence de monomère n'ayant pas réagi. Le taux de conversion est donc quantitatif (Figure III.9).

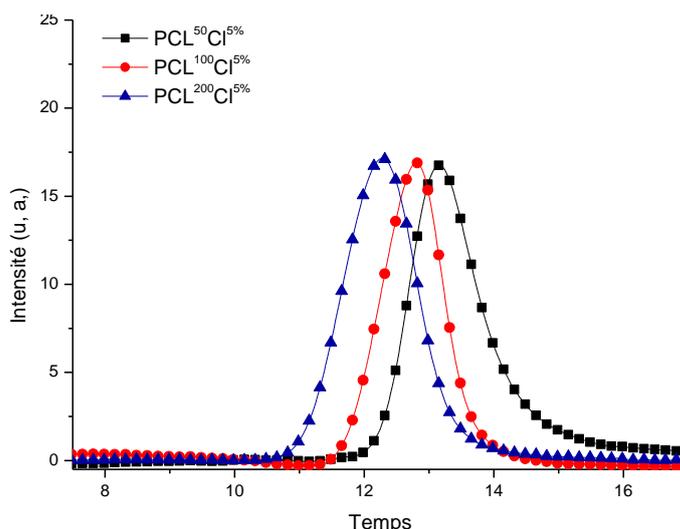


Figure III.9 : CES des trois copolymères PCL⁵⁰Cl^{5%}, PCL¹⁰⁰Cl^{5%}, et PCL²⁰⁰Cl^{5%}

Les résultats de la copolymérisation de l' α Cl ϵ CL et de l' ϵ CL (avec 5% en α Cl ϵ CL) sont résumés ci-dessous (Tableau III.3).

DP _{n,Th} (M _{n,Th})	F _{αClϵCL,Exp} (RMN)	DP _{n,Exp} (RMN)	x (RMN)	M _{n,Exp} (CES) / DP _{n,Exp} (CES) ^g	I _P (CES)
50 (5800 g.mol ⁻¹)	0,07	55	0,99	5300 / 45	1,4
100 (11600 g.mol ⁻¹)	0,04	106	0,99	11000 / 95	1,2
200 (23100 g.mol ⁻¹)	0,04	188	0,99	19700 / 170	1,3

Avec - DP_{n,Th} : degré de polymérisation moyen en nombre théorique.

- F _{α Cl ϵ CL,Exp} (RMN) : Fraction molaire en motif α Cl ϵ CL déterminé par RMN.

- M_{n,Th} : masse molaire moyenne en nombre de la poly(ϵ CL) théorique en g.mol⁻¹.

- DP_{n,Exp} (RMN) : degré de polymérisation moyen en nombre expérimental déterminé par RMN.

- x (RMN) : taux de conversion déterminé par RMN.

- M_{n,Exp} (CES) : masse molaire moyenne en nombre corrigé de la poly(ϵ CL) expérimentale déterminée par CES dans du DMF, LiCl 10mM (calibration avec des standard de polystyrène) en g.mol⁻¹.

- DP_{n,Exp} (CES) : degré de polymérisation moyen en nombre expérimental déterminé par CES.

- I_P (CES) : dispersité déterminée par CES.

Tableau III.3 : Copolymérisation de l' α Cl ϵ CL et de l' ϵ CL avec 5% molaire en α Cl ϵ CL.

Le taux de conversion est total et cela confirme les résultats obtenus en chromatographie d'exclusion stérique. Comme attendu la fraction molaire en résidu α Cl ϵ CL est de l'ordre de 5% dans le copolymère final. Les tailles sont aussi contrôlées puisque que l'écart entre les DP théoriques et les DP expérimentaux observés en RMN est de l'ordre de $\pm 10\%$. La polymérisation semble contrôlée.

g. La correction de la masse molaire est réalisée avec les paramètres de MHKS de la PCL en faisant l'approximation que la viscosité reste inchangée entre l'homopolymère et le copolymère à 5% en motif α Cl ϵ CL

III.2.2.1 Synthèse de la poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL) à 20% en α Cl ϵ CL

Les copolymères sont synthétisés comme précédemment en présence de DSDOP, dans le toluène à 40°C pendant 4 heures. Les copolymères obtenus avec $F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} = 20\%$ sont caractérisés par RMN ¹H dans du CDCl₃ (Figure III.10).

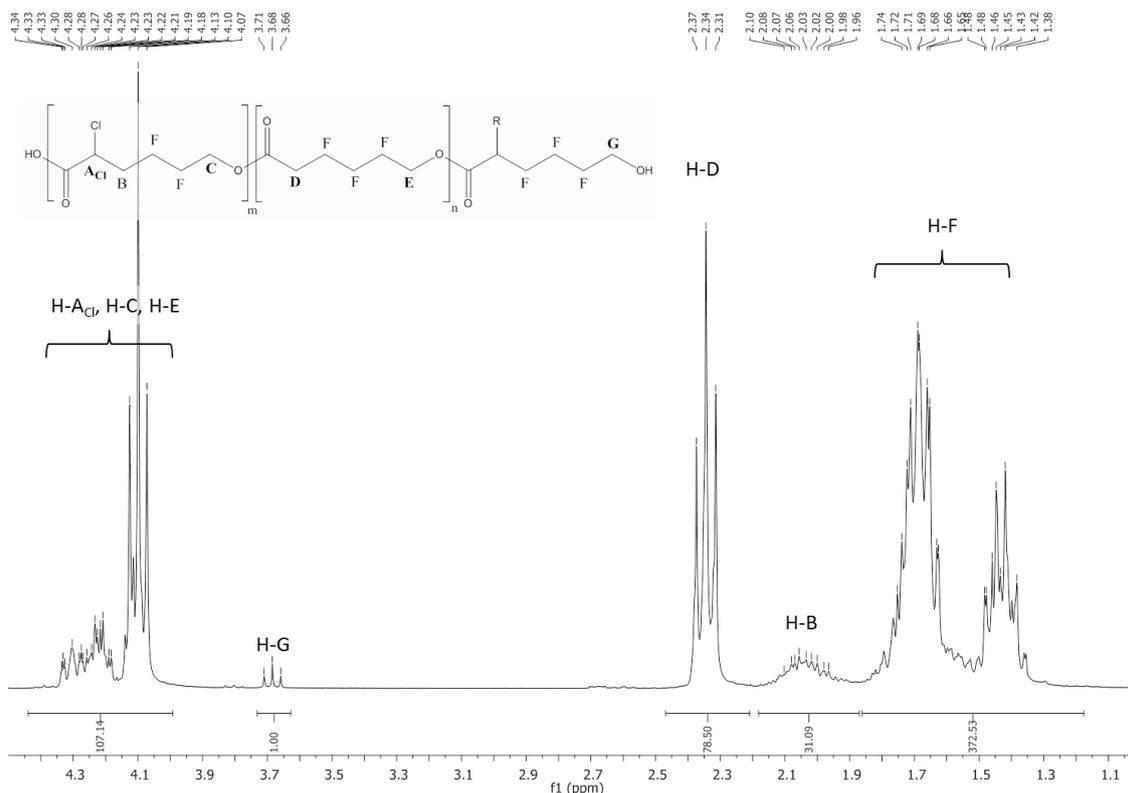


Figure III.10 : RMN ¹H du copolymère du PCL ¹⁰⁰N₃^{20%} catalysé par du DSDOP dans le CDCl₃

L'analyse RMN ¹H est complétée par CES (Figure III.11).

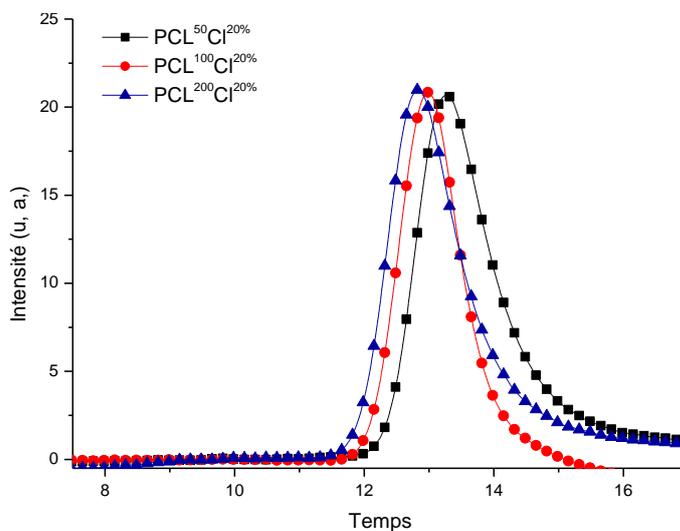


Figure III.11 : CES des trois copolymères PCL ⁵⁰Cl^{20%}, PCL ¹⁰⁰Cl^{20%}, et PCL ²⁰⁰Cl^{20%}

Les résultats de la copolymérisation de l' α Cl ϵ CL et de l' ϵ CL avec 20% en α Cl ϵ CL sont résumés ci-dessous (Tableau III.4).

$DP_{n,Th}(M_{n,Th})$	$F_{\alpha Cl\epsilon CL, Exp} (RMN)$	$DP_{n,Exp} (RMN)$	$x (RMN)$	$M_{n,Exp} (CES) / DP_{n,Exp} (CES)^h$	$I_p (CES)$
50 (6000 g.mol⁻¹)	0,21	53	0,99	5100 / 44	1,4
100 (12100 g.mol⁻¹)	0,22	98	0,99	10100 / 89	1,5
200 (24100 g.mol⁻¹)	0,21	184	0,99	19700 / 172	1,4

Avec - $DP_{n,Th}$: degré de polymérisation moyen en nombre théorique.

- $F_{\alpha Cl\epsilon CL, Exp} (RMN)$: Fraction molaire en motif α Cl ϵ CL déterminé par RMN.

- $M_{n,Th}$: masse molaire moyenne en nombre de la poly(ϵ CL) théorique en g.mol⁻¹.

- $DP_{n,Exp} (RMN)$: degré de polymérisation moyen en nombre expérimental déterminé par RMN.

- $x (RMN)$: taux de conversion déterminé par RMN.

- $M_{n,Exp} (CES)$: masse molaire moyenne en nombre corrigé de la poly(ϵ CL) expérimentale déterminée par CES dans du DMF, LiCl 10mM (calibration avec des standard de polystyrène) en g.mol⁻¹.

- $DP_{n,Exp} (CES)$: degré de polymérisation moyen en nombre expérimental déterminé par CES.

- $I_p (CES)$: dispersité déterminée par CES.

Tableau III.4 : Copolymérisation de l' α Cl ϵ CL et de l' ϵ CL avec 20% molaire en α Cl ϵ CL

Comme précédemment, l'absence de protons caractéristiques du monomère observé en RMN ¹H confirme que le taux de conversion est proche de 1. Cette observation est confortée après une analyse en CES. La fraction molaire en résidu α Cl ϵ CL est comprise en 21% et 22% pour 20% désirée. Le contrôle de la $F_{\alpha Cl\epsilon CL}$ est supérieur à celui de la première série des copolymères à 5%. Les tailles sont aussi contrôlées puisque que l'écart entre les DP théoriques et les DP expérimentaux observés en RMN sont de l'ordre de \pm 8%.

III.2.3 Conclusion

Les deux séries avec $F_{\alpha Cl\epsilon CL}$ de 5% et 20% de trois polymères de DP 50, 100 et 200 ont été synthétisées avec succès. La fraction molaire en motif α Cl ϵ CL ainsi que le degré de polymérisation sont contrôlés. Les atomes de chlore des six copolymères vont être substitués par un groupement azide, afin d'obtenir les PCL finales.

III.3 Obtention de la poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)

h. La correction de la masse molaire est réalisée avec les paramètres de HWSK de la PCL en faisant l'approximation que la viscosité reste inchangée entre l'homopolymère et le copolymère à 20% en motif α Cl ϵ CL.

Les poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL) sont obtenues par déplacement des atomes de chlore de la poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) par de l'azoture de sodium (Schéma III.9). Cette réaction se fait en 12H à température ambiante dans du DMF anhydre à l'abri de la lumière.

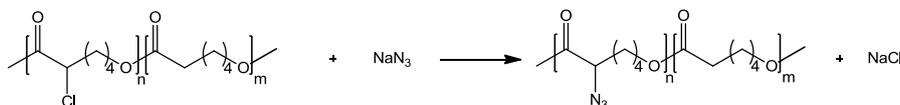


Schéma III.9 : Synthèse de la poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)

Le spectre infrarouge de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%} est réalisé (Figure III.12).ⁱ

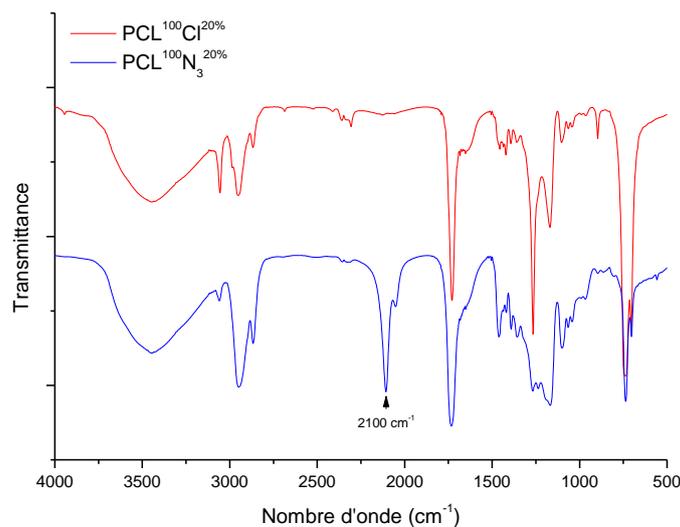


Figure III.12 : Spectre infrarouge de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%} et de la PCL¹⁰⁰Cl^{20%}.

La présence d'une bande d'absorption à 2100 cm⁻¹ sur le spectre infrarouge confirme bien la présence des groupements azide, bande absente du composé poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL).

La RMN ¹H de la poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL) est similaire à celle de la poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL). Il faut s'intéresser au massif de part et d'autre du signal E pour observer la substitution du chlore par l'azide (Figure III.13 et Figure III.14).

i. Les différents copolymères seront notés PCL^{DP}N₃^{F α Cl ϵ CL}, ainsi la poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) ayant un DP de 100 et une fraction molaire en α N₃ ϵ CL de 20% sera notée PCL¹⁰⁰N₃^{20%}.

III – Synthèse et caractérisation des copolymères poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL)

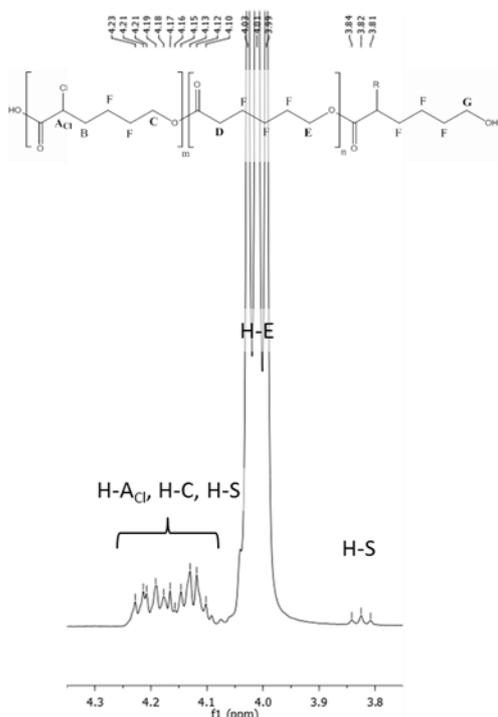


Figure III.13 : RMN ¹H de la PCL¹⁰⁰Cl^{20%}

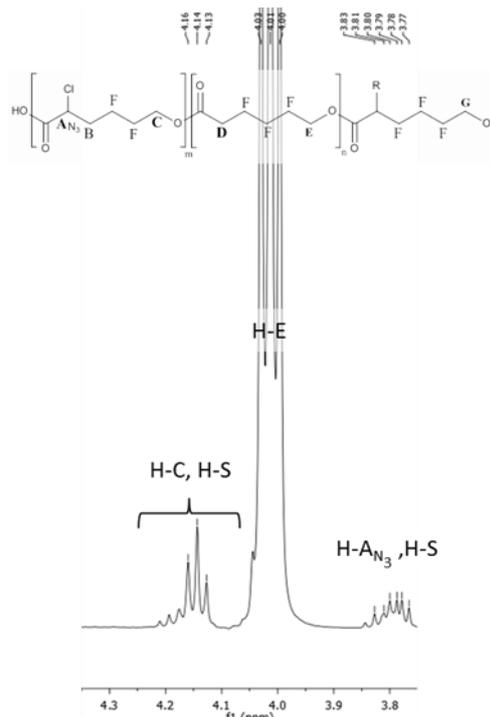


Figure III.14 : RMN ¹H de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}

Le déplacement du multiplet de 4,3 ppm (CH-Cl de la poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL)) à 3,8 ppm correspond à la substitution du chlore par un azide. Le rendement de substitution peut alors être estimé (Équation III.12) :

$$\eta_{\text{substitution}} (\text{RMN}) = \frac{I_{A_{N_3}}}{I_{A_{Cl}}} \text{ avec } I_{A_{Cl}} = I_{CSA_{Cl}} - I_{CS}$$

$$\text{et } I_{A_{N_3}} = I_{SA_{N_3}} - I_S$$

Avec - $\eta_{\text{substitution}} (\text{RMN})$: rendement de la substitution de la poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL) en poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL).

- $I_{A_{Cl}}$: intensité des multiplets correspondant aux protons $\underline{\text{CH}}\text{-Cl}$ (A_{Cl}) des résidus α Cl ϵ CL.

- $I_{A_{N_3}}$: intensité des multiplets correspondant aux protons $\underline{\text{CH}}\text{-Cl}$ (A_{N_3}) des résidus α N₃ ϵ CL.

- $I_{CSA_{Cl}}$: intensité des multiplets correspondant aux protons satellites (S), $\underline{\text{CH}}\text{-Cl}$ (A_{Cl}) et $\underline{\text{CH}}_2\text{-O}$ (C) des résidus α Cl ϵ CL.

- I_{CS} : intensité des multiplets correspondant aux protons satellites (S) et $\underline{\text{CH}}_2\text{-O}$ (C) des résidus α Cl ϵ CL.

- $I_{SA_{N_3}}$: intensité des multiplets correspondant aux protons satellites (S) et $\underline{\text{CH}}\text{-Cl}$ (A_{N_3}) des résidus α Cl ϵ CL.

- I_S : intensité des multiplets correspondant aux protons satellites (S).

Équation III.12

Le rendement de substitution de la PCL¹⁰⁰Cl^{20%} par une fonction azide est de 98%. Il est estimé comme quantitatif.

III – Synthèse et caractérisation des copolymères poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)

La PCL¹⁰⁰N₃^{20%} et la PCL¹⁰⁰Cl^{20%} ont été comparées en CES (Figure III.15). Le chromatogramme ne montre pas de différence de temps de rétention. Ceci démontre que le rayon hydrodynamique n'est pas influencé par la substitution du chlore par l'azide. De même cela prouve qu'il n'y pas de dégradation de la poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL) qu'aurait pu être causer par le caractère nucléophile et légèrement basique de l'azoture de sodium.

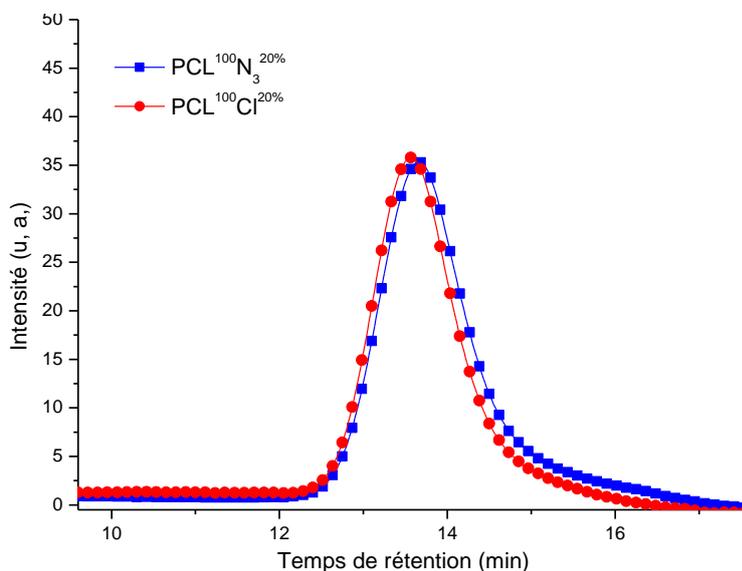


Figure III.15 : CES de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%} et de la PCL¹⁰⁰Cl^{20%}

La même démarche a été suivie pour l'ensemble des copolymères. Pour chacune, une bande à 2100 cm⁻¹ est observée en spectrométrie infrarouge. Les analyses CES prouvent toutes l'absence de dégradation des copolymères et un maintien des temps de rétention entre les poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) et les poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL). Les taux de substitution calculés selon l'équation 8 sont résumés ci-dessous (Tableau III.5).

	$\eta_{\text{substitution}}$ (RMN)
PCL ⁵⁰ N ₃ ^{5%}	95%
PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{5%}	97%
PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{5%}	97%
PCL ⁵⁰ N ₃ ^{20%}	96%
PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%}	98%
PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{20%}	97%

Avec $\eta_{\text{substitution}}$ (RMN) : Rendement de la substitution du chlore l'azide déterminé par RMN.

Tableau III.5 : Résultat de la substitution des poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) en poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)

Les taux de substitution de l'ensemble des copolymères sont supérieurs à 95%. La substitution est donc considérée comme quantitative.

Les copolymères poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL) ont été obtenus en deux étapes. Cette stratégie de synthèse permet de conserver la taille des chaînes de copolymère. De nombreux autres systèmes peuvent être synthétisés par ces approches, à condition que la substitution nucléophile du chlore soit possible et qu'il n'y ait pas de dégradation de la chaîne polyester.

III.4 Conclusion

Le monomère α Cl ϵ CL a été synthétisé et copolymérisé avec de l' ϵ CL en présence de DSDOP pour obtenir six copolymères : trois copolymères ayant une fraction molaire en α Cl ϵ CL de 5% avec un degré de polymérisation de 50, 100 et 200, et trois autres avec une fraction molaire en α Cl ϵ CL de 20%. Le contrôle du degré de polymérisation, le degré de polymérisation et la fraction molaire en groupement latéral ont été parfaitement maîtrisés, grâce aux utilisations du DSDOP et des conditions optimisées. Les atomes de chlore ont ensuite été substitués par des fonctions azide. Ces blocs hydrophobes seront ensuite couplés par CuAAC avec les conjugués propargyle de CO-V(N) et les conjugués propargyle de COs pour obtenir le système amphiphile.

Références bibliographiques

- [109] H. R. Kricheldorf, M. Berl, N. Scharnagl, *Macromolecules* **1988**, *21*, 286-293.
- [113] H. R. Kricheldorf, S. Eggerstedt, *Macromolecular Chemistry and Physics* **1998**, *199*, 283-290.
- [144] R. Riva, S. Schmeits, C. Jérôme, R. Jérôme, P. Lecomte, *Macromolecules* **2007**, *40*, 796-803.
- [176] P. Lecomte, F. Stassin, R. Jérôme, *Macromolecular Symposia* **2004**, *215*, 325-338.
- [177] H. Li, A. Debuigne, R. Jérôme, P. Lecomte, *Angewandte Chemie* **2006**, *118*, 2322-2325.
- [178] P. Dubois, R. Jérôme, P. Teyssie, *Polymer Bulletin* **1989**, *22*, 475-482.
- [179] H. Mark, in *Der Feste Körper*, Hirzel ed., **1938**, pp. 65-104.
- [180] W. Halabalova, L. Simek, J. Dostal, M. Bohdanecky, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **2004**, *9*, 65-75.
- [181] A. Schindler, Y. M. Hibionada, C. G. Pitt, *Journal of Polymer Science Part A - Polymer Chemistry* **1982**, *20*, 319-326.
- [182] C. Strazielle, H. Benoit, O. Vogl, *European Polymer Journal* **1978**, *14*, 331-334.
- [183] Y. Guillaneuf, P. Castignolles, *Journal of Polymer Science Part A - Polymer Chemistry* **2008**, *46*, 897-911.
- [184] S. Lenoir, R. Riva, X. Lou, C. Detrembleur, R. Jérôme, P. Lecomte, *Macromolecules* **2004**, *37*, 4055-4061.
- [185] P. Lecomte, C. Jérôme, in *New Smart Materials Via Metal Mediated Macromolecular Engineering*, Khosravi, Yagci and Savelyev ed., **2009**, pp. 343-360.

IV NANOGELS ET ENCAPSULATION

Sommaire

IV.1	<i>Synthèse des poly(αN₃ϵCL-co-ϵCL)-g-CO-V(N) par CuAAC</i>	134
IV.2	<i>Synthèse de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) modèle par CuAAC</i>	135
IV.3	<i>Synthèse de la PCL¹⁰⁰N₃^{5%}-g-CO-V(N) modèle par CuAAC</i>	138
IV.3.1	Conclusion	138
IV.4	<i>Synthèse des poly(αN₃ϵCL-co-ϵCL)-g-COs par CuAAC</i>	139
IV.4.1	Synthèse des PCL ⁵⁰ N ₃ ^{5%} -g-COs, PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{5%} -g-COs et PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{5%} -g-COs	139
IV.4.2	Synthèse des PCL ⁵⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs, PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs et PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	140
IV.4.3	Conclusion	143
IV.5	<i>Formation des nanoparticules</i>	144
IV.5.1	Nanoparticules à base de PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-CO-V(N) modèle	144
IV.5.1.1	Obtention de nanoparticule par dissolution directe	144
IV.5.1.2	Obtention de nanoparticules par la méthode des co-solvants	148
IV.5.1.3	Conclusion	149
IV.5.2	Nanoparticules à base de PCL ⁵⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs, PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs et PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	150
IV.5.2.1	Obtention de nanoparticules par la méthode des co-solvants	150
IV.5.2.2	Obtention des nanoparticules par dissolution directe	151
IV.5.2.3	Conclusion	154
IV.6	<i>Influence de la force ionique et du pH</i>	154
IV.6.1	Taille des nanoparticules de PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs en fonction de la force ionique	155
IV.6.2	Taille des NP de PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs en fonction du pH	156
IV.6.3	Conclusion	157
IV.7	<i>Réticulation des nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs</i>	158
IV.7.1	Synthèse de l'agent réticulant	158
IV.7.2	Réticulation des nanoparticules	159
IV.7.3	Taille des nanoparticules réticulées en fonction de la force ionique	162
IV.7.4	Conclusion	164
IV.8	<i>Encapsulation de la DOX dans les nanoparticules</i>	164
IV.8.1	Tests préliminaires d'encapsulation de doxorubicine	165
IV.8.2	Encapsulation de la DOX dans les nanoparticules, et réticulation	166
IV.8.3	Conclusion	167
IV.9	<i>Relargage de la DOX par les nanoparticules</i>	168
IV.10	Conclusion	170

Les deux précédents chapitres ont décrit la synthèse du bloc hydrophile composé de CO-V(N) ou de COs fonctionnalisés en position anomère par une fonction propargylamine, et la préparation de six copolymères poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL) de DP de 50, 100 et 200 avec une fraction molaire en résidu α N₃ ϵ CL de 5% et 20%. Ce chapitre traitera du couplage par chimie « click » CuAAC entre ces deux types de blocs pour obtenir les copolymères greffés finaux de type poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL)-g-CO-V(N) et de type poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL)-g-COs (Figure IV.1).

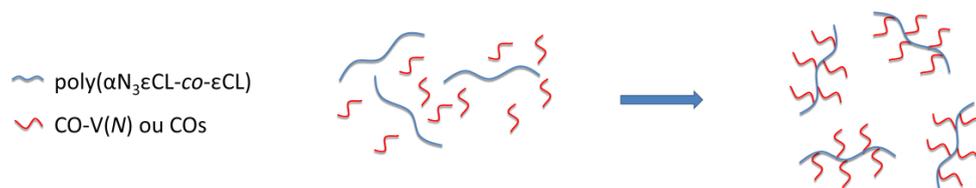
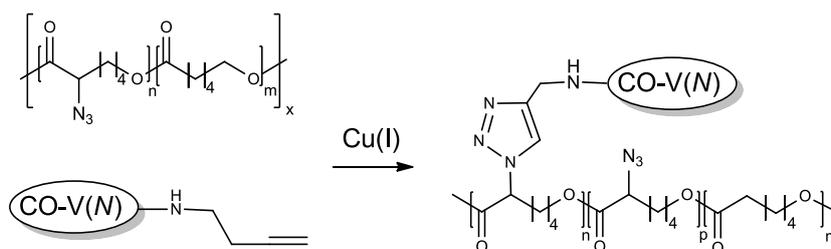


Figure IV.1 : Formation des copolymères greffés poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL)-g-CO-V(N) et poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL)-g-COs

Le couplage entre le bloc hydrophile et le bloc hydrophobe devra être suffisamment efficace pour obtenir un copolymère greffé soluble en phase aqueuse, tout en laissant quelques fonctions azide libres. Ces dernières seront utilisées dans un second temps pour permettre d'insérer un agent réticulant contenant des ponts disulfure et ainsi obtenir des nanogels répondant à un stimulus de type redox. Cette stratégie sera valable pour tous les copolymères greffés amphiphiles.

IV.1 Synthèse des poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL)-g-CO-V(N) par CuAAC

Les premiers tests de couplage ont été réalisés en présence du conjugué propargyle de CO-V(N) (Schéma IV.1). Le couplage du sucre modèle sur la chaîne de PCL permet à la fois de déterminer les meilleures conditions de chimie click mais aussi d'obtenir un copolymère greffé amphiphile modèle avec une structure plus facilement caractérisable. En effet, le conjugué propargyle de COs, qui n'est pas monodisperse, induira après couplage une nouvelle complexité dans l'analyse structurale du composé final. La PCL utilisée pour ce couplage préliminaire est la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}. Cette dernière permettra d'obtenir la macromolécule la plus hydrophile et de faciliter la mise en évidence du greffage par CES ou par RMN ¹H.

Schéma IV.1: Synthèse de la poly(α N₃εCL-co-εCL)-g-COs par CuAAC

IV.2 Synthèse de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) modèle par CuAAC

La réussite du couplage dépend de plusieurs éléments. Le solvant doit solubiliser les deux blocs et être facilement éliminable. Plusieurs solvants ont été testés, parmi ceux-ci : le DMSO, des mélanges eau/THF (3/7, 1/1, 9/7, v/v) ou le DMF. Ce dernier présente le meilleur compromis car le DMF solubilise parfaitement la PCL et solubilise modérément le CO-V(N). Le second élément important est la source de cuivre (I) qui doit être compatible avec le DMF. Le sulfate de cuivre (II) réduit en cuivre (I) *in situ* par de l'ascorbate de sodium n'a pas permis de catalyser le couplage. Le bromure de cuivre (I) en présence de *N,N,N',N'',N'''*-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDTA) a permis de coupler les deux blocs, mais la nature basique du PMDTA hydrolyse partiellement la PCL. Le dernier catalyseur testé est un complexe et iodure de cuivre (I) et de triéthylphosphite (CuI, P(OEt)₃)^[186] utilisé à l'INSA de Lyon pour réaliser des polymères de type poly(triazole).^[187-188]

Après couplage, de l'eau est ajoutée au milieu réactionnel afin de faire précipiter les PCL qui n'ont pas ou peu réagi sont éliminées par centrifugation. Le DMF, le catalyseur et le conjugué de CO-V(N) en excès sont éliminés par ultrafiltration sur une membrane avec un seuil de coupure de 10000 Da. Le produit est ensuite lyophilisé pour obtenir le copolymère greffé PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) parfaitement soluble en phase aqueuse.

Après lyophilisation, la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) est analysée en CES dans le DMF (Figure IV.2). La diminution du temps de rétention de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) par rapport à la PCL non greffée PCL¹⁰⁰N₃^{20%} indique qu'il y a augmentation du rayon hydrodynamique confirmant ainsi le couplage avec le CO-V(N). De plus, il n'y a pas de pic résiduel correspondant au CO-V(N) non greffé ce qui prouve qu'il a été éliminé par l'ultrafiltration.

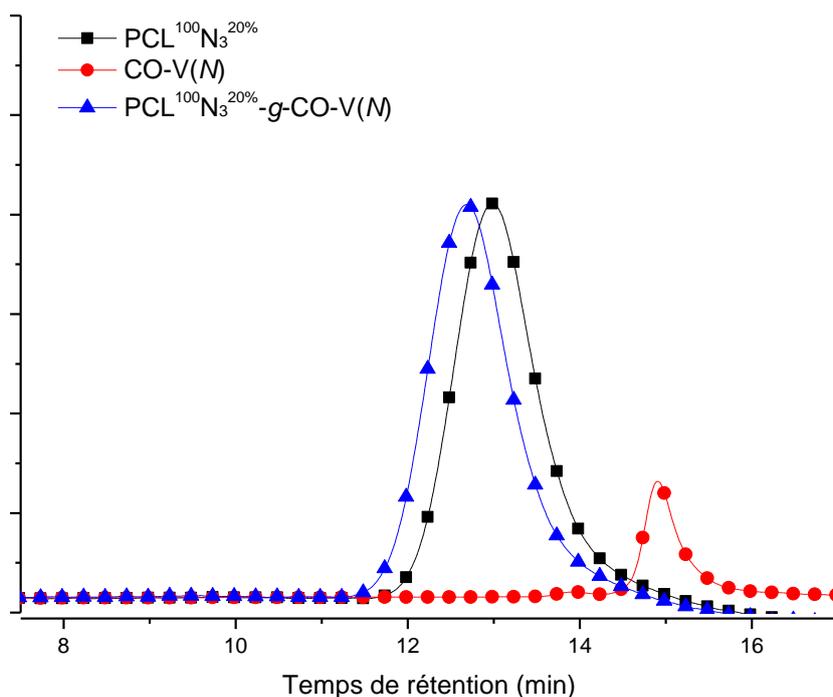


Figure IV.2 : CES de la $PCL^{100}N_3^{20\%}$ -g-CO-V(N) dans le DMF

Le système est analysé en RMN 1H dans le D_2O avec 0,5% (v/v) en acide acétique deutéré (Figure IV.3). Cela permet d'augmenter la concentration de l'échantillon analysé en RMN et d'augmenter sensiblement le rapport signal sur bruit. L'ajout d'acide acétique permet d'augmenter la solubilité du copolymère greffé dans le D_2O . Cela permet d'augmenter la concentration de l'échantillon analysé en RMN et d'augmenter sensiblement le rapport signal sur bruit. Ce mélange de solvant a été choisi après différents essais dans le DMF deutéré, des mélanges DMF/ D_2O qui n'ont pas permis d'obtenir des RMN 1H suffisamment définies.

La présence des protons caractéristiques de la PCL notés A, B, C, E et F en phase aqueuse confirme le couplage. Le proton caractéristique du triazole H-T, confirmant le succès de la CuAAC, est observé à 8,1 ppm.

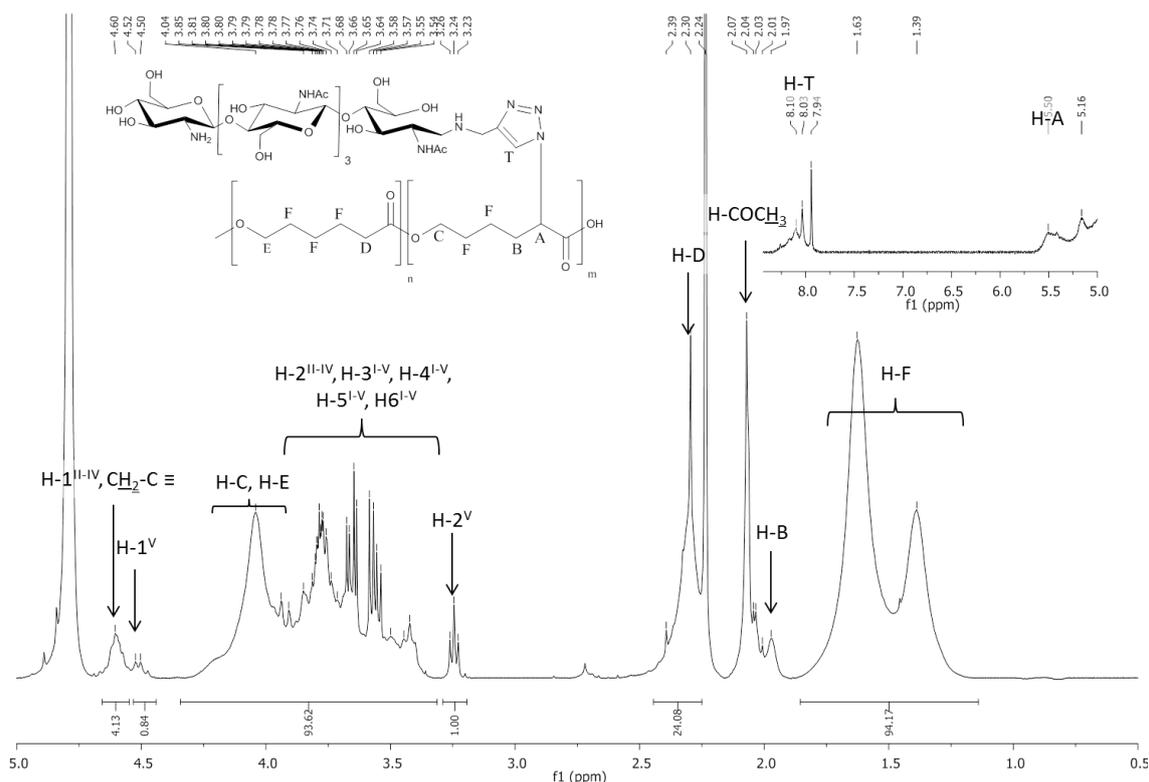


Figure IV.3 : RMN ^1H de la PCL $^{100}\text{N}_3^{20\%}$ -g-CO-V(N) dans le $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COOD}$

Le mélange de solvants $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COOD}$ ne permet pas de solubiliser correctement le cœur hydrophobe, il est effet peu mobile en phase aqueuse. Ainsi les intégrations des signaux des protons correspondant à la PCL sont sous-estimées par rapport aux intégrations des signaux des protons du CO-V(N). La séquence RMN ^1H a été modifiée pour compenser de manière partielle ce problème de solubilité : le temps de relaxation a été augmenté de 1 seconde à 10 secondes.

Malgré tout, le taux de greffage des CO-V(N) sur la PCL noté $F_{\text{CO-V(N)}}$ a été estimé en comparant l'intensité de l'intégrale du proton $H-2^V$ à 3,24 ppm du CO-V(N) avec les six protons H-F du massif compris entre 1,75 ppm et 1,25 ppm de la PCL (Équation IV.1).^[189]

$$F_{\text{CO-V(N)}}(\text{RMN}) = \frac{I_{H-2^V}}{I_F/6}$$

Avec - $F_{\text{CO-V(N)}}(\text{RMN})$: fraction molaire en CO-V(N) par rapport aux résidus $\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}$ et ϵCL de la PCL déterminée par RMN ^1H .

- I_{H-2^V} : intensité du multiplet correspondant au proton $H-2^V$ du CO-V(N).

- I_F : intensité des multiplets correspondant aux protons F de la PCL $^{100}\text{N}_3^{20\%}$.

Équation IV.1

La fraction molaire en CO-V(N) $F_{\text{CO-V(N)}}$ est de 6%. Sur le PCL $^{100}\text{N}_3^{20\%}$, cela signifie que six unités CO-V(N) ont été fixées sur une chaîne de DP 100. Le rendement de couplage est de

6 unités sur 20 positions azide disponibles, soit 30%. La littérature, décrit la CuAAC comme une chimie de couplage particulièrement efficace avec des rendements bien supérieurs.^[138] Ce constat peut s'expliquer par la différence de solubilité importante entre le CO-V(N) et la PCL qui rend difficile l'approche du conjugué propargyle de CO-V(N) au niveau de la PCL. Ce rendement faible de 30% est malgré tout suffisant et permet de rendre soluble le système dans l'eau.

IV.3 Synthèse de la PCL¹⁰⁰N₃^{5%}-g-CO-V(N) modèle par CuAAC

De la même manière, le CO-V(N) modèle a été greffé sur une PCL¹⁰⁰N₃^{5%} par chimie « click » catalysée par du CuI,P(OEt)₃ dans le DMF. Comme précédemment, le produit est ensuite purifié en deux temps: par précipitation des insolubles dans l'eau et par ultrafiltration. Cependant, la première étape de purification a éliminé l'ensemble du copolymère greffé, mettant en évidence le manque de solubilité de la PCL¹⁰⁰N₃^{5%}-g-CO-V(N) qui a totalement précipitée dans l'eau. Ce copolymère greffé n'est pas soluble, même en présence d'acide acétique. Le taux de greffage n'est certainement pas assez important pour solubiliser la PCL¹⁰⁰N₃^{5%}. Si le rendement de couplage est identique à celui observé dans le cas de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}, soit 30%, la PCL¹⁰⁰N₃^{5%} n'est greffée que par 1 ou 2 CO-V(N). Ce taux de greffage est alors insuffisant pour permettre la solubilisation de la PCL₁₀₀N₃^{5%}.

IV.3.1 Conclusion

La synthèse de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) a été mise au point en sélectionnant un solvant compatible pour les deux blocs et un catalyseur efficace. La structure unique du CO-V(N) a permis de mettre en place les conditions de couplage et la caractérisation du copolymère greffé modèle. La PCL¹⁰⁰N₃^{5%}-g-CO-V(N) n'est pas soluble dans l'eau et ne sera pas exploitée pour former des nanoparticules. Cette stratégie est ensuite appliquée aux différents copolymères qui seront greffés par les conjugués propargyle de COs.

IV.4 Synthèse des poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)-*g*-COs par CuAAC

Les conjugués propargyle de COs sont plus hydrophiles que les conjugués propargyle de CO-V(*N*), du fait de la présence d'un plus grand nombre d'amine libres le long des chaînes. Le premier essai de greffage de COs a donc été réalisé sur les PCL substituées à 5%. Rappelons que ces mêmes PCL ont précipité dans l'eau après un essai de fonctionnalisation avec le CO-V(*N*).

IV.4.1 Synthèse des PCL⁵⁰N₃^{5%}-*g*-COs, PCL¹⁰⁰N₃^{5%}-*g*-COs et PCL²⁰⁰N₃^{5%}-*g*-COs

La solubilité du COs dans le DMF est satisfaisante dans le DMF. Les conditions de couplage sont celles précédemment décrites et sont réalisées sur les PCL⁵⁰N₃^{5%}, PCL¹⁰⁰N₃^{5%} et PCL²⁰⁰N₃^{5%}. La chimie « click » est réalisée dans le DMF en présence de CuI, P(OEt)₃ (Schéma IV.2).

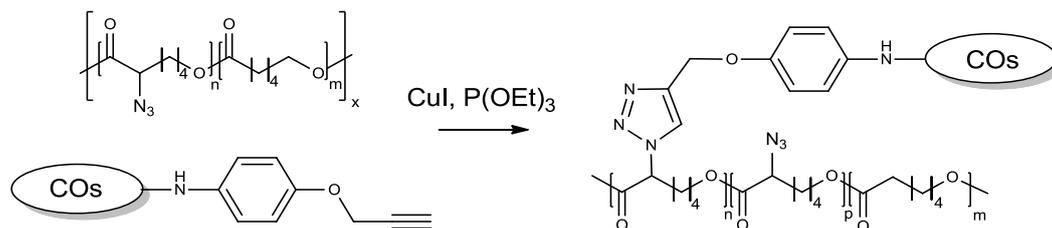


Schéma IV.2 : Synthèse de la poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)-*g*-CO-V(*N*) par CuAAC

Le produit est purifié dans un premier temps par centrifugation. De manière similaire à la PCL¹⁰⁰N₃^{5%}-*g*-CO-V(*N*), les trois copolymères greffés obtenus sont insolubles en phase aqueuse même en présence d'acide acétique. Le COs n'est pas suffisamment hydrophile pour solubiliser les PCL quelles que soient leurs tailles, car le taux de greffage pouvant atteindre 5% pour une réaction de chimie « click » CuAAC est certainement trop faible. La seconde série d'essais concerne les PCL⁵⁰N₃^{20%}, PCL¹⁰⁰N₃^{20%} et PCL²⁰⁰N₃^{20%} qui devraient être plus substituées par les COs.

IV.4.2 Synthèse des $\text{PCL}^{50}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs, $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs et $\text{PCL}^{200}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs

La réaction de couplage est réalisée comme précédemment. Le produit est purifié par centrifugation et par ultrafiltration puis lyophilisé, pour obtenir les poly($\alpha\text{N}_3\text{CL-co-}\epsilon\text{CL}$)-g-COs finales. Les copolymères greffés obtenus sont solubles en milieu aqueux. L'avancement de la réaction est suivi par CES dans le DMF. Les caractérisations de la $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs sont détaillées ci-dessous. Les caractérisations des deux autres copolymères greffés $\text{PCL}^{50}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs et $\text{PCL}^{200}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs seront résumées (Tableau IV.1).

L'analyse en CES dans le DMF montre un déplacement vers un temps de rétention plus court de la $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs par rapport à la $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}$ (Figure IV.4). L'augmentation du rayon hydrodynamique est causée par le couplage des COs. De plus, la dispersité observée en CES dans le DMF augmente de 1,1 à 1,2.

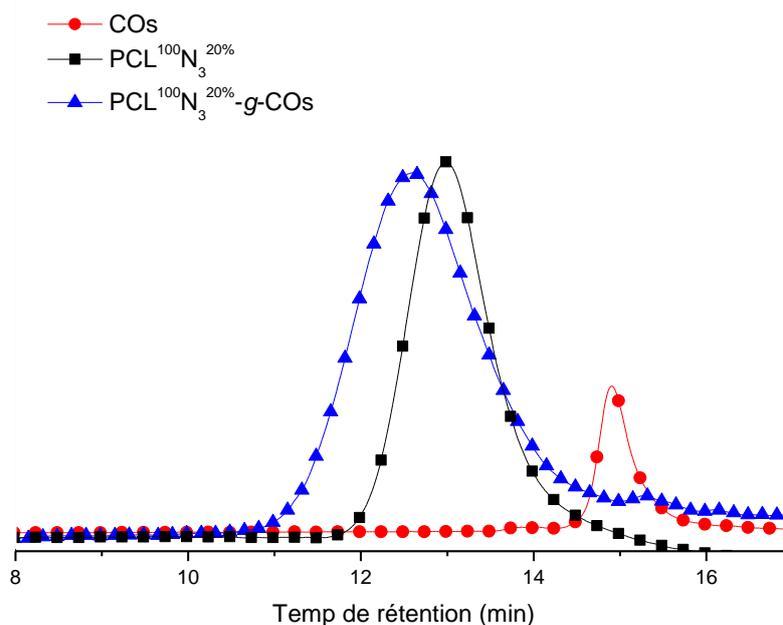


Figure IV.4 : CES de la $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs dans le DMF

La RMN ^1H dans le D_2O avec 0,5% en acide acétique deutéré (v/v) montre la présence des protons de la PCL et du COs, ainsi que du proton T à 8,10 ppm caractéristique du cycle triazole formé, ce qui confirme le couplage (Figure IV.5).

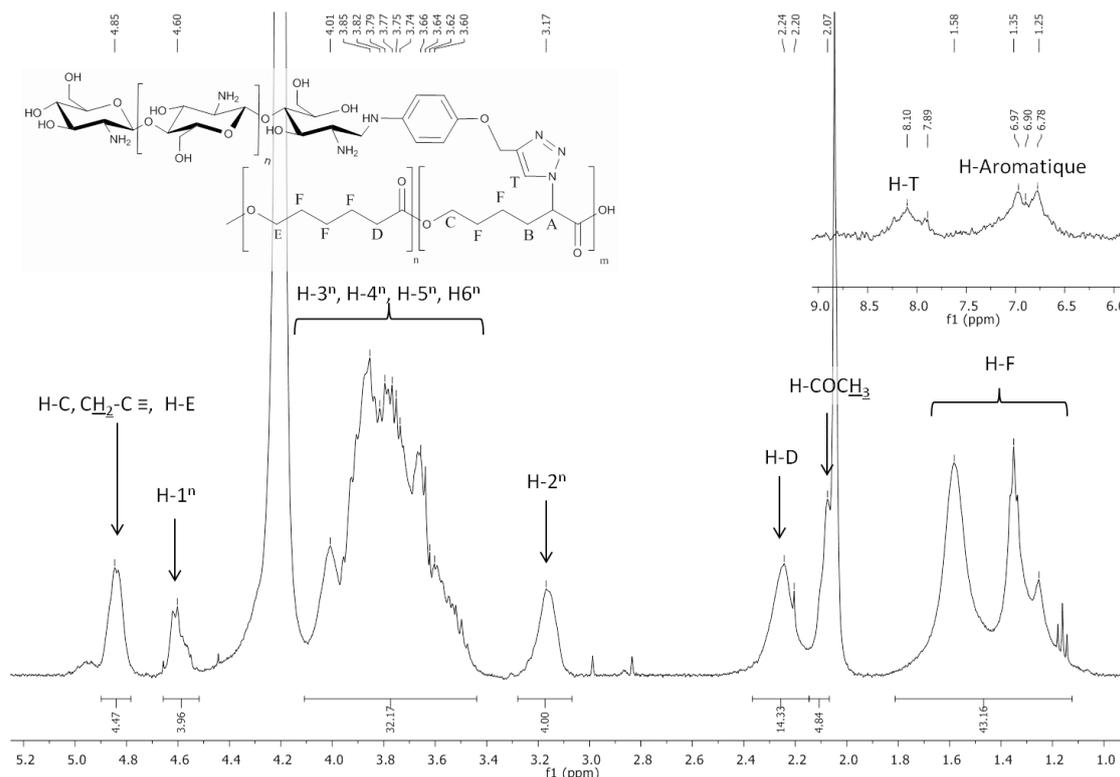


Figure IV.5 : RMN ^1H de la PCL $^{100}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs dans du $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COOD}$

L'estimation précédente (Équation IV.1) de la fraction molaire en CO-V(N) ne peut pas être utilisée dans le cas du COs. En effet, le dénombrement des protons des acétate COCH_3 à 2,05 ppm n'est pas suffisamment fiable car il chevauche le pic à 2,07 ppm correspondant à l'acétate de l'acide acétique deutéré. Dans le cas du conjugué propargyle de COs, il est intéressant de comparer le multiplet à 3,17 ppm correspondant aux protons H-2ⁿ du COs avec le massif à 4,85 ppm correspondant aux protons H-E et H-C de la PCL $^{100}\text{N}_3^{20\%}$ pour en déduire la fraction molaire en COs notée F_{COs} (Équation IV.2).

$$F_{\text{COs}} (\text{RMN}) = \frac{I_{\text{H-2}^n}/4}{I_{\text{EC}}/2}$$

Avec : $-F_{\text{COs}}^\circ (\text{RMN})$: fraction molaire en COs par rapport aux résidus $\alpha\text{N}_3\text{ECL}$ et ECL de la PCL déterminée par RMN ^1H .

$-I_{\text{H-2}^n}$: intensité des multiplets correspondant aux protons H-Aromatique du COs.

$-I_{\text{EC}}$: intensité des multiplets correspondant aux protons E et C de la PCL $^{100}\text{N}_3^{20\%}$.

Équation IV.2

Une RMN DOSY montre que les protons issus de la PCL et du COs possèdent le même coefficient de diffusion, c'est-à-dire que les deux groupements diffusent exactement à la même vitesse dans l'échantillon, ce qui se traduit expérimentalement par la présence des corrélations sur une droite horizontale unique. Cela signifie que ces protons appartiennent à la

même macromolécule et confirme le succès du couplage. Il est noté que les seules autres espèces présentant un autre coefficient de diffusion sont les solvants deutérés utilisés pour l'analyse RMN à savoir le D₂O et CD₃COOD (Figure IV.6).

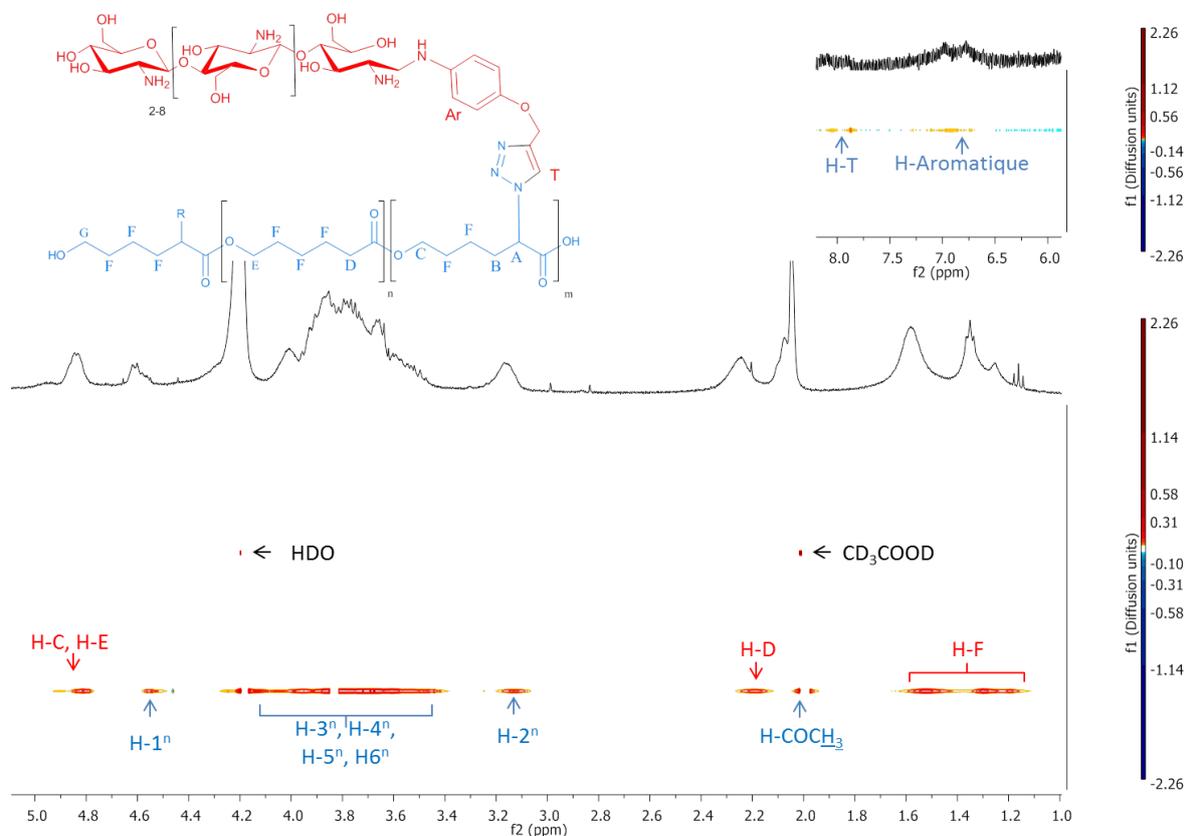


Figure IV.6 : RMN DOSY de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs dans du D₂O/CD₃COOD

Les copolymères greffés PCL⁵⁰N₃^{20%}-g-COs et PCL²⁰⁰N₃^{20%}-g-COs ont été caractérisés de la même manière. Les résultats sont résumés ci-dessous (Tableau IV.1).

	F _{CO-V(N)} (RMN), F _{COs} (RMN)	Rendement du couplage
PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-CO-V(N)	6%	30%
PCL ⁵⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	16%	80%
PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	15%	75%
PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	17%	85%

Avec - F_{CO-V(N)} (RMN): Fraction molaire déterminée par RMN en CO-V(N) par rapport aux motifs αClεCL et CL.
 - F_{COs} (RMN) : Fraction molaire déterminée par RMN en COs par rapport aux motifs αClεCL et CL.

Tableau IV.1 : Résultats des couplages entre les PCL et le CO-V(N) ou le COs

La même fraction molaire en COs greffé sur les trois PCL (F_{COs}(RMN)) est observée. Chaque PCL est substituée par la même proportion de COs, ce qui permettra dans un second

temps d'observer facilement l'influence du DP des PCL sur la morphologie des nanoparticules.

Le rendement de couplage des trois copolymères greffés à base de COs est de l'ordre de 80%, il reste donc 20% de fonction azide libre. La présence d'une bande d'absorption à 2100 cm^{-1} sur le spectre infrarouge confirme bien la présence de fonction azide résiduelle (Figure IV.7). Ces groupements résiduels serviront par la suite à stabiliser les nanogels en utilisant un agent réticulant bis-alcyne : le *bis*[(propargyle carbamate)-éthyl] de disulfure. Malgré un excès en COs et de catalyseur, des rendements plus importants n'ont jamais été observés. Cela pourrait s'expliquer par un problème d'encombrement stérique et/ou de répulsions électrostatiques entre les chaînes polycationiques des COs, phénomènes qui s'accroissent au fur et à mesure de l'avancement du couplage.

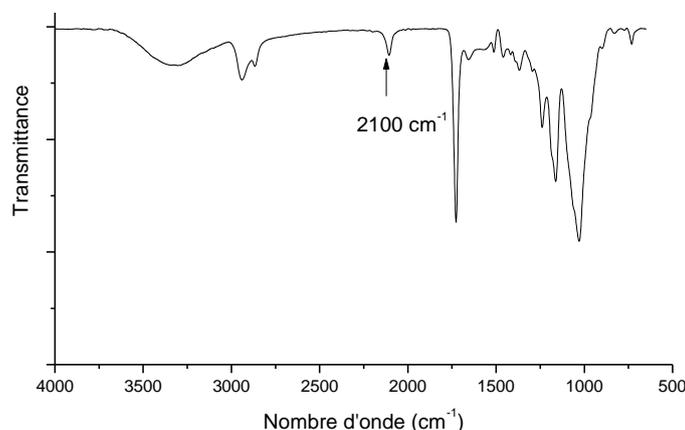


Figure IV.7 : Spectre infrarouge de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs

Les meilleurs rendements de couplage observés entre la PCL et les COs comparativement au CO-V(N), peuvent s'expliquer par la présence de la 4-propargyloxyaniline en position anomère. L'ajout de ce groupement aromatique pourrait faciliter l'approche du COs sur la PCL par le biais d'interaction hydrophobe.

IV.4.3 Conclusion

Les PCL substituées à 5% greffées par les conjugués de CO-V(N) et de COs ne sont pas solubles en phase aqueuse. Par contre, les PCL substituées à 20 % ont permis d'avoir accès à des copolymères greffés totalement solubles et substitués par le CO-V(N) modèle ou le COs. Nous avons donc quatre copolymères greffés amphiphiles PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N), PCL⁵⁰N₃^{20%}-g-COs, PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs et PCL²⁰⁰N₃^{20%}-g-COs à disposition pour réaliser des nanogels.

IV.5 Formation des nanoparticules

Le système PCL-*g*-CO-V(*N*) n'est soluble que dans quelques solvants comme l'eau et le DMF, tandis que le DMAc ou le NMP ne le solubilisent que partiellement. Les nanoparticules sont formées par dissolution directe ou par la méthode des co-solvants. Dans les deux cas, les copolymères greffés s'auto-assemblent pour former des nanoparticules (Figure IV.8).

La dissolution directe consiste à dissoudre directement le copolymère greffé dans un solvant. La solution obtenue est ensuite agitée pendant plusieurs heures, afin que les dynamiques d'auto-assemblage des nanoparticules soient à l'équilibre. Dans le cas de la méthode des co-solvants, le copolymère greffé est dissout dans un solvant des deux blocs, dans notre cas le DMF, puis de l'eau est ajoutée lentement. L'interaction répulsive qui apparaît progressivement entre le solvant polaire et la PCL favorise l'auto-assemblage des particules par interaction hydrophobe.

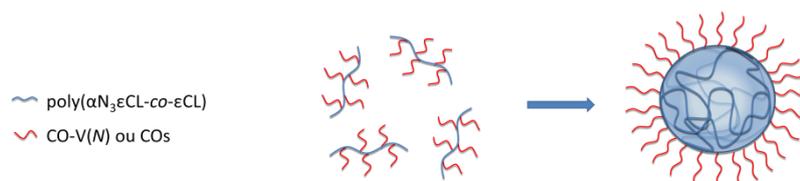


Figure IV.8 : Auto-assemblage des copolymères greffés pour former les nanogels

La taille des particules est ensuite étudiée par diffusion dynamique de la lumière et par microscopie électronique à transmission.

IV.5.1 Nanoparticules à base de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-*g*-CO-V(*N*) modèle

Seule l'étude de la taille des particules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-*g*-CO-V(*N*) modèles obtenue par dissolution directe et par la méthode des co-solvants dans le DMF et dans l'eau sera présentée dans cette partie.

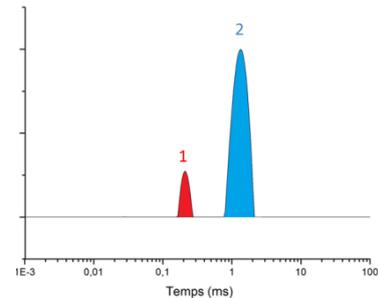
IV.5.1.1 Obtention de nanoparticule par dissolution directe

Dans un premier temps, le copolymère greffé modèle PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-*g*-CO-V(*N*) est dilué dans l'eau à différentes concentrations (de 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ à 4 $mg \cdot mL^{-1}$). Les solutions sont agitées pendant 12H à 40°C à une vitesse constante de 300 rpm. La taille des particules est ensuite observée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Figure IV.9).

La DLS est une technique fondée sur la mesure du mouvement brownien des particules (mouvement aléatoire des particules provoqué par les impacts des molécules du solvant). La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule. A une viscosité donnée, plus la particule est petite et plus son mouvement brownien présente une fréquence et une amplitude importantes. Le signal mesuré en DLS correspond aux fluctuations de la lumière d'un laser se diffusant au travers de l'échantillon grâce au mouvement brownien des particules. Ce signal est ensuite traité par un corrélateur numérique afin d'obtenir la fonction d'auto-corrélation du signal, et de remonter au rayon hydrodynamique des particules.

Il est aussi à noter que le rapport en nombre entre deux populations observé en DLS peut être quantifié si l'on fait l'approximation que les deux populations sont de même densité et sont toutes deux des particules (Équation IV.3).^[190]

$$\frac{N_2}{N_1} = \left(\frac{R_1}{R_2}\right)^3 \left(\frac{x_{w2}}{1 - x_{w2}}\right) \text{ où } x_{w2} = \frac{A_2}{A_2 + A_1}$$



- Avec N_2/N_1 : rapport en nombre entre la population 2 et 1.
- R_1/R_2 : rapport des rayons hydrodynamiques de la population 2 et 1.
- A_1 : Aire du pic A_1 .
- A_2 : Aire du pic A_2 .

Équation IV.3

Le rapport N_2/N_1 permet de mettre en évidence que la distribution en taille ne reflète pas le rapport réel en nombre des deux populations. Cet écart s'explique par le fait, que la diffusion de la lumière est plus intense pour les particules de grosse taille et de densité élevée que pour les petites particules. Les tracés DLS présentés ci-dessous mettent en évidence les écarts entre la distribution en nombre et en taille (Figure IV.9).

Après une série de tests préliminaires, la meilleure concentration pour une réponse suffisante et des fonctions de corrélation régulières en DLS est estimée à 2 mg.mL⁻¹. L'ensemble des analyses DLS présentées sont à cette concentration optimale.

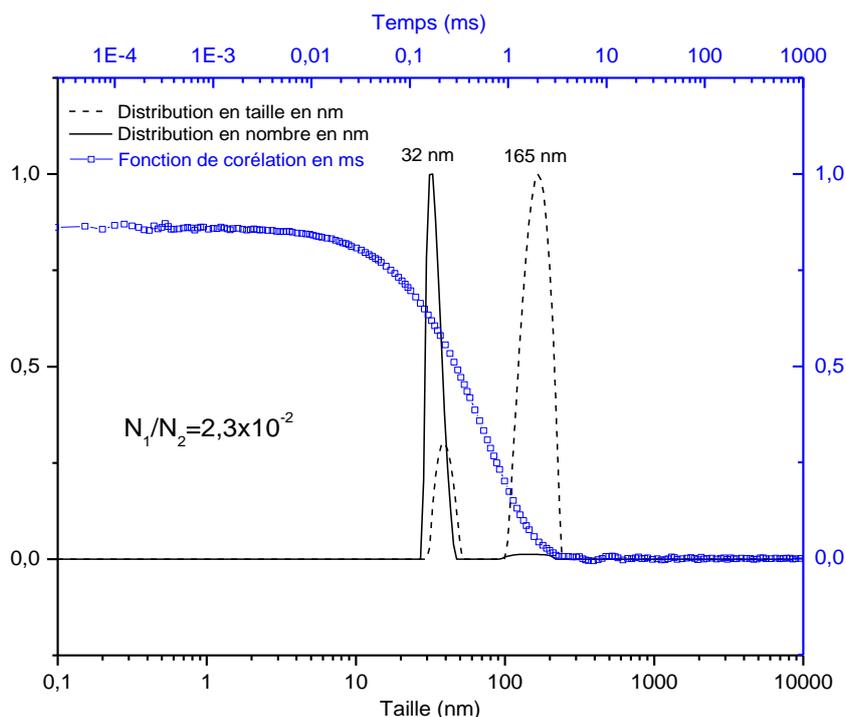


Figure IV.9 : DLS des particules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) modèle obtenues par dissolution directe dans l'eau 25°C à 2 mg.mL⁻¹

La DLS montre la présence en solution de deux populations distinctes. La distribution en taille met en évidence une population de petite taille présentant un rayon hydrodynamique R_h de 32 nm et une population de plus grande taille avec un R_h de 165 nm. La distribution en nombre indique que la petite population est très majoritaire avec un rapport N_2/N_1 de 2%. Une filtration sur filtre 0,1 μm ne permet pas d'éliminer la population de grande taille, même si la filtration est réalisée à plusieurs reprises. Une hypothèse serait que les espèces de grande taille se reforment spontanément et sont en constant équilibre avec les espèces de petite taille. Afin de déterminer la nature et la morphologie de ces deux populations, des clichés en microscopie électronique à transmission (MET) ont été réalisés (Figure IV.10).

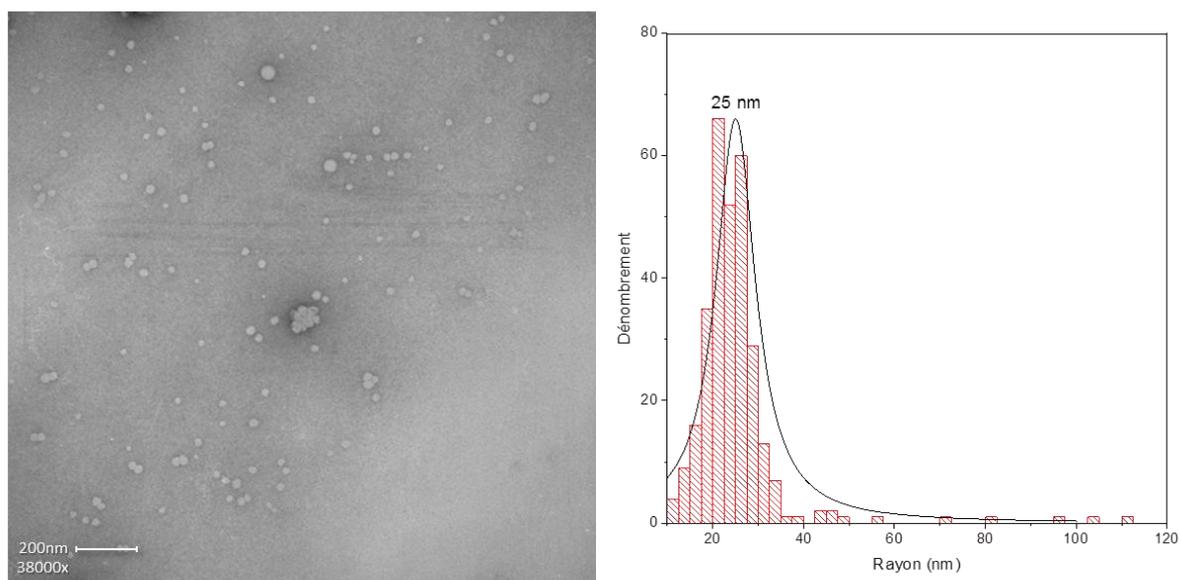


Figure IV.10 : MET et dénombrement des particules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) modèles

Les clichés en MET sont réalisés dans l'eau à concentrations identiques à celles utilisées pendant l'analyse en DLS, soit 2 mg.mL⁻¹. La microscopie révèle des particules de formes sphériques avec une population prédominante autour de 25 nm de rayon et un ensemble d'agrégats de ces particules qui correspondrait à la seconde population identifiée en DLS. L'agrégation spontanée de ces nanoparticules pourrait expliquer l'inefficacité de la filtration pour éliminer les agrégats. Le rapport en nombre des deux populations N₂/N₁ correspond donc au taux d'agrégation des nanoparticules. L'interprétation du cliché MET confirme globalement les données de la DLS.

Le dénombrement du cliché confirme bien que les particules sont très majoritaires et que les agrégats sont faiblement représentés. Cependant la valeur des tailles en MET observée n'est que relative. En effet, l'étape de séchage peut accentuer les phénomènes d'agrégation et aussi diminuer la taille des particules qui sont à l'état sec et non plus en solution comme en DLS. Les tailles observées en DLS sont donc considérées comme plus fiables car représentative de l'ensemble de l'échantillon en solution. De manière complémentaire à la DLS, la MET permet de visualiser la morphologie des nanoparticules et de compléter les données déjà obtenues. Malgré cela, les différences entre les deux techniques les résultats concordent.

Les particules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) comme précédemment sont aussi obtenues par dissolution directe dans le DMF. L'échantillon est ensuite analysé en DLS (Figure IV.11).

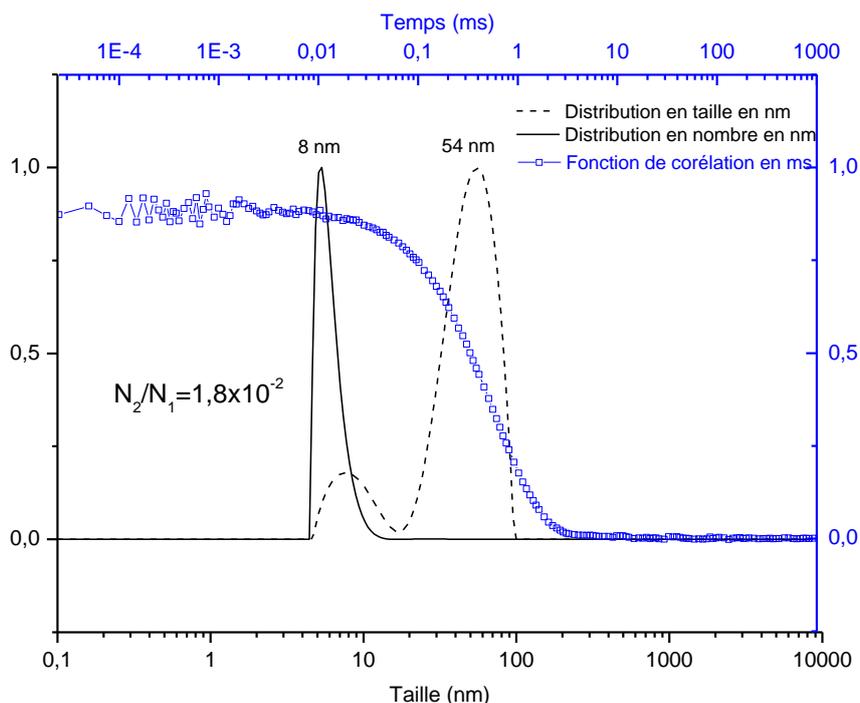


Figure IV.11 : DLS des particules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) modèle obtenues par dissolution directe dans le DMF à 25°C

Comme dans le cas de la dissolution directe dans l'eau, deux populations sont observées avec un taux d'agrégation faible inférieur à 2%. Cependant la taille de ces deux populations a fortement diminuée passant de 32 nm à 8 nm et de 165 nm à 54 nm par rapport à la dissolution directe des copolymères greffés dans l'eau. La petite population est toujours majoritaire. De plus, la dispersité du système a augmenté. La dissolution directe dans le DMF donne des particules de tailles moins bien définies que dans le cas d'une dissolution directe dans l'eau.

IV.5.1.2 Obtention de nanoparticules par la méthode des co-solvants

Dans un second temps, les nanoparticules à base du copolymère greffé PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) sont formées par la méthode des co-solvants. Le copolymère greffé est solubilisé dans un minimum de DMF qui solubilise les deux blocs. Ensuite de l'eau est ajoutée lentement, l'eau est un bon solvant uniquement pour la partie CO-V(N). La répulsion des chaînes de PCL avec l'eau force l'auto-organisation de micelles de type cœur/couronne où la couronne est constituée du bloc sucre et le cœur stabilisé par des interactions de nature hydrophobe par les PCL. La taille des particules est mesurée par DLS (Figure IV.12).

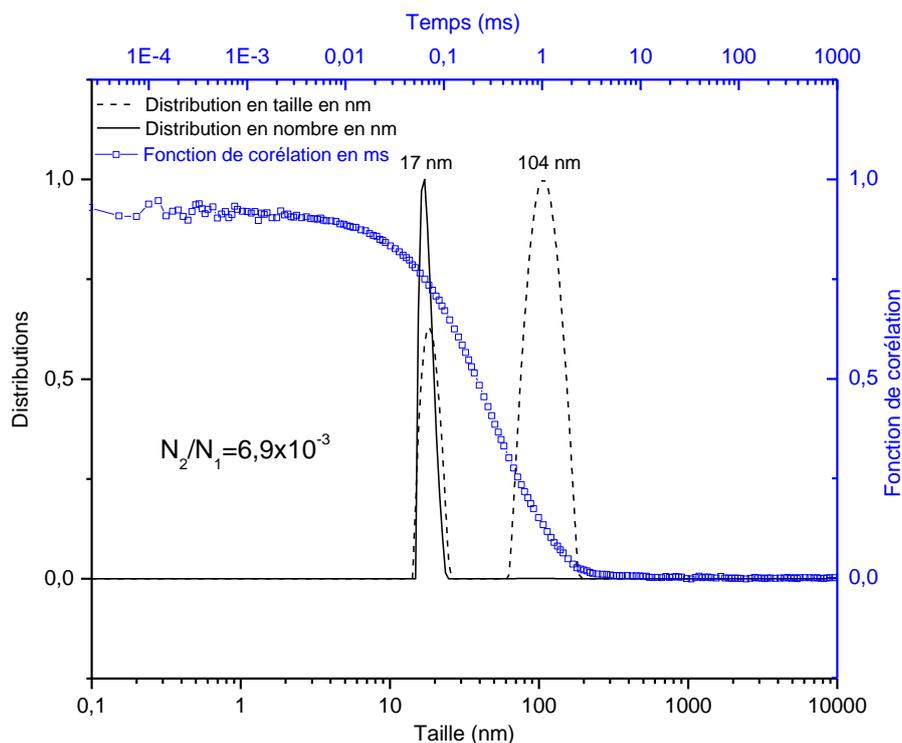


Figure IV.12 : DLS des particules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) modèle obtenues par la méthode des co-solvants dans le DMF et l'Eau 25°C

Les particules obtenues par la méthode des co-solvants ont un R_h de l'ordre de 17 nm, elles sont de taille intermédiaire entre les tailles observées par dissolution directe dans l'eau et dans le DMF. La DLS montre toujours quelques agrégats mais ils sont très minoritaires avec un taux d'agrégation de 0,7%.

IV.5.1.3 Conclusion

Ces trois voies de préparation des nanoparticules mettent en évidence qu'en solution, il existe deux populations qui correspondent aux nanoparticules et à des agrégats de nanoparticules. Les deux structurations sont toujours présentes quel que soit le solvant (eau ou DMF) ou la méthode de préparation (méthode des co-solvants ou dilution directe). La filtration ne permet pas d'éliminer les agrégats, ceux-ci se formant certainement spontanément. Le rapport N_2/N_1 observé en DLS est toujours en faveur d'une large majorité de particules par rapport aux agrégats. Cette observation est confirmée par la MET.

La dissolution directe dans le DMF donne des populations avec une distribution de taille particulièrement large par rapport à la dissolution directe dans l'eau ou à la méthode des co-solvants (DMF/eau). La taille des particules observées dans l'eau sont de l'ordre de 32 nm pour une dilution directe dans l'eau et de 17 nm dans le cas de la méthode des co-solvants. C'est par cette dernière méthode que le taux d'agrégation est le plus faible et que la dispersité

semble être la plus faible. C'est donc la meilleure technique, elle sera testée en priorité sur les copolymères greffés de type poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL)-g-COs.

IV.5.2 Nanoparticules à base de PCL⁵⁰N₃^{20%}-g-COs, PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs et PCL²⁰⁰N₃^{20%}-g-COs

Seule l'étude de la taille des particules de COs et PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs obtenues par dissolution directe et par la méthode des co-solvants dans le DMF et dans l'eau sera détaillée dans cette partie.

IV.5.2.1 Obtention de nanoparticules par la méthode des co-solvants

Dans un premier temps, c'est la méthode des co-solvants DMF/eau qui est testée sur le copolymère greffé PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs. Les particules sont observées dans un premier temps en DLS (Figure IV.13).

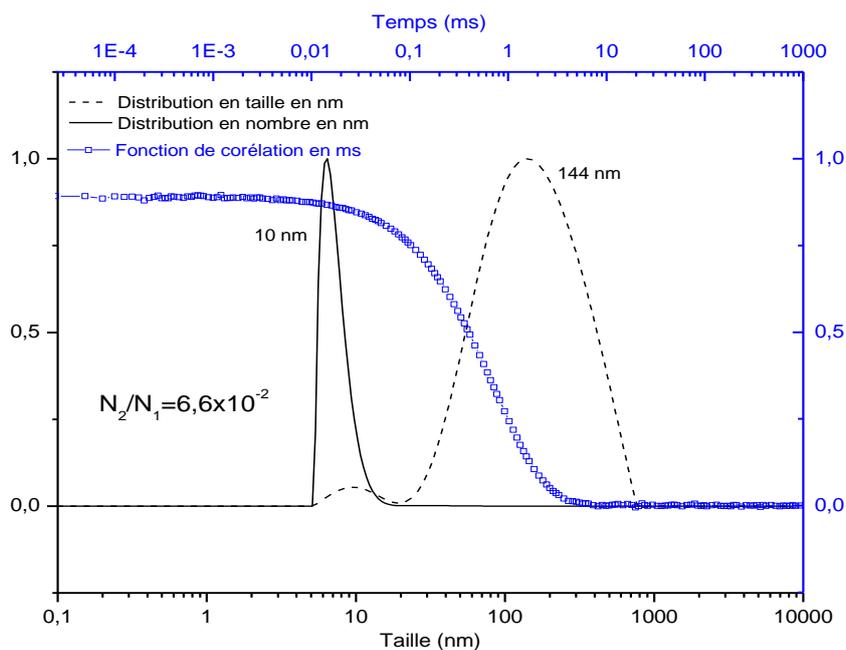


Figure IV.13 : DLS des particules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs modèle obtenues par la méthode des co-solvants dans le DMF/Eau à 25°C

Comme dans le cas du PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N), on observe deux populations qui correspondent aux particules et aux agrégats de particules. Cependant le rapport d'agrégation est toujours en faveur des particules même s'il est plutôt élevé avec une valeur de 7%. Il y a donc dix fois plus d'agrégation que dans le cas des particules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) obtenues par la méthode des co-solvants (taux agrégation de 0,7%).

IV.5.2.2 Obtention des nanoparticules par dissolution directe

Les particules sont aussi obtenues par dissolution directe dans le DMF et observées en DLS (Figure IV.14).

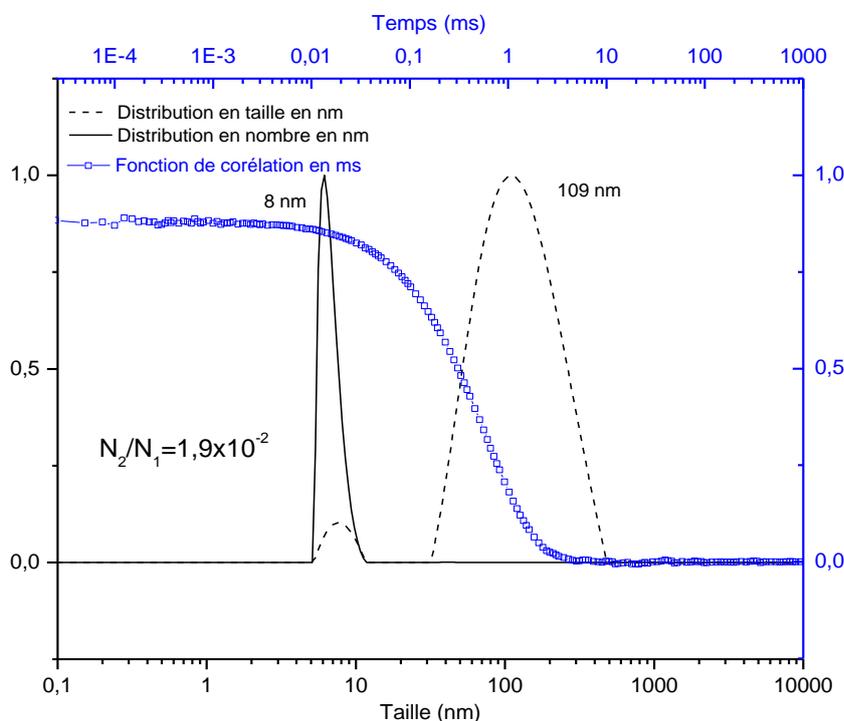


Figure IV.14 : DLS des particules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs obtenues par dissolution directe dans le DMF à 25°C

Les agrégats sont toujours présents mais en quantité limitée avec un taux d'agrégation de l'ordre de 2%. La taille des particules de 8 nm est du même ordre que dans le cas de la méthode des co-solvants, mais la dispersité est aussi plus étroite.

Pour finir, les particules sont aussi obtenues par dissolution directe dans l'eau. La solution est caractérisée en DLS (Figure IV.15) et dénombrée en MET (Figure IV.16).

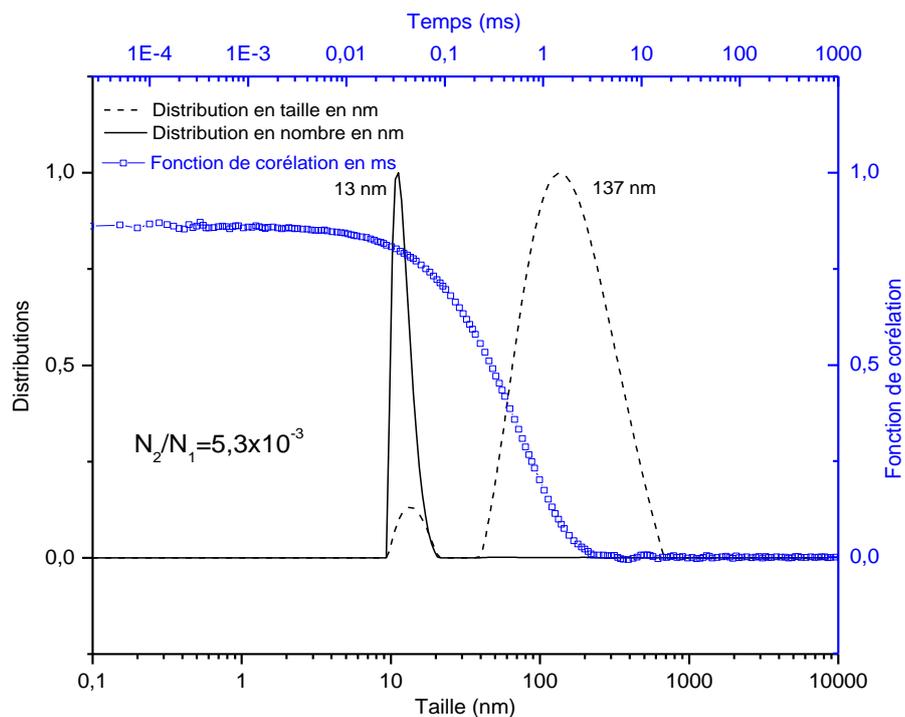


Figure IV.15 : DLS des particules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs obtenues par dissolution directe dans l'eau à 25°C

Le système PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs se caractérise de la même manière que le PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) dans l'eau. Deux populations sont observées mais comme précédemment la petite population centrée sur 13 nm est très majoritaire avec un taux d'agrégation très faible d'environ 0,5%.

Le dénombrement de cliché MET confirme que les particules sont majoritaires par rapport aux agrégats (Figure IV.16)

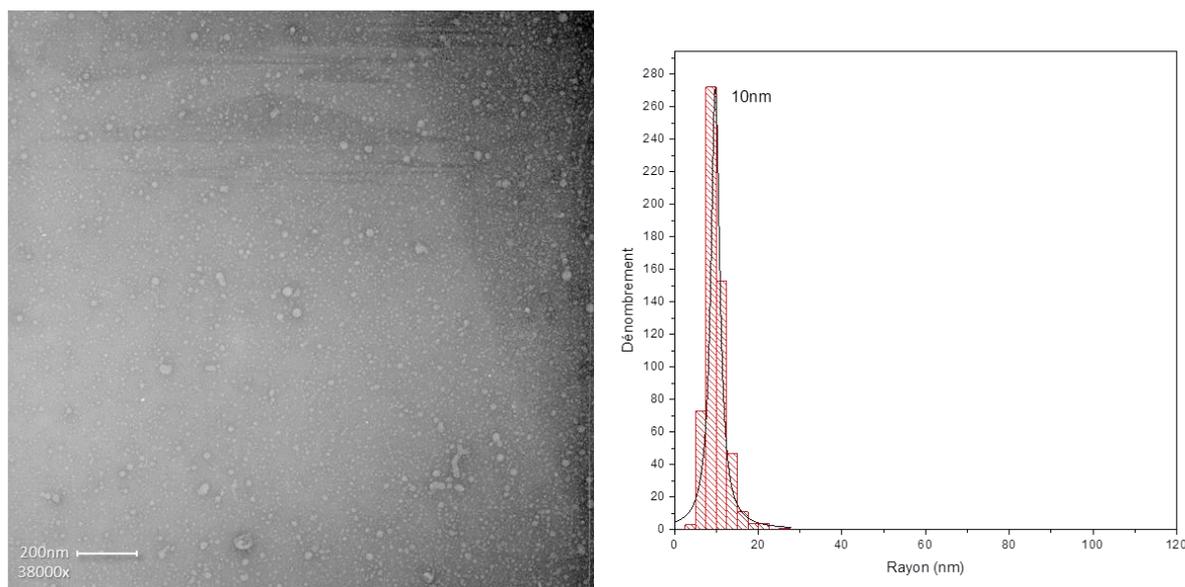


Figure IV.16 : MET et dénombrement des particules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs

D'après les observations réalisées sur le copolymère greffé PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs, la meilleure technique semble être la dilution directe dans l'eau. C'est la méthode qui permet d'obtenir des nanoparticules avec le plus faible taux d'agrégation. De plus, elle est plus simple et plus rapide à mettre en œuvre que la méthode des co-solvants. Cette voie permet d'obtenir des particules de tailles homogènes centrées sur un R_h de 13 nm avec un faible taux d'agrégation.

Les deux autres copolymères greffés PCL⁵⁰N₃^{20%}-g-COs et PCL²⁰⁰N₃^{20%}-g-COs sont mis en solution dans ces conditions. Dans les deux cas, il y a toujours deux populations. Les solutions sont observées en DLS et MET. Les résultats sont décrits ci-dessous (Tableau IV.2).

	$F_{CO-V(N)}$ (RMN), F_{COs} (RMN)	R_h (DLS) des nanoparticules	R_h (DLS) des agrégats	Taux d'agrégation
PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-CO-V(N)	6%	37	166	2,3%
PCL ⁵⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	16%	18	87	1,1%
PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	15%	13	137	0,5%
PCL ²⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	17%	9	88	0,4%

Avec - $F_{CO-V(N)}$ (RMN): Fraction molaire déterminée par RMN en CO-V(N) par rapport aux motifs $\alpha Cl\epsilon CL$ et CL.

- F_{COs} (RMN) : Fraction molaire déterminée par RMN en COs par rapport aux motifs $\alpha Cl\epsilon CL$ et CL.

- R_h (DLS) : Rayon hydrodynamique à 90° observé en DLS en nm.

Tableau IV.2 : Caractérisation des nanoparticules obtenues par dissolution directe dans l'eau

Les particules obtenues avec la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) sont plus grosses que celles obtenues avec la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs. Le taux de greffage en CO-V(N) de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%} est

de 6 %. Ce taux est inférieur à celui de la même PCL greffé par du COs qui est de 15%. La $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-CO-V(N)}$ est moins substituée et donc plus hydrophobe que son homologue $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$. Les $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-CO-V(N)}$ seraient donc plus aptes à s'agréger pour former des nanoparticules de grande taille. D'ailleurs, cela se traduit aussi par un taux d'agrégation plus élevé pour les particules de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-CO-V(N)}$ que celles de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$.

De plus, la différence de degré d'acétylation (DA) est aussi un paramètre important. Le DA du CO-V(N) de 80% tandis que celui du COs est de 10%. Ainsi les particules de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-CO-V(N)}$ possède un caractère plus hydrophobe que leurs homologues fonctionnalisés par du COs, ce qui pourrait augmenter le nombre de copolymère composant la micelle, dans le but de stabiliser la nanoparticule. De plus, Sorlier *et al.*^[191-192] ont montré que les interactions hydrophobes devenaient prédominantes entre les chaînes de chitine quand celles-ci présentaient un DA de 50% ou plus. Cette capacité d'agrégation supplémentaire des molécules de CO-V(N) peut engendrer des interactions interchaînes entre les couronne composées de CO-V(N) des nanoparticules et favoriser encore un peu plus les phénomènes d'agrégation.

On remarque aussi que la taille des nanoparticules composées des copolymères greffés $\text{poly}(\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-co-}\epsilon\text{CL})\text{-g-COs}$ augmente quand le DP de la chaîne de PCL diminue. Malheureusement, à l'heure actuelle, nous n'avons pas d'explication satisfaisante pour expliquer cette tendance.

IV.5.2.3 Conclusion

Dans le cas des particules à base de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-CO-V(N)}$, les meilleures conditions sont la méthode des co-solvants avec le système DMF/eau. Pour les particules $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$, la stratégie permettant de contrôler les tailles des particules et de limiter la formation d'agrégats correspond à la dissolution directe dans l'eau à une concentration de 2 mg.mL^{-1} . De plus, cette voie d'obtention permet d'avoir une dispersité relativement faible.

IV.6 Influence de la force ionique et du pH

Dans les parties suivantes, les études se concentreront sur le copolymère greffé $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$. Ce copolymère forme des nanoparticules avec des tailles comprises entre les particules formées de $\text{PCL}^{50}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$ et de $\text{PCL}^{200}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$

L'influence du pH et de la force ionique sur la taille des nanoparticules sera observée. Ces deux paramètres étant non-négligeables dans le cas de polymères chargés.

IV.6.1 Taille des nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs en fonction de la force ionique

Avant d'observer l'influence du pH, il est important de connaître l'influence de la force ionique sur le système. Cette force ionique sera identique à celle du tampon utilisé pour faire varier le pH. Les nanoparticules sont obtenues par dilution directe du copolymère greffé PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs dans une solution de NaCl à 100 mM pour obtenir une concentration finale de 2 mg.mL⁻¹. Les tailles des nanoparticules et des agrégats sont observées en DLS (Figure IV.17 et Figure IV.18).

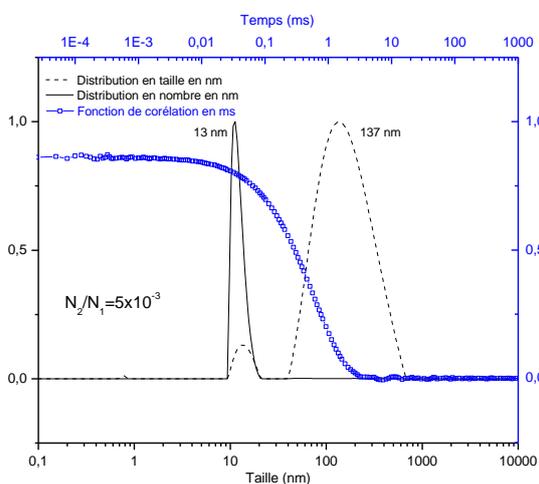


Figure IV.17 : DLS des nanoparticules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs dans l'eau distillée à 25°C

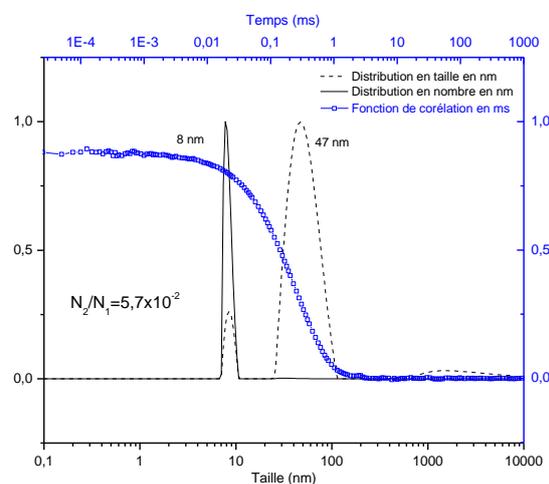


Figure IV.18 : DLS des nanoparticules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs dans un tampon NaCl à 100mM à 25°C

L'augmentation de la force ionique à 100 mM entraîne une diminution des tailles des nanoparticules et des agrégats. Le R_h des nanoparticules a été réduit de 13 nm à 8 nm, et la taille des agrégats a été réduite de 137 nm à 47 nm. Cette réduction du R_h est liée à l'appariement de plusieurs anions chlorures avec les charges positives des amine libres, limitant la répulsion entre les chaînes latérales de chitosane polycationiques.^[124] En effet, à pH neutre, une partie des amine du chitosane sont chargées ($pK_a=6,3$ à $6,5$).^[34-35] Les chaînes latérales de COs se resserrent, ce qui se traduit par une diminution du R_h (Figure IV.19). Cet effet est encore plus prononcé sur les agrégats dont le R_h est divisé par un facteur 3.

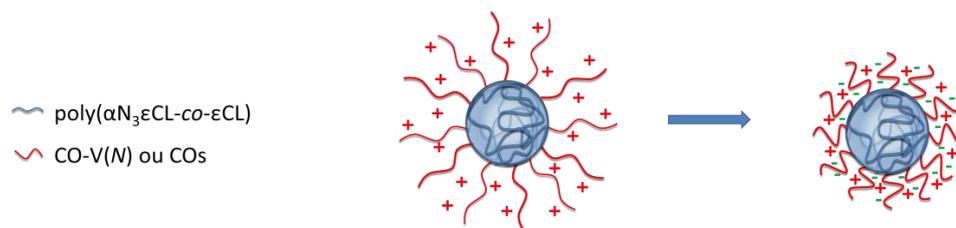


Figure IV.19 : Influence de la force ionique sur les nanoparticules

Dans les deux conditions (sans sel et NaCl 100 mM), les taux d'agrégation sont encore en faveur de la population de nanoparticule. Cependant, le taux d'agrégation est dix fois plus important quand les particules sont en présence d'une force ionique élevée. Cela peut s'expliquer certainement par la diminution de la solubilité des nanoparticules causée par le sel, et/ou la diminution de la charge globale des chaînes de chitosane limitant leurs répulsions (forme cationique compensée par les ions chlorures). Ces deux facteurs favorisent l'agrégation des nanoparticules.

IV.6.2 Taille des NP de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs en fonction du pH

Les nanoparticules sont formées par dissolution directe dans des solutions tampon de sodium hydrogénophosphate/acide citrique avec une gamme de pH variant de 3 à 8 et une force ionique ajustée à 100 mM par du NaCl pour obtenir une concentration finale en nanoparticule de 2 mg.mL⁻¹. Ensuite, les tailles des particules sont déterminées par DLS (Figure IV.20).

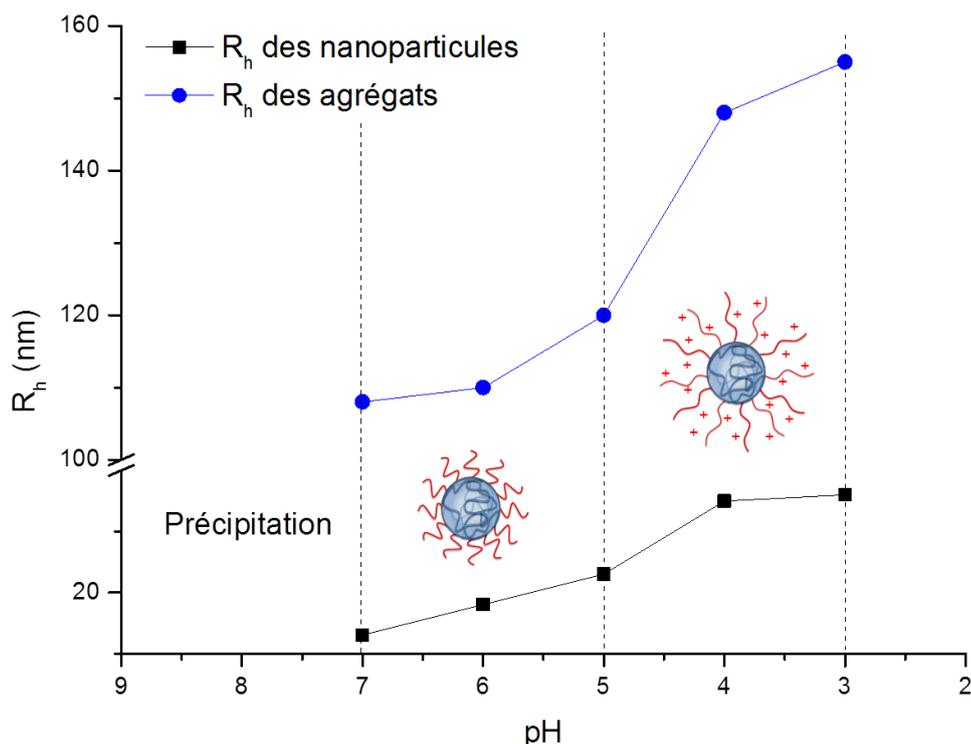


Figure IV.20 : Taille des particules et des agrégats composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs observées en DLS en fonction du pH.

De pH=7 jusqu'à pH=3, la taille des nanoparticules et des agrégats augmente. Cette hausse de la charge sur la chaîne de COs en milieu acide, entraîne une augmentation de la répulsion de ces dernières, ce qui augmente le rayon hydrodynamique observé. Une nette transition de taille des nanoparticules et des agrégats est observée vers pH=5. Cela correspond au pH apparent des amine du COs. La littérature décrit que le pK_a des chitosane est de l'ordre de 6,3 à 6,5.^[34-35] La baisse du pK_a apparent des amine du COs par rapport au chitosane seul, pourrait s'expliquer par l'augmentation de la charge globale des chaînes latérales polycationiques des nanoparticules. L'accumulation de ces charges en proximité directe rend un peu moins favorable la protonation des amine.^[193] Le système commence à précipiter pour un pH supérieur à 7. Le pH de la solution dépassant largement le pK_a apparent des amine la solubilité du copolymère greffé diminue, jusqu'à précipitation. La force ionique particulièrement élevée (100 mM) accentue encore ce phénomène. Cependant, à pH identique mais à force ionique plus faible (50 mM) le système ne précipite pas.

IV.6.3 Conclusion

Les particules chargées sont particulièrement sensibles aux conditions de pH et de force ionique. Les conditions expérimentales qui modifient la charge des chaînes ou qui font varier l'interaction entre ces chaînes influencent la taille des particules. De plus, ces paramètres

modifient aussi la solubilité du copolymère greffé en phase aqueuse. Dans une solution présentant une force ionique particulièrement élevée de 100 mM.

IV.7 Réticulation des nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs

Les nanoparticules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs obtenues sont ensuite réticulées par un agent de couplage. Cet agent possède deux extrémités alcyne pour réticuler les chaînes de PCL par chimie « click » CuAAC sur les azide résiduels et un pont disulfure sensible à la présence d'agent réducteur comme le GSH.

IV.7.1 Synthèse de l'agent réticulant

L'agent de réticulation *bis*[(propargyle carbamate)-éthyl] de disulfure est obtenu par modification de la cystamine. Les extrémités amine sont mises en présence de chloroformate de propargyle en milieu basique pour donner l'agent réticulant *bis*-propargyle (Schéma IV.3).^[194]

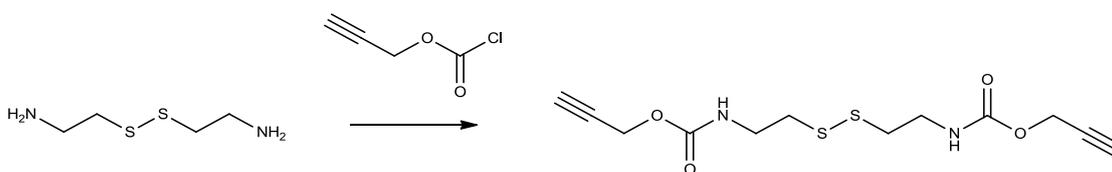


Schéma IV.3 : Synthèse de l'agent réticulant *bis*[(propargyle carbamate)-éthyl] de disulfure

Après purification, le produit est obtenu avec un rendement de 88%. La structure finale est confirmée par spectrométrie de masse ESI⁺ et par RMN ¹H (Figure IV.21).

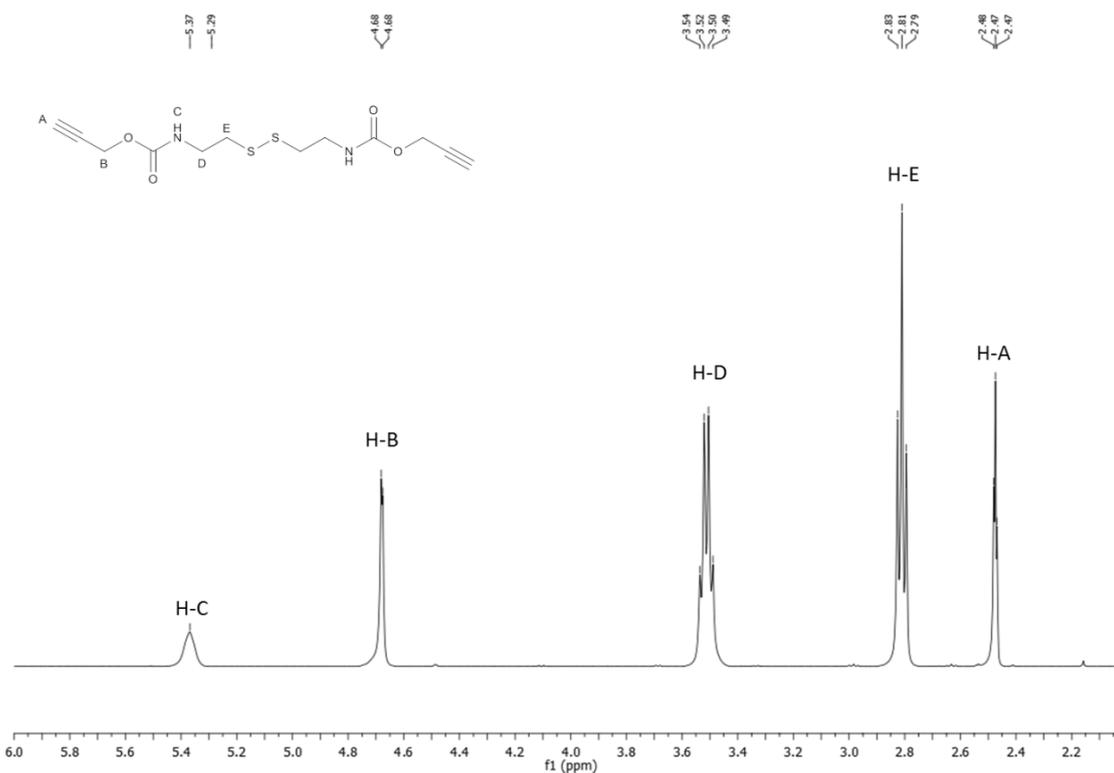


Figure IV.21 : RMN ^1H de l'agent réticulant dans le CDCl_3

IV.7.2 Réticulation des nanoparticules

La réticulation des nanoparticules composées de la $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$ a tout d'abord été étudiée dans le DMF en l'absence de principe actif. Cette étape se fait par chimie « click » CuAAC catalysé par du $\text{CuI}, \text{P}(\text{OEt})_3$ entre l'agent de réticulation et les fonctions azide résiduelles du copolymère greffé (Figure IV.22). La concentration de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilisée pour la réaction de CuAAC précédente est modifiée à $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Le choix d'une concentration plus faible que précédemment permet d'éviter la formation de réticulation intermoléculaire au profit de réticulation uniquement intramoléculaire. A cette concentration de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, l'organisation des copolymères greffés amphiphiles dans le DMF observée en DLS (Figure IV.14) indique que les particules formées ont un rayon hydrodynamique de 8 nm.

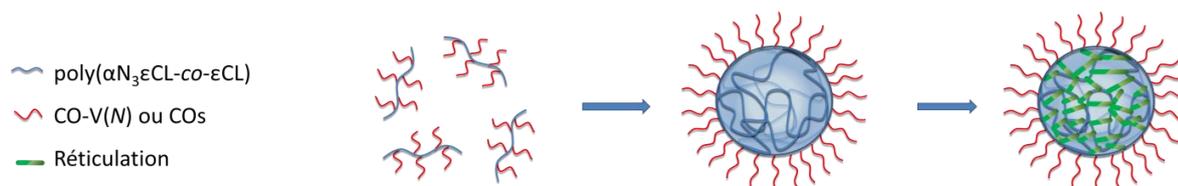


Figure IV.22 : Auto-assemblage et réticulation des nanoparticules par l'agent réticulant

La réaction est suivie par chromatographie d'exclusion stérique où le temps de rétention augmente après réticulation. Ceci va dans le sens d'une diminution du rayon hydrodynamique causé par le compactage du cœur réticulé (Figure IV.23). Cette diminution de la taille des nanoparticules après réticulation se retrouve dans de nombreux systèmes relatés dans la littérature.^[195-197]

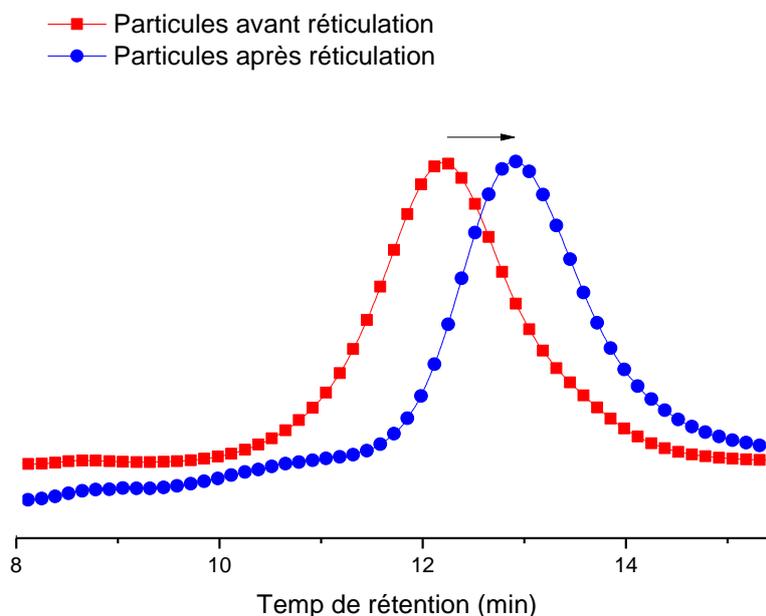


Figure IV.23 : CES des nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs non- et réticulées dans le DMF

La comparaison du spectre infrarouge du copolymère greffé avant et après réticulation montre la diminution de la bande d'absorption à 2100 cm⁻¹ correspondant aux fonctions azide (Figure IV.24). Cela confirme qu'une partie des azide ont été impliqués dans la réticulation réalisée par chimie « click » CuAAC.

IV – Nanogels et encapsulation

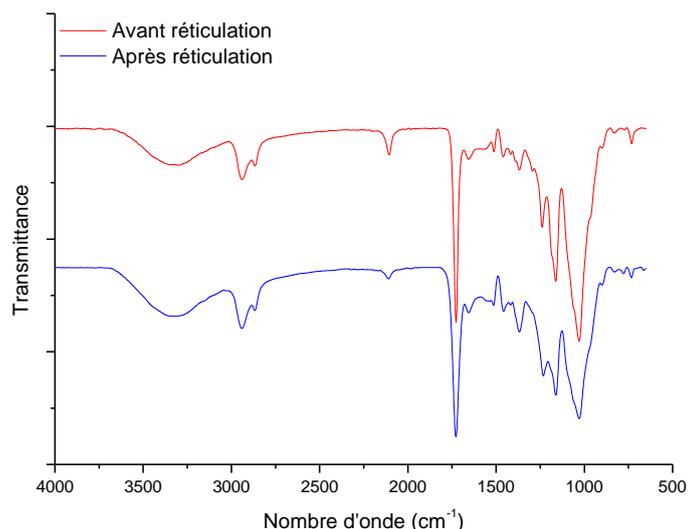


Figure IV.24 : Spectre infrarouge de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs avant et après réticulation

La DLS confirme la diminution du rayon hydrodynamique des nanoparticules dans l'eau après réticulation (Figure IV.25 et Figure IV.26). Avant réticulation, les nanoparticules possèdent un rayon hydrodynamique de 13 nm et un faible taux d'agrégation de 0,5%. L'analyse DLS du système après réticulation dans l'eau met en évidence des nanoparticules de rayon de 7 nm et un taux d'agrégation relativement constant de 1%. Cela montre que les réactions de réticulation intermoléculaires ont été largement limitées.

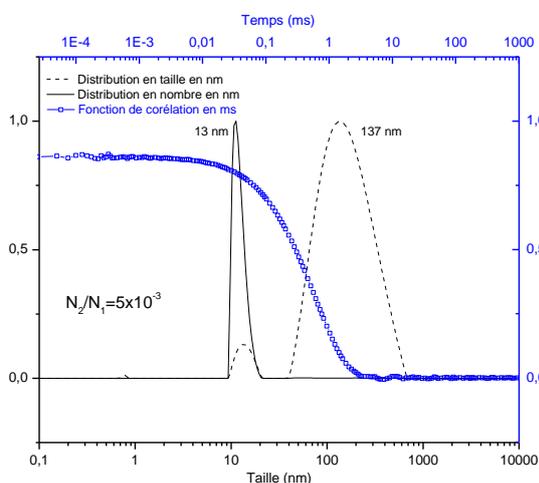


Figure IV.25 : DLS des nanoparticules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs avant réticulation dans l'eau à 25°C

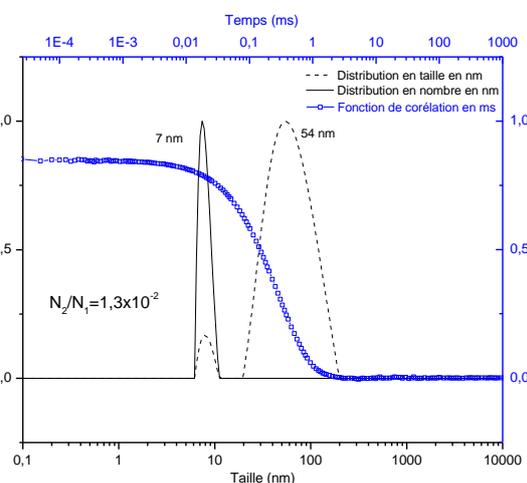


Figure IV.26 : DLS des nanoparticules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs après réticulation dans l'eau à 25°C

La réduction de la taille des nanoparticules après réticulation est également observée en microscopie électronique à transmission, même si le changement est moins notable. Le dénombrement des clichés en MET quantifie cette diminution de taille de 15 nm à 13 nm (Figure IV.27 et Figure IV.28).

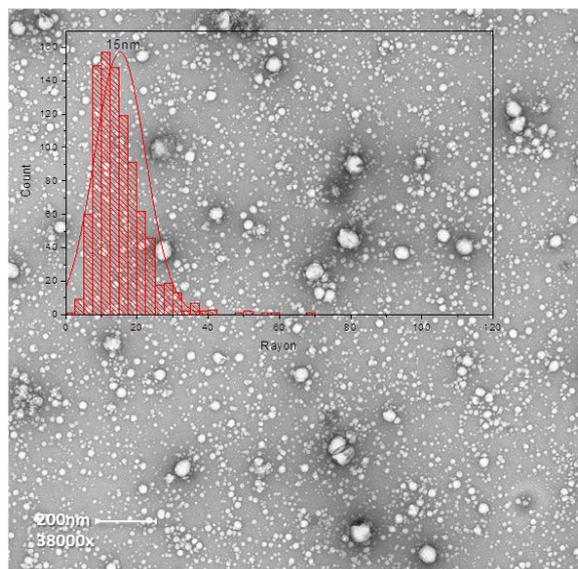


Figure IV.27 : MET et dénombrement des particules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs avant réticulation dans l'eau

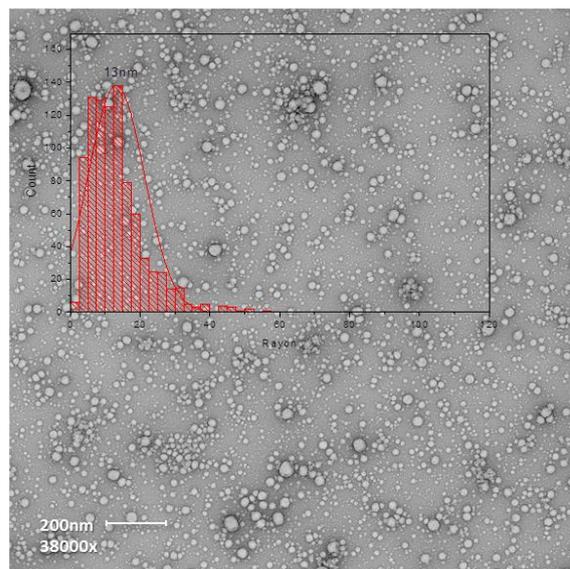


Figure IV.28 : MET et dénombrement des particules composées de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs après réticulation dans l'eau

La CES, la DLS et MET indiquent que la taille des particules a diminuée. Cette variation prouve indirectement que le système est bien réticulé.

IV.7.3 Taille des nanoparticules réticulées en fonction de la force ionique

Pour confirmer le succès de la réticulation, la variation de taille des particules non-réticulées et réticulées a été observée dans l'eau et dans une solution à 100 mM en NaCl. Comme nous l'avons démontré précédemment, la taille des nanoparticules non réticulées a tendance à diminuer avec la hausse de force ionique.

Des copolymères greffés PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs avec une fraction molaire en COs de 10% (rendement de couplage par CuAAC de 50%) ont été synthétisés uniquement pour cette étude ceci dans le but de générer des objets plus réticulés. Les particules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs non-réticulées ont été obtenues par dissolution directe dans l'eau et dans une solution à 100 mM en NaCl. Les échantillons sont caractérisés en DLS (Figure IV.29 et Figure IV.30).

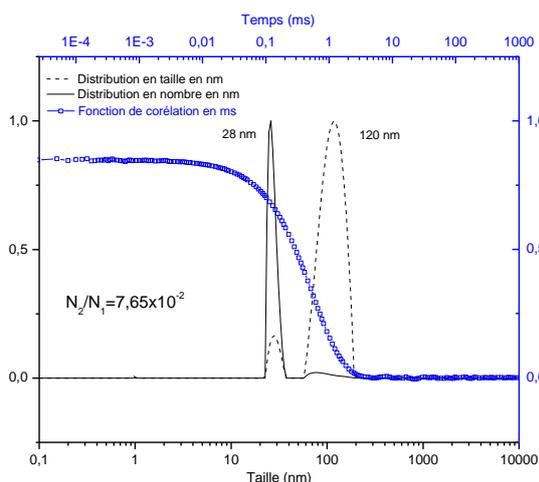


Figure IV.29 : DLS des nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs non-réticulées dans l'eau à 25°C

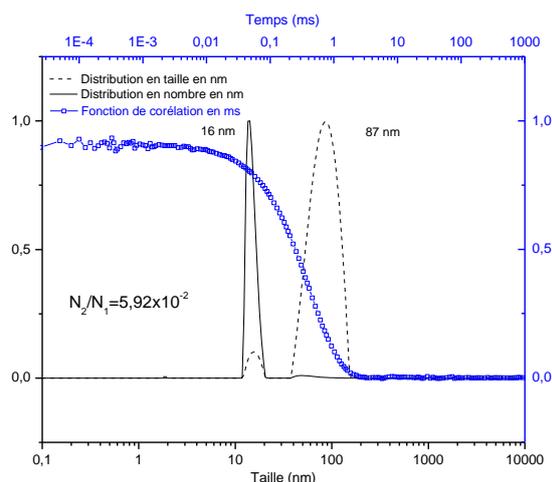


Figure IV.30 : DLS des nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs non-réticulées dans un tampon NaCl 100 à mM à 25°C

La taille des particules non réticulées dans l'eau diminue de 28 nm à 16 nm lorsqu'elles sont dissoutes dans du tampon NaCl 100 mM, soit une diminution du R_h de l'ordre de 40%. La même opération est réalisée avec les mêmes nanoparticules réticulées (Figure IV.31 et Figure IV.32).

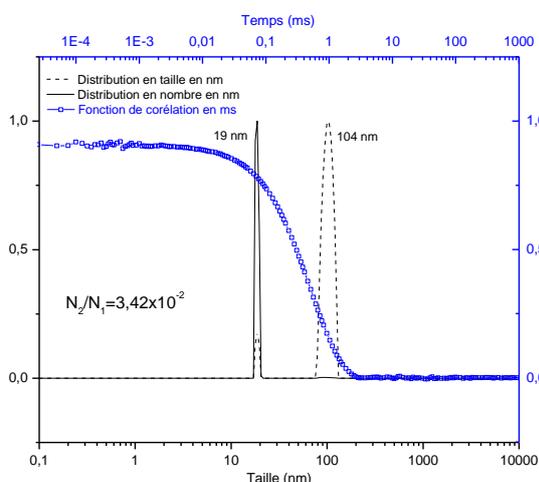


Figure IV.31 : DLS des nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs réticulées dans l'eau à 25°C

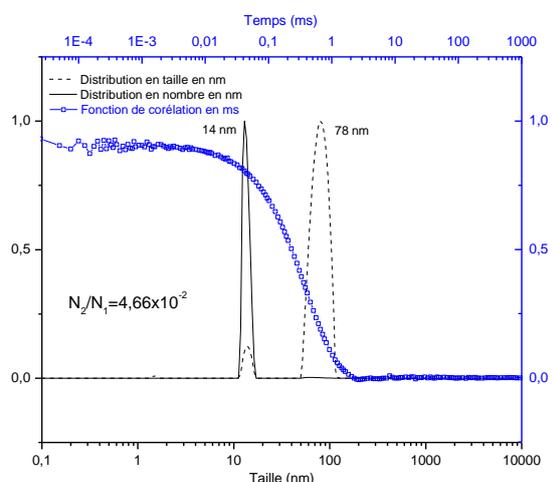


Figure IV.32 : DLS des nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs réticulées dans un tampon NaCl 100 à mM à 25°C

Dans ce cas, la taille des nanoparticules dans l'eau d'un R_h de 19 nm diminue à 14 nm dans le tampon, soit une diminution du R_h de 26%. La force ionique influence nettement moins les nanoparticules réticulées que celles non réticulées. Cela confirme que les nanoparticules réticulées sont moins sensibles à la force ionique.

IV.7.4 Conclusion

Les variations en tailles observées en MET et en DLS ont mis en évidence le succès de la réticulation des nanoparticules. De plus, l'organisation des nanoparticules a été pérennisée par réticulation, et il a été démontré que ces structures sont moins sensibles aux variations de force ionique que les nanoparticules non-réticulées.

IV.8 Encapsulation de la DOX dans les nanoparticules

Les processus de formation des nanoparticules et de leur réticulation par un agent contenant des ponts disulfure étant maîtrisés, la prochaine étape consiste à étudier l'encapsulation d'un principe actif hydrophobe par ces nouveaux copolymères greffés. Dans le cadre ce projet, la doxorubicine (DOX), une molécule anticancéreuse a été utilisée comme modèle (Schéma IV.4).

La doxorubicine est un principe actif utilisé dans le cadre de chimiothérapie anticancéreuse. C'est un principe actif de la famille des anthracyclines commercialisée sous le nom d'ADRIAMYCIN[®] ou de DOXIL[®]. Elle est produite naturellement par *Streptomyces peucetius*. Cette molécule est un intercalant de l'ADN qui inhibe la réplication des cellules cancéreuses. Son utilisation clinique est liée aux traitements des leucémies et des lymphomes.^[198]

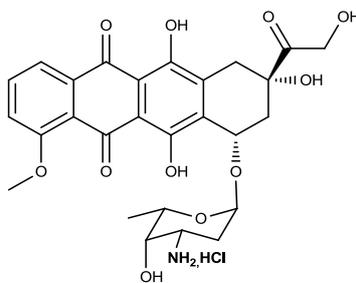


Schéma IV.4 : Structure de l'hydrochlorure de doxorubicine

Cependant la DOX est aussi une molécule cardiotoxique^[199], et son emploi n'est pas recommandé pour les patients ayant des antécédents cardiaques. La vectorisation de cette molécule par un nanogel aux propriétés de libération contrôlée, permettrait de diminuer cet effet indésirable en diminuant la concentration de la DOX au niveau des cellules cardiaques. De plus, c'est une molécule faiblement hydrophile présentant une solubilité dans l'eau de $0,271 \text{ g.L}^{-1}$ pour un pH compris entre 6,0 et 7,5. Sous sa forme chlorhydrate, la solubilité augmente jusqu'à $0,98 \text{ g.L}^{-1}$.^[200] La variation de solubilité est associée à la présence d'une amine libre ($\text{pK}_a=8,2$) qui lorsqu'elle est déprotonnée fait chuter la solubilité dans l'eau.^[201]

Encapsuler la DOX dans des nanogels permettrait de mieux contrôler la solubilité de ce principe actif.

IV.8.1 Tests préliminaires d'encapsulation de doxorubicine

Dans un premier temps, l'étude de l'encapsulation de la DOX par le copolymère greffé $PCL^{100}N_3^{20\%}$ -g-COs a été étudiée (Figure IV.33).

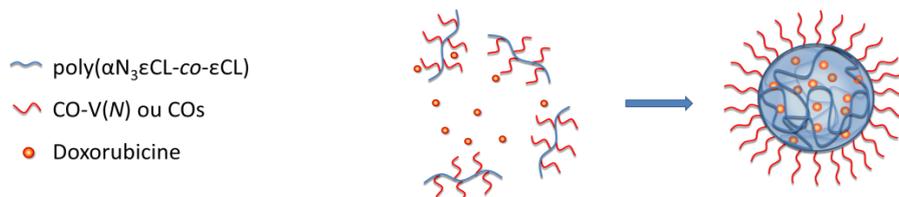


Figure IV.33 : Auto-assemblage des nanoparticules en présence de principe actif

La taille de nanoparticules en présence de DOX ($PCL^{100}N_3^{20\%}$ -g-COs/DOX, 10/1, m/m) est comparée avec des nanoparticules formées sans DOX. Un équivalent en HCl est ajouté aux nanoparticules sans DOX pour compenser l'effet de la force ionique induit par les sels chlorhydrate de cette dernière. Les tailles des particules avec et sans DOX sont observées en DLS (Figure IV.34 et Figure IV.35).^[202]

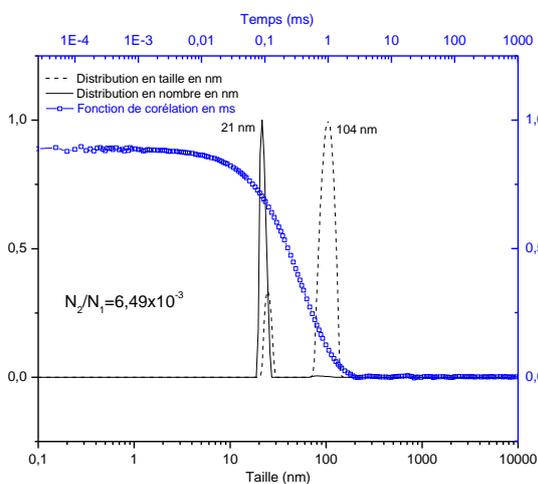


Figure IV.34 : DLS des particules composées de la $PCL^{100}N_3^{20\%}$ -g-COs sans DOX à 25°C

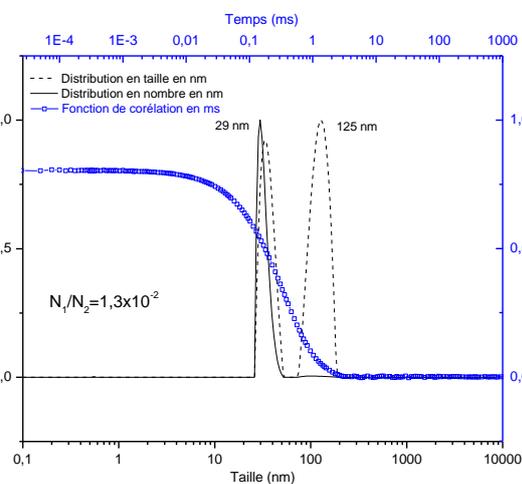


Figure IV.35: DLS des particules composées de la $PCL^{100}N_3^{20\%}$ -g-COs avec DOX à 25°C

Dans les deux cas, les taux d'agrégation sont inférieurs à 2%. A force ionique et pH identiques, la présence de DOX augmente la taille des nanoparticules et ceci va dans le sens des nombreuses données de la bibliographie relative aux phénomènes d'encapsulation.^[203-205] La DOX est encapsulée dans le cœur hydrophobe de la nanoparticule et vient gonfler cette dernière ce qui se traduit par une augmentation du R_h .

IV.8.2 Encapsulation de la DOX dans les nanoparticules, et réticulation

L'étude consiste à réaliser la micellisation du copolymère greffé en présence de DOX avec un rapport en masse de 1/10 DOX/copolymère puis de réticuler le cœur à l'aide de l'agent de réticulation comportant un pont disulfure.^[206-207] Cette réticulation est sensible à l'hydrolyse par action d'un agent réducteur comme le glutathion (GSH) (Figure IV.36).

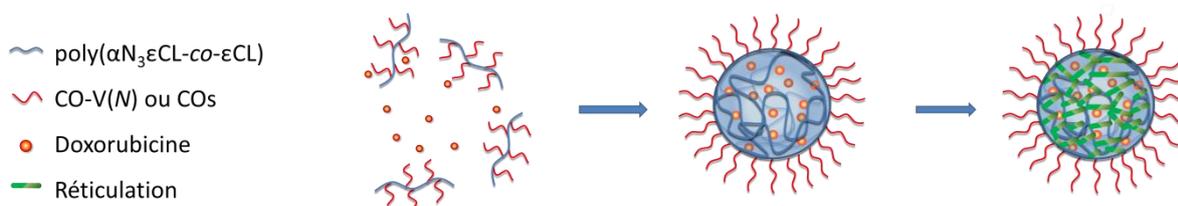


Figure IV.36 : Auto-assemblage de la nanoparticule en présence de principe actif puis réticulation

Pour encapsuler la DOX, les copolymères greffés amphiphiles sont mis en solution dans le DMF en présence de DOX sous sa forme hydrochlorure (DOX-HCl). Le système est mélangé pendant 1H, puis l'agent réticulant est ajouté en présence de CuI, P(OEt)₃. Après 16H, le mélange réactionnel est purifié par ultrafiltration sur une membrane de 10000 g.mol⁻¹ contre de l'eau. Le taux d'encapsulation est déterminé par dosage UV à 480 nm de la DOX en solution dans le filtrat (Équation IV.4). Le taux d'encapsulation mesuré est de 42 %.

$$T_{encapsulation} = \frac{n_{DOX,totale} - n_{DOX,libre}}{n_{DOX,totale}}$$

Avec – $T_{encapsulation}$: Taux d'encapsulation.

- $n_{DOX,totale}$: quantité totale en DOX en mol.

- $n_{DOX,libre}$: quantité en DOX libre en mol déterminée par dosage UV en mol.

Équation IV.4

Afin d'augmenter le taux d'encapsulation, la DOX-HCl est traitée par un équivalent de triéthylamine (avant micellisation) pour augmenter les interactions hydrophobes avec le cœur de PCL. De la même manière que ci-dessus, le taux d'encapsulation de la DOX est estimé par dosage du filtrat en UV à 480 nm. Le taux d'encapsulation passe alors à 86%.

Une étude des variations du spectre d'absorption UV-visible permet de confirmer que de la DOX a bien été encapsulée dans les nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs réticulées (Figure IV.37).

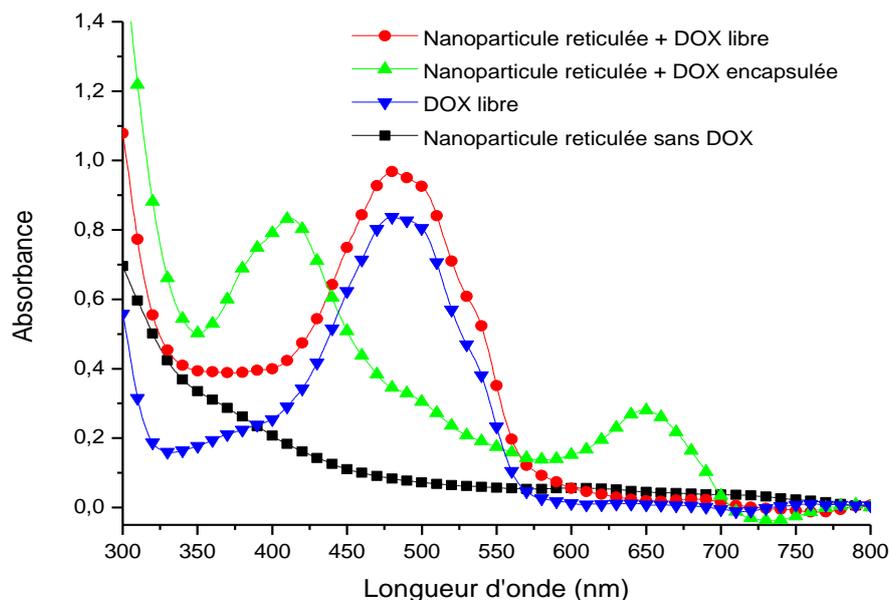


Figure IV.37 : Spectre UV-visible des nanoparticules réticulées en présence de DOX

Il est à noter que les nanoparticules réticulées seules sans DOX-HCl ne présentent pas de bandes d'absorption spécifiques (courbe ■). Comme cité précédemment, la DOX-HCl libre présente un maximum d'absorption à 480 nm (courbe ▼). Les nanoparticules réticulées ayant encapsulées de la DOX-HCl sont caractérisées par un déplacement hypsochrome de l'absorption maximale de la DOX-HCl de 480 nm à 412 nm (courbe ▲). Cette différence d'absorption est causée par la modification de l'état électronique de la DOX-HCl qui se retrouve confinée dans un nano-environnement. Un contrôle est réalisé en mélangeant des nanoparticules réticulées déjà formées sans DOX-HCl en présence d'une solution contenant de la DOX-HCl (courbe ●). Le maximum d'absorption observé est de 480 nm et permet d'affirmer que la couronne constituée de COs est relativement imperméable à la pénétration passive de la DOX-HCl.

En conclusion de cette partie, les nanoparticules réticulées sont capables d'encapsuler la DOX avec un taux d'encapsulation de 86% sous sa forme hydrophobe et de limiter sa diffusion en milieu aqueux. Il faut maintenant, vérifier, si les nanoparticules réticulées sont capables de libérer spécifiquement la DOX en présence d'un agent réducteur capable de cliver les liens disulfure.

IV.8.3 Conclusion

L'interaction entre la DOX et le copolymère greffé $PCL^{100}N_3^{20\%}-g-COs$ a été mis en évidence par DLS. Le taux d'encapsulation de la DOX sous forme amine est bien supérieur au

taux d'encapsulation de la forme chlorhydrate. Cela permet de déduire que ces interactions sont DOX/nanoparticule de types hydrophobes. De plus, l'analyse de spectre d'absorption dans l'UV-visible confirme que la DOX a bien été internalisée dans la nanoparticule.

IV.9 Relargage de la DOX par les nanoparticules

La libération contrôlée de la DOX encapsulée dans des nanoparticules de PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs réticulées a été étudiée en présence de glutathion (GSH) (Figure IV.38).

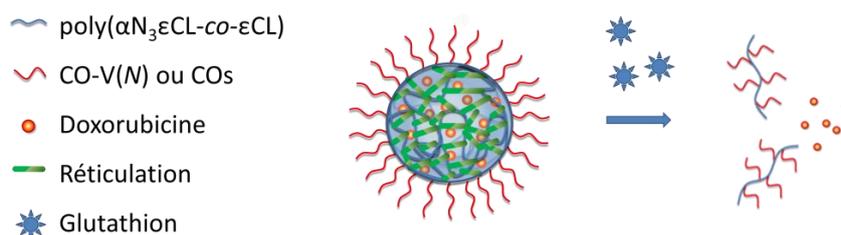


Figure IV.38 : Libération contrôlée de la DOX en présence de GSH

Pour ce faire, comme l'ont déjà décrit Du *et al.*,^[202] une quantité connue de particule est placée dans un boudin de dialyse avec un seuil de coupure 1000 g.mol⁻¹. La dialyse est faite contre un tampon phosphate (PBS) (10 mM, pH=7,4) pour se placer dans des conditions comparables aux conditions physiologiques. Trois conditions de relargage ont été étudiées. Pour mimer la proximité des cellules cancéreuses ou l'entrée de la nanoparticule dans les cellules, du GSH est ajouté au tampon, pour obtenir la concentration finale de 10 mM. De même, pour reproduire les conditions extracellulaire, du GSH est ajouté au tampon PBS pour obtenir une concentration finale de 2 μM. De plus, une solution témoin sans GSH est aussi testée. A intervalle régulier le dialysat des trois tests est dosé par fluorométrie, ce qui permet de suivre facilement la quantité de DOX libérée.

Le choix de la fluorométrie est justifié par la meilleure sensibilité de détection de cette technique en comparaison avec la spectroscopie UV-Visible. Des essais préliminaires ont permis d'estimer la limite de détection à 20 μg.mL⁻¹ tandis que la spectroscopie UV-visible présente une limite de détection de la DOX de l'ordre de 1 mg.mL⁻¹. Les résultats des trois tests de libération de la DOX par les nanoparticules sont présentés ci-dessous (Figure IV.39).

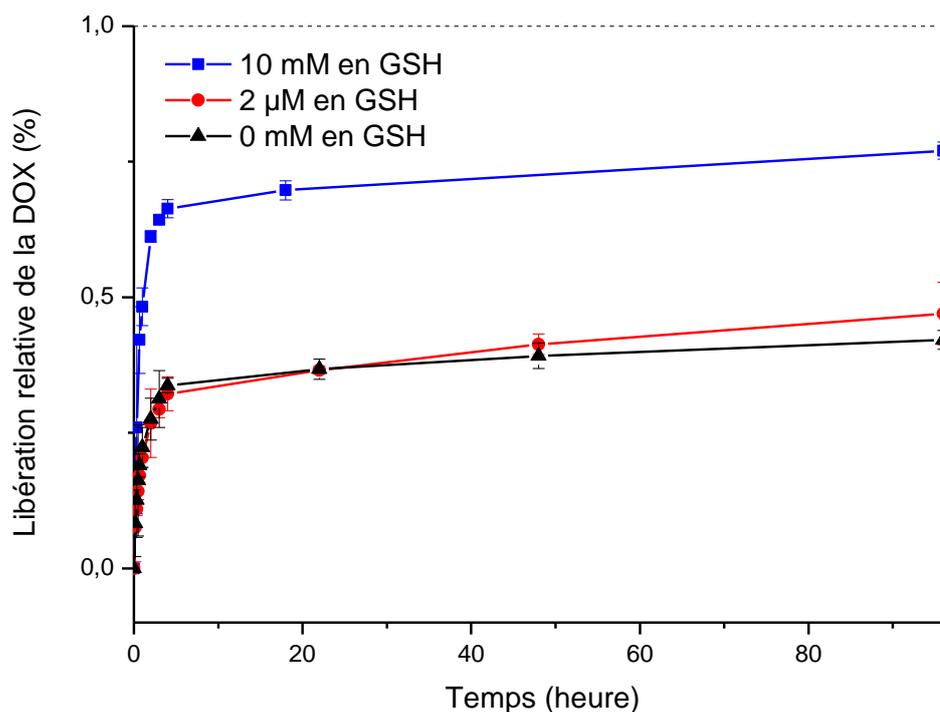


Figure IV.39 : Libération de la DOX en présence de GSH

Les libérations de la DOX en l'absence ou en présence de GSH à 2 μM sont très similaires. Après 4 H seulement 30% de la DOX encapsulée dans les NP-ret est libérée. Cette quantité n'excède pas 42% après 96 H dans l'eau mais continue à augmenter en présence de 2 μM en GSH pour atteindre 47%. La GSH n'est donc pas assez concentrée pour réduire efficacement les ponts disulfure de l'agent réticulant. Les 30% de DOX libérée après 4 H sont essentiellement causée par une diffusion liée au gradient de concentration entre la NP-ret concentrées en DOX et le milieu tamponné de la dialyse. Après ce laps de temps, l'évolution indique que le GSH à faible concentration contribue malgré tout à libérer la DOX, un peu plus efficacement que par diffusion passive uniquement.

En présence de GSH à 10 mM, soit la concentration en GSH intracellulaire ou à proximité de cellules cancéreuses, après 4 H, 66% de la DOX a été libérée. Après 96 H, la quantité libérée est de 77%. Cette libération semble tendre très difficilement vers une libération à 100%.

Il y a sélectivité dans le relargage de la DOX qui est 30% plus efficace quand la particule est en présence d'une concentration suffisante en GSH. Cependant la libération n'est pas totale puisque après 96 H, 20% de la DOX n'a toujours pas été libérée. De plus, il a été démontré que le nanogel n'est pas complètement imperméable puisqu'en l'absence de GSH, une quantité non-négligeable de 30% DOX a été malgré tout libérée.

IV.10 Conclusion

Dans ce chapitre, les synthèses des copolymères solubles dans l'eau composés de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}$ -g-CO-V(N), $\text{PCL}^{50}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs, $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs et $\text{PCL}^{200}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs ont été décrites. L'ensemble des copolymères greffés amphiphiles issus du greffage de CO-V(N) ou des COs sur des PCL possédant une fraction molaire en $\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}$ $F_{\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}}=5\%$ ne sont pas solubles en phase aqueuse. Il a été montré que les copolymères solubles dans l'eau possédant une $F_{\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}}=20\%$ s'auto-assemblent pour former des nanoparticules. Les nanoparticules composés de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}$ -g-COs ont ensuite été réticulées en présence d'un agent de couplage *bis*-propargyle et DOX pour former des nanogels stimulables par des agents réducteurs. Même si la sélectivité n'est pas totale, la libération de la doxorubicine est favorisée avec l'augmentation de la concentration en GSH. La différence est particulièrement notable entre une concentration équivalente à celle mesurée dans les cellules cancéreuses (10 mM) et celle mesurée en milieu extracellulaire (2 μM).

Références bibliographiques

- [34] T. Wang, M. Turhan, S. Gunasekaran, *Polymer International* **2004**, *53*, 911-918.
- [35] M. Rinaudo, G. Pavlov, J. Desbrières, *Polymer* **1999**, *40*, 7029-7032.
- [124] X. Li, X. Kong, S. Shi, X. Wang, Y. Gu, G. Guo, Y. Mao, F. Luo, X. Zhao, Y. Wei, Z. Qian, *Soft Materials* **2010**, *8*, 320-337.
- [138] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2952-3015.
- [186] F. E. Ziegler, K. W. Fowler, W. B. Rodgers, R. T. Wester, *Organic Syntheses* **1987**, *65*, 108-116.
- [187] S. Binauld, E. Fleury, E. Drockenmuller, *Journal of Polymer Science Part A - Polymer Chemistry* **2010**, *48*, 2470-2476.
- [188] C. Besset, S. Binauld, M. Ibert, P. Fuertes, J.-P. Pescault, E. Fleury, J. Bernard, E. Drockenmuller, *Macromolecules* **2010**, *43*, 17-19.
- [189] B. T. Holmes, A. W. Snow, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 12339-12342.
- [190] A. G. Dal Bo, V. Soldi, F. C. Giacomelli, C. Travelet, B. Jean, I. Pignot-Paintrand, R. Borsali, S. Fort, *Langmuir* **2012**, *28*, 1418-1426.
- [191] P. Sorlier, C. Viton, A. Domard, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1336-1342.
- [192] P. Sorlier, A. Denuziere, C. Viton, A. Domard, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 765-772.
- [193] J. W. Park, K. H. Choi, K. K. Park, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **1983**, *4*, 68-72.
- [194] S. Sinha, P. Ilankumaran, S. Chandrasekaran, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 771-774.
- [195] J.-H. Ryu, R. T. Chacko, S. Jiwpanich, S. Bickerton, R. P. Babu, S. Thayumanavan, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 17227-17235.
- [196] J. He, X. Tong, Y. Zhao, *Macromolecules* **2009**, *42*, 4845-4852.
- [197] R. Lupitskyy, S. Minko, *Soft Matter* **2010**, *6*, 4396-4402.
- [198] P. Mohan, N. Rapoport, *Molecular Pharmaceutics* **2010**, *7*, 1959-1973.
- [199] P. K. Singal, N. Iliskovic, *New England Journal of Medicine* **1998**, *339*, 900-905.
- [200] L. D. Mayer, L. C. L. Tai, M. B. Bally, G. N. Mitilenes, R. S. Ginsberg, P. R. Cullis, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1990**, *1025*, 143-151.
- [201] L. E. Gerweck, S. Vijayappa, S. Kozin, *Molecular Cancer Therapeutics* **2006**, *5*, 1275-1279.
- [202] J.-Z. Du, T.-M. Sun, W.-J. Song, J. Wu, J. Wang, *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49*, 3621-3626.
- [203] R. S. T. Aydin, M. Pulat, *Journal of Nanomaterials* **2012**.
- [204] J. M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1999**, *25*, 471-476.
- [205] J. Duan, H. M. Mansour, Y. Zhang, X. Deng, Y. Chen, J. Wang, Y. Pan, J. Zhao, *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *426*, 193-201.

IV – Nanogels et encapsulation

- [206] R. Cheng, F. Feng, F. Meng, C. Deng, J. Feijen, Z. Zhong, *Journal of Controlled Release* **2011**, *152*, 2-12.
- [207] D. H. Nguyen, J. H. Choi, Y. K. Joung, K. D. Park, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2011**, *26*, 287-300.

V CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de concevoir de nouveaux copolymères composés d'oligomères de chitine et de chitosane, greffés sur un polymère synthétique, la polycaprolactone.

Les oligosaccharides ainsi que la PCL sont décrits pour être biocompatibles. Ce type de molécules amphiphiles sont décrites pour former des nanoparticules par auto-assemblage. Après réticulation, les nanogels obtenus peuvent être utilisés pour vectoriser des principes actifs au niveau des cellules cancéreuses. Cette application est parfaitement en accord avec la nature biocompatible des matériaux qui les composent. Dans le cadre de ce projet, le choix d'oligomères de chitine et de chitosane se justifie par les nombreuses activités biologiques, particulièrement pour des propriétés antitumorales et des effets immunostimulants.

A l'issue de ce travail, le chitopentaose modèle, désigné CO-V(N), de structure parfaitement définie, a été modifié en position anomère par amination réductrice. L'organocatalyse de cette réaction par de l'aniline a été pour la première fois mise en évidence. Grâce à cela, le CO-V(N) a été fonctionnalisé directement sur la position réductrice par de la propargylamine, avec un bon rendement de 70%. La même stratégie d'organocatalyse a été utilisée pour fonctionnaliser le mélange d'oligomères de chitosane COs, mais sans succès. Cependant, l'utilisation d'un dérivé de l'aniline comme donneur d'amine, la 4-oxypropargylamine, a permis d'accéder, *via* amination réductrice, aux oligomères de chitosane fonctionnalisés par une fonction alcyne avec également un bon rendement de 70%.

Parallèlement, six poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) de DP 50, 100 et 200 avec une fraction molaire en motif α Cl ϵ CL de 5% et 20% ont été synthétisées par copolymérisation par ouverture de cycle des monomères d' α Cl ϵ CL et d' ϵ CL amorcée par le DSDOP. Par cette voie de synthèse, les structures se sont avérées être contrôlées et conformes à celles désirées. Les poly(α N $_3$ ϵ CL-*co*- ϵ CL) ont été ensuite obtenues par substitution nucléophile des fonctions chlore des copolymères poly(α Cl ϵ CL-*co*- ϵ CL) en présence d'azoture de sodium.

Ensuite, les poly(α N $_3$ ϵ CL-*co*- ϵ CL) ont été greffées par les oligosaccharides par chimie « click » CuAAC. Les copolymères présentant une fraction molaire en motif α N $_3$ ϵ CL de 5% greffés par le CO-V(N) ou par le COs ont précipité, c'est pourquoi seuls les poly(α N $_3$ ϵ CL-*co*- ϵ CL) de 20% ont retenu notre attention. Les copolymères greffés PCL¹⁰⁰N $_3$ ^{20%}-*g*-CO-V(N), PCL⁵⁰N $_3$ ^{20%}-*g*-COs, PCL¹⁰⁰N $_3$ ^{20%}-*g*-COs et PCL²⁰⁰N $_3$ ^{20%}-*g*-COs en solution aqueuse ont formé des nanoparticules par auto-assemblage de rayons compris entre 9 nm et 37 nm.

Par la suite, l'étude s'est concentrée sur le copolymère de taille intermédiaire PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs. De plus, il a été possible de réticuler cette particule contenant la molécule médicamenteuse grâce à l'agent pontant *bis*[(propargyle carbamate)-éthyl] de disulfure. Il a été démontré que les nanogels obtenus étaient capables d'encapsuler de la doxorubicine, une molécule anticancéreuse. Des tests de libération de la doxorubicine encapsulée dans ces nanogels en présence d'un réducteur, le GSH, ont été effectués. Ces tests ont démontré qu'en présence d'une concentration en GSH de 10 mM, concentration équivalente au milieu intracellulaire et au milieu proche des cellules cancéreuses, permettaient un relargage plus important qu'à des concentrations physiologiques en GSH de 2 μM.

Plusieurs perspectives se dégagent directement de ce travail.

Il apparaît intéressant, au vue de l'avancement du travail, de réaliser des tests de cytotoxicité des copolymères greffés afin de confirmer la biocompatibilité. De plus, il serait bon, afin de valider complètement la stratégie de vectorisation, de réaliser des tests de libération de la doxorubicine *in vivo*.

Par ailleurs, réaliser les structures similaires en utilisant les stratégies de couplage par chimie « click » thiol-ène ou/et thiol-yne permettrait de s'abstenir de l'utilisation de catalyseur à base de cuivre, et ainsi augmenter encore la biocompatibilité du système.

Parallèlement à ce travail de thèse, l'ensemble des savoir-faire développés pour permettre l'amination réductrice des oligomères de chitine et de chitosane (organocatalyse par l'aniline et utilisation de dérivés de l'aniline) pourrait être utilisé pour la fonctionnalisation d'autres séries saccharidiques peu réactives en position anomérique. Ou encore au vu des activités biologiques avérées des oligomères de chitosane, ces derniers pourraient être greffés sur d'autres systèmes macromoléculaires donnant ainsi accès à de nouveaux matériaux fonctionnels. De plus, il serait possible d'insérer de nombreux groupement en utilisant des homologues de la 4-oxypropargylaniline substituée par d'autres fonctions que l'alcyne, comme des fonctions azide, alcène, carboxylique, *etc...*

VI PARTIE EXPERIMENTALE

VI – Partie expérimentale

Sommaire

VI.1	<i>Méthodes Générales</i>	180
VI.1.1	Solvants et réactifs	180
VI.1.2	Chromatographie	180
VI.2	<i>Méthodes de caractérisation des molécules</i>	181
VI.2.1	Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	181
VI.2.2	Spectrométrie de masse (SM ESI ⁺ & SM MALDI-TOF)	181
VI.2.3	Spectroscopie infrarouge (IR)	181
VI.2.4	Spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis)	182
VI.2.5	Chromatographie d'exclusion stérique (CES)	182
VI.2.6	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	182
VI.2.7	Microscopie électronique à transmission (MET)	182
VI.2.8	Spectroscopie de fluorescence	183
VI.3	<i>Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane</i>	183
VI.3.1	Caractérisations préliminaires du CO-V(N)	183
VI.3.2	Modifications chimiques de l'oligomère de chitine CO-V(N)	184
VI.3.3	Caractérisations préliminaires du mélange d'oligomère de chitosane (COs)	187
VI.3.4	Modifications chimiques du COs	188
VI.4	<i>Polymérisation</i>	190
VI.4.1	Homopolymérisation de l' ϵ -caprolactone	190
VI.4.2	Copolymérisation de l' ϵ -caprolactone et de l' α -chloro- ϵ -caprolactone	193
VI.4.3	Obtention des poly(α N ₃ ϵ CL-co- ϵ CL)	197
VI.5	<i>Synthèse des copolymères greffés PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) et poly(αN₃ϵCL-co-ϵCL)-g-COs</i>	200
VI.5.1	Synthèse de la PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-CO-V(N)	200
VI.5.2	Synthèse des poly(α N ₃ ϵ CL-co- ϵ CL)-g-COs	201
VI.6	<i>Nanogels et encapsulation</i>	202
VI.6.1	Formation des nanoparticules par la méthode des co-solvants	202
VI.6.2	Formation des nanoparticules par dissolution directe	203
VI.6.3	Réticulation des nanoparticules de PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	203
VI.6.4	Encapsulation de la doxorubicine dans les nanoparticules de PCL ¹⁰⁰ N ₃ ^{20%} -g-COs	204
VI.6.5	Mesure du relargage	205

VI.1 Méthodes Générales

VI.1.1 Solvants et réactifs

Le toluène est séché sur un mélange styrène/n-butyllithium puis distillé sous pression réduite immédiatement avant utilisation. L' ϵ -caprolactone et le 1,4-butanediol sont purifiés par distillation sous pression réduite sur CaH_2 . Le triisopropylate d'aluminium est séché par chauffage sous pression réduite juste avant utilisation. L'eau utilisée est distillée ou désionisée.

Le CO-V(N) a été obtenu par ingénierie métabolique sur *Escherichia coli*.^[42] Le mélange d'oligomères de chitosane (COs), s-FACOSTM a été fourni par Kitto Life Co., Pyeongtaek Si, Corée du Sud.

Les autres solvants et réactifs sont utilisés sans purification préliminaire.

VI.1.2 Chromatographie

L'avancement de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice (silica gel 60 F₂₅₄ Merck, Darmstadt, Allemagne) en utilisant un système d'éluant approprié. Les CCM sont révélées pour les oligosaccharides par trempage dans une solution acide (H_2SO_4 , MeOH, H_2O ; 3/45/45), puis chauffées à 200°C, et pour les autres molécules organiques dans une solution oxydante (KMnO_4 10%, K_2SO_4 66%, NaOH 0,08%, H_2O), puis chauffées à 200°C.

Les purifications sur colonne de gel de silice (Geduran SI 60 : 40-63 μm , Merck, Darmstadt, Allemagne) sont de type "flash" (sous pression d'air), ou à pression ordinaire.

Les purifications sur colonne C_{18} sont réalisées sur un système Reveleris® Flash équipé de colonne C_{18} Flash Cartridges avec une double détection UV-visible et mesure de la diffusion de lumière.

VI.2 Méthodes de caractérisation des molécules

VI.2.1 Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses de résonance magnétique nucléaire ^1H ou ^{13}C ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance DPX400 équipé d'une sonde QNP de 5 mm. Les attributions de signaux sont réalisées à l'aide d'expériences multidimensionnelles COSY, HMQC et DOSY.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm). La multiplicité des signaux est noté : s pour singulet, d pour doublet, t pour triplet, q pour quadruplet, m pour multiplet ou massif, et dd pour doublet de doublets.

Pour les analyses effectuées dans l'eau deutéré (D_2O), le pic résiduel de l'HDO est utilisé comme standard interne (étalonné à $\delta = 4,79$ ppm à 298 K et $\delta = 4,20$ ppm à 353 K). Pour les analyses effectuées dans le chloroforme deutéré (CDCl_3), le pic résiduel du chloroforme est utilisé comme standard interne (étalonné à 7,26 ppm à 298 K pour les analyses ^1H , et à 77,16 ppm pour les analyses ^{13}C).

VI.2.2 Spectrométrie de masse (SM ESI⁺ & SM MALDI-TOF)

Les spectres de masses ont été effectués sur un spectromètre WATER Micromass ZQ par ionisation par électronébuliseur en mode positif (SM ESI⁺) et sur un spectromètre Bruker Daltonics Autoflex couplé à un détecteur du temps de vol (SM MALDI-TOF) en utilisant une matrice polaire DHB.

Le mélange d'oligomères de chitosane ainsi que les dérivés seront *N*-acétylé par la procédure générale (A) décrite ci-dessous, afin de faciliter leur désorption de la matrice polaire.

VI.2.3 Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres infrarouges ont été réalisés avec un spectromètre Perkin-Elmer spectrum RXI FTIR (Fourier Transformed. InfraRed) sur un domaine compris entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} . Les échantillons solubles dans le DCM sont déposés directement sur une pastille de KBr sinon ils sont dispersés au sein d'une poudre de KBr puis compactés avant analyse. Les

copolymères sont analysés en mode ATR (Attenuated Total Reflectance) à l'aide d'un spectromètre Perkin-Elmer spectrum 100 FTIR.

VI.2.4 Spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis)

Les spectres ultraviolet-visible sont réalisés sur un spectromètre Varian Cary 50 Bio. Les échantillons sont analysés dans une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique.

VI.2.5 Chromatographie d'exclusion stérique (CES)

La chromatographie d'exclusion stérique est réalisée à l'aide d'un système Agilent 390-MDS composé d'une pompe/injection 290-LC, d'un four Prostar 510, et d'un détecteur de l'indice de réfraction 390-MDS. L'exclusion stérique s'effectue à 60°C sur deux colonnes connectées en série Agilent PolyPore PL1113-6500 (linéaire, 7,5 x 300 mm, taille des particules de 5 µm, limite d'exclusion de 200 à 2000000 g.mol⁻¹) dans le DMF contenant 10 mM de LiCl, à un débit de 1 mL.min⁻¹. La calibration est réalisée avec du polystyrène linéaire.

Les solutions sont filtrées sur des membranes de 0,45 µm en PTFE avant injection.

VI.2.6 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les mesures de la diffusion de la lumière ont été effectuées sur un appareil ALV/CGS-8F S/N 069, équipé d'un laser rouge hélium-néon (JDSU) opérant à une longueur d'onde de 632,8 nm et à une puissance de 35 mW. L'échantillon est thermostaté à 25°C dans un bain de toluène.

Les solutions sont filtrées sur membrane de 0,45 µm, en MCE (Mix Cellulose Ester) pour les solutions aqueuses et 0,45 µm en PTFE pour les solutions organiques. Les mesures ont été effectuées à un angle de 90° sur une période 30 s à 300 s. Les fonctions de corrélation ont été traitées à l'aide d'un modèle exponentiel.

VI.2.7 Microscopie électronique à transmission (MET)

Les clichés sont réalisés à l'aide d'un microscope électronique Philips CM200 opérant à 80 kV. Les échantillons ont été préparés par dépôt de la solution sur une grille adaptée (400 mesh, en cuivre recouverte par un film de carbone). L'agent de contraste utilisé est de l'acétate d'uranile. La grille est ensuite séchée à température ambiante.

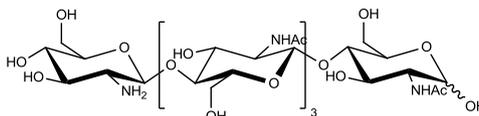
VI.2.8 Spectroscopie de fluorescence

Les dosages fluorimétriques de la DOX sont réalisés sur un spectromètre Perkin Elmer LS 50B. La longueur d'onde d'excitation est de 480 nm, et la longueur d'onde d'émission est réglée à 520 nm avec un temps d'intégration de 10 s. La fente d'excitation est fixée à 2,5 nm et celle d'émission à 10 nm.

VI.3 Modifications chimiques d'oligomères de chitine et de chitosane

VI.3.1 Caractérisations préliminaires du CO-V(N)

Tétra- $N,N^{\text{II}},N^{\text{III}},N^{\text{IV}}$ -acétyl-chitopentaose^[42] noté CO-V(N)



RMN ^1H : (D_2O , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 5,21 (d, 0,7H, $J = 2,0$ Hz, H-1 α^{I}); 4,72 (d, 0,3H, $J = 7,0$ Hz, H-1 β^{I}); 4,61 (m, 3H, H-1 $^{\text{II-V}}$); 4,00-3,40 (m, 29H, H-2 $^{\text{I-IV}}$, H-3 $^{\text{I-V}}$, H-4 $^{\text{I-V}}$, H-5 $^{\text{I-V}}$, H-6 $^{\text{I-V}}$); 2,84 (t, 1H, H-2 $^{\text{V}}$); 2,07 (m, 12H, COCH_3).

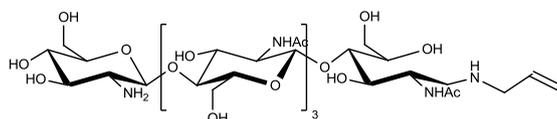
RMN ^{13}C : (D_2O , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 174,8, 174,6, 174,5 (C=O); 101,3 (C-1 $^{\text{II-V}}$); 94,8 (C-1 β^{I}); 90,5 (C-1 α^{I}); 79,7, 79,1, 79,0, 77,6, 76,3, 74,6, 74,5, 73,6, 72,5, 72,1, 71,9, 70,7, 70,0, 69,6, 69,3 (C-3 $^{\text{I-V}}$, C4 $^{\text{I-V}}$, C-5 $^{\text{I-V}}$); 62,6, 60,6, 60,2, 60,0, 56,4, 56,2, 55,4, 55,0, 54,0, 53,7 (C-2 $^{\text{I-V}}$, C-6 $^{\text{I-V}}$); 23,3, 22,2, 22,1, 21,9 (CH_3).

SM MALDI-TOF: m/z: 992,38 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 1014,44 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 1030,43 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

Ces analyses sont en accord avec celles décrites dans la littérature.^[42]

VI.3.2 Modifications chimiques de l'oligomère de chitine CO-V(N)

(Tri- N^{II} , N^{III} , N^{IV} -acétyl-chitotétraosyl)-(1→4)- N -acétyl-1-désoxy-1-prop-2-ènylamino-glucosaminitol noté conjugué allyle de CO-V(N)



Le tétra- $N,N^{\text{II}},N^{\text{III}},N^{\text{IV}}$ -acétyl-chitopentaose (50 mg, 0,05 mmol) et l'allylamine (374 μL , 5 mmol) sont mis en solution dans une solution tampon d'acétate d'ammonium (17 mL, 50 mM, pH=5,0). La solution est agitée 5 minutes à 0°C puis du cyanoborohydrure de sodium est ajouté (79 mg, 1,25 mmol). La solution est à nouveau agitée pendant 4 jours à 50°C. Le produit est purifié sur colonne C_{18} Sep-Pack (Élution : gradient eau/méthanol, 100-0 à 20-80). Un solide blanc est obtenu après lyophilisation.

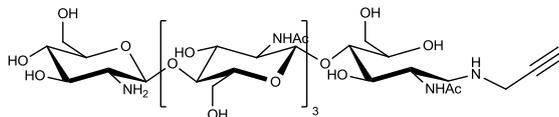
$m = 46 \text{ mg}$; $\eta = 92\%$.

RMN ^1H : (D_2O , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 5,90 (m, 1H, -CH=); 5,36 (dd, 2H, $J = 17,2$ et 9,9 Hz, =CH₂); 4,61 (m, 4H, H-1^{II-IV}); 4,50 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-1^V); 4,40 (m, 1H, H-2^I); 4,15-3,37 (m, 28H, H-2^{II-IV}, H-3^{I-IV}, H-4^{I-V}, H-5^{I-V}, H-6^{I-V}); 3,40 (m, 1H, H-3^V); 3,09 (m, 1H, H-1a^I); 2,95 (m, 1H, H-1b^I); 2,69 (t, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-2^V); 2,08 (s, 12H, COCH₃).

RMN ^{13}C : (D_2O , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 175,2 (C=O); 134,3 (=CH-); 118,6 (=CH₂); 103,1 (C-1^V); 101,7-101,0 (C-1^{II-IV}); 79,4, 79,0, 78,4, 76,0, 75,0, 74,9, 73,3, 72,4, 71,5, 69,9, 68,4, 62,2, 61,0, 60,4, 60,3, 60,1 (C-3^{I-IV}, C-4^{I-V}, C-5^{I-V}, C-6^{I-V}); 76,6 (C-3^V); 57,1 (C-2^I); 55,6-55,4 (C-2^{II-V}); 51,2 (CH₂); 50,7 (C-1^I); 27,0-22,5 (CH₃).

SM ESI⁺ : m/z : 1033,5 [M+H]⁺; 1055,2 [M+Na]⁺; 517,3 [M+2H]²⁺; 528,2 [M+H+Na]²⁺; 539,3 [M+2Na]²⁺; 547,3 [M+Na+K]²⁺; 555,3 [M+2K]²⁺.

(Tri- N^I, N^{II}, N^{III} -acétyl-Chitotétraosyl)-(1→4)- N -acétyl-1-désoxy-1-prop-2-ynylamino-glucosaminitol noté conjugué propargyle de CO-V(N)



Du tétra- $N, N^{II}, N^{III}, N^{IV}$ -acétyl-chitopentaose (500 mg, 0,5 mmol), de la propargylamine (161 μ L, 2,5 mmol) et de l'aniline (40 μ L, 0,25 mmol,) sont mis en solution dans une solution tampon d'acétate d'ammonium (17 mL, 50 mM, pH=5,0). La solution est agitée 5 minutes à température ambiante puis du cyanoborohydrure de sodium est ajouté (160 mg, 2,5 mmol). La solution est à nouveau agitée pendant 4 jours à 40°C.

Le mélange réactionnel est co-éaporé sous pression réduite avec du méthanol (5 x 10 mL) puis avec de l'eau (5 x 10 mL). Le résidu obtenu est purifié par chromatographie en phase inverse sur système Reveleris® Flash (colonne C_{18} , Éluion : gradient eau/acétonitrile, 100-0 à 20-80). Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc après lyophilisation.

$m = 35 \text{ mg}$; $\eta = 70\%$.

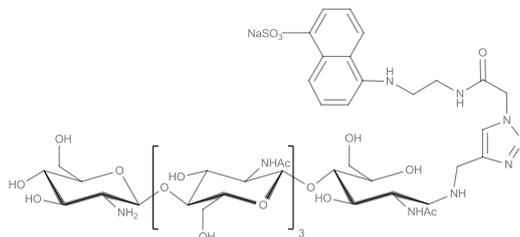
RMN ^1H : (D_2O , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,62-4,60 (m, 6H, $\text{H-1}^{\text{II-IV}}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv$); 4,49 (d, 1H, $J=8,0 \text{ Hz}$, H-1^{V}); 3,94-3,38 (m, 28H, $\text{H-2}^{\text{I-IV}}$, $\text{H-3}^{\text{I-V}}$, $\text{H-4}^{\text{I-V}}$, $\text{H-5}^{\text{I-V}}$, $\text{H-6a}^{\text{I-V}}$, $\text{H-6b}^{\text{I-V}}$); 3,41–3,38 (m, 1H, H-2^{V}); 2,94 (dd, 1H, $J=2,64 \text{ et } 12,23 \text{ Hz}$, H-1a^{I}); 2,77 (dd, 1H, $J=9,1 \text{ et } 12,1 \text{ Hz}$, H-1b^{I}); 2,69 (t, 1H, $J=8,7 \text{ Hz}$, H-2^{V}); 2,06 (s, 12H, COCH_3).

RMN ^{13}C : (D_2O , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 174,9 (C=O); 103,0 (C-1^{V}); 101,6-101,3 ($\text{C-1}^{\text{II-IV}}$); 79,4, 78,9, 78,4, 75,9, 75,0, 74,9, 74,8, 72,6, 72,4, 72,3, 71,5, 62,3, 61,0, 60,4, 60,3, 60,0, 51,0 ($\text{C-3}^{\text{I-IV}}$, $\text{C-4}^{\text{I-V}}$, $\text{C-5}^{\text{I-V}}$, $\text{C-6}^{\text{I-V}}$); 76,6 (C-3^{V}); 69,9 ($\text{HC}\equiv$); 57,0 (C-2^{I}); 55,6-55,4 ($\text{C-2}^{\text{II-V}}$); 49,0 (C-1^{I}); 37,4 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv$); 22,5-22,5 (CH_3).

SM ESI $^+$: m/z : 1031,6 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; 516,3 [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$.

SM MALDI-TOF : m/z : 1031,48 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; 1053,59 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 1069,37 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$.

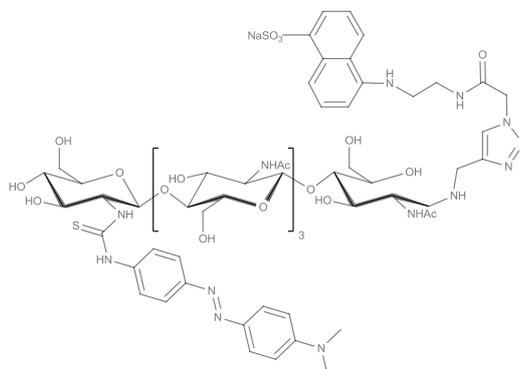
4-[(Tri- N^I, N^{II}, N^{III} -acétyl-chitotétraosyl)-(1→4)-(N-acétyl-1-désoxy-1-méthylamino-D-glucosaminitol)]-1-[(sodium-N-(acétylaminoéthyl)-5-naphthylamine-1-sulfonate]-1H-[1,2,3]-triazole noté CO-V(N)-EDANS



Le conjugué propargyle de CO-V(N) (20,6 mg, 0,025 mmol) et le *N*-[(azidoacétyl)aminoéthyl]-5-naphthylamine-1-sulfonate de sodium (N_3 -EDANS)^[208] (11mg, 0,03 mmol) sont mis en solution dans l'eau (1 mL). Une solution fraîchement préparée contenant du sulfate de cuivre (1 M ; 0,05 mmol) et de l'ascorbate de sodium (20 mg, 0,1 mmol) dans l'eau (50 μ L) est ajoutée et le milieu réactionnel est agité pendant 3 jours à 50°C. Après concentration sous pression réduite, le résidu est dissous dans l'eau et purifié sur une colonne Sep-Pack Plus C₁₈ (Élution : gradient eau/méthanol, 100-0 à 20-80). Le produit est obtenu sous forme d'un solide jaune-orangé après lyophilisation et est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification.

$m = 15,5 \text{ mg} ; \eta = 55\%$.

4-[N^{IV} -diméthylaminophénylazophényl-thioureido-(tri- N^I, N^{II}, N^{III} -acétyl-chitotétraosyl)-(1→4)-(N-acétyl-1-désoxy-1-méthylamino-D-glucosaminitol)]-1-[(sodium-N-(acétylaminoéthyl)-5-naphthylamine-1-sulfonate]-1H-[1,2,3]-triazole noté sonde FRET



Le conjugué CO-V(N)-EDANS (6 mg, 4,3 μ mol) et le 4'-isothiocyanate de 4-diméthylaminoazobenzène (DABITC) (2 mg, 7 μ mol) sont mis en solution dans le DMF (500 μ L), et le mélange réactionnel est agité à 37°C pendant 24 heures après ajout d'une solution

aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium ($30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,2 mL). Le mélange est additionné de gel de silice (1 g), puis concentré sous vide. Le solide obtenu est déposé au sommet d'une colonne de gel de silice (élution : gradient eau/acétonitrile, 0-100 à 60-40), et la sonde FRET est obtenue sous forme d'un solide orange après concentration sous vide, puis lyophilisation.

$$m = 6,3 \text{ mg} ; \eta = 87\%.$$

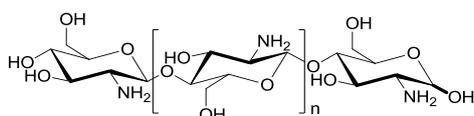
RMN ^1H : (DMSO, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 8,5 (H-triazole); 8,20-6,00 (m, H-Ar); 5,20–4,30 (m, H-1^{II-V}); 4,00-3,00 (H-2^{I-V}, H-3^{I-V}, H-4^{I-V}, H-5^{I-V}, H-6^{I-V}, 2xN-CH₃, 5xN-CH₂); 1,9-1,7 (m, H-COCH₃).

VI.3.3 Caractérisations préliminaires du mélange d'oligomère de chitosane (COs)

Procédure générale (A) : N-acétylation des oligomères de chitosane pour les analyses en SM MALDI-TOF

Le mélange commercial d'oligomères de chitosane (100 mg) est mis en solution dans un mélange de méthanol et d'eau (25 mL, 1/1) qui est ensuite additionné lentement d'anhydride acétique (7 mL). La solution est agitée une nuit à température ambiante, puis concentrée sous pression réduite. Le résidu est ensuite co-évaporé avec de l'eau (5 x 10 mL) puis repris dans l'eau pour être lyophilisé. Le solide obtenu est analysé en SM MALDI-TOF.

s-FACOS



RMN ^1H : (D₂O, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 5,32 (d, 0,6H, H-1 α^1); 4,70 (d, 0,4H, H-1 β^1); 4,55 (m, 3H, H-1ⁿ); 4,00-3,35 (m, 20H, H-3ⁿ, H-4ⁿ, H-5ⁿ, H-6ⁿ); 3,10 (dd, 1H, H-2¹); 2,76 (m, 3H, H-2ⁿ); 2,05 (s, 2H, H-COCH₃).

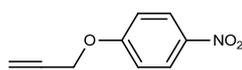
RMN ^{13}C : (D₂O, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 174,6 (CO); 101,9 (C-1ⁿ); 94,9 (C-1 β^1); 90,1 (C-1 α^1); 78,0 (C-4ⁿ); 76,2, 73,6, 71,9, 70,2, 69,7 (C-3ⁿ, C-5ⁿ); 60,6, 60,2 (C-6ⁿ); 56,6, 56,5 (C-2ⁿ); 22,2 (CH₃).

Le produit est N-acétylé selon la procédure générale (A) avant analyse SM MALDI-TOF.

SM MALDI-TOF : m/z: 447,47 [$M_{\text{CO-II(perNAC)+Na}}^+$]; 650,31 [$M_{\text{CO-III(perNAC)+Na}}^+$]; 853,32 [$M_{\text{CO-IV(perNAC)+Na}}^+$]; 1056,38 [$M_{\text{CO-V(perNAC)+Na}}^+$]; 1259,45 [$M_{\text{CO-VI(perNAC)+Na}}^+$].

VI.3.4 Modifications chimiques du COs

4-(2-propyn-1-yloxy)nitrobenzène ou 4-nitrophényl-propargyléther^[175]



Du paranitrophénol (11,2 g, 80 mmol) est mélangé à une solution de soude (150 mL, 0,8 M) puis l'ensemble est chauffé à 60°C sous agitation jusqu'à dissolution totale. Le bromure de tétrabutylammonium (2,6 g, 8 mmol) est ensuite ajouté suivi de l'addition lente de bromure de propargyle en solution dans du toluène (41 mL, 84 mmol), sous une agitation vigoureuse à 40°C. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (Élution : AcOEt/EP, 1/1). Après 24 H de réaction, le précipité orange est filtré et le filtrat est lavé avec de l'eau (3 x 30 mL). La phase organique et le solide orange sont rassemblés et la solution obtenue est concentrée sous pression réduite. Le solide jaune est repris dans le dioxane (100 mL) puis est précipité dans de l'eau (100 mL). Le précipité est purifié par recristallisation dans l'éthanol sous forme d'un solide blanc.

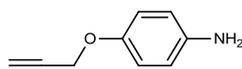
$$m = 2,16 \text{ g} ; \eta = 83\%.$$

RMN ¹H : (CDCl₃, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 8,21 (d, 2H, $J=9,3$ Hz, H-Ar³, H-Ar⁵); 7,05 (d, 2H, $J=9,3$ Hz, H-Ar², H-Ar⁶); 4,79 (s, 2H, CH₂-C≡); 2,58 (s, 1H, HC≡).

Ces analyses sont en accord avec celles décrites dans la littérature.^[175]

SM ESI⁺: m/z : 177,2 [M+H]⁺.

4-(2-propyn-1-yloxy)benzènamine ou 4-propargyloxyaniline^[175]



Le 4-nitrophényl-propargyléther (1 g, 5,75 mmol) est dissout dans du dioxane (23 mL). Une solution de chlorure d'étain (II) (4,2 g, 22,25 mmol) dans l'acide chlorhydrique concentré (12 mL) est ajoutée très lentement à la solution de 4-nitrophényl-propargyléther, tout en maintenant la température à 0°C. La solution est agitée à 0°C pendant 2H puis à

température ambiante pendant 4 jours. L'avancement de la réaction est suivie par CCM (Élution : AcOEt/EP, 2/8).

Le mélange réactionnel est neutralisé par ajout d'une solution de soude 2 M, on observe l'apparition d'un précipité qui est repris par addition de DCM. La phase aqueuse est lavée avec du DCM (2 x 40 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis concentré sous pression réduite. L'huile brune obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (Élution : AcOEt/EP, 2/8) pour conduire à la 4-propargylaniline .

$$m = 931 \text{ mg} ; \eta = 93\% .$$

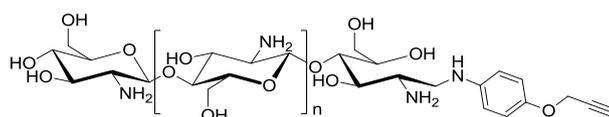
RMN ^1H : (CDCl₃, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 6,83 (d, 2H, $J=9,0$ Hz, H-Ar², H-Ar⁶); 6,64 (d, 2H, $J=9,0$ Hz, H-Ar³, H-Ar⁵); 4,61 (s, 2H, CH₂-C \equiv); 3,47 (s, 2H, NH₂); 2,50 (s, 1H, HC \equiv).

RMN ^{13}C : (CDCl₃, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 116,8, 116,8, 116,6, 116,6 (C-Ar); 79,6 (HC \equiv); 75,6 (-C \equiv); 57,2 (CH₂-C \equiv).

Ces analyses sont en accord avec celles décrites dans la littérature.^[175]

SM ESI⁺: m/z : 147,9 [M+H]⁺ ; 170,0 [M+Na]⁺.

(Chitooligosaccharidyl)-(1→4)-1-désoxy-1-[4-(2-propyn-1-yloxy)benzènamino]-glucosaminitol noté conjugué propargyle de COs



Le mélange commercial d'oligomères de chitosane (680 mg, 0,68 mmol) et de 4-propargyloxyaniline (60 mg, 3,4 mmol) sont mis en solution dans une solution tampon d'acétate d'ammonium (20 mL, 50 mM, pH=5,0). Quelques gouttes de méthanol sont ajoutées, jusqu'à dissolution complète de la 4-propargyloxyaniline. La solution est agitée 5 minutes à température ambiante puis du cyanoborohydrure de sodium est ajouté (21 mg, 3,4 mmol). La solution est agitée pendant 4 jours à 40°C.

Le mélange réactionnel est dilué dans l'eau (30 mL), puis lavé avec du DCM (2 x 50 mL). La phase aqueuse est concentrée sous vide puis le résidu est co-évaporé avec de l'eau (5 x 10 mL). Le produit brut est purifié par chromatographie en phase inverse sur un système

Reveleris® Flash (colonne C₁₈, Éluion : gradient eau/acétonitrile, 100-0 à 20-80), pour donner un solide blanc après lyophilisation.

$m = 483 \text{ mg}$; $\eta = 71\%$.

RMN ¹H : (D₂O, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 6,93-6,72 (m, 4H, H-Ar); 4,65 (s, 2H, CH₂-C \equiv); 4,60-4,47 (m, 4H, H-1ⁿ); 3,95-3,27 (m, 27H, H-1^{1a}, H-1^{1b}, H-3ⁿ, H-4ⁿ, H-5ⁿ, H-6ⁿ); 2,83-2,73 (m, 4H, H-2ⁿ); 1,98 (s, 2H, COCH₃).

RMN ¹³C : (D₂O, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 175,0 (CO); 118,2, 117,4, 117,1, 115,6 (C-Ar); 101,7-101,2 (C-1ⁿ); 79,1 (HC \equiv); 77,9, 77,7, 77,0, 76,6, 76,5, 75,2, 75,1, 74,9, 74,6, 74,5, 74,4, 73,3, 73,1, 72,1, 71,0, 70,0, 69,8, 67,0, 62,4, 60,9, 60,5, (C-3ⁿ, C-4ⁿ, C-5ⁿ, C-6ⁿ, CH₂-C \equiv); 57,4 (C-2¹); 56,7-55,8 (C-2ⁿ); 53,2 (C-1¹); 22,5 (CH₃).

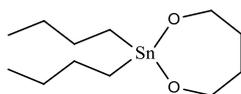
Le produit est N-acétylé selon la procédure générale (A) avant analyse SM MALDI-TOF.

SM MALDI-TOF^j : m/z : 620,25 [M_{II}+Na]⁺ ; 823,31 [M_{III}+Na]⁺ ; 1026,39 [M_{IV}+Na]⁺ ; 1229,48 [M_V+Na]⁺ ; 1432,61 [M_{VI}+Na]⁺.

VI.4 Polymérisation

VI.4.1 Homopolymérisation de l' ϵ -caprolactone

2-Dibutyl-2-stanna-1,3-dioxepane (DSDOP)



Un mélange contenant du diméthylate de dibutylétain (1,93 mL, 8,47 mmol) et du 1,4-butanediol anhydre (742 μ L, 8,47 mmol) est chauffé graduellement de 100°C à 170°C sur une période de quatre heures sous argon. Le méthanol formé au cours de la réaction est éliminé par aspiration sous vide. Le brut réactionnel est ensuite mis en solution dans 10 mL de toluène anhydre et conservé à 4°C sous argon.

j. Où M_{II} est la masse du conjugué propargyle de CO-II(perNAc), M_{III} est la masse du conjugué propargyle de CO-III(perNAc), M_{IV} est la masse du conjugué propargyle de CO-IV(perNAc), M_V est la masse du conjugué propargyle de CO-V(perNAc), et M_{VI} est la masse du conjugué propargyle de CO-VI(perNAc).

VI – Partie expérimentale

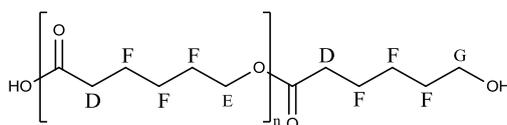
La concentration en produit final est déterminée par une série d'homopolymérisations selon la procédure générale (B) décrite ci-dessous. La concentration de l'échantillon finale est de 0,678 mol.L⁻¹.

$$n = 6,78 \text{ mmol} ; \eta = 77\%.$$

RMN ¹H : (CDCl₃, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 3,89 (s, 4H); 1,40 (m, 16H); 0,91 (m, 16H).

Ces analyses sont en accord avec celles décrites dans la littérature.^[113]

Procédure générale (B) : Homopolymérisation de l' ϵ -caprolactone



La verrerie est chauffée sous vide pour éliminer les traces d'eau et purgée à l'argon. Le toluène est distillé préalablement et est conservé sur styrène/n-butyllithium. Par la suite, il est de nouveau distillé juste avant la polymérisation.

Dans un montage sous argon (conditions anhydres strictes), 3 g d' ϵ -caprolactone sont séchés par distillation azeotropique avec du toluène fraîchement distillé (3 x 10 mL) avant la polymérisation. Le DSDOP en solution dans le toluène ou l' $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$ sont ajoutés. La polymérisation se déroule à 40°C pendant 4 H. L'avancement de la polymérisation est suivie par CES dans le DMF LiCl 10 mM.

Le mélange réactionnel est traité par quelques gouttes d'HCl 0,1M puis concentré sous vide. Le résidu est repris en solution dans le minimum de DCM, puis précipité dans du *n*-heptane (160 mL) avant d'être centrifugé à 5000 rpm pendant 20 min à température ambiante. Le culot est séché sous vide pour conduire au produit désiré.

Homopolymère PCL⁵⁰

La procédure générale d'homopolymérisation (B) est utilisée avec le monomère ϵ -caprolactone (3 g, 26,3 mmol) polymérisé avec le DSDOP à 0,677 M dans le toluène (777 μL , 0,526 mmol) ou avec l' $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$ (107 mg, 0,526 mmol).

Homopolymérisation avec l' $\text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$:

VI – Partie expérimentale

Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ^1H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec $I = 0,69$.

$$x (\text{RMN}) = 0,99 ; \text{DP}_{\text{n,Exp}} (\text{RMN}) = 84 ; m = 2,82 \text{ g} ; \eta_{\text{m}} = 94\%.$$

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,04 (m, 84H, H-E); 3,61 (m, 1H, H-G); 2,29 (m, 84H, H-D); 1,52 (m, 271H, H-F).

Homopolymérisation avec le DSDOP :

Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ^1H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec $I = 0,45$.

$$x (\text{RMN}) = 0,99 ; \text{DP}_{\text{n,Exp}} (\text{RMN}) = 49 ; m = 2,64 \text{ g} ; \eta_{\text{m}} = 88\%.$$

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,05 (m, 54H, H-E); 3,63 (m, 1H, H-G); 2,30 (m, 49H, H-D); 1,44 (m, 163H).

Homopolymère PCL¹⁰⁰

La procédure générale d'homopolymérisation (B) est utilisée avec le monomère ϵ -caprolactone (3 g, 26,3 mmol) polymérisé avec le DSDOP à 0,677 M dans le toluène (388 μL , 0,263 mmol) ou avec l' $\text{Al}(\text{OiPr})_3$ (53 mg, 0,263 mmol).

Homopolymérisation avec l' $\text{Al}(\text{OiPr})_3$:

Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ^1H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec $I = 0,78$.

$$x (\text{RMN}) = 0,99 ; \text{DP}_{\text{n,Exp}} (\text{RMN}) = 109 ; m = 2,73 \text{ g} ; \eta_{\text{m}} = 91\%.$$

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,07 (m, 111H, H-E); 3,64 (m, 1H, H-G); 2,32 (m, 109H, H-D); 1,47 (m, 332H, H-F).

Homopolymérisation avec le DSDOP :

Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ^1H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec $I = 0,70$.

$$x (\text{RMN}) = 0,99 ; \text{DP}_{\text{n,Exp}} (\text{RMN}) = 111 ; m = 2,58 \text{ g} ; \eta_{\text{m}} = 86\%.$$

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,10 (m, 110H, H-E); 3,66 (m, 1H, H-G); 2,35 (m, 111H, H-D); 1,40 (m, 351H, H-F).

Homopolymère PCL²⁰⁰

La procédure générale d'homopolymérisation (B) est utilisée avec le monomère ϵ -caprolactone (3 g, 26,3 mmol) polymérisé avec le DSDOP à 0,677 M dans le toluène (195 μL , 0,132 mmol) ou avec l' $\text{Al}(\text{OiPr})_3$ (27 mg, 0,132 mmol).

Homopolymérisation avec l' $\text{Al}(\text{OiPr})_3$

Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ^1H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec $I = 0,73$.

x (RMN) = 0,99 ; $\text{DP}_{\text{n,Exp}}$ (RMN) = 165 ; $m = 2,91$ g ; $\eta_{\text{m}} = 97\%$.

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,10 (m, 169H, H-E); 3,67 (m, 1H, H-G); 2,34 (m, 165H, H-D); 1,33 (m, 447H, H-F).

Homopolymérisation avec le DSDOP

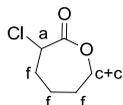
Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ^1H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec $I = 0,39$.

x (RMN) = 0,99 ; $\text{DP}_{\text{n,Exp}}$ (RMN) = 225 ; $m = 2,67$ g ; $\eta_{\text{m}} = 89\%$.

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,06 (m, 231H, H-E); 3,65 (m, 1H, H-G); 2,32 (m, 225H, H-D); 1,49 (m, 645H, H-F).

VI.4.2 Copolymérisation de l' ϵ -caprolactone et de l' α -chloro- ϵ -caprolactone

α -Chloro- ϵ -caprolactone^[184]



La 2-chlorocyclohexanone (20 g, 150 mmol) est mise en solution dans du DCM anhydre (200 mL) sous argon. L'acide 3-chloroperbenzoïque (54 g, 221 mmol) est ajouté puis la solution est agitée pendant 4 jours à température ambiante sous argon.

L'acide méta-chloroperbenzoïque en excès et l'acide méta-chlorobenzoïque sont précipités dans du DCM à -20°C , et éliminé par filtration. Le solide est rincé avec du DCM à -20°C (500 mL). La phase organique est ensuite lavée avec une solution saturée en KHSO_4 (3 x 300mL), puis avec une solution saturée en NaHCO_3 (3 x 300mL) et avec de l'eau (500 mL), puis séchée sur Na_2SO_4 anhydre. La phase organique est concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Elution : AcOEt/EP, 1/9). L'huile obtenue est distillée sous pression réduite ($68-70^{\circ}\text{C}$ à la pression de $4,7 \times 10^{-2}$ mmHg) et cristallise à 4°C . Le produit est conservé à -20°C .

$F_{\text{Cl}\epsilon\text{CL}}$ (RMN) = 0 (non détectée par RNM ^1H), $m = 12,3$ g ; $\eta = 61\%$.

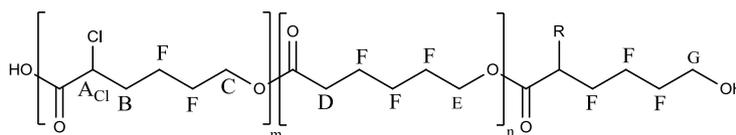
RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,80 (dd, 1H, H-a); 4,62 (m, 1H, H-c); 4,23 (m, 1H, H-c'); 2,18-1,80 (m, 6H, H-f).

RMN ^{13}C : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 170,08 (C=O); 69,46 (C-c); 58,52 (C-a); 32,43, 28,92, 24,95 (C-f).

Ces analyses sont en accord avec celles décrites dans la littérature.^[184]

SM ESI $^+$: m/z 149,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 171,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Procédure générale (C) : Copolymérisation de l' ϵ -caprolactone et de l' α -chloro- ϵ -caprolactone



La verrerie est chauffée sous vide pour éliminer les traces d'eau et purgée à l'argon. Le toluène est distillé et conservé sur styrène/n-butyllithium. Par la suite, il est de nouveau distillé juste avant la polymérisation.

Dans un montage sous argon (conditions anhydres strictes), l' ϵ -caprolactone et α -chloro- ϵ -caprolactone (pour un total de 3 g de monomères) sont séchées par distillation azéotrope avec du toluène fraîchement distillé (3 x 10 mL) avant la polymérisation. Le résidu est dilué dans du toluène (10 mL) puis le DSDOP en solution dans le toluène est ajouté. La polymérisation se déroule à 40°C pendant 4 H. L'avancement de la polymérisation est suivie par CES.

Le mélange réactionnel est traité par quelques gouttes d'HCl 0,1 M puis concentré sous pression réduite. Le résidu est dissous dans le minimum de DCM, puis est ensuite précipité dans le *n*-heptane (160 mL) avant d'être centrifugé à 5000 rpm pendant 20 min à température ambiante. Le culot séché sous pression réduite pour obtenir la PCL finale.

Copolymère PCL⁵⁰Cl^{5%}

La procédure générale (C) est utilisée. Le monomère ϵ -caprolactone (2,808 g, 24,6 mmol) et le monomère α -chloro- ϵ -caprolactone (0,192 g, 1,29 mmol) sont copolymérisés en présence de DSDOP à 0,677 M dans le toluène (765 μ L, 0,518 mmol).

Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées analyse RMN ¹H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec I = 0,21.

$$x \text{ (RMN)} = 0,99 ; DP_{n,Exp} \text{ (RMN)} = 55 ; F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} = 0,07 ; m = 2,64 \text{ g} ; \eta_m = 88\% .$$

RMN ¹H : (CDCl₃, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,25 (m, 6H, H-A_{Cl}, H-C); 4,09 (m, 52H, H-E); 3,70 (m, 1H, H-G); 2,32 (m, 52H, H-D); 1,99 (m, 4H, H-B); 1,52 (m, 190H, H-F).

Copolymère PCL¹⁰⁰Cl^{5%}

La procédure générale (C) est utilisée. Le monomère ϵ -caprolactone (2,808 g, 24,6 mmol) et le monomère α -chloro- ϵ -caprolactone (0,192 g, 1,29 mmol) sont copolymérisés en présence de DSDOP à 0,677 M dans le toluène (382 μ L, 0,259 mmol).

Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ¹H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec I = 0,49.

$$x \text{ (RMN)} = 0,99 ; DP_{n,Exp} \text{ (RMN)} = 106 ; F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} = 0,04 ; m = 2,73 \text{ g} ; \eta_m = 91\% .$$

RMN ¹H : (CDCl₃, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,21 (m, 6H, H-A_{Cl}, H-C); 4,08 (m, 105H, H-E); 3,68 (m, 1H, H-G); 2,34 (m, 103H, H-D); 1,98 (m, 5H, H-B); 1,50 (m, 344H, H-F).

Copolymère PCL²⁰⁰Cl^{5%}

La procédure générale (C) est utilisée. Le monomère ϵ -caprolactone (2,808 g, 24,6 mmol) et le monomère α -chloro- ϵ -caprolactone (0,192 g, 1,29 mmol) sont copolymérisés en présence de DSDOP à 0,677 M dans le toluène (87 μ L, 0,130 mmol).

VI – Partie expérimentale

Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ^1H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec $I = 0,80$.

$$x (\text{RMN}) = 0,99 ; DP_{n,\text{Exp}} (\text{RMN}) = 188 ; F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} = 0,04 ; m = 2,85 \text{ g} ; \eta_m = 95\%.$$

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,22 (m, 11, H-A_{Cl}, H-C); 4,08 (m, 182H, H-E); 3,63 (m, 1H, H-G); 2,34 (m, 181H, H-D); 1,98 (m, 10H, H-B); 1,48 (m, 617H, H-F).

Copolymère PCL⁵⁰Cl^{20%}

La procédure générale (C) est utilisée. Le monomère ϵ -caprolactone (2,265 g, 19,8 mmol) et le monomère α -chloro- ϵ -caprolactone (0,735 g, 4,96 mmol) sont copolymérisés en présence de DSDOP à 0,677 M dans le toluène (732 μL , 0,496 mmol).

Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ^1H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec $I = 0,34$.

$$x (\text{RMN}) = 0,99 ; DP_{n,\text{Exp}} (\text{RMN}) = 53 ; F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} = 0,21 ; m = 2,87 \text{ g} ; \eta_m = 95\%.$$

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,14 (m, 17, H-A_{Cl}, H-C); 4,00 (m, 42H, H-E); 3,58 (m, 1H, H-G); 2,24 (m, 42H, H-D); 1,90 (m, 11H, H-B); 1,45 (m, 211H, H-F).

Copolymère PCL¹⁰⁰Cl^{20%}

La procédure générale (C) est utilisée. Le monomère ϵ -caprolactone (2,265 g, 19,8 mmol) et le monomère α -chloro- ϵ -caprolactone (0,735 g, 4,96 mmol) sont copolymérisés en présence de DSDOP à 0,677 M dans le toluène (366 μL , 0,248 mmol).

Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ^1H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec $I = 0,41$.

$$x (\text{RMN}) = 0,99 ; DP_{n,\text{Exp}} (\text{RMN}) = 98 ; F_{\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} = 0,22 ; m = 2,61 \text{ g} ; \eta_m = 87\%.$$

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,25 (m, 32, H-A_{Cl}, H-C); 4,11 (m, 75H, H-E); 3,58 (m, 1H, H-G); 2,24 (m, 78H, H-D); 1,94 (m, 31H, H-B); 1,46 (m, 372H, H-F).

Copolymère PCL²⁰⁰Cl^{20%}

La procédure générale (C) est utilisée. Le monomère ϵ -caprolactone (2,265 g, 19,8 mmol) et le monomère α -chloro- ϵ -caprolactone (0,735 g, 4,96 mmol) sont copolymérisés en présence de DSDOP à 0,677 M dans le toluène (0,183 μL , 0,124 mmol).

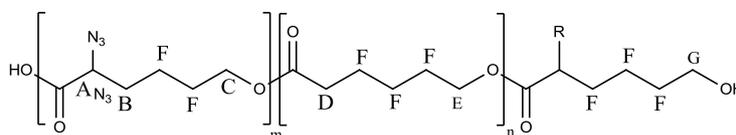
Des traces correspondant aux protons H-e du monomère n'ayant pas réagi sont observées par analyse RMN ^1H du brut réactionnel à 2,55 ppm avec $I = 0,70$.

x (RMN) = 0,99 ; $DP_{n,Exp}$ (RMN) = 184 ; $F_{\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}} = 0,21$; $m = 2,76$ g ; $\eta_m = 92\%$.

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,21 (m, 58, H- A_{Cl} , H-C); 4,08 (m, 147H, H-E); 3,56 (m, 1H, H-G); 2,21 (m, 149H, H-D); 1,91 (m, 59H, H-B); 1,41 (m, 705H, H-F).

VI.4.3 Obtention des poly($\alpha\text{N}_3\varepsilon\text{CL-co-}\varepsilon\text{CL}$)

Procédure générale (D) : Synthèse des poly($\alpha\text{N}_3\varepsilon\text{CL-co-}\varepsilon\text{CL}$) à partir de la poly($\text{Cl}_3\varepsilon\text{CL-co-}\varepsilon\text{CL}$)



Le copolymère poly($\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL-co-}\varepsilon\text{CL}$) est mis en solution dans le DMF (4 mL) puis de l'azoture de sodium (1,1 éq par chlore) est ajouté. La solution est agitée pendant 12 H à température ambiante, sous argon et à l'abri de la lumière.

La solution est diluée dans du toluène (80 mL), et le précipité est culotté par trois centrifugations successives à 8000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est ensuite évaporé sous pression réduite pour obtenir la poly($\alpha\text{N}_3\varepsilon\text{CL-co-}\varepsilon\text{CL}$) avec un rendement quantitatif.

Copolymère PCL $^{50}\text{N}_3^{5\%}$

La procédure générale (D) est utilisée. La PCL $^{50}\text{Cl}^{5\%}$ (150mg, 0,065 mmol en chlorure) est mise en solution dans du DMF (4 mL) en présence d'azoture de sodium (4,6 mg, 0,071 mmol).

$\eta_{\text{substitution}} = 95\%$; $m = 148$ mg ; $\eta_m = 99\%$.

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,25 (m, 4H, H-C); 4,09 (m, 52H, H-E); 3,83 (m, 2H, H- A_{N_3}); 3,70 (m, 1H, H-G); 2,32 (m, 52H, H-D); 1,99 (m, 4H, H-B); 1,52 (m, 190H, H-F).

IR : (cm^{-1} , KBr) : 2100 (N_3).

Copolymère PCL¹⁰⁰N₃^{5%}

La procédure générale (D) est utilisée. La PCL⁵⁰Cl^{5%} (150mg, 0,065 mmol en chlorure) est mise en solution dans du DMF (4 mL) en présence d'azoture de sodium (4,6 mg, 0,071 mmol).

$$\eta_{\text{substitution}} = 97\% ; m = 143 \text{ mg} ; \eta_m = 95\%.$$

RMN ¹H : (CDCl₃, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,21 (m, 4H, H-C); 4,08 (m, 105H, H-E); 3,80 (m, 2H, H-A_{N₃}); 3,68 (m, 1H, H-G); 2,34 (m, 103H, H-D); 1,98 (m, 5H, H-B); 1,50 (m, 344H, H-F).

IR : (cm⁻¹, KBr) : 2100 (N₃).

Copolymère PCL²⁰⁰N₃^{5%}

La procédure générale (D) est utilisée. La PCL⁵⁰Cl^{5%} (150mg, 0,065 mmol en chlorure) est mise en solution dans du DMF (4 mL) en présence d'azoture de sodium (4,6 mg, 0,071 mmol).

$$\eta_{\text{substitution}} = 97\% ; m = 145 \text{ mg} ; \eta_m = 95\%.$$

RMN ¹H : (CDCl₃, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,22 (m, 8H, H-C); 4,08 (m, 182H, H-E); 3,81 (m, 4H, H-A_{N₃}); 3,63 (m, 1H, H-G); 2,34 (m, 181H, H-D); 1,98 (m, 10H, H-B); 1,48 (m, 617H, H-F).

IR : (cm⁻¹, KBr) : 2100 (N₃).

Copolymère PCL⁵⁰N₃^{20%}

La procédure générale (D) est utilisée. La PCL⁵⁰Cl^{5%} (150mg, 0,260 mmol en chlorure) est mise en solution dans du DMF (4 mL) en présence d'azoture de sodium (18,5 mg, 0,285 mmol).

$$\eta_{\text{substitution}} = 96\% ; m = 139 \text{ mg} ; \eta_m = 97\%.$$

RMN ¹H : (CDCl₃, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,24 (m, 11H, H-C); 4,10 (m, 42H, H-E); 3,79 (m, 5H, H-A_{N₃}); 3,58 (m, 1H, H-G); 2,24 (m, 42H, H-D); 1,90 (m, 11H, H-B); 1,45 (m, 211H, H-F).

IR : (cm^{-1} , KBr) : 2100 (N_3).

Copolymère PCL¹⁰⁰N₃^{20%}

La procédure générale (D) est utilisée. La PCL⁵⁰Cl^{5%} (150mg, 0,260 mmol en chlorure) est mise en solution dans du DMF (4 mL) en présence d'azoture de sodium (18,5 mg, 0,285 mmol).

$\eta_{\text{substitution}} = 98\%$; $m = 141 \text{ mg}$; $\eta_m = 95\%$.

RMN ¹H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,25 (m, 22H, H-C); 4,11 (m, 75H, H-E); 3,81 (m, 11H, H-A_{N₃}); 3,58 (m, 1H, H-G); 2,24 (m, 78H, H-D); 1,94 (m, 31H, H-B); 1,46 (m, 372H, H-F).

IR : (cm^{-1} , KBr) : 2100 (N_3).

Copolymère PCL²⁰⁰N₃^{20%}

La procédure générale (D) est utilisée. La PCL⁵⁰Cl^{5%} (150mg, 0,260 mmol en chlorure) est mise en solution dans du DMF (4 mL) en présence d'azoture de sodium (18,5 mg, 0,285 mmol).

$\eta_{\text{substitution}} = 97\%$; $m = 133 \text{ mg}$; $\eta_m = 89\%$.

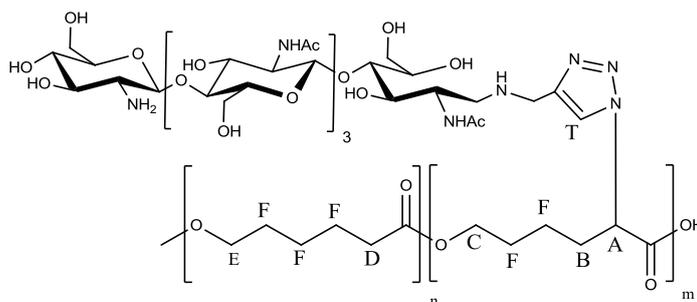
RMN ¹H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 4,21 (m, 38H, H-C); 4,08 (m, 147H, H-E); 3,77 (m, 19H, H-A_{N₃}); 3,56 (m, 1H, H-G); 2,21 (m, 149H, H-D); 1,91 (m, 59H, H-B); 1,41 (m, 705H, H-F).

IR : (cm^{-1} , KBr) : 2100 (N_3).

VI.5 Synthèse des copolymères greffés PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N) et poly(α N₃ ϵ CL-co- ϵ CL)-g-COs

VI.5.1 Synthèse de la PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N)

Copolymères greffés PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-CO-V(N)



Le copolymère PCL¹⁰⁰N₃^{20%} (50 mg, 0,082 mmol en azide) est mis en solution dans du DMF anhydre (5 mL) sous atmosphère d'argon. Le conjugué de propargyle de CO-V(N) (164 mg, 0,164 mmol) et le catalyseur CuI,P(OEt)₃ (58 mg, 0,164 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée à l'abri de la lumière pendant 72 H à 40°C. L'avancement de la réaction est suivi par CES.

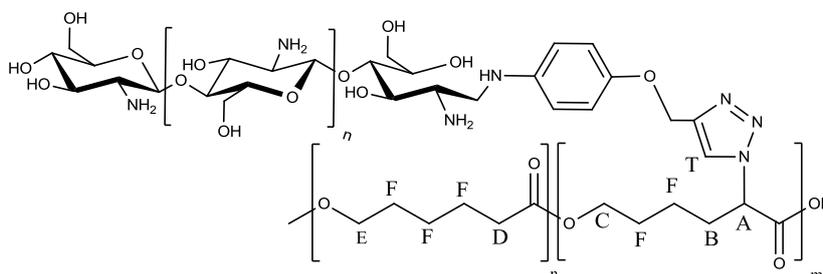
Le brut réactionnel est dilué dans de l'eau (80 mL) contenant de l'acide acétique (200 μ L). La solution est centrifugée à 8000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est purifié par ultrafiltration sur une membrane d'acétate de cellulose présentant un seuil d'exclusion de 10000 g.mol⁻¹ contre 2 L d'eau. Le contenu de la cellule d'ultrafiltration est ensuite lyophilisé.

F_{CO-V(N)} = 6% ; Rendement de couplage de 30% ; m = 49 mg.

RMN ¹H : (D₂O, 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 8,07 (m, 1H, H-T); 5,50 (m, 1H, H-A); 4,60 (m, 3H, H-1^{II-IV}); 4,49 (d, $J=11,5$, 1H, H-1^I); 4,40-3,35 (m, 94H, H-C, H-E, H-2^{II-IV}, H-3^{I-V}, H-4^{I-V}, H-5^{I-V}, H-6^{I-V}); 3,24 (t, 1H, H-2^V); 2,30 (m, 23H, H-D); 2,07 (s, 12H, H-COCH₃); 1,97 (m, 5H, H-B); 1,81-1,17 (m, 92H, H-F).

VI.5.2 Synthèse des poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)-*g*-COs

Procédure générale (E) : Synthèse des copolymères greffés poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL)-*g*-COs



Le copolymère poly(α N₃ ϵ CL-*co*- ϵ CL) fraîchement préparé est mis en solution dans du DMF anhydre sous atmosphère d'argon. Le conjugué propargyle de COs (1,2 éq en fonction azide) et le catalyseur CuI,P(OEt)₃ (2 éq en fonction azide) sont ensuite ajoutés ainsi que 300 à 500 μ L d'eau pour faciliter la dissolution du conjugué propargyle de COs. La solution est agitée à l'abri de la lumière pendant 36 H à 40°C. L'avancement de la réaction est suivi par CES.

Le brut réactionnel est dilué dans de l'eau (80 mL) contenant d'acide acétique (200 μ L). La solution est centrifugée à 8000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le précipité est éliminé et le surnageant est purifié par ultrafiltration sur une membrane d'acétate de cellulose présentant un seuil d'exclusion de 10000 g.mol⁻¹ contre 2 L d'eau. Le contenu de la cellule d'ultrafiltration est ensuite lyophilisé.

Copolymères greffés PCL⁵⁰N₃^{20%}-*g*-COs

La procédure générale (E) est appliquée. Le copolymère PCL⁵⁰N₃^{20%} (50 mg, 0,082 mmol en azide) est dissous dans du DMF anhydre (5 mL). Du conjugué de propargyle de COs (100,4 mg, 0,1 mmol, 1,2 éq) et du CuI,P(OEt)₃ (58 mg, 0,164 mmol) sont ajoutés.

F_{COs} = 16% ; Rendement de couplage de 80% ; m = 103 mg.

RMN ¹H : (D₂O, AcOH-d₄, 353 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 8,10 (s, 1H, H-T); 6,93-6,75 (m, 4H, H-Ar); 5,35 (m, 1H, H-A); 4,82 (m, 4H, CH₂-C \equiv , H-C); 4,56 (m, 5H, H-1ⁿ); 3,97-3,42 (m, 32H, H-3ⁿ, H-4ⁿ, H-5ⁿ, H-6ⁿ, H-E); 3,15 (m, 5H, H-2ⁿ); 2,16 (m, 11H, H-D); 2,01 (m, 3H, H-COCH₃); 1,53-1,19 (m, 46H, H-F).

RMN DOSY : Unique coefficient de diffusion de 1,40.

Copolymères greffés PCL¹⁰⁰N₃^{20%}-g-COs

La procédure générale (E) est appliquée. Le copolymère PCL¹⁰⁰N₃^{20%} (50 mg, 0,082 mmol en azide) est dissous dans du DMF anhydre (5 mL). Du conjugué de propargyle de COs (100,4 mg, 0,1 mmol) et du CuI,P(OEt)₃ (58 mg, 0,164 mmol) sont ajoutés.

F_{COs} = 15% ; Rendement de couplage de 75% ; m = 97 mg.

RMN ¹H : (D₂O, AcOH-d₄, 353 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 8,16 (s, 1H, H-T); 6,96-6,78 (m, 4H, H-Ar); 5,40 (m, 1H, H-A); 4,82 (m, 4H, H-C, CH₂-C≡); 4,60 (m, 5H, H-1ⁿ); 4,01-3,45 (m, 32H, H-3ⁿ, H-4ⁿ, H-5ⁿ, H-6ⁿ, H-E); 3,17 (m, 5H, H-2ⁿ); 2,24 (m, 14H, H-D); 2,05 (m, 3H, H-COCH₃); 1,58-1,14 (m, 43H, H-F).

RMN DOSY : Unique coefficient de diffusion de 0,265.

Copolymères greffés PCL²⁰⁰N₃^{20%}-g-COs

La procédure générale (E) est appliquée. Le copolymère PCL²⁰⁰N₃^{20%} (50 mg, 0,082 mmol en azide) est dissous dans du DMF anhydre (5 mL). Du conjugué de propargyle de COs (100,4 mg, 0,1 mmol) et du CuI,P(OEt)₃ (58 mg, 0,164 mmol) sont ajoutés.

F_{COs} = 17% ; Rendement de couplage de 85% ; m = 84 mg.

RMN ¹H : (D₂O, AcOH-d₄, 353 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 8,10 (s, 1H, H-T); 6,98-6,78 (m, 4H, H-Ar); 5,23 (m, 1H, H-A); 4,82 (m, 12H, CH₂-C≡, H-E); 4,60 (m, 5H, H-1ⁿ); 4,10-3,45 (m, 31H, H-3ⁿ, H-4ⁿ, H-5ⁿ, H-6ⁿ, H-E); 3,15 (m, 5H, H-2ⁿ); 2,26 (m, 13H, H-D); 2,04 (m, 3H, H-COCH₃); 1,58-1,14 (m, 37H, H-F).

RMN DOSY : Unique coefficient de diffusion de 0,240.

VI.6 Nanogels et encapsulation**VI.6.1 Formation des nanoparticules par la méthode des co-solvants**

Le copolymère greffé (5 mg) est mis en solution dans le minimum de DMF (500 μL). Puis de l'eau est ajoutée (2 mL) à une vitesse de 500 μL.H⁻¹ sous une agitation de 300 rpm. Le DMF résiduel est alors éliminé par dialyse contre de l'eau (le seuil d'exclusion est de 500 g.mol⁻¹) Le volume de solution dialysée est ensuite ajusté à 2,5 mL pour avoir une

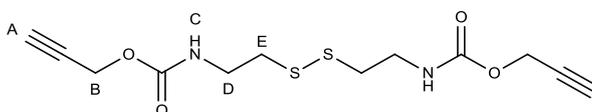
concentration finale de 2 mg.mL^{-1} . La solution est encore agitée à 300 rpm à 40°C pendant 12 H avant analyse.

VI.6.2 Formation des nanoparticules par dissolution directe

Le copolymère greffé (5 mg) est mis en solution dans le DMF ou dans l'eau (2,5 mL). La solution est agitée à 300 rpm à 40°C pendant 12 H avant analyse.

VI.6.3 Réticulation des nanoparticules de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$

Synthèse de l'agent réticulant : bis[(propargyle carbamate)-éthyl] de disulfure^[194]



La cystamine (1 g, 4,4 mmol, 8,8 mmol en amine) est mise en solution dans du dioxane (12 mL) et de la soude (0,01 M, quantité suffisante pour atteindre un $\text{pH}=9$ soit ≈ 8 mL). Le chloroformate de propargyle est ensuite ajouté (1,73 mL, 17,6 mmol). L'avancement de la réaction est suivie par CCM (élution : AcOEt/EP, 4/6.). La solution est agitée à température ambiante pendant 2 H.

Le milieu réactionnel est repris dans du DCM (125 mL) et dans de l'eau (125 mL). La phase aqueuse est éliminée. La phase organique est lavée plusieurs fois avec de l'eau (125 mL), jusqu'à pH neutre. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis concentrée sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (élution : AcOEt/EP, 2/8, v/v). Le produit est séché sous pression réduite pour obtenir une huile limpide qui cristallise à 4°C .

$$m = 1,21 \text{ g} ; \eta = 88\%.$$

RMN ^1H : (CDCl_3 , 298 K, 400 MHz) : δ (ppm) = 5,33 (s, 1H, H-C); 4,68 (s, 2H, H-B); 3,51 (q, 2H, H-D); 2,81 (t, 2H, H-E); 2,47 (s, 1H, H-A).

SM ESI $^+$: m/z : 317,2 [M+H] $^+$.

Réticulation des particules de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$

Le copolymère greffé $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$ (50 mg, 9,02 μmol en N_3 résiduel libre) fraîchement préparé est mis en solution dans 25 mL de DMF et la solution est agitée 4 H. Puis

de l'agent réticulant *bis*[(propargyle carbamate)-éthyl] de disulfure (5,7 mg, 18 μmol) et du $\text{CuI}, \text{P}(\text{OEt})_3$ (6,4 mg, 18 μmol) sont ajoutés. La solution est agitée 48 H à 40°C à l'abri de la lumière.

Le brut réactionnel est dilué dans de l'eau (100 mL) contenant de l'acide acétique (200 μL). La solution est purifiée par ultrafiltration sur une membrane en acétate de cellulose présentant un seuil d'exclusion de 10000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ contre 2 L d'eau. Le contenu de la cellule d'ultrafiltration est ensuite lyophilisé.

$$m = 48 \text{ mg.}$$

VI.6.4 Encapsulation de la doxorubicine dans les nanoparticules de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$

Encapsulation de la doxorubicine sous forme chlorhydrate dans les nanoparticules de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$ ^[202]

Le copolymère greffé $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$ (10 mg, 1,80 μmol en N_3 résiduel libre) fraîchement préparé et de la DOX-HCl (1 mg, 1,84 μmol) sont mis en solution dans 20 mL de DMF. la solution est agitée pendant 4 H puis de l'agent réticulant *bis*[(propargyle carbamate)-éthyl] de disulfure (1,2 mg, 3,6 μmol) et du $\text{CuI}, \text{P}(\text{OEt})_3$ (6,4 mg, 18 μmol) sont ajoutés. La solution est agitée 48 H à 40°C à l'abri de la lumière.

Le brut réactionnel est dilué dans de l'eau (100 mL) contenant de l'acide acétique (200 μL). La solution est purifiée par ultrafiltration sur une membrane en acétate de cellulose présentant un seuil d'exclusion de 10000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ contre 2 L d'eau. Un dosage fluorimétrique du filtrat est réalisé pour déterminer le taux d'encapsulation. Le contenu de la cellule d'ultrafiltration est lyophilisé.

$$T_{\text{encapsulation}} = 42 \% ; m = 6,7 \text{ mg.}$$

Encapsulation de la doxorubicine hydrophobisée dans des nanoparticules de $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$

Le copolymère greffé $\text{PCL}^{100}\text{N}_3^{20\%}\text{-g-COs}$ (10 mg, 1,80 μmol en N_3 résiduel libre) fraîchement préparé et de la DOX-HCl (1 mg, 1,84 μmol) sont mis en solution dans 20 mL de DMF. De la triéthylamine (0,50 μL , 3,68 μmol) est ajoutée, et la solution est agitée pendant 4 H puis de l'agent réticulant *bis*[(propargyle carbamate)-éthyl] de disulfure (1,2 mg, 3,6 μmol)

et du CuI,P(OEt)_3 (6,4 mg, 18 μmol) sont ajoutés. La solution est agitée 48 H à 40°C à l'abri de la lumière.

Le brut réactionnel est dilué dans de l'eau (100 mL) contenant de l'acide acétique (200 μL). La solution est purifiée par ultrafiltration sur une membrane de seuil d'exclusion de 10000 g.mol^{-1} contre 2 L d'eau. Un dosage fluorimétrique du filtrat est réalisé pour déterminer le taux d'encapsulation. Le contenu de la cellule d'ultrafiltration est lyophilisé.

$$T_{\text{encapsulation}} = 86 \% ; m = 6,9 \text{ mg.}$$

VI.6.5 Mesure du relargage

Une solution de nanoparticules contenant de la DOX (2 ml, 2 mg.mL^{-1}) est placée dans un boudin de dialyse de seuil d'exclusion de 1000 g.mol^{-1} . La dialyse s'effectue contre du tampon phosphate (PBS) (10 mM, pH=7,4), et contre du tampon PBS contenant de la GSH (10 mM et 2 μM). A intervalle régulier, les solutions tampon sont dosées par fluorométrie et la solution tampon est renouvelée.

Références bibliographiques

- [42] E. Samain, S. Drouillard, A. Heyraud, H. Driguez, R. A. Geremia, *Carbohydrate Research* **1997**, *302*, 35-42.
- [113] H. R. Kricheldorf, S. Eggerstedt, *Macromolecular Chemistry and Physics* **1998**, *199*, 283-290.
- [175] T. Meinhardt, D. Lang, H. Dill, A. Krueger, *Advanced Functional Materials* **2011**, *21*, 494-500.
- [184] S. Lenoir, R. Riva, X. Lou, C. Detrembleur, R. Jérôme, P. Lecomte, *Macromolecules* **2004**, *37*, 4055-4061.
- [194] S. Sinha, P. Ilankumaran, S. Chandrasekaran, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 771-774.
- [202] J.-Z. Du, T.-M. Sun, W.-J. Song, J. Wu, J. Wang, *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49*, 3621-3626.
- [208] S. Zhang, Y. Zhao, *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 523-528.

Copolymères à base de polycaprolactones greffées par des chitooligosaccharides : vers des nanogels bioactifs et biostimulables

Actuellement, la mise au point de systèmes de vectorisation d'agents chimio-thérapeutiques performants fait l'objet d'une intense recherche. Les nanoparticules en particulier sont étudiées, car elles permettent de solubiliser des molécules hydrophobes en milieux aqueux tout en diminuant leur toxicité et leur dégradation. Toutefois, le devenir à long terme des nanoparticules est un paramètre important qu'il faut considérer dans la conception de ces nanovecteurs. Pour cette raison, le développement de nanoparticules auto-assemblées constituées de copolymères à bloc entièrement biocompatibles, biodégradables et aux propriétés de libération contrôlée est recommandé.

Dans cette perspective, nous avons étudié les propriétés d'auto-organisation de copolymères greffés amphiphiles de type chitooligosaccharide-*grafted*-polycaprolactone. Le premier chapitre révèle l'utilisation de l'aniline et de son dérivé alcyne comme un outil efficace pour l'amination réductrice de chitooligosaccharides. Dans le second chapitre, différentes familles de polycaprolactone avec des fonctions azide latérales sont décrites. Le troisième chapitre traite du couplage par chimie « click » de chaque bloc ainsi que de la caractérisation physico-chimique des nanoparticules en solution aqueuse. La réticulation de ses particules a permis d'obtenir les nanogels finaux. Pour conclure, des tests d'encapsulation et de libération contrôlée de la Doxorubicine (avec ou sans ajout de glutathion) ont été effectués

Mots clés : chitooligosaccharide, polycaprolactone, nanogels, amination réductrice, copolymère greffé, vectorisation.

Chitooligosaccharide grafted polycaprolactone copolymers : toward bioactive and biocompatible nanogels

Currently, the development of efficient drug delivery systems has a great attention. Nanoparticles are particularly studied for their capacity to solubilise hydrophobic drugs in aqueous media and to decrease their toxicity and degradability. However, long term compatibility has to be considered in the conception of this nanocarrier. For this reasons, the development of self-assembled particles constituted of biocompatible, biodegradable block copolymers is highly recommended.

In this perspective, we have studied the self-assembled properties of chitooligosaccharide-*grafted*-polycaprolactone copolymers. The first chapter reveals aniline catalysis and its alkyne derivative as an efficient way for reductive amination of chitooligosaccharides. The second chapter describes the synthesis of different polycaprolactones with pendant azide groups. The third chapter is dedicated to the grafting of each bloc performed by “click” chemistry as well as the formation and characterisation of nanoparticle conducted in aqueous media. These nanoparticles were cross-linked to form reduction-sensitive final nanogels. At last, entrapment and controlled Doxorubicine release (with or without glutathione) were explored.

Key words: chitooligosaccharide, polycaprolactone, nanogels, reductive amination, grafted copolymer, controlled drug release.