



**HAL**  
open science

# Nouveaux systèmes micellaires intelligents à partir d'huile de lin : synthèse, comportements physico-chimiques et encapsulation

Louise Hespel

► **To cite this version:**

Louise Hespel. Nouveaux systèmes micellaires intelligents à partir d'huile de lin : synthèse, comportements physico-chimiques et encapsulation. Polymères. INSA de Rouen, 2013. Français. NNT : 2013ISAM0023 . tel-00924698

**HAL Id: tel-00924698**

**<https://theses.hal.science/tel-00924698>**

Submitted on 7 Jan 2014

**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

Présentée par

**Louise HESPEL**

En vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'INSA de ROUEN**

**Spécialité : Chimie macromoléculaire**

**Ecole Doctorale Normande de chimie**

**NOUVEAUX SYSTÈMES MICELLAIRES INTELLIGENTS**

**A PARTIR D'HUILE DE LIN :**

**SYNTHÈSE, COMPORTEMENTS PHYSICO-CHIMIQUES ET ENCAPSULATION**

Date de soutenance, le 31/10/2013

M. P. LUTZ	Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg, <b>Examineur</b>
Mme. V. HEROGUEZ	Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux 1, <b>Rapporteur</b>
M. C. CHASSENIEUX	Professeur, Université du Maine, <b>Rapporteur</b>
M. L. PICTON	Professeur, Université de Rouen
Mme. L. LECAMP	Professeur, Université de Rouen
Mme. G. MORANDI	Maître de conférence, INSA de Rouen



*A Florian,*

## REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué au laboratoire Polymères, Biopolymères et Surfaces (UMR 6270) dans l'équipe matériaux macromoléculaires à l'INSA de ROUEN.

Je tiens à remercier Mme Valérie Héroguez, M. Christophe Chassenieux et M. Pierre Lutz pour avoir accepté d'étudier mon travail. J'ai notamment beaucoup apprécié les discussions que nous avons pu avoir lors de la soutenance.

Merci à M. Luc Picton et M. Didier Lecerf pour leurs précieux conseils. Les réunions avec vous ont toujours permis de rendre moins obscurs certains résultats. Ces moments d'éclaircissements étaient comme la trouée dans les nuages et ont permis de redonner de reprendre de l'altitude quand je ne savais plus quoi faire ou quoi penser.

Je n'oublie pas Laurence Lecamp, ma directrice de thèse. Malgré ta montagne de travail, tu te montrais toujours disponible quand je venais te voir. J'ai essayé de ne pas trop en abuser.

Toute ma gratitude à Gaëlle Morandi qui a encadré mes travaux pendant trois ans et qui a supporté mes trop-pleins d'énergie comme mes peurs soudaines. Je te remercie également de m'avoir accordé mon indépendance tout en répondant immédiatement présent quand je demandais de l'aide.

Fabrice Burel, qui m'a accueilli dans son équipe, surtout préviens moi quand tu auras un lombricomposteur (je t'assure c'est génial).

Toute ma reconnaissance à « la cave » représentée glorieusement par Catherine, Jérémy et Sylvaine. Avec une pensée toute particulière pour Catherine à qui j'envoie (comme le veut la coutume à la cave) plus de « gras » qu'il n'est possible d'envoyer. Je t'assure que ton aide quotidienne au labo et ta bonne humeur sont très précieuses.

Pour moi, l'administration sera toujours un labyrinthe obscur, lieu de tous les cauchemars. Je te serais éternellement grée, Mumu, de m'avoir tendu le fil d'Ariane à maintes reprises et de m'avoir sorti des méandres de l'administration.

Je tiens ici à faire une dédicace toute particulière à Nas pour nos quarts d'heure débilité salvateurs. Mais au fait tu es qui déjà ?

Et encore plus particulière à Philippe pour sa provoc', son humour et sa gentillesse.

Mais je ne dois pas non plus négliger Nicolas et Daniela qui ont toujours été de bons conseils.

Je n'oublierais jamais les doctorants et les post-doctorants qui sont passés au labo et plus particulièrement : Najib (avec les cours d'Arabe tous les jours à 16h), Jérôme (pour tes propos scandaleux, ton organisation légendaire et la bière), Faten (co-bureau exemplaire), Yuyu (ta cuisine est fabuleuse, garde ton dynamisme, ta curiosité et ton ouverture d'esprit), Hanbin (toujours un plaisir de partager une bière avec toi) et Charlotte.

Je dois l'avouer, les pauses partagées avec Martin et Thierry se transformaient à chaque fois en « réunions de travail » (de nombreuses idées ont vu le jour grâce à ces pauses mais aussi bien des fous rires).

Vincent, en homme magnanime, a subi sans broncher la rédaction de ma thèse notamment lorsque je me défoulais dans le bureau. Au plaisir de te revoir !

Pendant ces trois années, j'ai passé un grand nombre d'heures sur les tatamis à l'aikido et au karaté. Je voudrais dédier, ici, un « arigato » à mes partenaires.

Merci aux amis de tous les jours : Martin, Luc, Emeline avec qui j'ai partagé beaucoup de moments agréables.

Et de toujours : Cocotte (c'était dur de te laisser à Sika), Louis (dit Winwar, il ne fait pas parti de l'équipe DE-adj pour rien), Marine (avec qui j'ai partagé tous mes repas du mercredi midi), ma paupiette d'Amérique (ou aussi N°42), ma paupiette d'ici (ou hobbit jouflu au pied poilu) quel plaisir de vous retrouver pour partager un feu de cheminée, un repas gastronomique et gargantuesque suivi de la traditionnelle « petite prune » locale (« Y en a aussi !! »), des jeux de société (surtout Nostra city) et des discussions à n'en plus finir.

Je remercie de tout cœur toute ma famille qui m'a soutenue pendant ces trois ans en ne doutant jamais de l'issue de ce travail. Toute ma reconnaissance affectueuse à Camille et Marie, mes deux grandes sœurs préférées, toujours prêtes à remonter le moral. Mille poutoux à Jonas, Baptiste, Joris et Arthur. Rien de tel que les neveux pour redescendre sur terre.

J'ai évidemment gardé le meilleur pour la fin. Je remercie de tout mon cœur Florian, mon tendre barbu, sans qui je ne ferais pas la moitié des choses que nous entreprenons ensemble.

## Abréviations :

A : amorceur

AA : acide acrylique

ADN : acide désoxyribonucléique

AIBN : azobisisobutyronitrile

ARC : Association pour la Recherche sur le Cancer

ATRP : Atom Transfer Radical Polymerization

cac : concentration d'agrégation critique

cmc : concentration micellaire critique

CO : lipoamorceur tosylé issu de l'huile de ricin

CROP : Cationic Ring-Opening Polymerization

Dh : diamètre hydrodynamique

DP : degré de polymerization

EBIB : éthyl-2-bromo-2-méthylpropionate

EBP : éthyl-2-bromopropionate

ECP : éthyl-2-chloropropionate

EPR : permeability and retention effect

FDA : Food and Drug Administration

FTIR ou IR : infrarouge à transformée de fourrier

GUV : Giant Unilamellar Vesicle

HLB : balance hydrophile lipophile

Ip ou PDI : polymolécularité

$k_{act}$  : constante de vitesse d'activation

$k_{deact}$  : constante de vitesse de désactivation

LA1 : lipoamorceur 1

LA2: lipoamorceur 2

LCST : Lower Critical Solution Temperature

LPAA : lipide-*b*-poly(acide acrylique)

LPNIPAM : lipide-*b*-poly(N-isopropylacrylamide)

LPOx : lipide-*b*-poly(isopropyl-2-oxazoline)

LP*t*BA : lipide-*b*-poly(acrylate de *tert*-butyle)

LUV : Large Unilamellar Vesicle

M : monomère

Me<sub>6</sub>TREN : (tris [2-(diméthylamino)éthyl]amine)

MLV : Multilamellar Vesicle

$\overline{M}_{n,RMN}$  : masse molaire moyenne en nombre déterminé par RMN

$\overline{M}_{n,SEC}$  : masse molaire moyenne en nombre déterminé par SEC

$\overline{Mn}_{théo}$  : masse molaire moyenne en nombre théorique

$\overline{Mp}_{SEC}$  : masse molaire moyenne au pic déterminé par SEC

NIPAM : N-Isopropylacrylamide

PAA : poly(acide acrylique)

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG : poly(éthylène glycol)

PIpOx : poly(2-isopropyl-2-oxazoline)

PMDETA : pentaméthyl-diéthylène-triamine

PNIPAM : poly(N-isopropylacrylamide)

POx : poly(oxazoline)

P*t*BA : poly (acrylate de *tert*-butyle)

PVP : poly(vinylpyrrolidone)

RAFT : Reversible Addition-Fragmentation Transfer

RMN : résonance magnétique nucléaire

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

*t*BA : acrylate de *tert*-butyle

TFA : acide trifluoroacétique

Tr : temps de rétention

SUV : Small Unilamellar Vesicle

$\overline{X_{n,RMN}}$  : degré de polymérisation moyen en nombre déterminé par RMN

$\overline{X_{n,theo}}$  : degré de polymérisation moyen en nombre théorique

# Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Etude bibliographique</b>	<b>5</b>
<b>Introduction</b>	<b>6</b>
<b>I. Les systèmes de vectorisation de principes actifs</b>	<b>7</b>
A. Les propriétés requises pour un système de vectorisation	7
B. Les liposomes	11
C. Les micelles, des vecteurs de médicament très prometteurs	15
1. Une organisation de molécules amphiphiles sous la forme d'une sphère	15
2. Les micelles à base de polymères	17
3. Des systèmes micellaires prometteurs	19
D. Conclusion	21
<b>II. La synthèse de copolymères amphiphiles à partir de triglycérides ou de lipide</b>	<b>22</b>
A. Les huiles végétales	22
1. Structure et propriétés des triglycérides	22
2. Principaux polymères issus de triglycérides	24
3. L'huile de lin, une excellente candidate	26
B. Synthèse de copolymère amphiphile par couplage chimique	28
1. A partir du phosphatidyléthanolamine (PE)	28
2. A partir de lipide	30
3. A partir d'huile végétale	31
4. Propriétés générales de ces systèmes	33
a) Des copolymères amphiphiles pour stabiliser des liposomes aux systèmes micellaires	33
b) Influence de la partie hydrophile sur la micellisation	34
c) Influence de la chaîne hydrophobe sur la micellisation	34
d) Conclusion	36
C. Utilisation du lipide comme amorceur de la réaction de polymérisation	36
1. Polymérisation classique	36
2. Polymérisation contrôlée	38
a) Par CROP	38
b) Par RAFT	40
c) Par ATRP	41
<b>Conclusion</b>	<b>42</b>

<b>Chapitre II : Synthèse de copolymères amphiphiles</b>	<b>48</b>
<b>Introduction</b>	<b>49</b>
<b>I. Synthèse contrôlée de copolymères amphiphiles par ATRP</b>	<b>51</b>
A. L'ATRP : une technique de choix pour la synthèse d'architectures contrôlées	51
B. Synthèse du lipoamorceur 1	51
1. Caractérisation de l'huile de lin	51
2. Première étape : Réduction de l'huile de lin en alcool gras	53
3. Deuxième étape : Estérification de l'alcool gras en lipoamorceur 1	54
4. Conservation des insaturations pendant la synthèse du lipoamorceur 1	57
C. Synthèse du copolymère amphiphile lipide-b-poly(acide acrylique)	60
1. Brève revue de la synthèse du poly(acide acrylique) par ATRP	60
2. Optimisation des conditions de synthèse du copolymère lipide-b-poly(acrylate de tert-butyle)	60
3. Acidolyse du copolymère lipide-b-poly(acrylate de tert-butyle)	63
4. Vérification de la pérennité des insaturations lors de la polymérisation	64
5. Caractérisation des différents copolymères synthétisés	66
D. Synthèse du copolymère amphiphile lipide-b-poly(N-isopropylacrylamide)	67
1. Le PNIPAM un polymère thermosensible de choix	67
2. Etat de l'art sur la synthèse par ATRP du PNIPAM	68
3. Etude de la synthèse par ATRP du PNIPAM	69
<b>II. Synthèse d'un copolymère amphiphile thermosensible par CROP assistée par micro-ondes</b>	<b>71</b>
A. Brève présentation des polyoxazolines	72
B. Synthèse du copolymère lipide-b-POx par réaction de terminaison sur un alcool gras	73
C. Synthèse du lipoamorceur 2	74
1. Synthèse du lipoamorceur tosylé	75
2. Synthèse du lipoamorceur mésylé	76
3. Conservation des insaturations	78
D. Synthèse du lipide-b-polyoxazoline par amorçage avec le lipoamorceur 2	80
E. Pérennité des insaturations au cours de la synthèse du LPOx	83
<b>Conclusion</b>	<b>84</b>
<b>Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux</b>	<b>89</b>
<b>Introduction</b>	<b>90</b>

<b>I.</b>	<b>Le système pH-sensible</b>	<b>90</b>
A.	Auto-association en milieu aqueux et influence du pH	91
1.	Observation qualitative des propriétés tensioactives	91
2.	Détermination de la concentration d'agrégation critique (cac)	92
3.	Comportement du copolymère aux interfaces	95
4.	Détermination de la nature des objets en solution	98
B.	Influence de la température sur la structure du système	102
C.	Influence de la longueur de la chaîne hydrophile sur la cmc	103
D.	Conclusion	105
<b>II.</b>	<b>Le système thermosensible</b>	<b>105</b>
A.	Auto-association en milieu aqueux	105
1.	Observations qualitatives des propriétés tensioactives	105
2.	Influence de la température sur la structure du système	106
a)	La LCST versus point de trouble	106
b)	Une courbe de turbidité révélatrice d'un copolymère	108
c)	Des points de trouble proches de la température du corps humain	109
3.	Auto-association du LPOx sous forme de micelles	110
a)	Détermination de la cac et de la nature des objets en solution	110
b)	Evolution de la taille des objets en solution avec la température	112
B.	Influence du pH sur la structure du système	112
C.	Conclusion	113
<b>III.</b>	<b>Le système mixte</b>	<b>114</b>
A.	Auto-association en milieu aqueux à pH acide	115
1.	Etude de l'évolution de la taille des objets en fonction du pH et de la température	115
a)	A pH acide	116
b)	A pH basique	119
B.	Conclusion	122
	<b>Conclusion</b>	<b>122</b>

## **Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux** **127**

	<b>Introduction</b>	<b>128</b>
<b>I.</b>	<b>La réticulation de systèmes micellaires dans la littérature</b>	<b>129</b>
<b>II.</b>	<b>Etude de la réticulation des doubles liaisons lipidiques</b>	<b>133</b>
A.	Essais préliminaires de réticulation en masse de l'huile de lin	133

B.	Optimisation des conditions de photoréticulation en masse de l'alcool gras	137
1.	Influence de la quantité d'éthylène glycol dithioacétate	138
2.	Influence de l'intensité du rayonnement	140
3.	Conclusion	141
C.	Photoréticulation d'un copolymère amphiphile en solution aqueuse	142
1.	Méthodes de suivi de la réaction	142
2.	Influence de l'encapsulation de l'EGD sur la taille des objets en solution	144
3.	Conclusion	145
<b>III.</b>	<b>Réticulation du cœur des micelles en milieu aqueux</b>	<b>146</b>
A.	Système pH-sensible	146
1.	Stabilisation des micelles de LPAA 3d à pH basique	146
2.	Optimisation de la photoréticulation	149
a)	Agent de réticulation di ou tétra-fonctionnel	149
b)	Temps d'irradiation	150
c)	Conclusion	151
B.	Système thermosensible	152
C.	Système mixte	153
	<b>Conclusion</b>	<b>155</b>
<b>Chapitre V :</b>	<b>Etude de l'encapsulation et suivi de libération</b>	<b>159</b>
<b>Introduction</b>		<b>160</b>
<b>I.</b>	<b>Capacité d'encapsulation et de relargage : étude qualitative</b>	<b>161</b>
A.	Mise en évidence de la capacité d'encapsulation et de relargage à l'aide d'un colorant	161
1.	Encapsulation d'un colorant par les différents systèmes	162
2.	Libération d'un colorant par les différents systèmes non réticulés	163
a)	Les systèmes isolés	163
b)	Les systèmes mixtes	164
c)	Les systèmes mixtes réticulés	165
B.	Mise en évidence de la capacité d'encapsulation et de relargage du LPAA par fluorescence du pyrène	166
<b>II.</b>	<b>Capacité d'encapsulation et de relargage : étude quantitative</b>	<b>167</b>
A.	Quantification de la capacité d'encapsulation	167
1.	Description des principes actifs	167
2.	Description de la méthode d'analyse	170
3.	Des bonnes capacités d'encapsulation dépendants du principe actif	172
a)	Pour les systèmes isolés	172

b)	Pour les systèmes mixtes	175
c)	Pour les systèmes réticulés	175
<b>B.</b>	<b>Suivi de libération</b>	<b>175</b>
1.	Mise en place d'une méthode d'analyse	176
2.	Suivi de la libération de la benzophénone	176
a)	Essais préliminaires	176
b)	Choix d'une membrane de dialyse	177
c)	Réalisation des essais de suivi de libération	178
d)	Stabilité de la benzophénone à pH acide dans les micelles de LPAA	179
3.	Suivi de la libération de la vitamine K1	180
	<b>Conclusion</b>	<b>181</b>
	<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>183</b>
	<b>Partie expérimentale</b>	<b>188</b>
	<b>Annexes</b>	

## INTRODUCTION GENERALE

D'après l'ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), le cancer est depuis quelques années la première cause de mortalité prématurée. A l'échelle mondiale, on estime que, d'ici 2030, il y aura plus de 26 millions de nouveaux cas de cancer chaque année. Trouver des traitements efficaces est donc un problème de santé publique majeur.

L'un des possibles leviers pour augmenter l'efficacité des traitements réside en l'utilisation de systèmes de vectorisation afin de transporter les molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible biologique. Bien que longtemps en retrait, la recherche dans ce domaine connaît un essor considérable depuis plusieurs décennies <sup>[w1]</sup>. Les vecteurs, dits de première génération, sont des liposomes (décrits pour la première fois en 1961 par Bangham) rapidement assimilés par le foie et utilisés dans le traitement de pathologies hépatiques <sup>[w2]</sup>. De nombreux progrès ont été apportés depuis ces premiers vecteurs puisque deux nouvelles générations de systèmes de vectorisation ont vu le jour. La deuxième génération de vecteurs visait à rendre les systèmes « furtifs » vis-à-vis du système immunitaire afin d'augmenter leur temps de circulation dans le système sanguin et de pouvoir atteindre d'autres organes que le foie. Dans ce but, des polymères hydrophiles, principalement le poly(éthylène glycol), ont été incorporés à la surface des vecteurs empêchant ainsi la fixation des protéines plasmiques, premier maillon du système immunitaire, et inhibant ainsi la reconnaissance des vecteurs par l'organisme. Puis la troisième génération de vecteur, munie de ligands capables de reconnaître des récepteurs spécifiques surexprimés par des cellules malades, est apparue, permettant ainsi un ciblage actif des vecteurs. Parallèlement à ces évolutions de concept, de nombreuses recherches ont été menées afin de disposer de vecteurs de structures et de tailles différentes. Actuellement, l'évolution de ces systèmes se fait vers l'utilisation de polymères dits « intelligents » permettant de déclencher le relargage des molécules biologiquement actives suite à un stimulus extérieur spécifique.

Toutes ces évolutions se sont faites simultanément au développement de techniques de polymérisation de plus en plus pointues permettant d'assurer un contrôle optimal de l'architecture des polymères et offrant une grande versatilité de structure. Les techniques de polymérisation contrôlée de type cationique, anionique et par ouverture de cycle ont été, dans un premier temps, très pratiquées tant dans le monde académique qu'industriel car ces techniques permettent un bon contrôle de la polymérisation et ainsi de l'architecture du

polymère final. Le développement des méthodes de polymérisation contrôlée de type radicalaire a notamment permis une évolution spectaculaire dans les biomatériaux et les surfaces bioactives<sup>1</sup> car elles permettent la polymérisation d'une très grande variété de monomères. En effet, ces méthodes de polymérisation se révèlent idéales pour répondre aux contraintes requises telles qu'une composition et une architecture très bien définies et la présence de fonctions spécifiques.

Parmi les méthodes de polymérisation contrôlée, l'ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization) voit son utilisation croître dans la synthèse de vecteurs de médicaments depuis quinze ans. En effet, ce procédé présente un grand intérêt pour la synthèse des surfaces bioactives<sup>1</sup> présentant des propriétés antifouling, antibactériennes, sensibles à l'environnement ou des surfaces fonctionnalisées.

Pour être efficace, les systèmes de vectorisation doivent satisfaire à plusieurs critères :

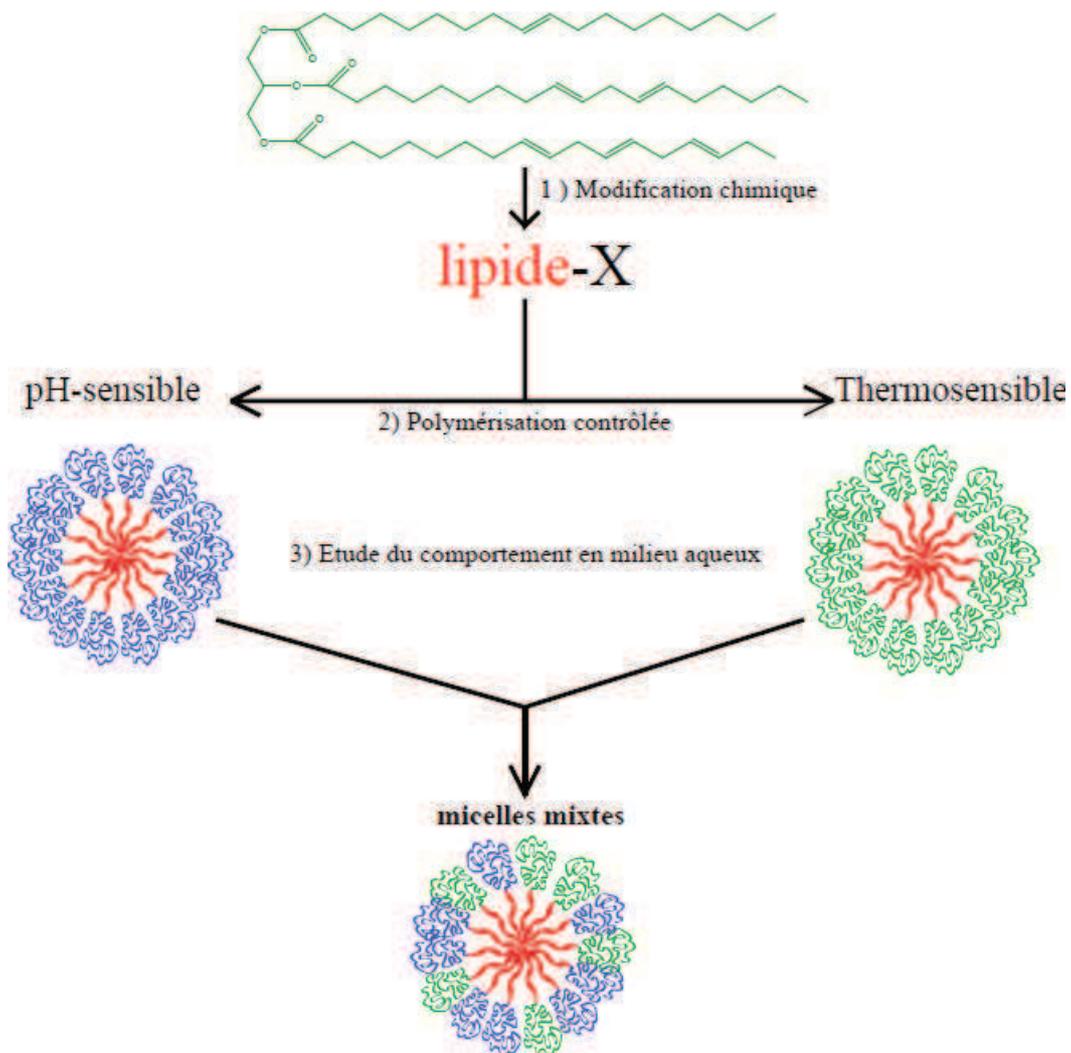
- La capacité à atteindre la zone à traiter
- La capacité à être bioassimilable et à ne présenter aucune toxicité propre
- La capacité à charger et libérer le médicament au moment voulu

Grâce à leur petite taille leur permettant d'atteindre des zones comme les tumeurs et de présenter un temps de circulation dans le sang plus long que les autres systèmes, les micelles nous semblent être le vecteur de médicaments le plus adapté pour répondre à la première problématique. Nous avons donc choisi de centrer notre étude sur ce système de vectorisation.

Afin d'améliorer la biocompatibilité et la bioassimilation des micelles, et dans un contexte plus général de développement de nouveaux polymères à partir de ressources renouvelables, nous avons choisi de synthétiser des copolymères amphiphiles contenant un bloc hydrophobe issu d'huile de lin. Une stratégie en deux principales étapes a été développée dans ce but : 1) modification chimique de l'huile végétale afin d'isoler les chaînes grasses et d'insérer un site amorceur de polymérisation et 2) croissance des blocs synthétiques hydrophiles à partir des lipoamorceurs *via* une technique de polymérisation contrôlée. Deux techniques de polymérisation contrôlées ont été retenues : la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) et la polymérisation cationique par ouverture de cycle (CROP) afin d'accéder à deux copolymères répondant à des stimuli différents : l'un sensible aux changements de pH et l'autre sensible aux modifications de température. Les techniques d'ATRP et de CROP permettront d'assurer un bon contrôle de la polymérisation et donc de

l'architecture finale du copolymère bien que l'amorceur soit issu d'une huile végétale brute et donc de composition variable.

Après l'étude du comportement en milieux aqueux de chacun des deux copolymères de façon isolée, et afin d'élaborer des systèmes capables de répondre aux deux stimuli, les deux copolymères amphiphiles ont ensuite été mélangés en solution aqueuse pour former des micelles mixtes.



**Schéma 1 : Stratégie de synthèses des systèmes micellaires**

Parallèlement, nous avons essayé de répondre au problème de la faible stabilité des systèmes micellaires lors de la dilution en stabilisant leur cœur par photoréticulation des doubles liaisons présentes sur les chaînes grasses. Cette réticulation du cœur des micelles devrait également permettre une libération plus lente des principes actifs.

Le présent manuscrit est constitué de cinq chapitres. Le premier chapitre est dédié à une étude bibliographique présentant les systèmes de vectorisation de type liposomes et micelles ainsi que la synthèse de copolymères amphiphiles à partir de lipides.

Le deuxième chapitre est consacré à la synthèse des différents copolymères amphiphiles par ATRP et CROP ainsi qu'à leur caractérisation.

Le comportement en milieu aqueux des différents copolymères amphiphiles seuls ou associés dans des systèmes mixtes est décrit dans le chapitre trois. L'influence d'un changement de pH et/ou de température sur leur structure y est en particulier étudiée.

Le quatrième chapitre présente l'étude de la réticulation du cœur des micelles et du changement de comportement en milieu aqueux qui en découle.

Enfin, la capacité d'encapsulation et de libération des différents systèmes élaborés fait l'objet du dernier chapitre.

1. Xu, F. J., Neoh, K. G. & Kang, E. T. Bioactive surfaces and biomaterials via atom transfer radical polymerization. *Progress in Polymer Science* **34**, 719–761 (2009).

[w1] **Patrick Couvreur**, « Super Vector ! », *La revue pour l'histoire du CNRS* [En ligne], 24 | 2009, mis en ligne le 05 octobre 2009, consulté le 10 juillet 2013. URL : <http://histoire-cnrs.revues.org/9061>

[w2] <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/glossaire/mot/vectorisationPlus.htm>, consulté le 10/07/2013.

*Chapitre I*  
*Etude Bibliographique*

### Introduction

Les systèmes de vectorisation font l'objet, depuis plusieurs décennies, de nombreuses études afin d'apporter une solution aux problèmes de stabilité et d'efficacité des médicaments. Depuis leur première description, les liposomes ont fait l'objet de nombreuses études et leur efficacité comme vecteur de médicaments n'est plus à prouver. Un grand pas a été fait depuis ces premiers vecteurs. Il existe maintenant d'autres systèmes de vectorisation de médicament parmi lesquels nous pouvons lister les suivants :

- Pour le transport de médicament :
  - Les polymersomes : structure identique à celle des liposomes mais contenant un polymère pour former la partie hydrophile
  - Les micelles
- Pour le transport d'ADN :
  - Les virus désactivés
  - Les polyplexes composés de polymères et d'ADN

Pour chaque famille, de nombreuses sous-familles existent rendant très riche la liste des systèmes de vectorisation. En effet, grâce à la chimie moderne, il est possible de synthétiser une grande variété d'architectures et de nature de polymères. Ces systèmes sont de plus en plus perfectionnés avec l'utilisation :

- de polymères intelligents répondant à un stimulus de l'environnement et permettant un temps de circulation dans le sang de plus en plus long,
- de ligands capables de reconnaître spécifiquement une cellule malade.

Dans le cadre de notre étude, nous allons nous focaliser sur les micelles formées de copolymère amphiphile. Plus particulièrement, nous allons étudier les copolymères amphiphiles synthétisés à partir d'huile végétale.

Ce chapitre bibliographique se découpe en deux parties, l'une concerne la description des liposomes et des micelles tandis que l'autre se focalise sur la synthèse de copolymères amphiphiles à partir de lipide.

Les liposomes sont des systèmes de vectorisation efficaces dont certains sont présents sur le marché. En effet, les liposomes présentent les propriétés nécessaires à un bon système de vectorisation (stabilité, capacité d'encapsulation, faible toxicité, temps de circulation dans le sang).

Les micelles, notamment celles à base de polymère présentent une grande stabilité, une petite taille et un temps de circulation dans le sang plus long. Elles constituent donc des alternatives prometteuses aux liposomes. La première partie de ce chapitre sera consacrée à une étude comparative de ces deux systèmes de vectorisation.

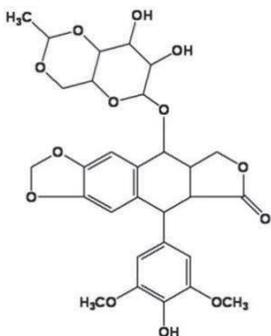
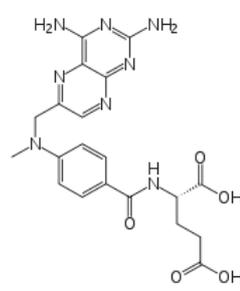
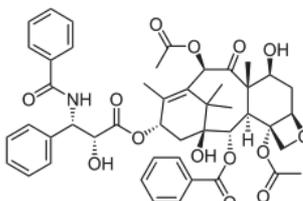
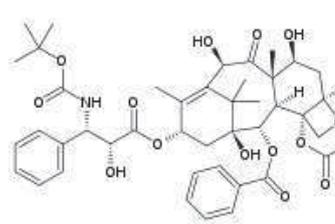
Afin d'améliorer la bioassimilation des systèmes de vectorisation, les copolymères amphiphiles seront, dans le cadre de notre étude, synthétisés à partir d'huile végétale. Après avoir brièvement décrit les huiles végétales et leur rôle croissant dans la synthèse des polymères, nous nous intéresserons aux différentes méthodes de synthèse de copolymères amphiphiles comportant une partie hydrophobe lipidique, qu'elle soit issue de phosphatidyléthanolamine (PE), de la pétrochimie ou d'huile végétale.

### **I. Les systèmes de vectorisation de principes actifs**

#### **A. Les propriétés requises pour un système de vectorisation**

Une majorité des médicaments et des anticancéreux possède une très faible solubilité dans l'eau comme décrit le **tableau I - 1**.

Tableau I - 1 : Solubilité de quelques anticancéreux

Nom	Utilisation <sup>[w5]</sup> en cas de	Structure	Solubilité dans l'eau
<b>Etoposide</b>	Cancer du poumon, des testicules, lymphome, leucémie, glioblastome		0,2 mg/mL <sup>[w3]</sup>
<b>Méthotrexate</b>	Leucémie, néoplasies, prophylaxie, maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde		0,17 mg/mL <sup>[w4]</sup>
<b>Paclitaxel</b>	Cancer du poumon, du sein et de l'ovaire		< 0,1 µg/mL <sup>1</sup>
<b>Docétaxel</b>	Cancer du sein, du poumon et de la prostate		0,025 µg/mL <sup>[w1]</sup>

La solubilité des anticancéreux est pourtant une propriété cruciale. En effet, l'injection par intraveineuse d'un produit hydrophobe cause la formation d'agrégats. Cela a plusieurs conséquences néfastes. Tout d'abord, cela peut conduire à une concentration locale très élevée en principe actif provoquant des lésions locales importantes dues à la toxicité de celui-ci.

Ensuite, cela peut également provoquer l'occlusion des petits vaisseaux sanguins. Le pronostic vital du patient est alors menacé.

Afin de remédier à ce problème, l'utilisation d'objets solubles dans l'eau et capables de véhiculer le principe actif a été proposée. Ces objets sont appelés vecteurs de médicament ou de principe actif. Ces systèmes de vectorisation doivent répondre à certains critères :

### 1- Encapsulation d'un principe actif :

Le vecteur doit être capable d'encapsuler (c'est-à-dire de contenir en son sein) le principe actif améliorant de ce fait sa solubilité et sa biocompatibilité<sup>2</sup>. Ce principe actif peut être de nature différente : un agent d'imagerie médicale, un brin d'ADN, un anticancéreux ou bien encore un vaccin.

L'encapsulation a également d'autres avantages. En effet, cela va protéger le principe actif du milieu extérieur et éviter ainsi sa désactivation<sup>3</sup> et son élimination par le système immunitaire. De manière manifeste, un bon système de vectorisation doit montrer une excellente solubilité dans l'eau.

### 2- Biocompatibilité et furtivité :

Le vecteur de médicament ne doit présenter aucune toxicité propre. Il ne doit avoir aucune influence sur les cellules saines avant et après la libération du principe actif et doit pouvoir s'éliminer soit par voie rénale soit par bio-assimilation au terme de son action. Le vecteur de médicament est considéré comme bio-assimilable lorsque lui et/ou ses produits de dégradations peuvent être absorbés par l'organisme sans provoquer de lésion.

Le vecteur doit passer inaperçu auprès du système immunitaire afin de ne pas être éliminé du système sanguin. Cela permet d'augmenter son temps de circulation dans l'organisme et ainsi d'augmenter son efficacité.

### 3- Libération ciblée du principe actif :

Il existe plusieurs types de ciblage thérapeutique (**Schéma I - 1**). Le premier est dit passif car il n'est dû qu'aux propriétés physiques du système de vectorisation comme sa taille.

En effet, les systèmes de petites tailles vont avoir tendance à s'accumuler dans les zones très vascularisées mais possédant un système lymphatique défaillant comme c'est le cas pour les tumeurs. Ce phénomène est appelé *permeability and retention effect* (EPR)<sup>4-6</sup>.

Le deuxième type de ciblage thérapeutique est le ciblage actif. Le ciblage est actif grâce à l'utilisation de polymères intelligents (pH ou thermo-sensible). En effet, afin d'augmenter l'efficacité du principe actif, le vecteur de médicament libère le principe actif dans des conditions de pH et/ou de température données. On parle alors de libération contrôlée.

Il est également possible d'introduire en surface du vecteur des récepteurs spécifiques ou des molécules cibles comme des anticorps ou des glycolipides afin de cibler de façon spécifique une cellule, une protéine. Les immunoliposomes sont un exemple de cette classe de vecteurs de médicament.

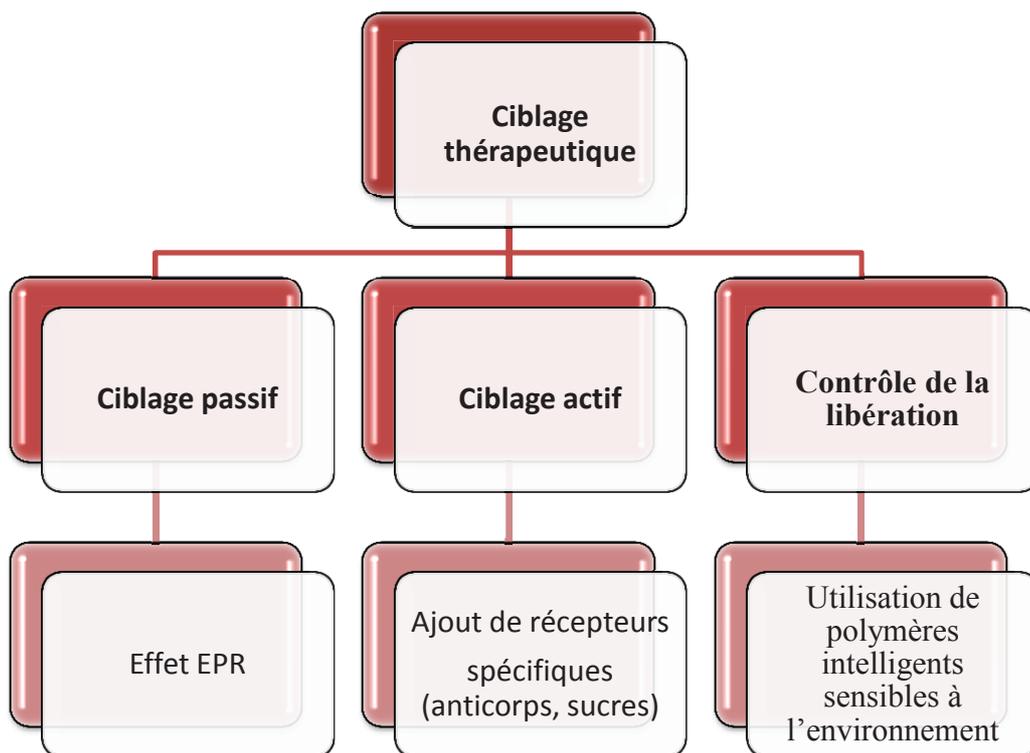


Schéma I - 1 : Description des différents types de ciblage thérapeutique

Les systèmes de vectorisation peuvent être répartis, selon leur nature, en plusieurs sous-classes. La classification suivante (Schéma I - 2) a été extraite et adaptée de celle proposée par Kevin Letchford et Helen Burt<sup>7</sup>.

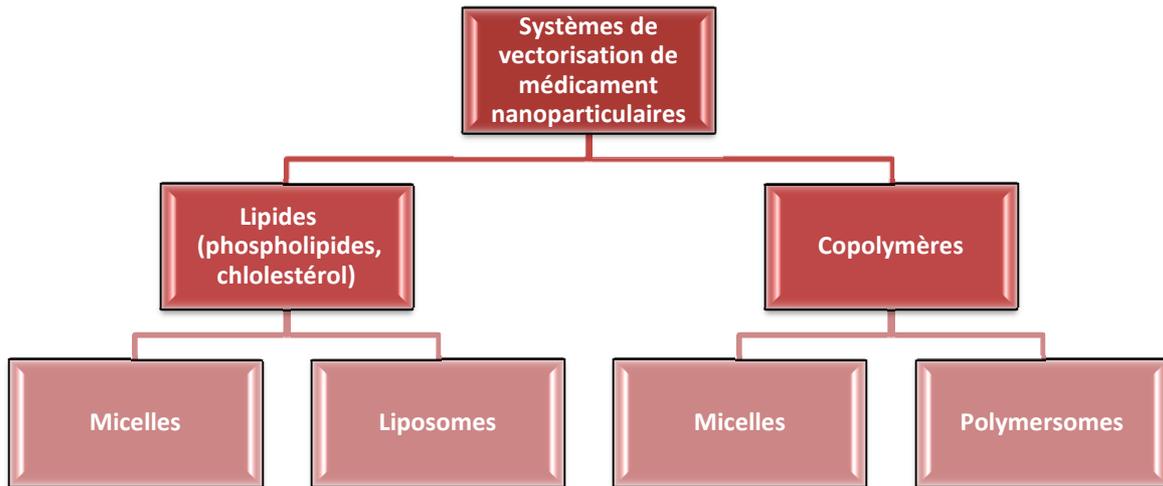


Schéma I - 2 : Classification des systèmes de vectorisation

Dans cette classification, les liposomes et les micelles sont les plus étudiés. Nous allons dédier les paragraphes suivants à leur description.

## B. Les liposomes

Il s'agit de vésicules sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques qui isole(nt) un ou plusieurs compartiment(s) aqueux<sup>8</sup> (Schéma I - 3).

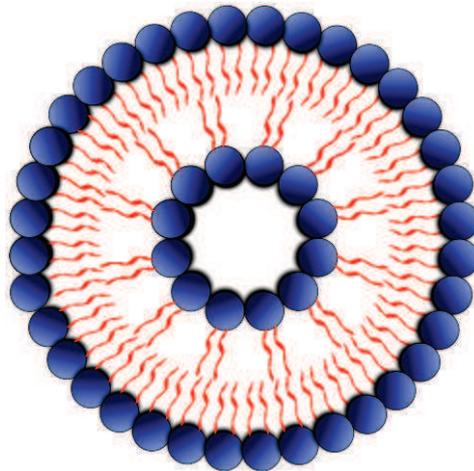


Schéma I - 3 : Coupe d'un liposome

Ces couches lipidiques sont constituées de macromolécules amphiphiles. Les phospholipides (Schéma I - 4), composantes majeures de la membrane de nos cellules, forment naturellement des liposomes en milieu aqueux.

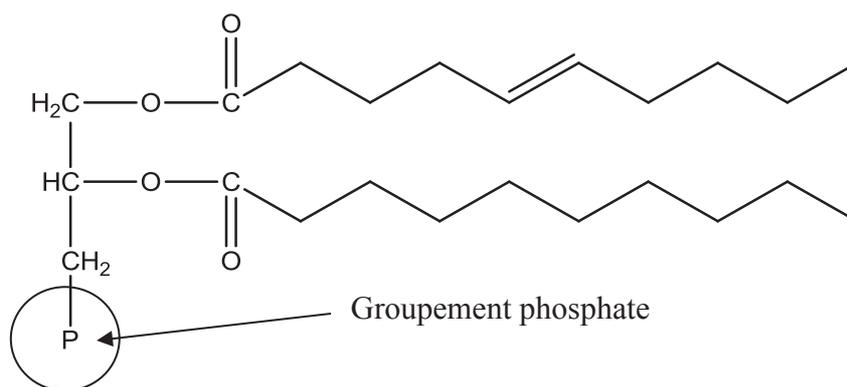


Schéma I - 4 : Structure d'un phospholipide

Comme le montre le **schéma I - 4**, un phospholipide est une molécule amphiphile car composée d'une partie hydrophile (le groupement phosphate) et d'une partie hydrophobe (les chaînes carbonées). En milieu aqueux et à partir d'une concentration critique (cac = concentration d'agrégation critique), les phospholipides s'auto-organisent de façon à ne pas exposer la partie hydrophobe à l'eau. La présence des deux chaînes hydrophobes d'un volume similaire à la partie hydrophile donne une géométrie quasi-cylindrique à la molécule (**Schéma I - 5**). Les phospholipides ont alors tendance, comme le prévoit les paramètres d'Israelachvili<sup>9</sup> à s'assembler en couches lamellaires sphériques et forment un liposome.

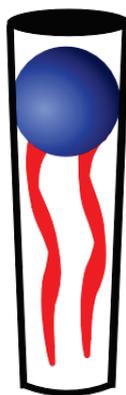
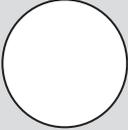
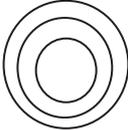


Schéma I - 5 : Représentation d'une molécule amphiphile à géométrie quasi-cylindrique

Deux grandes familles de liposome existent se distinguant par leur nombre de couches lipidiques. Ainsi, il existe des liposomes unilamellaires (à une seule couche) et des liposomes multilamellaires (à plusieurs couches). La taille des liposomes est très variable (**Tableau I - 2**) allant de 20 nm à plus de 1000 nm pour les structures multilamellaires.

Tableau I - 2 : Les grandes familles des liposomes

Type de liposome	Schéma	Taille
<b>Liposome unilamellaire de petite taille (SUV = Small Unilamellar Vesicle)</b>		20 à 200 nm
<b>Liposome unilamellaire de grande taille (LUV = Large Unilamellar Vesicle)</b>		De 200 à 1000 nm
<b>Liposome unilamellaire géante (GUV = Giant Unilamellar Vesicle)</b>		Supérieure à 1000 nm
<b>Liposome multilamellaire (MLV = Multilamellar vesicle)</b>		À partir de 200 nm

De par leur structure, les liposomes présentent l'avantage de pouvoir encapsuler des principes actifs :

- hydrophiles : à l'intérieur de la ou des zone(s) aqueuse(s)
- hydrophobes : à l'intérieur des membranes lipidiques
- amphiphiles : à l'interface entre les régions hydrophobe et hydrophile.

De plus, leur taille leur permet d'atteindre d'excellentes capacités d'encapsulation. Les liposomes peuvent encapsuler jusqu'à 50% de leur masse d'un principe actif<sup>10</sup>.

Toutefois leur application est limitée à cause de leur rapide élimination du corps et leur faible capacité à rentrer dans les cellules. En effet, leur taille importante les rend vulnérables face au système immunitaire. Lorsqu'un objet est introduit dans le sang, des protéines vont s'adsorber à sa surface particulièrement si celui-ci est hydrophobe. C'est pourquoi la plupart des liposomes sont stabilisés par l'incorporation de polyéthylène glycol sur la surface de la bicouche du liposome ou par incorporation de copolymère PEG-lipide (**Schéma I - 6**)<sup>11,12</sup>. Ces liposomes sont dénommés liposomes « discrets » ou « stériquement stabilisés ».

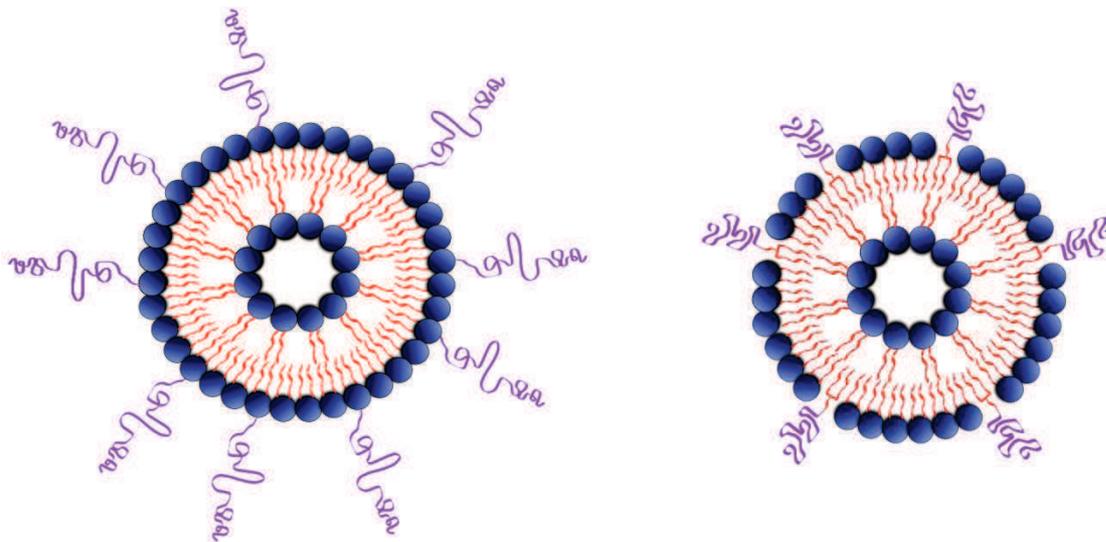


Schéma I - 6 : Incorporation de chaînes de polyéthylène glycol en surface du liposome

En greffant des ligands spécifiques à leur surface (anticorps, antigènes, protéines, peptides ou bien encore des oligosaccharides<sup>13</sup>) (Schéma I - 7), les liposomes peuvent être reconnus à la surface des cellules et ainsi cibler et libérer le principe actif au niveau des cellules malades. Ils sont alors appelés « immunoliposomes »<sup>10</sup>.

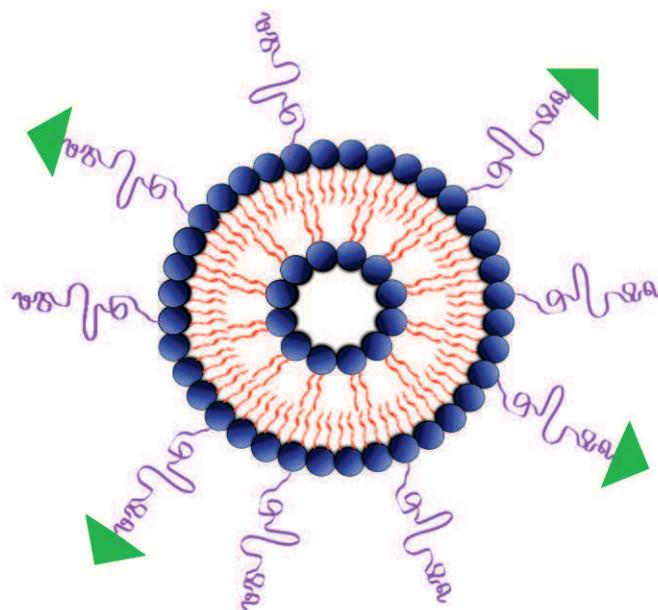


Schéma I - 7 : Schéma d'un immunoliposome

Ce sont les raisons pour lesquelles les liposomes ont largement prouvé leur efficacité en tant que vecteur de médicament. Ils sont d'ailleurs maintenant très présents sur le marché car approuvés par l'US Food and Drug Administration (US FDA)<sup>14</sup>. On peut voir ainsi sur le

marché le Doxil® qui contient de la doxorubicine (mécanisme d'action : empêche la réplication de l'ADN ; utilisation dans le traitement de nombreux cancers) encapsulée, le Daunosome® qui lui encapsule du daunorubicine (mécanisme d'action : empêche la réplication de l'ADN ; utilisation dans le traitement des leucémies) ou encore l'Ambisome® qui est le plus vieux liposome commercial (présent sur le marché depuis 1990)<sup>13</sup>.

Toutefois leurs principaux avantages, c'est-à-dire leur structure et leur taille, sont aussi leurs plus gros défauts. Cela peut provoquer un relargage précoce du principe actif mais également la mise en route de la phagocytose, c'est-à-dire de la destruction du "corps étranger" par le système immunitaire. Les liposomes sont donc rapidement détruits. Leur grande taille les empêche également d'accéder à certaines tumeurs dont le système vasculaire est trop étroit<sup>3</sup>. De plus ils ont tendance à s'accumuler dans le foie et la rate ce qui limite leur utilisation. En thérapie génique, bien que prometteurs, ils restent actuellement moins intéressants que les vecteurs viraux. En effet, les liposomes montrent des problèmes de ciblage. Ils peuvent aussi être reconnus par les cellules saines et entrer en compétition avec les lipoprotéines naturelles<sup>3</sup>.

Les micelles semblent être un bon compromis afin de remédier aux désavantages des liposomes.

### **C. Les micelles, des vecteurs de médicament très prometteurs**

#### **1. Une organisation de molécules amphiphiles sous la forme d'une sphère**

Comme un liposome, une micelle est une association de molécules amphiphiles. La différence réside dans la géométrie de la molécule qui présente plutôt une forme de cône qu'une forme de cylindre. La tête polaire occupe un volume plus important que l'unique queue hydrophobe (**Schéma I - 8**).

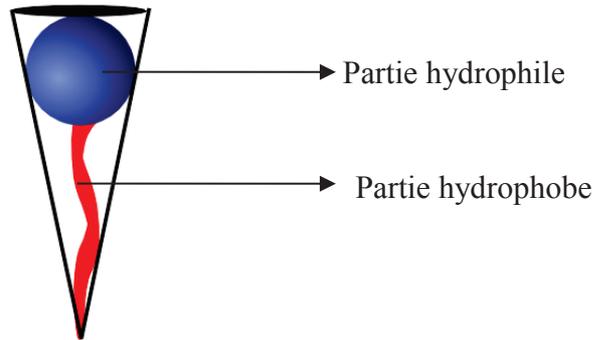


Schéma I - 8 : Représentation d'une molécule amphiphile à géométrie conique

Pour cette raison, en milieu aqueux et au-dessus d'une concentration critique (cmc = concentration micellaire critique), la géométrie de la molécule n'engendre pas une structure lamellaire mais privilégie la formation d'une sphère avec des groupements polaires en périphérie (la couronne) et les parties hydrophobes au cœur (Schéma I - 9). Cette structure sphérique est appelée micelle.

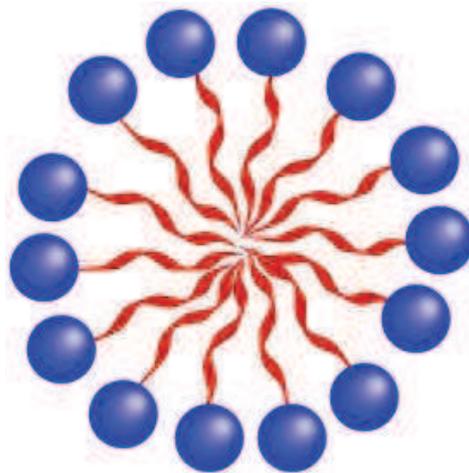


Schéma I - 9 : Représentation simplifiée d'une micelle

Par rapport aux liposomes, les micelles sont beaucoup plus petites. En effet, elles présentent une taille située entre 5 et 100 nm<sup>15</sup>. Elles ont la particularité d'être, pour la plupart, dans un équilibre dynamique entre la forme isolée, unimère, et la forme agrégée, micelle.

Comme mentionné dans le schéma I - 2, plusieurs types de micelles existent :

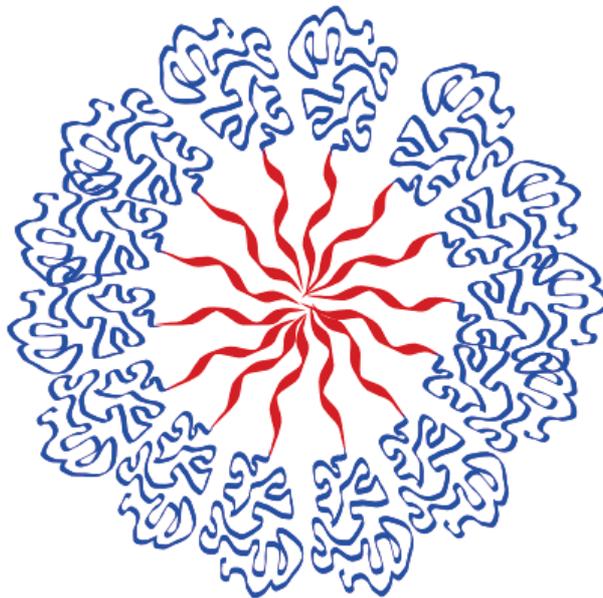
- Des micelles de tensioactifs classiques (tween, sorbitan ...) (non citées dans le schéma I - 2 car hors-sujet).

- Des micelles lipidiques.
- Des micelles à base de polymère.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement à cette dernière catégorie.

### 2. Les micelles à base de polymère

Les micelles à base de polymère sont constituées de copolymère amphiphile<sup>2</sup>. La partie hydrophile n'est donc plus une tête polaire mais une pelote d'une longue chaîne de polymère hydrophile (**Schéma I - 10**).



**Schéma I - 10 : Représentation d'une micelle de copolymère amphiphile**

Les micelles à base de copolymère amphiphile allient les propriétés avantageuses des micelles et du copolymère utilisé.

Premièrement, la couronne hydrophile joue un rôle clé. Elle permet de stabiliser la micelle et d'améliorer sa biocompatibilité tout en assurant la protection du principe actif contenu à l'intérieur<sup>15</sup>. La couronne a également pour mission de rendre invisible la micelle face au système immunitaire. Pour cela, le poly(éthylène glycol) (PEG) est connu pour inhiber l'adsorption des protéines à la surface des micelles par répulsion stérique<sup>16</sup>. Il est le polymère le plus utilisé pour former la couronne des micelles du fait également de sa très grande solubilité dans l'eau et de sa biocompatibilité. Son utilisation en milieu médical a été

approuvée par la FDA.<sup>17</sup> Il est aussi possible d'utiliser des polymères hydrophiles intelligents, sensibles à leur environnement afin de contrôler la libération du principe actif.

Grâce à la furtivité apportée par la couronne, les micelles ne sont pas détruites et le temps de circulation dans le sang s'en trouve prolongé. Par conséquent, la concentration des micelles dans le sang par rapport aux liposomes est plus importante alors qu'elle est diminuée dans les reins<sup>15</sup>.

Deuxièmement, la taille des micelles (5 à 100 nm) est un sérieux atout. Associée à leur longévité, elle permet une accumulation de celles-ci dans les tumeurs par effet EPR. Ainsi, les micelles de polymère bénéficient plus de l'effet EPR que les liposomes et s'accumulent plus efficacement dans les zones cancéreuses très vascularisées.<sup>17</sup> La petite taille des micelles permet également de simplifier l'étape de purification par une simple filtration<sup>18</sup>.

Troisièmement, les micelles à base de copolymère amphiphile sont plus stables que les micelles de tensioactif<sup>19</sup>. Elles possèdent une concentration micellaire critique plus faible ce qui signifie que leur stabilité sera bien meilleure lors de leur dilution dans le système sanguin. Ceci est accentué par le levier qu'offre l'utilisation de polymère sur la longueur de la chaîne hydrophobe. En effet, plus la chaîne hydrophobe est longue, plus la cmc devient faible améliorant ainsi la stabilité de la micelle. Cela augmente également le volume du cœur et donc, la capacité d'encapsulation. L'accès à des polymères hydrophobes de nature diverse permet également d'optimiser la compatibilité entre le cœur et le principe actif améliorant par ce biais la capacité d'encapsulation.

Pour résumer, le **tableau I - 3** inspiré par la revue de Christine Allen décrit les propriétés idéales d'un système micellaire<sup>16</sup> pour la vectorisation de principe actif.

**Tableau I - 3 : Description du système micellaire idéal dans le cadre de la vectorisation de principes actifs.**

Cœur de la micelle	Micelle dans son entité	Couronne de la micelle
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Haute capacité d'encapsulation</li> <li>- Libération contrôlée</li> <li>- Haut degré de compatibilité entre le principe actif et le cœur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Taille entre 10 et 100 nm</li> <li>- Grande stabilité : cmc basse</li> <li>- Vitesse lente de dissociation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Barrière stérique efficace : →Epaisseur de la couronne →Densité de surface importante</li> <li>- Protection efficace de la couronne</li> </ul>

C'est pourquoi l'utilisation des micelles<sup>18</sup> comme vecteur de médicament dans le traitement des cancers est très prometteuse. Déjà quelques systèmes micellaires sont présents sur le marché.

### 3. Des systèmes micellaires prometteurs

Le Pluronic<sup>6, 20, 21</sup> est un vecteur de médicament commercialisé par BASF. Il est aussi connu sous le nom de Poloxamer ou de Synperonic. Il s'agit d'un polymère tribloc comportant une chaîne hydrophobe de poly(oxyde de propylène) et deux chaînes hydrophiles de poly(éthylène glycol) avec des proportions variables (Schéma I - 11, Tableau I - 4).

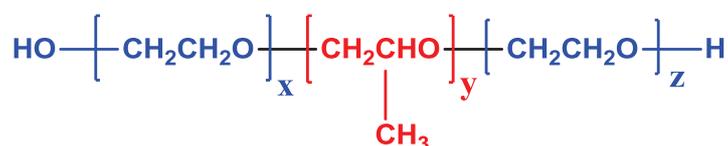


Schéma I - 11 : Formule chimique du Pluronic

**Tableau I - 4 : Présentation des principales propriétés de trois Pluronics disponibles chez BASF<sup>20</sup>**

Type de Pluronic	Formule	Mw (g/mol)	HLB	cmc (mmol/L)
<b>Pluronic L61</b>	EG <sub>2</sub> -PO <sub>30</sub> -EG <sub>2</sub>	1950	3	0,11
<b>Pluronic P85</b>	EG <sub>26</sub> -PO <sub>40</sub> -EG <sub>26</sub>	4600	16	0,065
<b>Pluronic F127</b>	EG <sub>100</sub> -PO <sub>65</sub> -EG <sub>100</sub>	12600	22	0,0028

Ces copolymères s'auto-assemblent en milieu aqueux sous forme de micelles très stables grâce à une cmc de l'ordre de la micromole par litre. Le Pluronic se montre efficace pour encapsuler de nombreux principes actifs dont la doxorubicine. De plus, les résultats cliniques démontrent l'amélioration notable de l'efficacité du traitement avec la doxorubicine encapsulée dans le Pluronic comparée à la doxorubicine seule<sup>20</sup>. Afin d'accéder au ciblage thérapeutique actif, la couronne PEG peut être modifiée par ajout de peptides ou de protéines.

Plusieurs revues<sup>15,22</sup> répertorient les polymères utilisés dans la vectorisation de médicament et notamment les systèmes de copolymère formant des micelles en solution aqueuse. Le **tableau I – 5** répertorie quelques-uns de ces systèmes afin d'illustrer la variété des systèmes étudiés. Ce tableau met d'ailleurs en évidence le fait que les systèmes amphiphiles étudiés présentent tous des concentrations micellaires critiques relativement faibles entre 1 et 20 mg/L. De plus, on peut remarquer que la capacité d'encapsulation de chaque système est dépendant de la nature du principe actif. Ceci montre que la capacité d'encapsulation est très dépendante de l'affinité cœur/principe actif et que pour un principe actif donné, un système micellaire n'a pas la même capacité d'encapsulation selon la nature du cœur. Il est donc difficile de comparer l'efficacité d'un système par rapport à un autre.

Tableau I - 5 : Quelques systèmes de vectorisation micellaires à base de polymère

Copolymères étudiés	cmc (mg/L) <sup>16</sup>	Principe actif encapsulé
Poly(éthylène glycol)- <i>b</i> -Poly(styrène)	1-5	
Poly(éthylène glycol)- <i>b</i> -Poly(acide lactique)	35	Paclitaxel, testostérone <sup>3</sup>
Poly(éthylène glycol)- <i>b</i> -Poly(oxyde de propylène)- <i>b</i> -Poly(éthylène glycol)	10-1000	Doxorubicine, cisplatine, epirubicine, haloperidol, ATP <sup>3,15</sup>
Poly(éthylène glycol)- <i>b</i> -Poly(benzyl aspartate)	5-18	Amphotericine B, Doxorubicine, Indomethacine, KRN-500 <sup>3</sup>
Poly(éthylène glycol)- <i>b</i> -Polycaprolactane	1,2	FK506, L-685, L-818 <sup>15</sup> , Indomethacine <sup>3</sup>
Poly(éthylène glycol)- <i>b</i> -Poly(L-Lysine)		Antisense oligonucleotide, Cyclophosphamide, dérivé iodé d'acide benzoïque, ADN <sup>3</sup>
Poly(benzyl aspartate)- <i>b</i> -Poly(éthylène glycol)	5-18	Doxorubicine, indomethacine, KRN, amphotericine <sup>15</sup>

## D. Conclusion

Afin de répondre aux problématiques de la vectorisation de médicament (toxicité, temps de circulation, EPR, ciblage ...), nous avons choisi de nous orienter vers des systèmes micellaires dont la partie hydrophile sera composée d'un polymère intelligent biocompatible.

Pour améliorer la biocompatibilité et la stabilité du système micellaire, nous avons souhaité travailler à base de lipides pour former la partie hydrophobe et plus particulièrement à partir de l'huile de lin (produit local, pas de compétition avec le marché de l'alimentaire).

## II. La synthèse de copolymères amphiphiles à partir de triglycérides ou de lipides

Depuis la prise de conscience de notre impact environnemental, la synthèse de polymères à partir de ressources renouvelables connaît un essor considérable. Afin de remplacer les ressources fossiles, les huiles végétales sont largement étudiées et exploitées à l'échelle industrielle. Environ 80% de la production mondiale d'huile est de source végétale. Parmi ces huiles végétales, la plus grande partie est produite à partir de soja, de palme, de colza et de tournesol<sup>23</sup>.

Les huiles végétales sont de plus en plus utilisées dans l'industrie en tant que matière première pour la fabrication de tensioactif, de produit cosmétique, de lubrifiant, de vernis, de peinture et de revêtement de surface (ex : le linoléum est produit à partir d'huile de lin). Par ailleurs, elles sont de plus en plus étudiées pour la synthèse de polymères grâce à leurs structures variées.

Nous allons présenter les propriétés particulières des huiles végétales en nous focalisant plus particulièrement sur l'huile de lin qui est à la base de notre projet.

### A. Les huiles végétales

#### 1. Structure et propriétés des triglycérides

La structure et les propriétés des triglycérides ainsi que la synthèse des principaux polymères à partir de ces derniers ont été largement décrites par F. Seniha Güner & al.<sup>24</sup>.

Les huiles végétales sont constituées de triglycérides dont la structure générale est représentée dans le **schéma I - 12**.

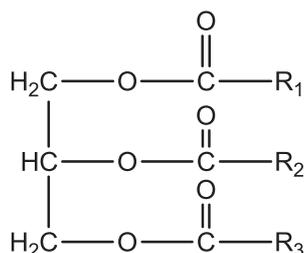
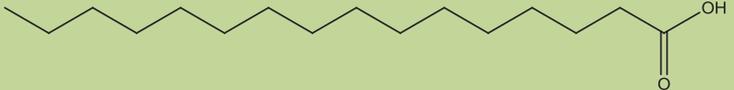
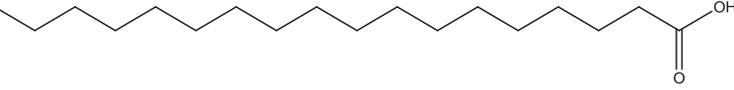
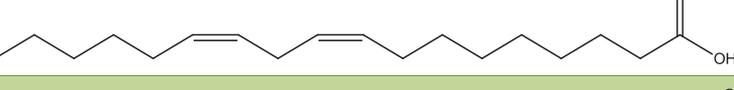


Schéma I - 12 : Structure générale d'une molécule de triglycéride avec R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> des chaînes d'acides gras

Les triglycérides sont des triesters constitués de trois chaînes d'acides gras, non nécessairement identiques. Les acides gras sont des chaînes alkyles plus ou moins longues qui peuvent être saturées ou insaturées et posséder différents groupements fonctionnels. Dans la majorité des cas, il s'agit de chaînes alkyles présentant des doubles liaisons non conjuguées. Le **tableau I - 6** regroupe les différents acides gras rencontrés dans l'huile de lin.

Tableau I - 6 : Principaux acides gras constituant l'huile de lin

Nom	Composition (%)	Structure
Acide palmitique	5-7	
Acide stéarique	4-7	
Acide oléique	17-22	
Acide linoléique	13-18	
Acide linoléique	48-58	

L'huile de lin comprend cinq acides gras différents. L'acide linoléique est majoritaire suivi ensuite de l'acide oléique et de l'acide linoléique dans des proportions équivalentes. A eux trois, ils constituent 78 à 98% des acides gras de l'huile de lin.

Les propriétés physiques et chimiques des huiles végétales sont régies par la stéréochimie des doubles liaisons présentes sur la chaîne, le degré d'insaturation et la longueur de la chaîne de carbone.

La propriété la plus importante est le degré d'insaturation mesuré par l'indice d'iode. Il correspond à la quantité d'iode (en mg) qui a réagi sur les doubles liaisons pour 100 g de produit. La méthode de Wijs est la plus connue pour réaliser cette analyse.

En fonction de l'indice d'iode, les triglycérides sont séparés en trois groupes : siccatif, semi siccatif et non siccatif. La siccativité s'interprète comme la facilité de l'huile à « sécher » à l'air libre c'est-à-dire sa capacité à s'oxyder et à réticuler en présence d'air. Toutefois, afin de classer de façon précise les différentes huiles, l'indice d'iode doit être complété par la position des doubles liaisons et leur conjugaison. En effet, la position des doubles liaisons et leur conjugaison ont une influence sur la réactivité de l'huile. Le **tableau I - 7** répertorie les trois groupes en fonction de leur indice d'iode et donne un exemple d'huile pour chaque groupe.

**Tableau I - 7 : Les indices d'iode pour les différentes huiles**

Nature	Indice d'iode	Exemple d'huile
Siccatif	<b>&gt; 150</b>	Huile de lin
Semi siccatif	<b>110 &lt; I &lt; 150</b>	Huile de soja
Non siccatif	<b>&lt; 110</b>	Huile de ricin

L'huile de lin fait partie des huiles très siccatives avec un indice d'iode entre 170 et 204. Ce fort indice d'iode est dû à la présence majoritaire de l'acide linoléique avec ses trois insaturations. Cette propriété explique ainsi l'intérêt de l'industrie de la peinture et des vernis pour l'huile de lin.

## 2. Principaux polymères issus de triglycérides

Les acides gras possèdent une grande variété de structure. En effet, certains d'entre eux comportent des insaturations, des fonctions alcool ou époxyde. Les triglycérides peuvent être également chimiquement modifiés afin d'introduire sur la chaîne une large gamme de fonctions chimiques. Cette diversité de structure a permis de synthétiser une large gamme de matériaux polymères à partir des huiles <sup>23-27</sup>.

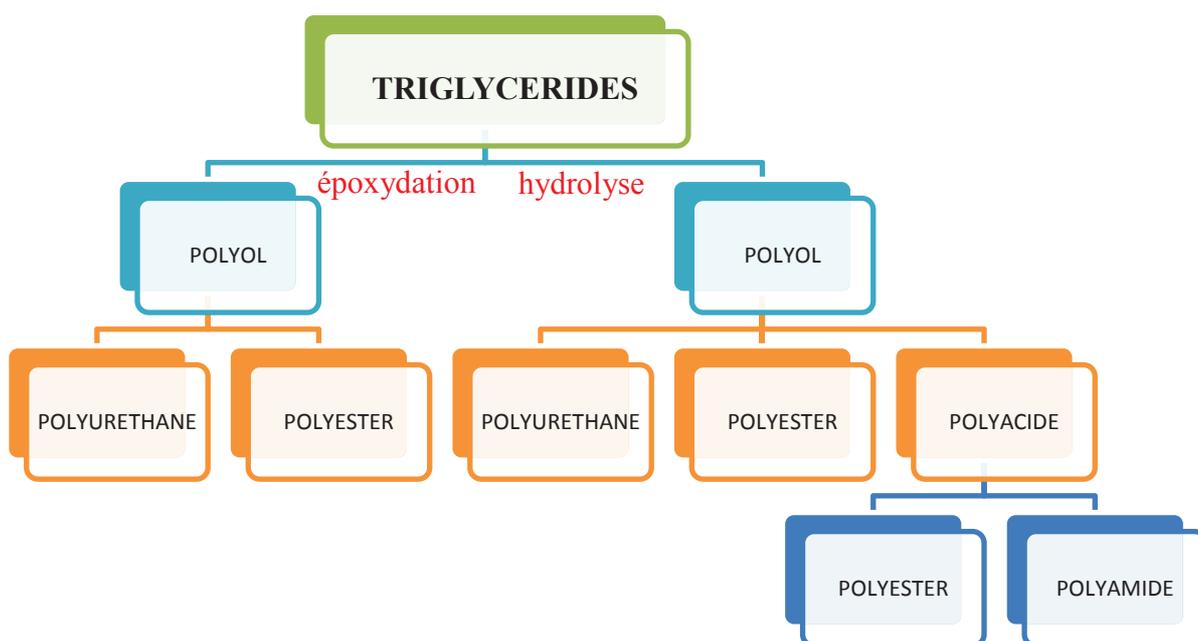


Schéma I - 13 : Récapitulatif des polymères synthétisés à partir de triglycérides

Comme le montre le schéma I - 13, trois grandes familles de polymère peuvent être facilement synthétisées à partir des triglycérides. Il s'agit des polyesters, des polyuréthanes et des polyamides.

La majorité des matériaux polymères sont obtenus en deux étapes principales. Tout d'abord, les triglycérides sont transformés en polyols soit par hydrolyse soit par époxydation. Dans le cas d'une hydrolyse, la fonction alcool est en bout de chaîne alors qu'elle est en milieu de chaîne lors d'une époxydation. La structure du polymère final est donc très

dépendante de cette étape. Ensuite, les polyols obtenus sont mis en présence de diisocyanates pour former des polyuréthanes ou d'un polyacide pour former des polyesters.

L'huile de lin est principalement utilisée dans l'industrie des peintures, vernis et revêtements grâce à sa haute siccativité. On la trouve également, dans une moindre mesure dans la synthèse des polyesters et des polyuréthanes. En effet, l'huile de soja, de tournesol ou encore de ricin sont plus prisées comme précurseurs de monomères.

### 3. L'huile de lin, une excellente candidate

Les huiles d'origine végétale voient leur utilisation croître dans la synthèse de polymères industriels. Les différentes possibilités de modifications chimiques ont été étudiées et ont démontré le grand potentiel des triglycérides.

Notre équipe a de plus une grande expérience dans la chimie des huiles et en particulier l'huile de lin. Il nous a donc semblé naturel d'utiliser directement de l'huile de lin afin de synthétiser un copolymère amphiphile.

La littérature donne quelques exemples de synthèse de copolymères amphiphiles à partir de lipide.

En général, comme illustré par le **schéma I - 14**, deux voies de synthèse se distinguent. La première propose un couplage chimique d'une partie lipide à une partie hydrophile après l'étape de polymérisation. La seconde propose une polymérisation, qu'elle soit classique ou contrôlée, d'un monomère en utilisant le lipide chimiquement modifié comme amorceur de la polymérisation.

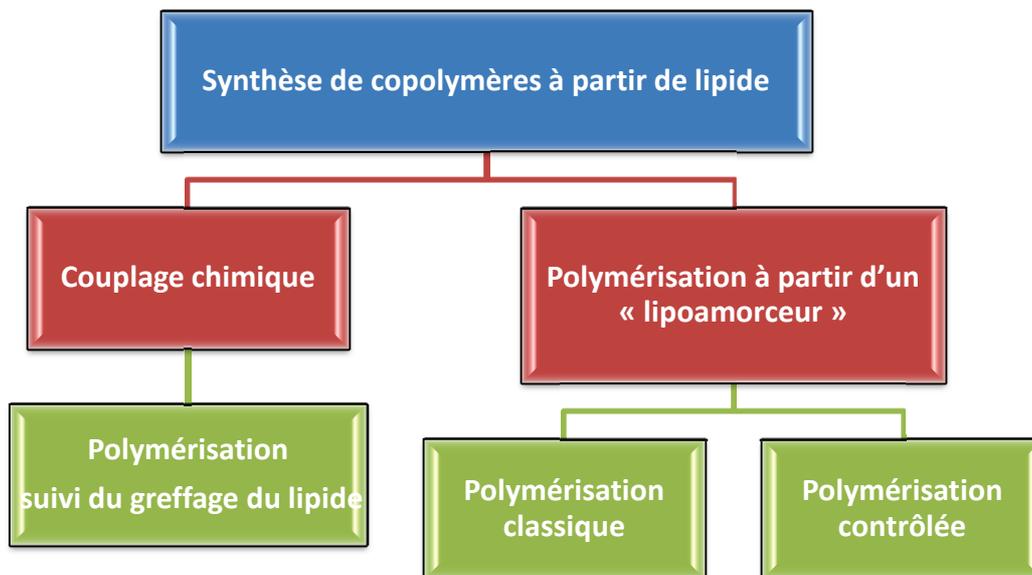


Schéma I - 14 : Les différents types de synthèse existants de copolymère amphiphile à partir de lipide.

Il est très important de différencier ces différentes voies car elles ne conduisent pas à la même structure finale du copolymère. En effet, la polymérisation d'un monomère à partir d'un « lipoamorreur » conduit à une structure linéaire du copolymère. Le couplage chimique d'une partie lipide à un polymère, quant à lui, peut tout aussi bien donner une architecture linéaire ou en peigne du copolymère final selon la localisation du greffage. Le couplage chimique du lipide à un monomère favorise exclusivement l'architecture en peigne (Schémas I - 15 et I - 16).

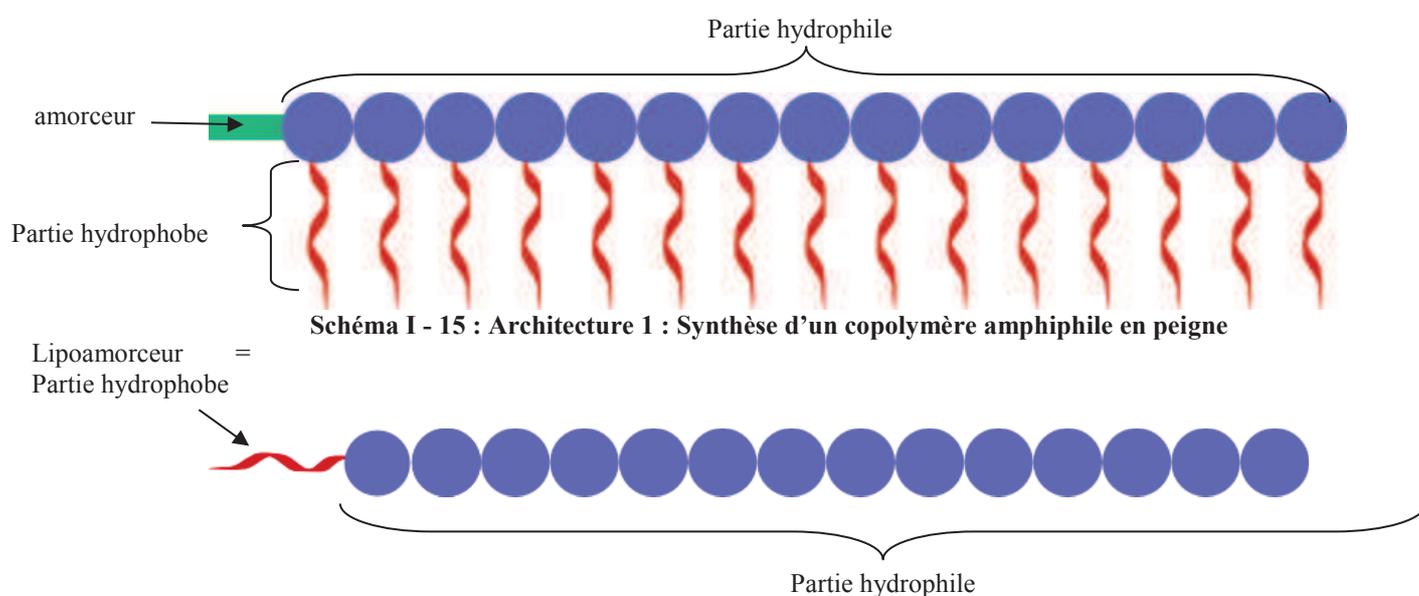


Schéma I - 16 : Architecture 2 : Synthèse d'un copolymère amphiphile à partir d'un lipoamorreur

## B. Synthèse de copolymère amphiphile par couplage chimique

Dans cette partie, le polymère est tout d'abord synthétisé. Après modification chimique, la partie lipide est couplée avec le polymère pour former un copolymère amphiphile. Faces aux nombreux exemples présents dans la littérature, les méthodes de synthèse présentées dans ce paragraphe ne sont pas exhaustives. Il ne s'agit ici que de quelques exemples illustratifs.

### 1. A partir du phosphatidyléthanolamine (PE)

Le copolymère amphiphile poly(éthylène glycol)-phosphatidyléthanolamine (PEG-PE) représente la grande majorité de ces études. Toutefois d'autres systèmes existent<sup>28</sup> (Schéma I - 17).

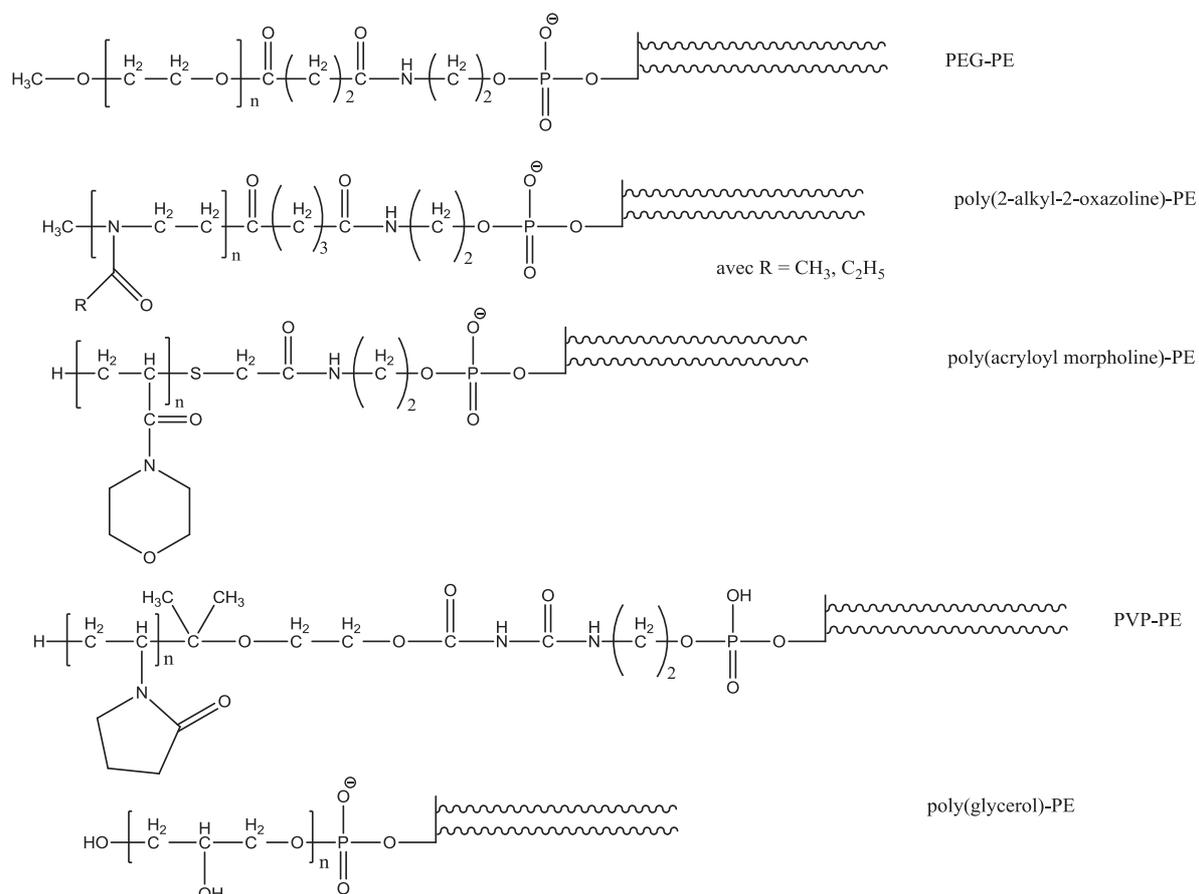
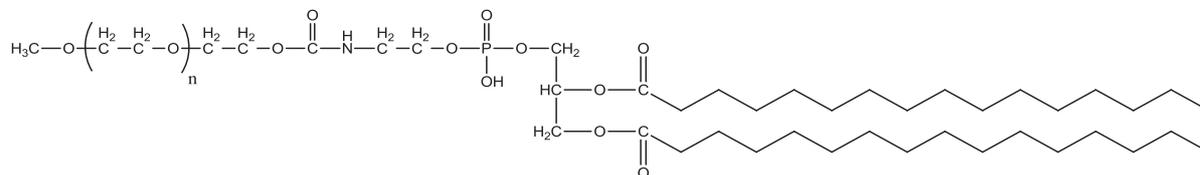


Schéma I - 17 : Différents systèmes PE-polymère existant dans la littérature

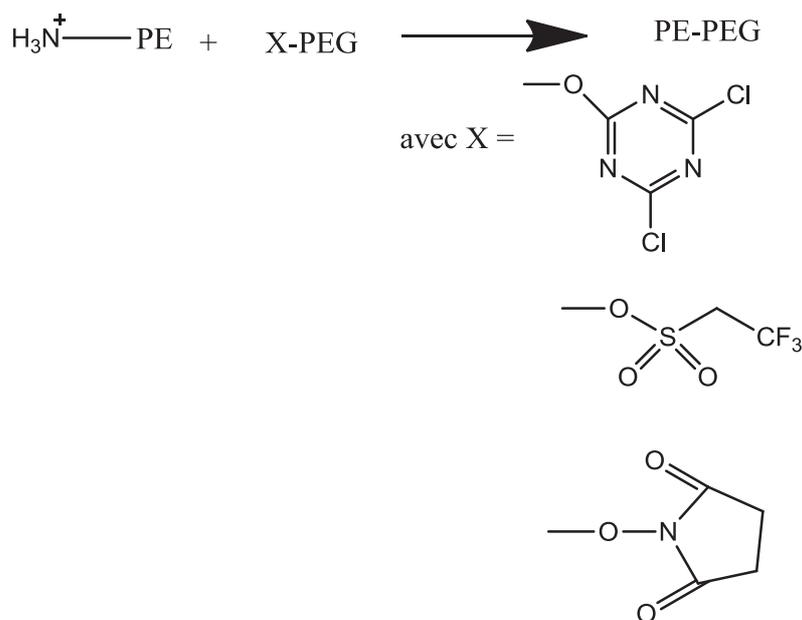
Nous ne présenterons pas dans le détail tous ces systèmes. Nous accentuerons notre étude sur les systèmes PEG-PE et PVP-PE car ils sont très présents dans la littérature.

Le copolymère poly(éthylène glycol)-phosphatidyléthanolamine (PEG-PE) (**Schéma I - 18**) a fait l'objet de nombreuses études en vue d'une application comme vecteur de médicament<sup>29,30</sup>.



**Schéma I - 18 : Exemple d'un copolymère PEG-PE**

Il est utilisé dans le milieu pharmaceutique pour encapsuler la doxorubicine, un anticancéreux, sous le nom de Doxil®. Plusieurs méthodes de synthèse<sup>31</sup>, résumées dans le schéma I - 19, ont été proposées.



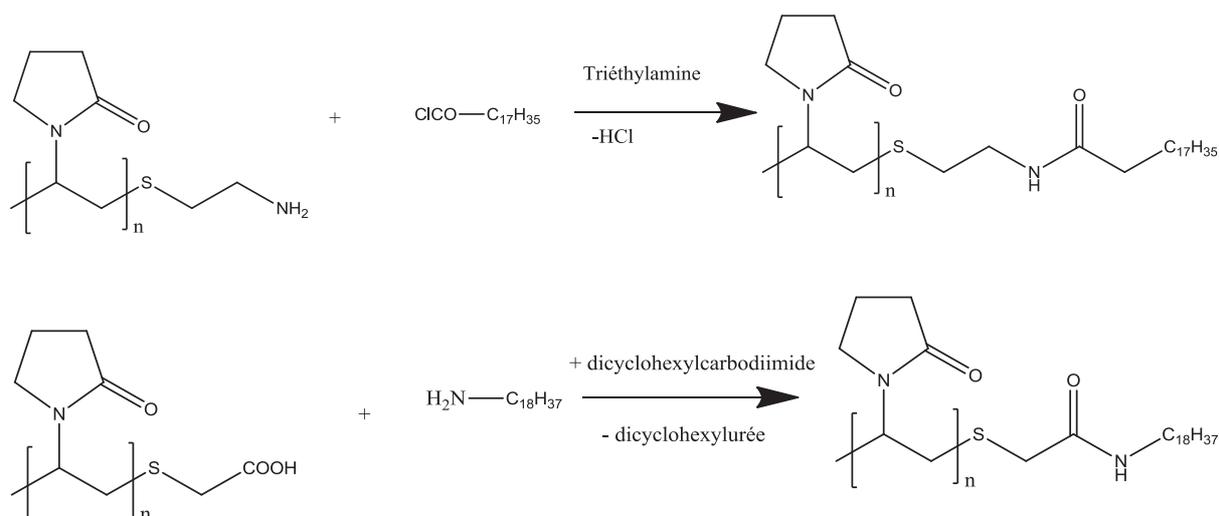
**Schéma I - 19 : Résumé des différentes voies de synthèse pour obtenir le copolymère PEG-PE**

Ces différentes méthodes de synthèse ont été utilisées également pour d'autres polymères hydrophiles comme le poly(N-isopropylacrylamide) ou le poly(N-diméthylacrylamide). En effet, le PEG, bien que très efficace et populaire, n'est pas le seul polymère capable de rendre furtif des objets face au système immunitaire.

## 2. A partir de lipides

Le PEG peut également être chimiquement modifié afin d'introduire en bout de chaîne une chaîne lipide et ainsi former un copolymère amphiphile<sup>32</sup>. Afin de simuler le PE, l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl) propionique (DMPA) subit une acylation en présence du chlorure d'acide 10-undecanoïque ce qui permet de synthétiser un acide avec deux chaînes alkyles. Le dérivé du DMPA est alors couplé avec le PEG via une réaction d'estérification. Le copolymère amphiphile ainsi synthétisé comporte une partie hydrophobe contenant deux chaînes grasses<sup>32</sup>. Les auteurs synthétisent de cette manière deux copolymères amphiphiles, l'un avec  $M_{n\text{PEG}} = 2000 \text{ g/mol}$ , l'autre avec  $M_{n\text{PEG}} = 5000 \text{ g/mol}$ . L'étude du comportement en milieu aqueux de ces copolymères révèle qu'ils s'auto-associent sous forme de micelles à des cmc basses (respectivement,  $2,27 \mu\text{mol/L}$  et  $5,46 \mu\text{mol/L}$ )<sup>32</sup>.

Par ailleurs, un autre système attire aussi l'attention, il s'agit du copolymère lipide-polyvinylpyrrolidone (lipide-PVP) qui est reconnu comme une alternative prometteuse aux systèmes lipide-PEG<sup>33</sup>. La synthèse de ces systèmes se décompose en deux étapes. Tout d'abord, la PVP est obtenue par polymérisation radicalaire en présence de mercaptoéthylamine ou d'acide mercapto-acétique comme amorceur de la réaction. L'utilisation de ces amorceurs permet d'introduire, respectivement, des groupements amine et acide carboxylique en bout de chaîne du polymère. Comme le représente le **schéma I - 20**, ces groupements terminaux servent de point d'ancrage à la partie hydrophobe.

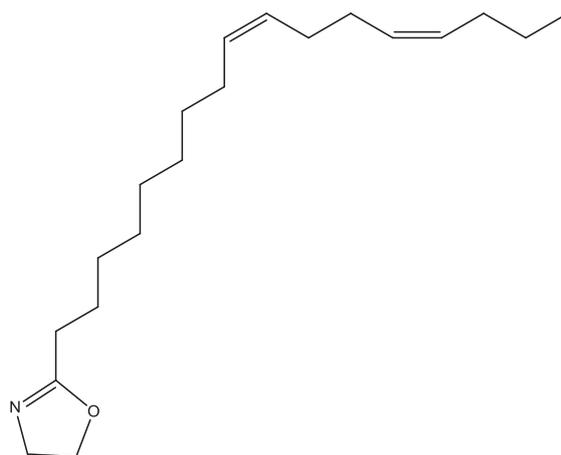


**Schéma I - 20 : Couplage de la partie hydrophobe avec le PVP par deux voies de synthèse.**

Les copolymères amphiphiles lipide-PNIPAM<sup>34</sup> et PE-Poly(oxazoline)<sup>35</sup> sont synthétisés d'une façon similaire à celle décrite juste au-dessus du point de vue de l'introduction des chaînes grasses en extrémité de chaîne.

### 3. A partir d'huile végétale

En 2006, R. Hoogenboom et U. S. Schubert<sup>36</sup> synthétisent par polymérisation assistée par micro-ondes le poly(2-acide linoléique-2-oxazoline) (**Schéma I - 21**) à partir d'un monomère modifié. Ils utilisent de l'huile de soja comme produit de départ pour la synthèse du monomère.



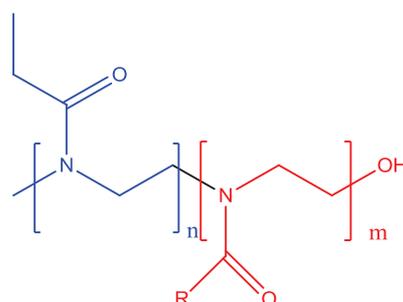
**Schéma I - 21 : Le monomère 2-acide linoléique -2-oxazoline**

L'huile de soja est constituée par ordre d'importance d'acide linoléique, oléique, palmitique, linoléique et stéarique. Le monomère obtenu à la fin est donc un mélange de 2-

oxazoline avec les différents acides gras. Pour plus de clarté, le monomère est appelé 2-acide linoléique-2-oxazoline puisqu'il s'agit de l'acide majoritaire dans l'huile de soja. En moyenne, le monomère contient une chaîne de 17 carbones avec 1,5 insaturation. L'amorceur utilisé est le tosylate de méthyle.

Les polymères obtenus ont une masse molaire moyenne en nombre allant de 2000 à 12000 g/mol avec une polymolécularité autour de 1,2.

Toutefois, ils sont totalement hydrophobes. En incorporant dans cette chaîne une partie poly(2-éthyl-2-oxazoline), un copolymère amphiphile poly(2-éthyl-2-oxazoline)-*b*-poly(2-acide linoléique-2-oxazoline)<sup>37</sup> est synthétisé (**Schéma I - 22**).



**Schéma I - 22 : Structure du copolymère amphiphile synthétisé par ROP à partir d'huile de soja avec R = chaîne lipidique**

Le poly(2-éthyl-2-oxazoline) forme la partie hydrophile tandis que le poly(2-acide linoléique-2-oxazoline) constitue la partie hydrophobe.

Deux copolymères ont été préparés avec les compositions suivantes des deux blocs :

**Tableau I - 8 : Principales caractéristiques des copolymères P(EtOx)-*b*-P(soyOx) synthétisés**

Copolymère	DP <sub>EtOx,RMN</sub>	DP <sub>soyOx,RMN</sub>	M <sub>n,SEC</sub> (g/mol)	Ip <sub>SEC</sub>
<b>1</b>	68	11	8000	1,2
<b>2</b>	68	18	9100	1,19

Les copolymères obtenus présentent des masses molaires moyennes en nombre respectivement de 8000 et 9100 g/mol avec un indice de polymolécularité inférieur ou égal à 1,2.

Ces copolymères amphiphiles ont la capacité de s'auto-assembler dans l'eau sous forme de micelles d'une dizaine de nanomètres de rayon hydrodynamique. Toutefois, aucune valeur de concentration micellaire critique n'est mentionnée.

En règle générale, les copolymères amphiphiles greffés montrent une tendance à s'agréger par rapport à un copolymère amphiphile linéaire plus stable.<sup>15</sup> Ceci est dû à la rigidité du bloc hydrophobe et au faible nombre d'unimères qui forment une micelle. Les blocs hydrophobes peuvent encore se retrouver en contact avec l'eau. Les interactions entre les blocs hydrophobes se font donc plus facilement et provoquent ainsi la formation d'agrégats.

#### 4. Propriétés générales de ces systèmes

- a) Des copolymères amphiphiles pour stabiliser des liposomes aux systèmes micellaires

Les systèmes PEG-PE ont été tout d'abord étudiés pour stabiliser les liposomes et augmenter leur temps de circulation dans le sang. Ainsi le copolymère PEG-PE peut être incorporé dans la bicouche des liposomes (**Schéma I - 23**).

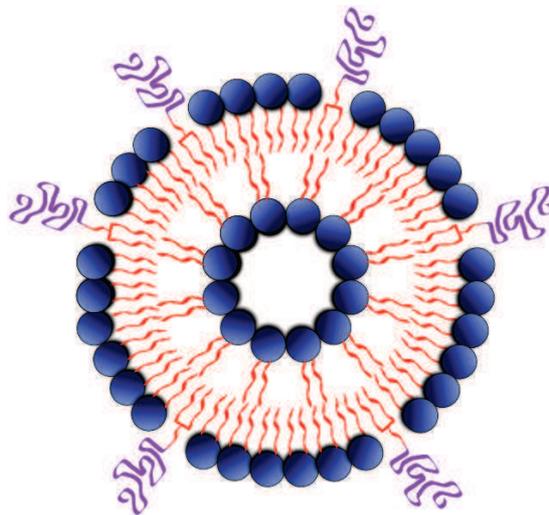


Schéma I - 23 : Copolymère PEG-PE incorporé dans la bicouche d'un liposome

La présence du PEG permet de rendre furtif le liposome<sup>38,39</sup> et d'obtenir un temps de demi-vie dans le sang supérieur à 48 h<sup>31</sup>. Des résultats similaires à ceux du PEG ont été obtenus avec la PVP<sup>28</sup>. Plus récemment, un lipide-PEG a été synthétisé afin de stabiliser des nanoparticules magnétiques<sup>40</sup> par estérification du PEG avec différents acides gras.

Tous ces systèmes sont amphiphiles et présentent, de ce fait, une cmc en milieu aqueux. En effet, utilisés seuls, ils forment des micelles dans l'eau. Ils peuvent donc être utilisés comme vecteur de médicament ou agent révélateur<sup>18</sup>. Nous allons donc nous appliquer à décrire ces différents systèmes micellaires et à mettre en évidence l'influence des parties hydrophile et hydrophobe.

### b) Influence de la partie hydrophile sur la micellisation

Les copolymères amphiphiles issus de dérivés lipidiques représentent une part importante des travaux de V. P. Torchilin, V.S. Trubetskoy et A.N Lukyanov. En particulier, le copolymère PEG-PE a été étudié de façon très détaillée<sup>29</sup>.

On s'aperçoit que, pour une gamme de copolymères de faibles masses molaires moyennes en nombre (de 750 à 5000 g/mol), les cmc observées sont basses (entre  $6.10^{-6}$  mol/L et  $1.10^{-5}$  mol/L) permettant ainsi d'obtenir des objets stables. La taille des objets varie entre 10 et 40 nm selon les masses molaires moyennes en nombre. Il s'agit donc d'objets relativement petits, ce qui favorise l'effet EPR. La couronne en PEG permet d'obtenir un long temps de circulation dans le sang, ce temps de vie dépendant de la longueur de la chaîne hydrophile. En effet, plus la chaîne hydrophile est longue, plus le temps de circulation dans le sang s'en trouve amélioré<sup>29,41</sup>. La capacité d'encapsulation de ces copolymères a été étudiée. Pour un principe actif donné, la capacité d'encapsulation est similaire quelle que soit la masse molaire du copolymère, environ 30 % pour la chlorure de triméthyl ester et la vitamine K3, 20% pour le Tamoxifen et 1% pour le Paclitaxel. La différence de capacité d'encapsulation entre la Vitamine K3 et la Paclitaxel est très importante. On voit ici l'importance de l'affinité cœur/principe actif. La capacité d'encapsulation est donc aussi liée à l'hydrophobie du médicament.<sup>17</sup>

### c) Influence de la chaîne hydrophobe sur la micellisation

En règle générale, la longueur de la chaîne hydrophobe semble avoir plus d'influence sur la formation des nanoparticules, leurs propriétés physico-chimiques et la capacité d'encapsulation<sup>42</sup>. Différents copolymères lipide-PEG-lipide ont été étudiés en faisant varier la longueur de la partie lipide.

Tout d'abord, il faut bien noter que le copolymère contenant deux parties hydrophobes s'auto-assemble en milieu aqueux sous forme de micelles « fleur » (**Schéma I - 24**). La structure diffère donc de celle étudiée précédemment.

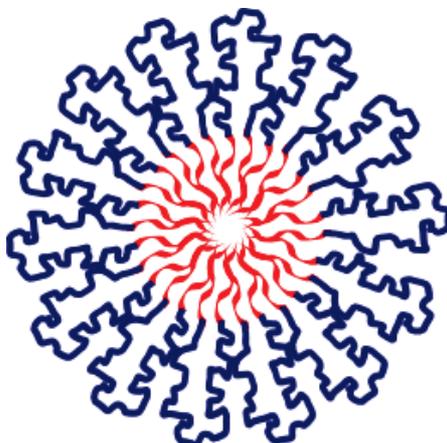


Schéma I - 24 : Représentation d'une micelle-fleur

Toutefois l'importance de la longueur de la chaîne hydrophobe est sans équivoque. En effet, les objets les plus stables et les plus petits sont obtenus pour des longueurs de chaînes entre C16 et C20. La meilleure capacité d'encapsulation est obtenue avec l'acide lignocérique (C20). En effet, elle passe de 16% avec l'acide myristique (C14) à 20% avec l'acide lignocérique. Il est à souligner ici qu'à longueur de chaîne hydrophile et taille d'objet similaire, la capacité d'encapsulation augmente quand la balance hydrophile-lipophile (HLB) diminue, c'est-à-dire quand le système devient plus hydrophobe. Il a été démontré que, de manière générale, les micelles à base de polymère montrent une bonne capacité d'encapsulation et les principes actifs encapsulés dans un cœur lipide sont plus durablement liés à la micelle<sup>12</sup>.

Une étude avec un autre polymère hydrophile, la PVP, amène aux mêmes structures micellaires<sup>33</sup>. Différents copolymères ont été synthétisés à partir d'acide palmitique et d'acide stéarique, avec une longueur de bloc PVP comprise entre 1500 et 15000 g.mol<sup>-1</sup>. Ces systèmes forment spontanément des micelles en milieu aqueux avec des cmc basses (entre 2.10<sup>-6</sup> et 2.10<sup>-4</sup> mol/L) bien qu'elles aient une tendance à être plus élevées qu'avec le PEG. De plus la cmc semble augmenter avec la masse molaire du PVP ce qui ne paraît pas être le cas avec le PEG. Toutefois, les micelles formées par un copolymère PVP-lipide peuvent être considérées

comme stables. Quant aux tailles des objets obtenus en solution, elles sont similaires à celles obtenues avec les systèmes PEG-lipide, c'est-à-dire entre 10 et 20 nm.

d) Conclusion

Toutes ces études démontrent bien l'intérêt des copolymères amphiphiles comportant un bloc lipidique. Cependant, la purification des copolymères obtenus par la voie de couplage est difficile requérant régulièrement plusieurs étapes de dialyse, de lyophilisation et de purification par dissolution<sup>42</sup>.

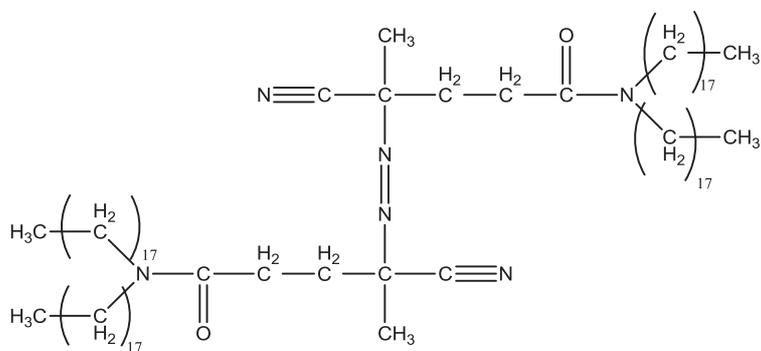
Afin d'éviter ces inconvénients, la deuxième voie de synthèse propose une solution originale : synthétiser à partir d'huile végétale un amorceur permettant la polymérisation ultérieure d'un monomère.

### C. Utilisation du lipide comme amorceur de la réaction de polymérisation

#### 1. Polymérisation classique

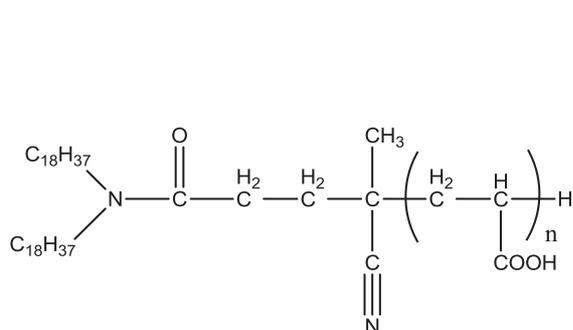
Afin de synthétiser un copolymère amphiphile à base d'acide acrylique ou de N-isopropylacrylamide (NIPAM) par polymérisation radicalaire classique, un nouveau type d'amorceur a été proposé<sup>43,44</sup>. Ce nouvel amorceur (**Schéma I – 25**) comporte des parties lipidiques et permet d'insérer une partie hydrophobe dans le copolymère.

L'amorceur, comme le présente le **schéma I - 25**, possède quatre longues chaînes C18. Il est préparé par réaction entre la dioctadécylamine et le disuccinimidyl 4,4'-azobis-(4-cyanovalérate).

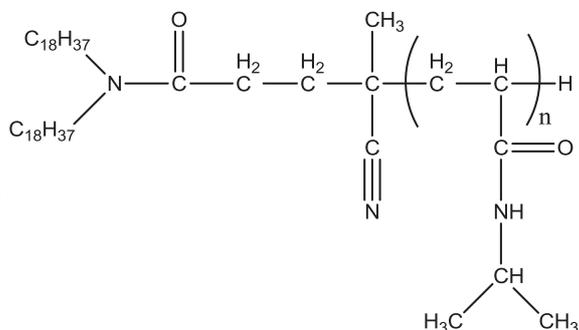


**Schéma I - 25 : Lipoamorceur pour une polymérisation radicalaire**

Comme l'AIBN (azobisisobutyronitrile), ce lipoamorceur forme deux radicaux séparant ainsi les chaînes lipidiques. Le copolymère final possède donc deux chaînes grasses (**Schémas I – 26 et I - 27**).



**Schéma I - 26 : lipide-b-PAA**



**Schéma I - 27 : lipide-b-PNIPAM**

Le système lipide-*b*-PAA synthétisé ici est utilisé pour former des liposomes mixtes avec le L- $\alpha$ -Dipalmitoylphosphatidylcholine en milieu aqueux et ne rentre donc pas dans le cadre de notre étude car la formation de micelles avec ce copolymère amphiphile n'a pas été étudiée. Nous nous consacrons donc ici au second système qui forme des micelles en milieu aqueux. Les copolymères synthétisés sont très polydisperses. Ils présentent en RMN une masse molaire moyenne en nombre de 32000 et 61000 g/mol avec une cmc faible respectivement de  $1,56 \cdot 10^{-6}$  mol/L et  $1,49 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Les micelles obtenues ont, de ce fait, des tailles assez importantes d'environ 70 nm. Le système présente une LCST (lower critical solution temperature) autour de  $32^\circ\text{C}$ <sup>34</sup>, c'est-à-dire que le système s'agrège au-delà de cette température. Cette LCST est similaire à celle du PNIPAM seul. Ceci peut paraître étrange car il est connu que la présence d'une partie hydrophobe a tendance à diminuer la LCST<sup>34</sup>, mais peut être expliqué par le fait que la partie hydrophobe formant le cœur des micelles ne se trouve pas en contact de l'eau et donc n'influence pas la LCST. Cette hypothèse a été vérifiée dans plusieurs études similaires dans lesquelles ont été synthétisés des PNIPAM- $C_n$  (avec  $n = 3, 8, 10, 12, 14, 18$ )<sup>34 45</sup>. Les auteurs observent une diminution de la LCST pour les PNIPAM- $C_n$  avec  $n < 14$  par rapport au PNIPAM seul. Toutefois, le PNIPAM-C18 présente une LCST similaire à celle du PNIPAM seul. Cette étude confirme également l'hypothèse émise dans le paragraphe 1- a) v.), à savoir que les meilleurs résultats en termes de micellisation sont obtenus pour des chaînes grasses supérieures à C14.

## 2. Polymérisation contrôlée

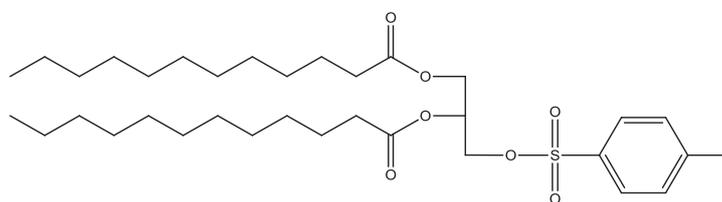
Cette voie de synthèse consiste à synthétiser de façon contrôlée un copolymère à partir d'un lipoamorceur. Très peu d'études portent sur cette problématique. Ceci est d'ailleurs surprenant pour Meier et. al. qui insistent dans leur revue<sup>23</sup> sur ce fait.

Plusieurs manières de synthétiser de façon contrôlée un copolymère amphiphile à partir d'un lipoamorceur ont été rapportées. En effet, la CROP (Cationic Ring Opening Polymerization = polymérisation cationique par ouverture de cycle), l'ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization = polymérisation radicalaire par transfert d'atomes) et la RAFT (Reversible Addition - Fragmentation chain Transfert = addition-fragmentation réversible par transfert de chaîne) sont autant d'exemples où l'amorceur peut contenir une chaîne lipidique.

### a) Par CROP

#### i. A partir de PE

Le lipoamorceur synthétisé (**Schéma I - 28**) est issu du PE et comporte deux chaînes hydrophobes.



**Schéma I - 28 : 1,2-Didodécanoylpropyl-p-toluènesulfonate**

Le copolymère final PE-*b*-polyoxazoline présente des  $M_n$  entre 3700 et 6500 g/mol avec des indices de polymolécularité compris entre 1,27 et 1,32. La partie hydrophile est relativement petite. Cette étude révèle que ce lipoamorceur tosylé manque d'efficacité à l'amorçage et des réactions de transfert ont été observées d'où un indice de polymolécularité important<sup>46</sup>.

#### ii. A partir de chaînes alkyles issues de la pétrochimie

Les amorceurs commerciaux suivants ont été testés pour polymériser de façon contrôlée le monomère 2-méthyl-2-oxazoline :

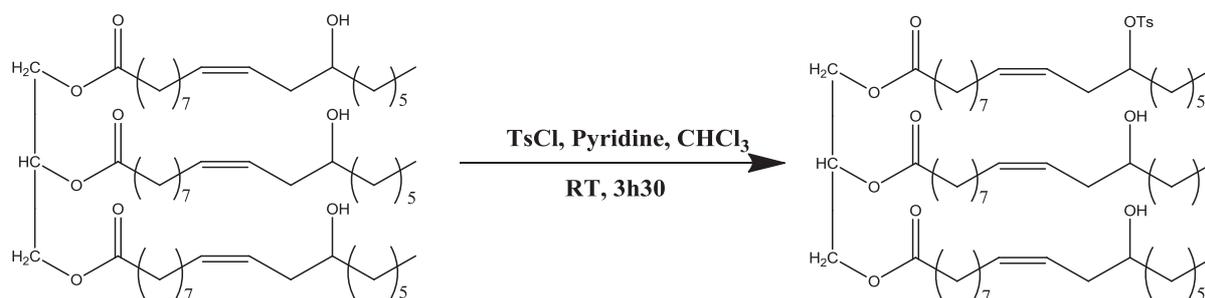
- Iodométhane
- Iodododécane
- Iodoctadécane.

Les auteurs démontrent le caractère contrôlé de la réaction de polymérisation par CROP via une étude cinétique sur l'amorceur iodoctadécane<sup>47</sup>. Les copolymères synthétisés présentent des masses allant de 2000 à 8000 g/mol et une polymolécularité de 1,2.

Par ailleurs, une étude en milieu aqueux a été réalisée sur les copolymères PO<sub>x</sub>-C<sub>12</sub> et PO<sub>x</sub>-C<sub>18</sub> d'environ 5000 g/mol avec une polymolécularité d'environ 1,1-1,2. Ils présentent des cmc respectivement de  $7,3 \cdot 10^{-5}$  mol/L et  $3,7 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Il s'agit de cmc faibles prouvant une bonne stabilité du système. De plus, nous avons ici la confirmation de la diminution de la cmc, et donc d'une meilleure stabilité du système, quand la partie hydrophobe augmente. Il est à noter qu'aucune propriété thermosensible n'est attendue ici, le groupement méthyle ne le permettant pas.

### iii. A partir d'huile végétale

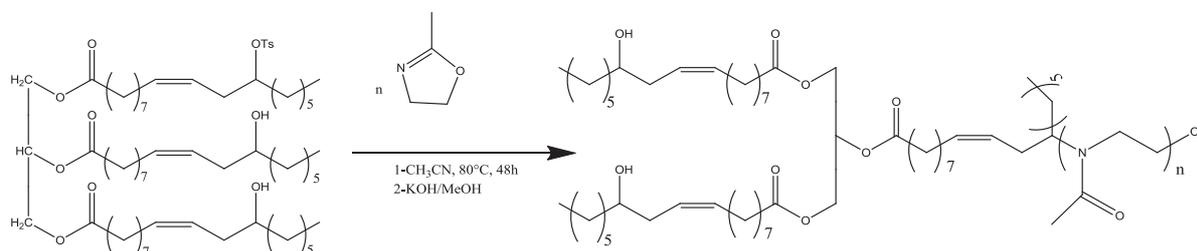
Les principaux polymères synthétisés à partir d'huile végétale sont des polyoxazolines. En effet, un lipoamorceur tosylé a été obtenu à partir d'huile de ricin<sup>48</sup>. L'huile de ricin subit, ici, une tosylation partielle (**Schéma I - 29**) afin d'introduire sur une seule chaîne le groupe partant tosylate.



**Schéma I - 29 : Synthèse d'un « lipoamorceur » à partir d'huile de ricin**

Le lipoamorceur ainsi synthétisé est ensuite engagé dans la polymérisation de la 2-méthyl-2-oxazoline. La synthèse n'est pas réalisée à l'aide de micro-ondes d'où un temps de

réaction long. En effet, le lipoamorceur et le monomère sont, dans ce cas, solubilisés dans de l'acétonitrile et chauffés à 80°C pendant deux jours (**Schéma I - 30**).



**Schéma I - 30 : Synthèse ROP du lipide-*b*-poly(2-méthyl-2-oxazoline)**

Les copolymères synthétisés sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau I - 9 : Principales caractérisations des copolymères amphiphiles lipide-*b*-Poly(2-méthyl-2-oxazoline) synthétisés**

	DP <sub>n, SEC</sub>	Mn,SEC (g/mol)	IpSEC
<b>CO-PO<sub>x5</sub></b>	5	1350	1,06
<b>CO-PO<sub>x10</sub></b>	9,3	1720	1,1
<b>CO-PO<sub>x15</sub></b>	10,3	1810	1,12
<b>CO-PO<sub>x20</sub></b>	15,2	2220	1,12

Les copolymères synthétisés sont de faibles masses molaires moyennes en nombre, entre 1300 et 2200 g/mol et la polymolécularité se situe entre 1,06 et 1,12. Le contrôle de la réaction obtenu est satisfaisant.

Le comportement en milieu aqueux de ces copolymères amphiphiles a été étudié. Il s'avère qu'ils s'auto-assemblent dans l'eau avec une concentration d'agrégation critique (cac) relativement basse autour de  $2,5 \cdot 10^{-4}$  et  $3 \cdot 10^{-4}$  mol/L pour les copolymères CO-PO<sub>x5</sub> et CO-PO<sub>x10</sub>. La taille des objets en solution est environ de 200-300 nm ce qui correspond à la taille d'agrégats. Ce système amphiphile sort du cadre de notre étude car il ne forme pas de micelle en solution aqueuse.

#### b) Par RAFT

Le lipoamorceur synthétisé (**Schéma I - 31**) est issu du L- $\alpha$ -phosphatidyléthanolamine dimyristol et présente deux chaînes hydrophobes en C18.

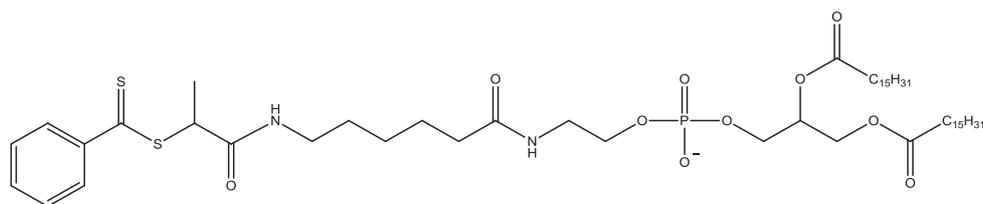


Schéma I - 31 : Lipoamorceur issu du L- $\alpha$ - phosphatidyléthanolamine dimyristol

Ce lipoamorceur est engagé dans la polymérisation de l'acryloylmorpholine<sup>49</sup>. Les copolymères étudiés comportent une partie hydrophile importante avec des tailles entre 9500 et 51000 g/mol et une polymolécularité autour de 1,1. Les auteurs démontrent un contrôle efficace de la polymérisation de l'acryloylmorpholine par RAFT avec ce lipoamorceur.

c) Par ATRP

Plusieurs lipoamorceurs ont été synthétisés à partir de chaînes alkyles issues de la pétrochimie ou du PE (Schéma I – 32)<sup>50</sup>.

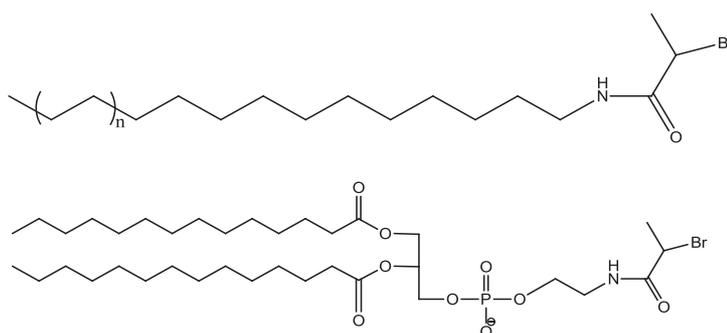


Schéma I - 32 : Le lipoamorceur N-isopropyl-2-bromo-propionamide et un lipoamorceur issu du L- $\alpha$ - phosphatidyléthanolamine dimyristol

Ces lipoamorceurs sont engagés dans la polymérisation d'acrylamide par ATRP. Les copolymères étudiés comportent une partie hydrophile importante avec des tailles entre 9000 et 17000 g/mol pour le PE-*b*-polyacrylamide. Les auteurs rapportent un bon contrôle de la polymérisation, néanmoins, il est à signaler que l'étude cinétique a été réalisée sur un amorceur modèle, le N-isopropyl-2-bromopropionamide et non pas sur l'amorceur issu du PE. De plus, les indices de polymolécularité n'ont pas pu être déterminés.

Pour tous les cas présentés ici, l'application sort du cadre de nos travaux. En effet, ils sont utilisés pour stabiliser des vésicules ou des lipoparticules et pour former des films bicouches.

### Conclusion générale

Cette étude bibliographique met bien en évidence l'intérêt et la large utilisation des liposomes pour la vectorisation de principe actif mais en souligne également les limites. En effet, leur grande taille favorise leur élimination du système sanguin et donc limite la libération contrôlée grâce à l'effet EPR.

Afin de contourner cet inconvénient, nous avons choisi de nous intéresser aux micelles à base de polymère comportant un bloc hydrophobe lipidique. En effet, ces systèmes peuvent allier de multiples avantages liés :

- à leur petite taille qui favorise un long temps de circulation dans le sang, le ciblage par l'effet EPR et la furtivité du système.
- à la nature du bloc hydrophobe : un bloc hydrophobe issu d'huile végétale permet d'améliorer la biocompatibilité. L'huile de lin a été choisie comme source des blocs hydrophobes du fait de sa large disponibilité locale, de la longueur de ses chaînes grasses et de la présence d'insaturations sur celles-ci qui permettront de stabiliser à posteriori les micelles.
- aux polymères hydrophiles utilisés qui permettent d'améliorer la furtivité, la stabilité et d'obtenir un contrôle de la libération selon l'environnement grâce à l'utilisation de polymère intelligent.
- à la technique de polymérisation contrôlée qui permet de contrôler la structure finale du copolymère amphiphile et ainsi de sa HLB.

La large littérature sur des copolymères amphiphiles comportant des chaînes lipidiques démontre bien leur intérêt, cependant très peu d'études portent sur l'utilisation d'une technique de polymérisation contrôlée lors de leur synthèse. Or cette voie permet un contrôle précis de la composition et de la structure finale et évite de nombreuses étapes de purification. C'est pourquoi nous avons choisi de nous intéresser à cette approche pour synthétiser des copolymères amphiphiles lipide-*b*-(polymère intelligent).

### Internet

[w1] : **Patrick Couvreur**, « Super Vector ! », *La revue pour l'histoire du CNRS* [En ligne], 24 | 2009, mis en ligne le 05 octobre 2009, consulté le 10 juillet 2013. URL : <http://histoire-cnrs.revues.org/9061>

[w2] : <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/glossaire/mot/vectorisationPlus.htm>

[w3] : [www.drugbank.ca/drugs/DB01248](http://www.drugbank.ca/drugs/DB01248)

[w4] : [www.inspiralis.com/go/anti\\_cancer\\_agents.php](http://www.inspiralis.com/go/anti_cancer_agents.php)

[w5] : [www.pharmaetudes.com/ressources/.../section5/42-anticancereux.pdf](http://www.pharmaetudes.com/ressources/.../section5/42-anticancereux.pdf)

1. Konno, T., Watanabe, J. & Ishihara, K. Enhanced solubility of paclitaxel using water-soluble and biocompatible 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. *Journal of biomedical materials research. Part A* **65**, 209–14 (2003).
2. Sawant, R. . R. & Torchilin, V. P. Multifunctionality of lipid-core micelles for drug delivery and tumour targeting. *Molecular Membrane Biology* **27**, 232–246 (2010).
3. Jones, M. & Leroux, J. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* **48**, 101–11 (1999).
4. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release* **65**, 271–84 (2000).
5. Maeda, H., Sawa, T. & Konno, T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *Journal of controlled release* **74**, 47–61 (2001).
6. Maeda, H. SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews* **46**, 169–85 (2001).
7. Letchford, K. & Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* **65**, 259–69 (2007).
8. Lorin, A., Flore, C., Thomas, A. & Brasseur, R. Les liposomes : description , fabrication et applications. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement* **8**, 163–176 (2004).
9. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surfaces forces*. (1992).
10. Musacchio, T. & Torchilin, V. P. Lipid-Based Delivery Systems : Liposomes and Lipid-Core Micelles - Properties and Applications. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* **194**, 260–292 (2010).
11. Lasic, D. D. in *Handbook of Biological Physics* (R. Lipowsky, E. S.) 491–516 (1995).
12. Musacchio, T. & Torchilin, V. P. Recent developments in lipid-based pharmaceutical nanocarriers. *Frontiers in Bioscience* **16**, 1388–1412 (2011).
13. Lasic, D. D. Novel Applications of liposomes. *TIBTECH* **16**, 307–321 (1998).
14. Barenholz, Y. Liposome application: problems and prospects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **6**, 66–77 (2001).
15. Torchilin, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of controlled release* **73**, 137–72 (2001).
16. Allen, C., Maysinger, D. & Eisenberg, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **16**, 3–27 (1999).

17. Torchilin, V. P. Lipide-Core Micelles for Targeted Drug Delivery. *Current Drug Delivery* **2**, 319–327 (2005).
18. Trubetskoy, V. Polymeric micelles as carriers of diagnostic agents. *Advanced drug delivery reviews* **37**, 81–88 (1999).
19. Kwon, G. S., Naito, M., Kataoka, K., Yokoyama, M; Sakurai, Y., Okano, T. Block copolymer micelles as vehicles for hydrophobic drugs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2**, 429–434 (1994).
20. Kabanov, A. V, Batrakova, E. V & Alakhov, V. Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of controlled release* **82**, 189–212 (2002).
21. Kabanov, A. V, Lemieux, P., Vinogradov, S. & Alakhov, V. Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Advanced drug delivery reviews* **54**, 223–33 (2002).
22. Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S. & Shakesheff, K. M. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical reviews* **99**, 3181–98 (1999).
23. Meier, M. a. R., Metzger, J. O. & Schubert, U. S. Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science. *Chemical Society Reviews* **36**, 1788 (2007).
24. Seniha Güner, F., Yağcı, Y. & Tuncer Erciyes, a. Polymers from triglyceride oils. *Progress in Polymer Science* **31**, 633–670 (2006).
25. Montero de Espinosa, L. & Meier, M. a. R. Plant oils: The perfect renewable resource for polymer science?! *European Polymer Journal* **47**, 837–852 (2011).
26. Sharma, V. & Kundu, P. P. Addition polymers from natural oils—A review. *Progress in Polymer Science* **31**, 983–1008 (2006).
27. Kwon, G. S. & Kataokab, K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. *Advanced drug delivery reviews* **16**, 295–309 (1995).
28. Torchilin, V. P. & Trubetskoy, V. S. Which polymers can make nanoparticulate drugs carriers long-circulating? *Advanced drug delivery reviews* **16**, 141–155 (1995).
29. Lukyanov, A. N. & Torchilin, V. P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Advanced drug delivery reviews* **56**, 1273–89 (2004).
30. Edwards, K., Johnsson, M., Karlsson, G. & Silvander, M. Preparations of Small Unilamellar Liposomes. *Biophysical Journal* **73**, 258–266 (1997).
31. Zalipsky, S. Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* **16**, 157–182 (1995).

32. Tian, L., Yam, L., Wang, J., Tat, H. & Uhrich, K. E. Core crosslinkable polymeric micelles from PEG-lipid amphiphiles as drug carriers. *Journal of Materials Chemistry* **14**, 2317–2324 (2004).
33. Torchilin, V. P., Levchenko, T.S., Whiteman, K.R., Yaroslavov, A.A., Tsatsakis, A.M., Rizos, A.R., Michailova, E.V., Shtilman, M.I. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones synthesis, properties and liposome surface modification. *Biomaterials* **22**, 3035–3044 (2001).
34. Chung, J. E., Yokoyama, M., Sukuki, K., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T. Reversibly thermo-responsive alkyl-terminated poly(N-isopropylacrylamide) core-shell micellar structures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **9**, 37–48 (1997).
35. Woodle, M. C., Engbers, C. M. & Zalipsky, S. New amphipatic polymer-lipid conjugates forming long-circulating reticuloendothelial system-evading liposomes. *Bioconjugate chemistry* **5**, 493–6 (1994).
36. Hoogenboom, R. & Schubert, U. S. Microwave-assisted cationic ring-opening polymerization of a soy-based 2-oxazoline monomer. *Green Chemistry* **8**, 895 (2006).
37. Hoogenboom, R., Leenen, M.A.M., Huang, H., Fustin, C-A., Gohy, J-F., Schubert, U.S. Microwave-assisted synthesis and micellization behavior of soy-based copoly(2-oxazoline)s. *Colloid and Polymer Science* **284**, 1313–1318 (2006).
38. Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. & Huang, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS* **268**, 235–237 (1990).
39. Bedu-Addo, F. K. & Huang, L. Interaction of PEG-phospholipid conjugates with phospholipid: implications in liposomal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **16**, 235–247 (1995).
40. Lim, E.-K., Yang, J., Park, M-Y., Park, J., Suh, J-S., Yoon, H-G., Huh, Y-M., Haam, S. Synthesis of water soluble PEGylated magnetic complexes using mPEG-fatty acid for biomedical applications. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **64**, 111–7 (2008).
41. Constantinides, P. P., Chaubal, M. V. & Shorr, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Advanced drug delivery reviews* **60**, 757–767 (2008).
42. Lee, J., Jung, S-W., Kim, I-S, Jeong, Y-I., Kim, Y-H., Kim, S-H. Polymeric nanoparticle composed of fatty acids and poly ( ethylene glycol ) as a drug carrier. *International journal of pharmaceutics* **251**, 23–32 (2003).
43. Kitano, H. & Ise, N. pH-Responsive Liposomes Which Contain Amphiphiles Prepared. *Macromolecules* **24**, 42–46 (1991).
44. Winnik, F. M., Davidson, A. R. & Hamer, G. K. Amphiphilic Poly(N-isopropylacrylamides) Prepared by Using a Lipophilic Radical Initiator: Synthesis and Solution Properties in Water. *Macromolecules* **28**, 1876–1880 (1992).
45. Ringsdorf, H., Venzmer, J. & Winnik, F. M. Fluorescence Studies of Hydrophobically Modified Poly(Ni-isopropylacrylamides). *Macromolecules* **24**, 1678–1686 (1991).

46. Einzmann, M. & Binder, W. H. Novel functional initiators for oxazoline polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **39**, 2821–2831 (2001).
47. Volet, G., Chanthavong, V., Wintgens, V. & Amiel, C. Synthesis of Monoalkyl End-Capped Poly(2-methyl-2-oxazoline) and Its Micelle Formation in Aqueous Solution. *Macromolecules* **38**, 5190–5197 (2005).
48. Giardi, C., Lapinte, V., Charnay, C. & Robin, J. J. Nonionic polyoxazoline surfactants based on renewable source: Synthesis, surface and bulk properties. *Reactive and Functional Polymers* **69**, 643–649 (2009).
49. Daviot, D., Agosto, F. D. & Spitz, R. Synthesis of Lipid-R-End-Functionalized Chains by RAFT Polymerization . Stabilization of Lipid / Polymer Particle Assemblies. *Macromolecules* **41**, 8346–8353 (2008).
50. Théato, P., Zentel, R. & Schwarz, S. Synthesis of End-Functionalized Lipopolymers and Their Characterization with Regard to Polymer-Supported Lipid Membranes. *Macromolecular Bioscience* **2**, 387–394 (2002).

*Chapitre II*  
*Synthèse des copolymères amphiphiles*

### Introduction

Ce chapitre est consacré à la synthèse contrôlée de copolymères amphiphiles à partir d'huile de lin. L'auto-association des copolymères amphiphiles en milieu aqueux est fortement liée à leur balance hydrophile-lipophile (HLB). Il est donc important dans le cadre de ce projet de contrôler précisément la composition du copolymère. Pour cela, des techniques de polymérisation dites contrôlées sont utilisées afin d'obtenir un parfait contrôle des tailles des chaînes de polymères et ainsi contrôler la HLB finale. Les copolymères amphiphiles choisis présentent la particularité d'être « intelligents », c'est-à-dire qu'ils sont capables de répondre à un stimulus de l'environnement. Nous avons choisi de synthétiser deux types de copolymères intelligents : pH-sensible et thermosensible.

Pour le caractère pH-sensible, le poly(acide acrylique) nous a semblé être un polymère de choix car il présente une très faible toxicité. Concernant la sensibilité aux changements de température, le poly(*N*-isopropylacrylamide) (p(NIPAM)) et le poly(2-isopropyl-2-oxazoline) (p(IpOx)) ont été retenus. Tous deux présentent des températures de transition hydrophile/hydrophobe proches de celle du corps humain et sont largement utilisés dans le cadre d'études biomédicales.

L'approche synthétique se déroule en deux principales étapes (**Schéma II - 1**) :

- 1) Modification chimique de l'huile de lin native afin d'introduire les sites amorceur de polymérisation
- 2) Déclenchement de la polymérisation adéquate afin d'ajouter le bloc synthétique de façon contrôlée.

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

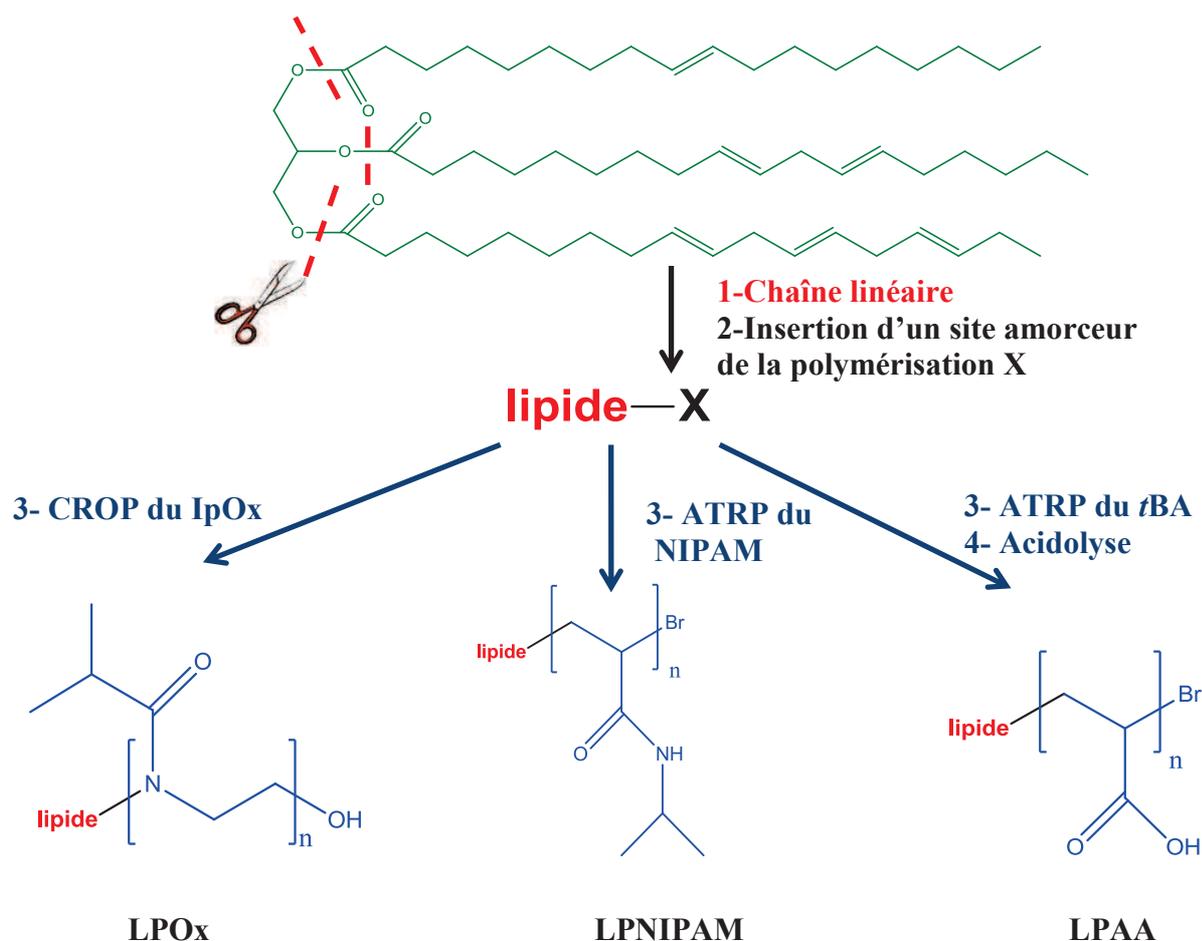


Schéma II - 1 : Stratégies de synthèse des copolymères amphiphiles

Le présent chapitre est découpé en deux parties principales correspondant aux deux techniques de polymérisation contrôlée utilisées. La première partie se focalise ainsi sur la synthèse de deux copolymères amphiphiles par Polymérisation Radicalaire par Transfert d'Atome (ATRP) : le LPAA et le LPNIPAM.

La seconde partie porte sur la synthèse et la caractérisation d'un copolymère amphiphile par Polymérisation par Ouverture de Cycle Cationique (CROP) : le LPOx. Ce travail a été réalisé en collaboration avec un laboratoire de l'Université de Southampton en Angleterre dans le cadre du projet INTERREG IS:CE Chem.



## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

l'autre, l'huile de lin peut présenter une grande hétérogénéité de composition en acides gras. Il est donc important de connaître parfaitement la composition de l'huile de départ.

Afin de déterminer la composition précise de cette huile, nous avons procédé à une analyse en RMN  $^1\text{H}$  (**Figure II - 1**). L'interprétation des spectres est facilitée par une littérature riche sur le sujet<sup>2-6</sup>. Les intégrations nous permettent d'accéder à plusieurs informations importantes :

- 1- La composition massique en acides gras de l'huile
- 2- Le nombre moyen d'insaturations par molécule de triglycéride
- 3- L'indice d'iode

Le détail de ces calculs est présenté en **annexe II - 1**.

**Tableau II - 1 : Caractérisation chimique de l'huile de lin**

<b>Nbre d'insaturations par molécule</b>	<b>6</b>
<b>Indice d'iode (RMN)</b>	<b>178</b>
<b>Indice d'iode (dosage)</b>	<b>175</b>
<b>Composition massique (%)</b>	
<b>Acide linoléique</b>	<b>54</b>
<b>Acide linoléique</b>	<b>9</b>
<b>Acide oléique</b>	<b>24</b>
<b>Acides saturés</b>	<b>13</b>

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

Il a été déterminé que l'huile de lin utilisée présente en moyenne 6 insaturations par molécule de triglycérides. D'après la RMN, l'indice d'iode de l'huile de lin est de 178 ce qui la classe parmi les huiles siccatives. Un dosage des doubles liaisons par la méthode de Wijs permet de confirmer ce résultat. En effet, l'indice d'iode obtenu par dosage des insaturations de l'huile de lin est de 175.

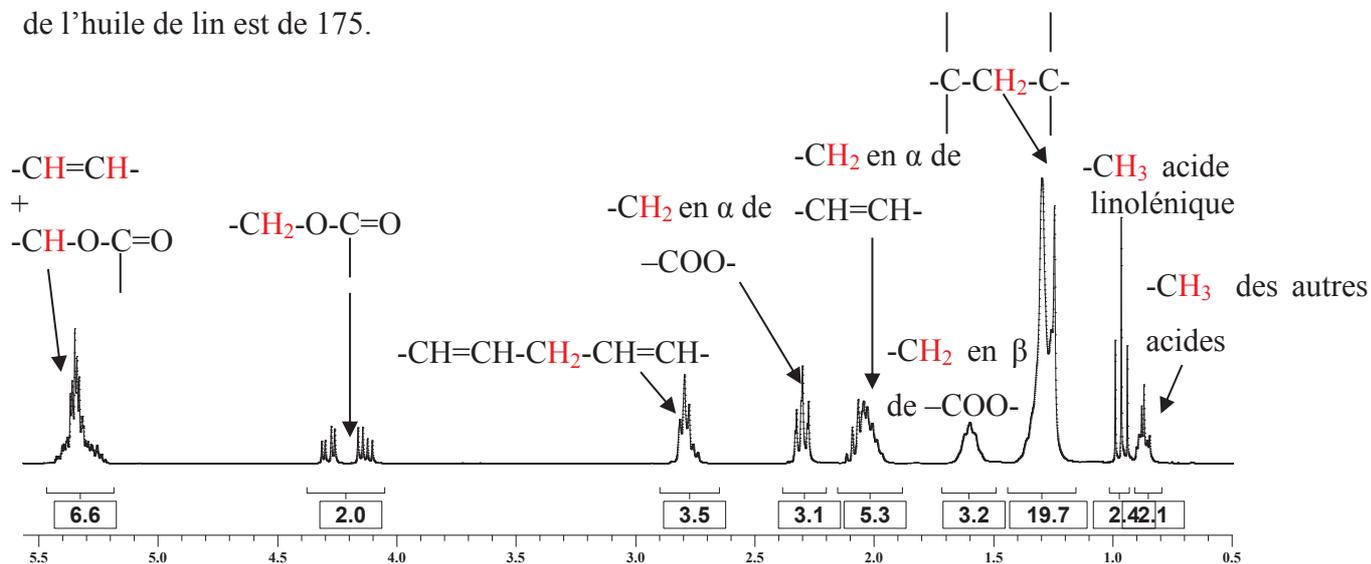
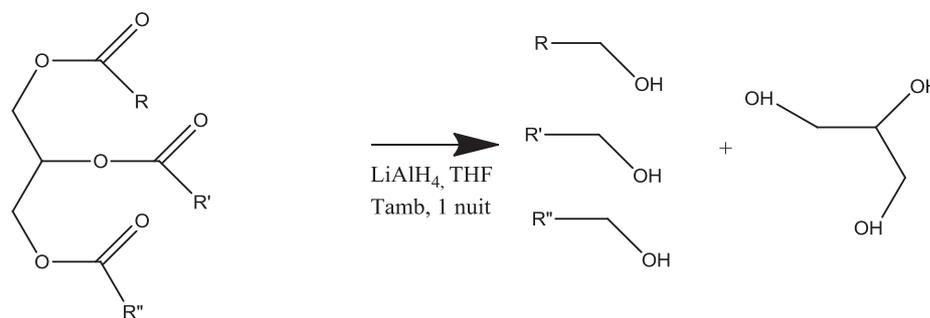


Figure II - 1 : RMN  $^1\text{H}$  de l'huile de lin

### 2. Première étape : Réduction de l'huile de lin en alcool gras

Afin d'obtenir des copolymères finaux linéaires, il est tout d'abord nécessaire d'isoler les chaînes alkyles de l'huile de lin native. Cela est réalisé par réduction des fonctions ester par action d'aluminohydruure de lithium afin de former des alcools gras selon la réaction suivante :



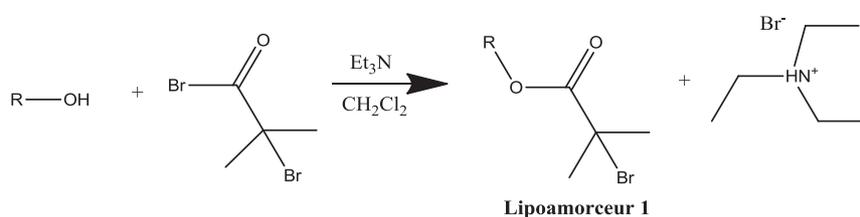
Avec  $R$ ,  $R'$  et  $R''$  : chaînes alkyles (in)saturées

Schéma réactionnel II - 2 : Réduction de l'huile de lin en alcool gras

Le rendement de la réaction est de 89%. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (**Figure II - 2, A et B**) montrent la disparition du signal correspondant aux  $\text{CH}_2$  de la partie glycérol ( $\delta_{\text{CH}_2} = [4,0 - 4,2]$  ppm et l'apparition des protons en  $\alpha$  de la fonction alcool générée ( $\delta_{\text{H}\alpha} = 3,6$  ppm and  $\delta_{\text{H}\beta} = 1,5$  ppm). Les spectres FTIR (**Figure II - 3 A et B**) prouvent la disparition des fonctions ester de l'huile de lin ( $\nu_{\text{C}=\text{O}} = 1742 \text{ cm}^{-1}$  et  $\nu_{\text{C}-\text{O}} = 1159 \text{ cm}^{-1}$ ) et l'apparition du groupement alcool ( $\nu_{\text{O}-\text{H}} = 3329 \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3. Deuxième étape : Estérification de l'alcool gras en lipoamorceur 1

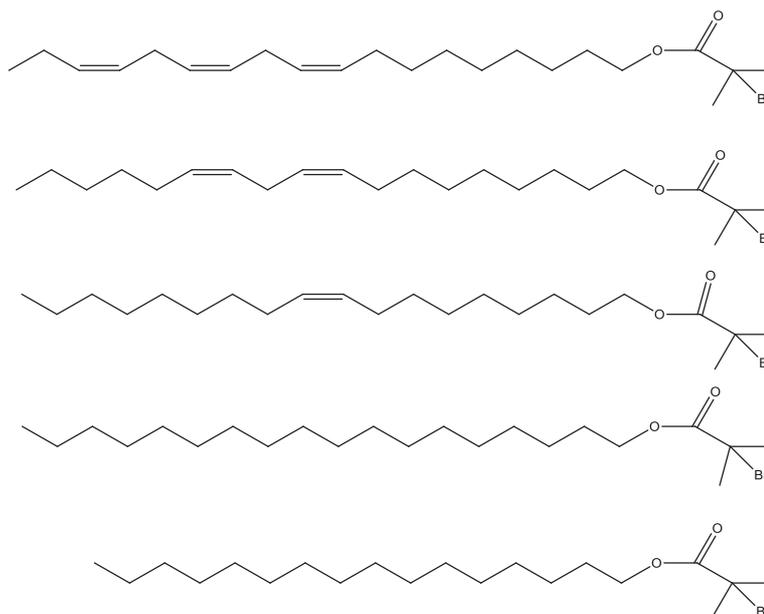
L'estérification de l'alcool par réaction avec un bromure d'acide permet d'insérer en extrémité de chaîne un groupement qui permettra par la suite d'amorcer la polymérisation.



**Schéma réactionnel II - 3 : Estérification de l'alcool gras**

La réaction est conduite dans le dichlorométhane, sous atmosphère inerte, et en présence de triéthylamine. Le produit final est purifié sur une colonne de silice. Le rendement de la réaction est de 65%. Le produit obtenu est composé d'un mélange des différentes chaînes alkyles conformément à la composition initiale de l'huile de lin (**Schéma II - 2**).

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles



**Schéma II - 2 : Mélanges de lipoamorceurs 1 obtenus après réduction de l'huile de lin et estérification de l'alcool gras**

Dans un souci de clarté, la composition statistique du mélange ne sera pas représentée à chaque étape, et seul l'acide linoléique (majoritaire) sera utilisé pour schématiser chaque étape (pour simplifier la représentation, les doubles liaisons seront représentées, par la suite, en configuration E bien qu'elles soient naturellement en configuration Z).

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (**Figure II - 2C**) du produit final montre le déplacement des pics correspondant aux protons en  $\alpha$  et en  $\beta$  de la fonction ester introduite ( $\delta_{\text{H}\alpha} = 4,1$  ppm et  $\delta_{\text{H}\beta} = 1,6$  ppm) ainsi que l'apparition du signal du *gem*-diméthyle ( $\delta = 1,9$  ppm).

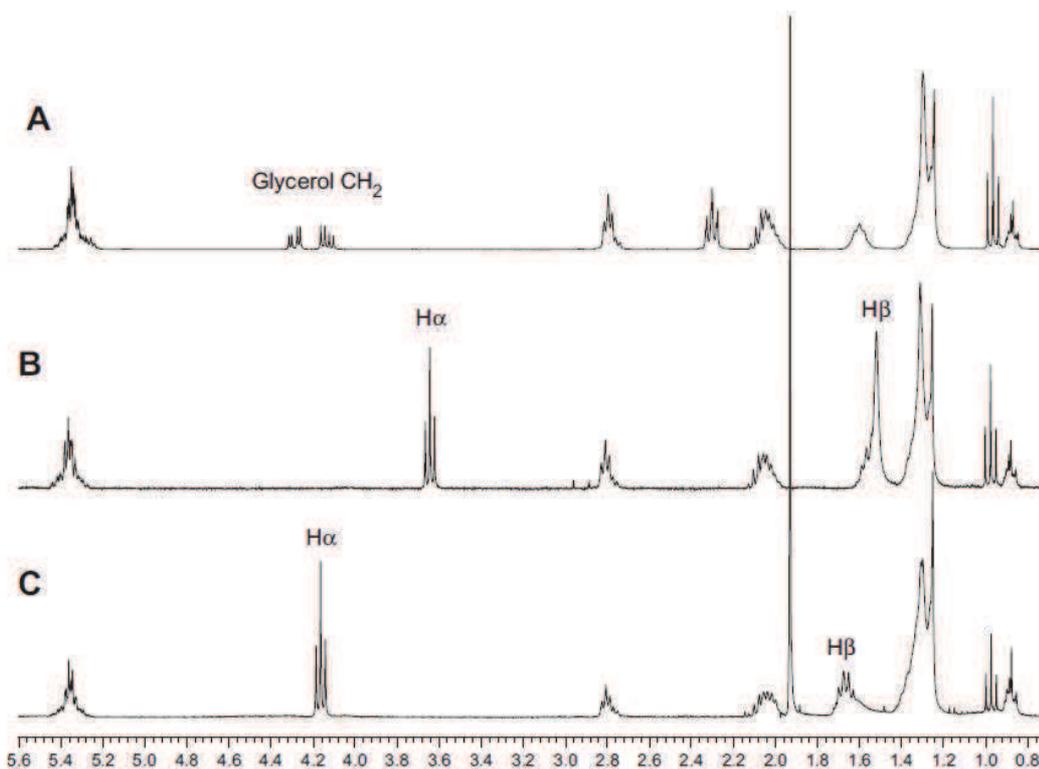
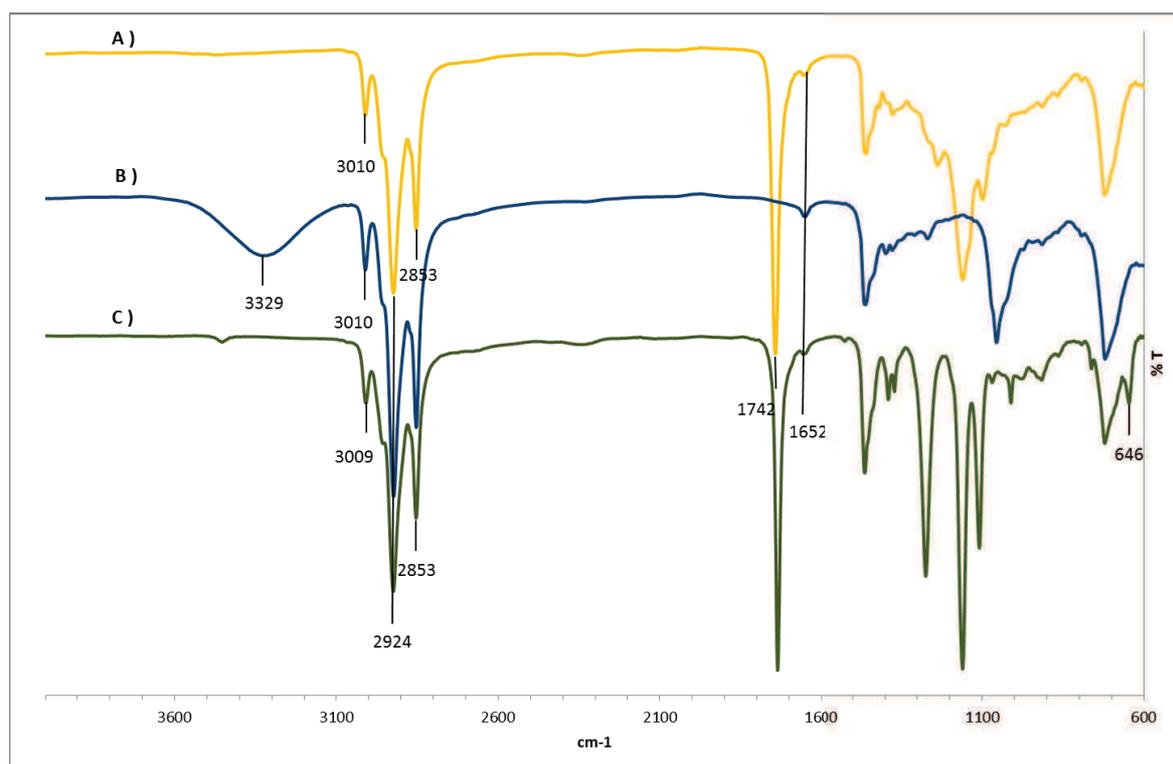


Figure II - 2 : Spectres RMN (A) de l'huile de lin, (B) de l'alcool gras et (C) du lipoamorceur

Le spectre IR (**Figure II - 3C**) montre la disparition de la bande correspondant à la fonction alcool ( $\nu_{\text{OH}} = 3329 \text{ cm}^{-1}$ ) ainsi que la réapparition de la bande correspondant à la fonction ester ( $\nu_{\text{CO}} = 1742 \text{ cm}^{-1}$ ).

Il est important de garder en mémoire qu'à la fin de la synthèse du lipoamorceur 1, nous avons toujours un mélange des chaînes linoléique, linoléique, oléique, stéarique et palmitique.



**Figure II - 3 : Spectres IR de (A) l'huile de lin, (B) de l'alcool gras et (C) du lipoamorceur 1**

#### 4. Conservation des insaturations pendant la synthèse du lipoamorceur 1

Il est crucial de s'assurer de la pérennité des insaturations durant la synthèse. En effet, leur modification chimique pourrait entraîner l'apparition de ramifications lors de l'étape de polymérisation. De plus, elles auront un rôle important dans la suite de l'étude car elles seront exploitées afin de stabiliser les micelles.

Dans un premier temps, l'analyse des spectres RMN et IR au cours de la synthèse du lipoamorceur 1 (LA1) nous indique que les doubles liaisons sont toujours présentes. En effet, nous pouvons voir deux bandes caractéristiques en IR à 1652  $\text{cm}^{-1}$  et 3010  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ ). En RMN, les pics correspondant aux doubles liaisons se situent entre 5,2 et 5,6 ppm.

L'analyse de l'intensité relative des différents signaux en RMN  $^1\text{H}$  permet de remonter au nombre d'insaturations par chaîne (**Annexes II-1 et II-2**). Ces résultats ont été croisés avec ceux de la détermination de l'indice d'iode par la méthode de Wijs (**Annexe II-3**). Les résultats obtenus sont consignés dans le **tableau II - 2**.

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

Tableau II - 2 : Suivi du nombre d'insaturations au cours de la synthèse du lipoamorceur 1

	Suivi RMN <sup>1</sup> H		Méthode de Wijs	
	Indice d'iode calculé	Nbre insaturations/molécule	Indice d'iode mesuré	Nbre insaturations/molécule
Huile de lin	178	6,1	175	6,4
Alcool gras	171	1,8	190	2,0
Lipoamorceur 1	119	2,0	127	2,2

Des résultats similaires sont obtenus entre l'analyse par RMN et le dosage par la méthode de Wijs. Le nombre d'insaturations se retrouve divisé par 3 entre l'huile de lin et l'alcool gras. En effet, l'huile de lin présente 6 insaturations en moyenne par molécule alors que l'alcool gras et le lipoamorceur n'en contiennent plus que 2 en moyenne. Ceci est tout à fait logique, la molécule finale étant composée d'une seule chaîne alkyle contre trois pour l'huile de lin. Les résultats sont donc cohérents avec une préservation quantitative des insaturations.

Par ailleurs, le spectre RMN <sup>1</sup>H différencie les méthyles linoléniques ( $\delta = 0,9\text{ppm}$ ) des méthyles des autres chaînes ( $\delta = 0,82\text{ ppm}$ ). Il est donc possible d'accéder aux différentes proportions de chaque chaîne présente (**Annexes II – 1 et 2**). Le **tableau II - 3** montre que le ratio des différentes chaînes reste similaire au cours de la synthèse.

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

Tableau II - 3 : Evolution du ratio des différentes chaînes grasses au cours de la synthèse

	Huile de lin	Alcool gras	Lipoamorceur 1
<b>chaînes linoléiques</b>	54%	52%	50%
<b>chaînes linoléiques</b>	10%	7%	12%
<b>chaînes oléiques</b>	23%	21%	20%
<b>chaînes saturées</b>	13%	20%	18%

Une analyse au spectromètre de masse permet également de confirmer la présence de toutes les chaînes alkyles et d'accéder aux masses molaires précises de chacune. Ces dernières sont répertoriées dans le tableau ci-dessous. Toutefois les analyses effectuées n'ont pas permis de quantifier les proportions de chaque chaîne.

Tableau II - 4 : Détermination des masses molaires précises pour chaque chaîne

Nom de la chaîne grasse correspondante	m/z
<b>Linoléique</b>	419,3
<b>Linoléique</b>	421,3
<b>Oléique</b>	423,3
<b>Stéarique</b>	425,3
<b>Palmitique</b>	397,3

Les analyses réalisées démontrent donc, non seulement, la pérennité des insaturations au cours de la synthèse du LA1 mais aussi la conservation des proportions de chaque chaîne grasse. Le lipoamorceur 1 obtenu peut donc maintenant être engagé en ATRP afin de former les structures dibloc.

### C. Synthèse du copolymère amphiphile lipide-*b*-poly(acide acrylique)

#### 1. Brève revue de la synthèse du poly(acide acrylique) par ATRP

Le poly(acide acrylique) est couramment utilisé pour composer les vecteurs de médicament<sup>1,7,8</sup>. Ce polymère regroupe les avantages d'être très soluble dans l'eau, biocompatible et pH-sensible.

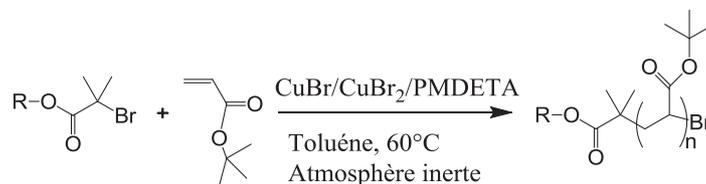
De précédents travaux<sup>9, 10</sup> ont montré que l'ATRP n'est pas efficace pour polymériser de façon contrôlée l'acide acrylique (AA). En effet l'acide acrylique réagit rapidement avec le métal pour donner un complexe carboxylate inefficace en tant que catalyseur<sup>11,12</sup>, empêchant ainsi le bon déroulement de la polymérisation contrôlée. Les indices de polymolécularité obtenus sont alors trop élevés.

En revanche, Matyjaszewski a décrit la synthèse contrôlée de poly(acrylate de *tert*-butyle) (PtBA) par ATRP<sup>13</sup>. Le PAA peut être obtenu à partir du PtBA via une simple réaction d'hydrolyse des motifs *t*BA régulièrement décrite dans la littérature<sup>1, 14</sup>. De plus, le *t*BA étant hydrophobe au même titre que le lipoamorceur, l'ATRP peut être conduite en phase homogène.

La polymérisation du *t*BA apparaît donc comme un choix judicieux pour obtenir un bloc PAA.

#### 2. Optimisation des conditions de synthèse du copolymère lipide-*b*-poly(acrylate de *tert*-butyle)

Plusieurs expériences ont été nécessaires afin d'optimiser le contrôle de la polymérisation (**Schéma réactionnel II - 4**) en ajustant les conditions d'ATRP.



*Avec R = chaînes alkyles (in)saturées*

**Schéma réactionnel II - 4 : Polymérisation par ATRP de l'acrylate de *tert*-butyle**

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

La polymérisation a été conduite tout d'abord dans les conditions décrites dans la littérature comme optimales pour l'ATRP du *t*BA<sup>11, 13</sup> : 60°C, système catalytique cuivre en présence de pentaméthyl-diéthyl-triamine (PMDETA) comme ligand dans les proportions suivantes : [CuBr]:[PMDETA]:[Amorceur] = 0,5:0,5:1. Ce premier essai a conduit à un bon contrôle de la réaction sur les premières de la réaction. Toutefois, le suivi cinétique a révélé une diminution de la concentration en espèces propageantes au cours du temps. Bien que déjà de bonne qualité, nous avons souhaité améliorer encore le contrôle obtenu.

Afin d'obtenir un contrôle optimal de la réaction, plusieurs systèmes catalytiques ont ensuite été testés : CuBr, CuBr/CuBr<sub>2</sub>, CuCl, CuCl/CuCl<sub>2</sub>. Deux ratios [Monomère]/[Amorceur] ont également été testés : 100/1 et 50/1. L'optimisation de l'ATRP du *t*BA est décrite en **annexe II - 4**.

Le contrôle optimal a été obtenu dans les conditions suivantes :

[Monomère]:[Lipoamorceur]:[CuBr]:[CuBr<sub>2</sub>]:[PMDETA]= 50:1:0,5:0,025:0,525

Les polymérisations sont suivies par RMN <sup>1</sup>H et SEC (chromatographie d'exclusion stérique) afin d'établir le contrôle de la réaction.

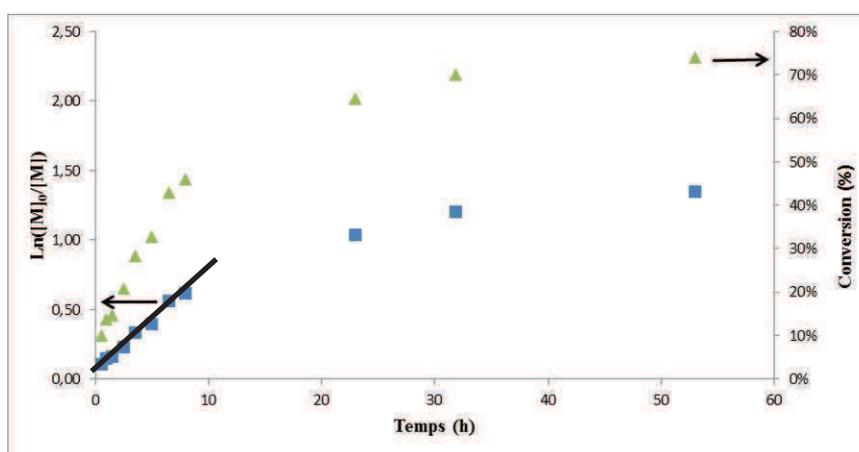
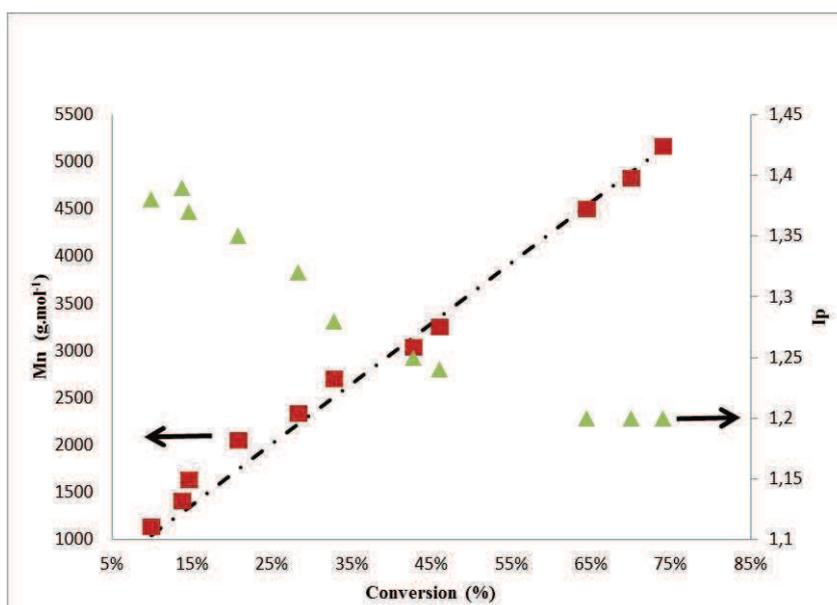


Figure II - 4 : Suivi cinétique de la polymérisation du *t*BA par ATRP avec les conditions optimales, (■)  $\ln([M]_0/[M])$  vs temps et (▲) conversion vs temps

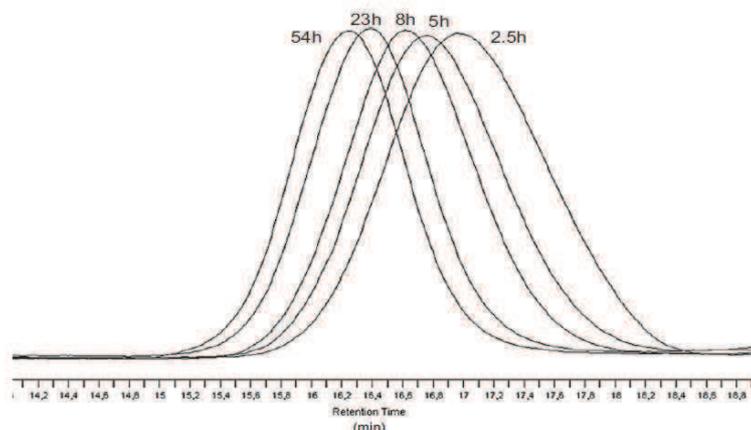


**Figure II - 5 : Relation entre la masse molaire (RMN - - -, SEC ■), la polymolécularité (▲) et la conversion**

L'évolution de  $\ln([M_0]/[M])$  en fonction du temps (**Figure II - 4**) est linéaire ce qui démontre une cinétique de consommation du monomère du premier ordre, compatible avec une concentration en espèces actives constante et ce jusqu'à 50% de conversion. Les masses molaires moyennes en nombre (**Figure II - 5**) augmentent linéairement avec la conversion et montrent une bonne adéquation avec les masses molaires théoriques calculées à partir de la conversion en monomère. De plus l'indice de polymolécularité diminue progressivement avec la conversion pour atteindre un plateau à 1,2.

Au-delà de dix heures de réaction, une incurvation se produit pour arriver à un plateau (**Figure II - 4**). Ceci indique une diminution de la concentration en espèces propageantes. Cette diminution pourrait être due à des réactions de terminaison au niveau des doubles liaisons de la chaîne du lipoamorceur (par couplage chaîne-chaîne). Ces réactions de terminaison devraient provoquer, d'une part, une déviation entre les masses molaires moyennes théoriques et expérimentales et d'autre part, une augmentation de l'indice de polymolécularité (Ip). Or, ces deux phénomènes ne sont pas visibles (**Figure II - 5**). De plus, en cas de réactions de terminaison, des épaulements devraient apparaître sur les chromatogrammes SEC. La **figure II - 6** présente l'évolution des spectres en SEC où aucun épaulement n'est observé, démontrant ainsi que les réactions de terminaison restent négligeables même après 54h de polymérisation. La diminution en concentration de l'espèce

propageante au cours du temps ne s'accompagne donc pas d'une perte de contrôle de la polymérisation et serait ici plus probablement due à une inhibition progressive du système catalytique.



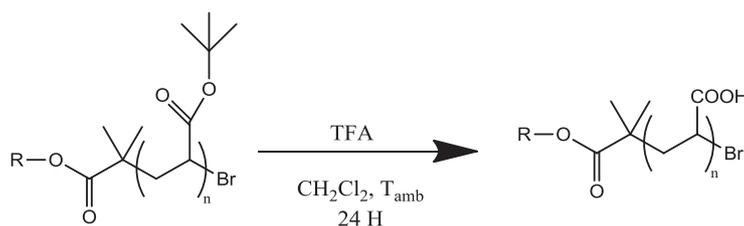
**Figure II - 6 : Evolution des masses en SEC dans les conditions optimales**

Tous les critères d'une polymérisation contrôlée démontrés dans cette polymérisation mettent en évidence l'efficacité du lipoamorceur 1 comme amorceur de l'ATRP du *t*BA.

Enfin, il est intéressant de noter que l'on peut contrôler la masse molaire du copolymère en jouant sur la conversion et donc sur le temps de polymérisation.

### 3. Acidolyse du copolymère lipide-b-poly(acrylate de *tert*-butyle)

A la fin de l'ATRP, le copolymère est hydrophobe dans sa totalité. Afin d'obtenir un copolymère amphiphile, une acidolyse (**Schéma réactionnel II - 5**) est réalisée pour transformer les motifs acrylate de *tert*-butyle en motifs acide acrylique.



*Avec R = chaînes alkyles (in)saturées*

**Schéma réactionnel II - 5 : Acidolyse du copolymère lipide-b-poly(acrylate de *tert*-butyle)**

Cette acidolyse est effectuée par action de l'acide trifluoroacétique sur la fonction ester pendante conduisant à l'élimination du groupement *tert*-butyle. Aucune hydrolyse de la

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

fonction ester n'a été observée. Le polymère final précipite dans le milieu et est isolé par filtration. Nous obtenons une poudre blanche (**Figure II - 7**).



**Figure II - 7 : Photo du copolymère final lipide-*b*-poly(acide acrylique)**

### 4. Vérification de la pérennité des insaturations lors de la polymérisation

Il est important à l'issue de la synthèse de vérifier la pérennité des doubles liaisons des chaînes alkyles afin de confirmer l'absence de réactions de transfert lors de l'étape de polymérisation et de garantir la linéarité des copolymères finaux.

Nous avons tenté d'utiliser les mêmes méthodes que celles développées dans la partie B4 afin de déterminer le nombre de doubles liaisons par macromolécule. Toutefois ces méthodes se sont montrées inefficaces donnant des résultats aberrants ou trop approximatifs. Ceci est probablement dû au fait que le copolymère s'auto-organise dans l'eau de telle sorte que la partie grasse se trouve enfermée à l'intérieur des objets et protégée par la couronne de PAA. Il est donc très difficile d'appliquer ici la méthode de Wijs car les doubles liaisons sont difficilement accessibles au réactif, ICl.

Par ailleurs, si les signaux des doubles liaisons apparaissent bien en RMN  $^1\text{H}$ , la faible proportion de protons éthyléniques dans le copolymère conduit à une très faible intensité des signaux d'où une trop grande imprécision pour une vérification quantitative de la conservation des insaturations.

Afin de savoir si des réactions de transfert peuvent avoir lieu au niveau des doubles liaisons lors de l'ATRP du *t*BA, nous avons donc eu recours à une polymérisation modèle. La polymérisation du *t*BA a été amorcée à partir d'éthyl-2-bromo-2-méthylpropionate (EBIB), un amorceur classique d'ATRP, et en présence d'alcool gras non modifié en quantité équivalente ( $[A] : [\text{alcool gras}] = 1 : 1$ ) dans les conditions optimisées précédemment. La polymérisation a été stoppée à 40 % de conversion et le polymère final analysé en SEC.

L'analyse ne révèle qu'une seule population (**Figure II - 8**) et ne présente aucun épaulement. Le pic de l'amorceur résiduel, l'EBIB, se mélange avec celui du solvant. Un décrochement de la ligne se produit vers  $t_r = 19,5$  min. Cela correspond au pic de l'alcool gras. De plus, l'indice de polymolécularité obtenu est de 1,3 pour une masse molaire moyenne en nombre de 2310 g/mol ( $M_{n,theo} = 2460$  g/mol).

Ces résultats tendent donc à démontrer l'absence de réaction de transfert sur les doubles liaisons lipidiques.

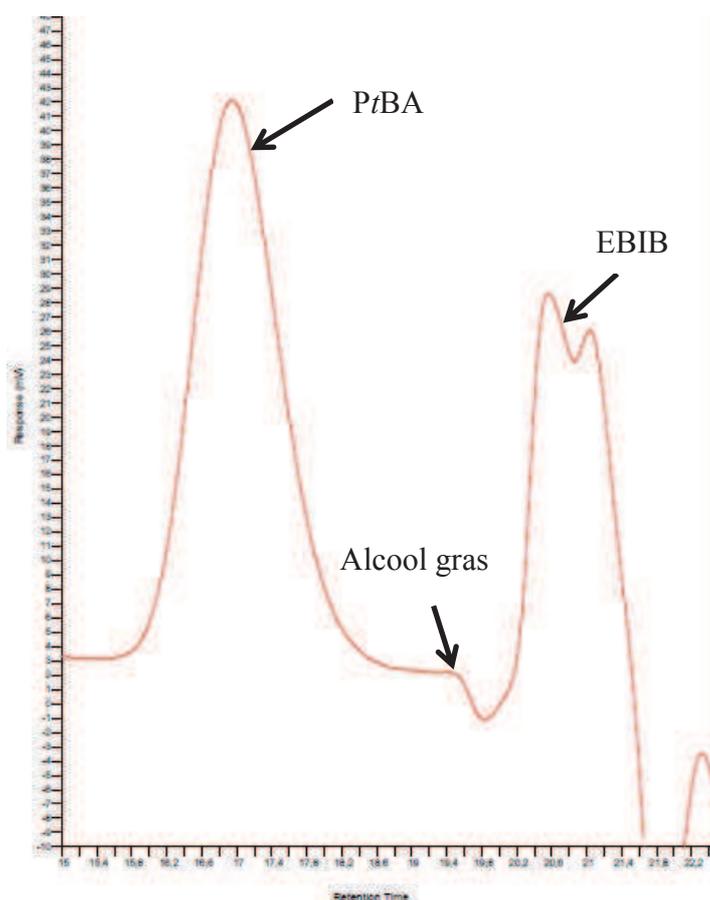


Figure II - 8 : Chromatogramme du copolymère amorcé par de l'EBIB en présence d'alcool gras

### 5. Caractérisation des différents copolymères synthétisés

Plusieurs copolymères ont donc été synthétisés dans les conditions optimales d'ATRP avec différents degrés de conversion afin de faire varier la longueur du bloc PAA et d'obtenir ainsi une gamme de copolymères amphiphiles avec une HLB allant de 8 à 16 (**Tableau II - 5**).

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

tableau II - 5 : Principales caractéristiques des copolymères synthétisés

<u>Lipide-<i>b</i>-PtBA</u>					<u>Lipide-<i>b</i>-PAA</u>			
Ref.	Conv.(%)	$\overline{X}_{n,RMN}$ <sup>a)</sup>	$\overline{M}_{n,RMN}$ <sup>b)</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )	$\overline{M}_{n,SEC}$ <sup>c)</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )	PDI <sup>c)</sup>	Ref	$\overline{M}_{n,RMN}$ <sup>d)</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )	HLB <sup>e)</sup>
2a	7	3	860	1100	1,25	3a	660	8
2b	14	14	2200	2230	1,5	3b	1420	14
2c	34	17	2590	2740	1,27	3c	1630	15
2d	45	22	3290	3170	1,28	3d	2030	16

a)  $\overline{X}_{n,RMN} = \text{Conversion} \times [\text{Monomère}]/[\text{Amorceur}]$

b)  $\overline{M}_{n,RMN} = M_{\text{amorceur}} + \overline{X}_{n,RMN} \times M_{tBA}$

c) déterminées en SEC en utilisant un étalonnage PMMA

d)  $\overline{M}_{n,RMN} = M_{\text{amorceur}} + \overline{X}_{n,RMN} \times M_{AA}$

e) 
$$HLB = 20 \times \frac{Mn_{\text{partie hydrophile}}}{Mn_{\text{totale}}}$$

Un dosage conductimétrique couplé à un suivi pH-métrique nous a permis de déterminer le pKa du copolymère à 5,7. Le résultat obtenu est cohérent avec la littérature<sup>14, 15</sup> qui annonce un pKa de 5,8. L'acide acrylique présente un pKa de 4,75. La différence entre l'acide acrylique seul et le copolymère peut s'expliquer par la difficulté à déprotoner les fonctions acryliques qui se trouvent au cœur de la pelote d'où un pKa plus élevé.

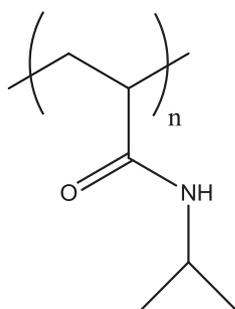
Par ailleurs, le dosage par conductimétrie nous a permis de déterminer le nombre n de motifs acide acrylique présents dans la chaîne de polymère. Pour le copolymère 3c, nous obtenons  $\overline{X}_{n_{\text{acide}}} = 19$  ( $\overline{X}_{n_{\text{théo}}} = 17$ ). Pour le copolymère 3d, nous obtenons  $\overline{X}_{n_{\text{acide}}} = 19$  ( $\overline{X}_{n_{\text{théo}}} = 22$ ). Les résultats obtenus sont donc parfaitement cohérents avec le degré de polymérisation théorique, confirmant l'excellent contrôle obtenu par ATRP.

Au vu des résultats obtenus pour la synthèse contrôlée d'un copolymère amphiphile pH-sensible lipide-*b*-PAA (LPAA), nous avons souhaité appliquer cette même méthode pour la synthèse d'un autre copolymère amphiphile mais cette fois thermosensible : le lipide-*b*-PNIPAM.

### D. Synthèse du copolymère amphiphile lipide-*b*-poly(*N*-isopropylacrylamide)

#### 1. Le PNIPAM un polymère thermosensible de choix

Comme le montre le **schéma II - 3** ci-dessous, le PNIPAM contient un groupement acrylamide et un groupement isopropyle qui sont pendants à la chaîne principale.



**Schéma II - 3 : Structure générale du poly(*N*-isopropylacrylamide)**

Lorsque le polymère est en milieu aqueux, le groupement acrylamide permet la création de liaisons hydrogène avec l'eau et ainsi augmente la solubilité du polymère dans l'eau. Les molécules d'eau forment une « cage » autour de la molécule. Lorsque la solution est chauffée jusqu'à une température critique, le mouvement brownien du groupement isopropyle casse les liaisons hydrogène. Ceci engendre une perte de solubilité du polymère qui s'agrège. C'est pourquoi ce polymère est dit « thermosensible ». Cette température critique est appelée « Lower Critical Solution Temperature » ou LCST. Le PNIPAM est, grâce à cette propriété, très souvent utilisé comme système de vectorisation car il présente une LCST de 32 °C<sup>16</sup>, proche de la température du corps humain ce qui le rend donc particulièrement attrayant. Il est souvent associé au poly(éthylène glycol) (PEG). Le PEG, en plus des rôles multiples vus dans la partie bibliographique, a pour effet d'améliorer la solubilisation du NIPAM et donc d'augmenter la LCST jusqu'à 37-39°C<sup>17,18</sup>.

#### 2. Etat de l'art sur la synthèse par ATRP du PNIPAM

La synthèse par ATRP du PNIPAM est couramment décrite dans la littérature. Toutefois peu d'études portent sur le contrôle de la polymérisation.

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

Nous avons répertorié dans le **tableau II - 6** ces études, toutes utilisent le même système catalytique CuCl/Me<sub>6</sub>TREN (tris [2-(diméthylamino)éthyl]amine) en proportion 1:1.

**Tableau II - 6 : Différentes études sur la polymérisation du NIPAM par ATRP**

Auteur	Amorceur	[M] : [A]	Solvant	Tps (h)	M <sub>n,SEC</sub> (g/mol)	I <sub>p</sub>
<b>Patrizi</b> <sup>19</sup>	Dextran modifié	120 : 1	DMF/H <sub>2</sub> O (50/50)	3	4500	1,18
<b>Xia</b> <sup>20</sup>	Méthyl 2-chloropropionate	100 : 1	MeOH	7	3800	1,13
<b>Xia</b> <sup>20</sup>	Méthyl 2-chloropropionate	50 : 1	iPrOH	6	8000	1,15
<b>Xia</b> <sup>20</sup>	Méthyl 2-chloropropionate	50 : 1	tBuOH	3	7300	1,15
<b>Xia</b> <sup>20</sup>	Méthyl 2-chloropropionate	100 : 1	tBuOH	4	14300	1,16
<b>Masci</b> <sup>21</sup>	Ethyl 2-chloropropionate	50 : 1	DMF/H <sub>2</sub> O (50/50 v/v)	35min	6700	1,19

Bien que les indices de polymolécularité présentés dans le tableau soient faibles, les suivis cinétiques montrent une incurvation de la courbe  $\ln([M]/[M]_0)$  en fonction du temps expliquée par une diminution progressive de la concentration en catalyseur.

L'un des meilleurs résultats est obtenu avec le Dextran modifié pour lequel un bon contrôle de la réaction est réalisé sur 3h.

Les difficultés observées pour obtenir un bon contrôle de la polymérisation sont attribuées à trois phénomènes. Premièrement, le catalyseur se retrouve désactivé par complexation avec le polymère en formation<sup>22</sup>. Deuxièmement, une désactivation trop lente couplée à une activation trop rapide ( $k_{\text{deact}} \ll k_{\text{act}}$ ) augmentent la concentration en radicaux et donc expliquent les hauts taux de conversions obtenus<sup>23</sup>. Enfin, le groupement halogène amorceur de la réaction est sujet à une réaction de cyclisation impliquant la fonction amide<sup>22,23</sup>. L'espèce active est donc prépondérante par rapport à l'espèce dormante laissant libre cours aux réactions de transfert et de terminaison. De plus, des réactions de cyclisation provoquent la perte progressive de l'halogène final.<sup>21</sup>

La littérature révèle donc des difficultés pour obtenir un parfait contrôle de la synthèse par ATRP du PNIPAM. Toutefois, les indices de polymolécularité observés restent faibles ce qui semble démontrer un contrôle correct de la structure finale. Nous nous sommes intéressés

à l'ATRP de ce monomère à partir du lipoamorçeur 1 afin d'obtenir des copolymères amphiphiles thermosensibles.

### 3. Étude de la synthèse par ATRP du PNIPAM

Avant de réaliser des essais sur le lipoamorçeur, nous avons cherché à optimiser les conditions de polymérisation sur un amorçeur commercial : l'éthyl-2-chloropropionate (ECP). Les conditions décrites dans la littérature par Patrizi<sup>19</sup> ont été reproduites dans un mélange DMF/eau comme solvant. Cependant, cet essai a conduit à l'obtention d'une très forte conversion en un temps court (96% en 1h). L'analyse SEC d'un prélèvement à 84% de conversion montre un très large étalement des populations et la présence de hautes masses pour des temps très courts de polymérisation (**Figure II - 9**). Le chromatogramme correspondant au produit final présente la même polymolécularité avec une plus grande proportion de hautes masses.

Afin de parvenir à contrôler la polymérisation, de nombreux essais ont été réalisés en faisant varier différents paramètres : la nature de l'amorçeur (l'éthyl-2-bromopropionate (EBP)), le système catalytique et le solvant (composition et volume) (**Tableau II - 7**).

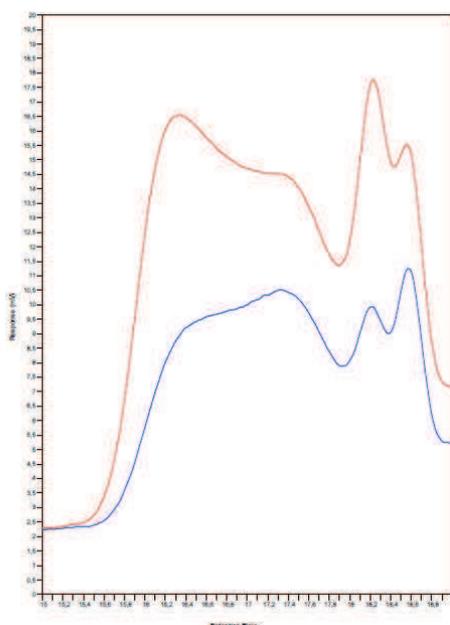
## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

**Tableau II - 7 : Optimisation sur un amorceur commercial de la polymérisation par ATRP du NIPAM**

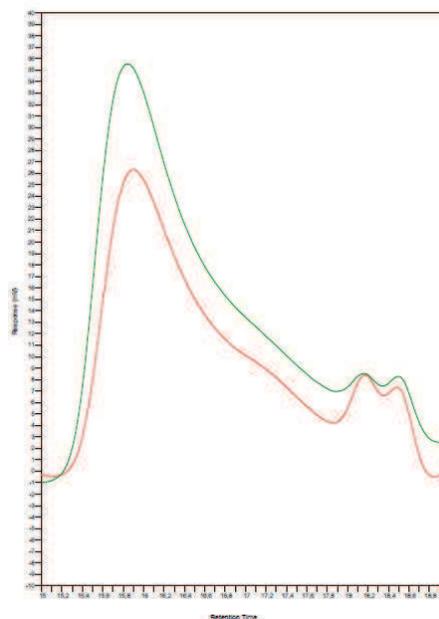
Essai	Amorceur ([M] : [A])	Système catalytique (ratio)	Solvant(s)	
			Composition	Quantité (mL/g de monomère)
1	ECP (120 : 1)	CuCl/Me <sub>6</sub> TREN (1 : 1)	DMF / H <sub>2</sub> O (1/1)	1,6
2				3,2
3		CuCl/CuCl <sub>2</sub> / Me <sub>6</sub> TREN (1 : 0,05 : 1,05)		1,6
4		CuCl/CuCl <sub>2</sub> /Me <sub>6</sub> TREN (1 : 0,01 : 1,01)		1,6
6	EBP (50 : 1)	CuBr/PMDETA (1 : 1)	Méthanol	1,4
7		CuBr/PMDETA (0,5 : 0,5)		1,4

Lors de chaque essai, de hauts degrés de conversion sont obtenus en quelques minutes. Ceci est cohérent avec une concentration trop élevée en radicaux. Ces résultats ont déjà été décrits dans la littérature<sup>23</sup> et sont expliqués par une trop lente désactivation du polymère en formation. De plus, il est également souligné dans la littérature que de hauts degrés de conversion sont obtenus en quelques minutes lorsque l'eau est utilisée comme solvant<sup>23</sup>.

Bien que les polymérisations soient toujours non contrôlées quelles que soient les conditions testées, une amélioration notable de la polymolécularité finale a néanmoins été obtenue puisque l'essai 4 conduit à l'obtention d'une seule population (**Figure II - 10**). Une trainée vers les faibles masses molaires est néanmoins bien visible, ce phénomène également décrit par Teodorescu et Matyjaszewsky s'explique par un lent amorçage de la réaction<sup>22</sup>. De plus, le contrôle de la polymérisation est loin d'être atteint puisque les masses obtenues sont identiques quelle que soit la conversion, révélant ainsi les phénomènes de transfert et terminaison.



**Figure II - 9 :** Le suivi cinétique de l'essai 1 en SEC montre la présence de plusieurs populations (bleu) à  $X_n = 84\%$  (30 min) et (rouge) à  $X_n = 96\%$  (1h30)



**Figure II - 10 :** Le suivi cinétique de l'essai 4 en SEC montre un déplacement du spectre vers les plus grosses masses molaires moyenne en nombre (rouge) à  $X_n = 91,8\%$  (30 min) et (vert) à  $X_n = 97,5\%$  (3h)

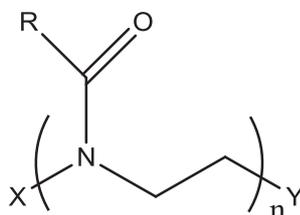
Face à l'impossibilité d'obtenir un contrôle satisfaisant de la polymérisation sur un amorceur classique et ce malgré les nombreux essais effectués, une nouvelle voie d'accès à des copolymères thermosensibles a été envisagée *via* une autre technique de polymérisation contrôlée : la CROP.

### **II. Synthèse d'un copolymère amphiphile thermosensible par CROP assistée par micro-ondes**

Cette ré-orientation de la voie d'accès à un copolymère thermosensible est née des échanges scientifiques favorisés par le projet ISCE-Chem. L'équipe du Dr. Martin Grossel de l'université de Southampton développe en effet la synthèse de polyoxazolines thermosensibles par voie micro-ondes et de façon contrôlée. Une collaboration a donc été mise en place afin de synthétiser des copolymères lipide-*b*-polyoxazoline dans ce laboratoire.

### A. Brève présentation des polyoxazolines

Les polyoxazolines (POx) présentent la structure générale suivante (**Schéma II - 4**). Elles sont synthétisées via une polymérisation cationique par ouverture de cycle.



**Schéma II - 4 : Structure générale d'une polyoxazoline**

La structure du polymère diffère de celle du PNIPAM en cela même qu'une partie de l'amide appartient à la chaîne principale. La nature de la chaîne pendante aura par ailleurs une plus forte influence sur la LCST du polymère<sup>24</sup>. Selon la nature de R, le degré d'hydrophilie du polymère va être modifié ce qui impactera ses propriétés thermosensibles<sup>25</sup>.

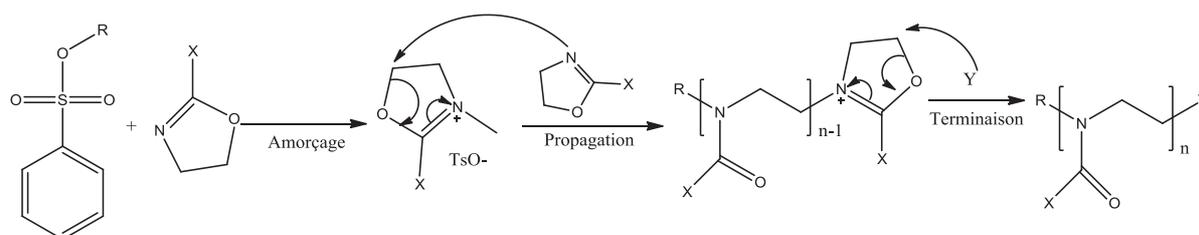
- R=méthyle → le polymère est soluble dans l'eau à pression atmosphérique à toute température.
- R= éthyle, propyle, isopropyle → le polymère présente une température critique de solubilité (LCST).
- R = chaîne alkyle plus longue que C3 → le polymère est insoluble dans l'eau quelle que soit la température.

Nous nous intéresserons principalement à la deuxième catégorie de polymère. Selon la littérature, l'homopolymère poly(2-isopropyl-2-oxazoline) présente une LCST entre 35 et 47°C<sup>26</sup>. Il s'agit donc d'un polymère tout à fait intéressant pour des applications biomédicales puisque sa LCST est proche de celle du corps humain et qu'il est autorisé par la FDA<sup>27</sup>. De plus, le laboratoire anglais travaille sur ce polymère et possède la technologie pour le synthétiser.

A une température inférieure à la LCST, les POx sont parfaitement solubles dans l'eau. On peut remarquer que la chaîne principale est fortement similaire à celle du PEG,

l'oxygène étant remplacé par un azote. Il en résulte une flexibilité similaire de la chaîne. C'est une des raisons pour laquelle le POx montre une excellente capacité à protéger les micelles ou liposomes du système immunitaire. En effet, les copolymères amphiphiles à base de polyoxazoline ont montré des propriétés similaires à ceux à base de PEG en termes de stabilisation, furtivité, toxicité et accumulation dans les reins et le foie<sup>28,29</sup>. De plus, la non toxicité ( $LD50 > 4 \text{ g/kg}^{30}$ ) et la biocompatibilité des POx en font un excellent concurrent au PEG<sup>31</sup>.

Les polyoxazolines sont obtenues par polymérisation cationique par ouverture de cycle (CROP) (Schéma réactionnel II - 6). Il est ainsi possible, en plus d'influer sur la nature de la chaîne pendante R, de modifier la nature de l'amorceur X et de la fonction terminale Y<sup>26</sup> (Schéma réactionnel II - 6). C'est pourquoi on trouve dans la littérature une très grande variété de polymères et copolymères POx.<sup>26</sup>



**Schéma réactionnel II - 6 : Les différentes étapes de la polymérisation par CROP de l'oxazoline.**

Avec l'arrivée de la synthèse assistée par micro-ondes permettant d'améliorer le contrôle de la réaction de polymérisation et de diminuer considérablement le temps de réaction<sup>28</sup>, la synthèse des polyoxazolines est devenue très rapide et donc compétitive.

### **B. Synthèse du copolymère lipide-*b*-POx par réaction de terminaison sur un alcool gras**

Comme détaillé précédemment (Schéma réactionnel II - 6), deux voies d'insertion de la chaîne lipidique sont envisageables : lors de l'amorçage ou lors de la terminaison. La seconde voie semble plus facile d'accès dans la mesure où elle ne nécessite pas la synthèse d'un amorceur particulier et où une simple désactivation des chaînes en croissance sur l'alcool gras est envisageable. Cette voie a donc dans un premier temps été privilégiée.

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

La réaction se déroule dans de l'acétonitrile anhydre avec le p-toluènesulfonate de méthyle comme amorceur. Une fois la polymérisation réalisée dans un réacteur à micro-ondes, l'alcool gras est ajouté avec de la triéthylamine afin d'obtenir le copolymère amphiphile LPOx. Le ratio  $[M]/[A]$  a été modifié lors des différents essais pour accéder à différentes longueurs de chaîne.

La première difficulté à laquelle nous nous sommes heurtés lors de cette synthèse est la séparation difficile du copolymère attendu et des chaînes grasses n'ayant pas réagi. Celle-ci s'effectue par dialyse prolongée dans un mélange éthanol/eau. De plus, après plusieurs jours de dialyse, le suivi en RMN révèle une atténuation très importante des signaux de l'alcool gras, conduisant à des valeurs d'intégration relative bien en deçà des valeurs attendues pour une terminaison quantitative. Enfin, les analyses SEC montrent la présence de chaînes lipidiques résiduelles. La totalité des analyses effectuées conduit donc à la conclusion que la terminaison des chaînes sur l'alcool gras n'est pas effective ni quantitative. Ceci pourrait être expliqué par la faible nucléophilie de l'alcool gras.

Nous avons donc décidé de privilégier la seconde voie d'accès aux copolymères par utilisation d'un lipoamorceur. La littérature décrit la synthèse de copolymère amphiphile à partir d'huile végétale par CROP<sup>32,33</sup>. Une thèse soutenue fin novembre 2011 par Chloé Gardi traite de la synthèse de copolymères lipide-*b*-polyoxazoline. Toutefois la technique par micro-ondes n'est pas utilisée et les lipoamorceurs sont issus d'alcools gras saturés très bien définis<sup>34</sup>. Ces études démontrent que l'idée de synthétiser un copolymère lipide-*b*-POx est pertinente.

### C. Synthèse du lipoamorceur 2

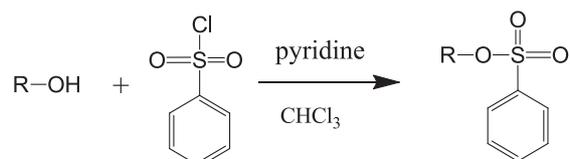
La première étape de la polymérisation consiste en une réaction nucléophile entre le monomère et l'amorceur. L'amorceur doit contenir un excellent groupe partant de type triflate, mésylate ou tosylate. La première étape consiste donc en l'insertion d'un groupe partant à l'extrémité d'une chaîne lipidique.

Comme précédemment la synthèse du lipoamorceur se déroule en deux étapes. La première consiste toujours en la réduction de l'huile de lin en alcool gras telle que détaillée au paragraphe II.B.2. La deuxième étape consiste en l'introduction d'un groupe partant en

extrémité de chaîne. Deux groupements ont été testés : une fonction tosyle ou une fonction mésyle.

### 1. Synthèse du lipoamorceur tosylé

La synthèse du lipoamorceur tosylé est réalisée par action d'une solution de chlorure de p-toluènesulfonyle dans le chloroforme sur l'alcool gras en présence de pyridine.



*Avec R = chaînes alkyles (in)saturées*

**Schéma réactionnel II - 7 : Réaction de tosylation d'un alcool gras**

En RMN <sup>1</sup>H, le bon déroulement de la réaction est visible via un déplacement du signal des CH<sub>2</sub> initialement en α de la fonction alcool de 3,6 ppm à 4 ppm lors de l'introduction de la fonction tosylate. Le **tableau II - 8** montre les différents paramètres sur lesquels nous avons influé afin d'améliorer la conversion. En augmentant la quantité de chlorure de p-toluènesulfonyle, la température et le temps de réaction, on arrive à augmenter la conversion. Bien que plusieurs essais aient été réalisés pour optimiser la réaction, nous n'avons jamais atteint une conversion totale. Par ailleurs, la séparation du produit final du chlorure de p-toluènesulfonyle résiduel est difficile et nécessite une chromatographie sur colonne d'où de faibles rendements. Ainsi, plus le chlorure de p-toluènesulfonyle est en excès, plus il est difficile de le séparer du produit final. Il faut donc faire un compromis entre une bonne conversion et peu de chlorure de p-toluènesulfonyle résiduel.

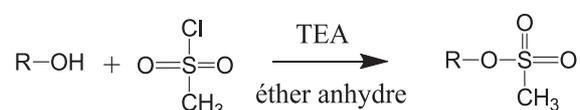
**Tableau II - 8 : Optimisation de la tosylation de l'alcool gras**

Conditions	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4
<b>n<sub>eq</sub>(TsCl)</b>	1,05	1,3	1,15	2,00
<b>Température (°C)</b>	amb	50	Amb	amb
<b>Temps (h)</b>	12	24	3,5	3,5
<b>Conversion (%)</b>	48	61	68,6	91,5
<b>Rendement (%)</b>	15	/	19	/

Face aux rendements modérés obtenus et aux difficultés de purification rencontrées lors de cette synthèse, nous avons décidé d'étudier la réaction avec le chlorure de méthanesulfonyle malgré sa toxicité bien plus importante que celle du chlorure de p-toluènesulfonyle.

### 2. Synthèse du lipoamorceur mésylé

La synthèse du lipoamorceur mésylé consiste en la réaction du chlorure de méthanesulfonyle sur la fonction alcool de l'alcool gras.



*Avec R = chaînes alkyles (in)saturées*

**Schéma réactionnel II - 8 : Réaction de mésylation des alcools gras**

L'avantage de cette seconde approche réside dans la purification du produit final puisque celle-ci s'effectue très simplement et très efficacement par lavages successifs à l'eau. Le rendement de la réaction est de 77%.

La comparaison des spectres FTIR (**Figure II - 11**) montre la disparition totale de la bande d'élongation des fonctions alcool ( $\nu_{\text{OH}} = 3350 \text{ cm}^{-1}$ ). Deux bandes très intenses apparaissent à  $1354 \text{ cm}^{-1}$  et  $1174 \text{ cm}^{-1}$ , celles-ci correspondant aux vibrations d'élongation du groupement  $\text{SO}_2$  introduit.

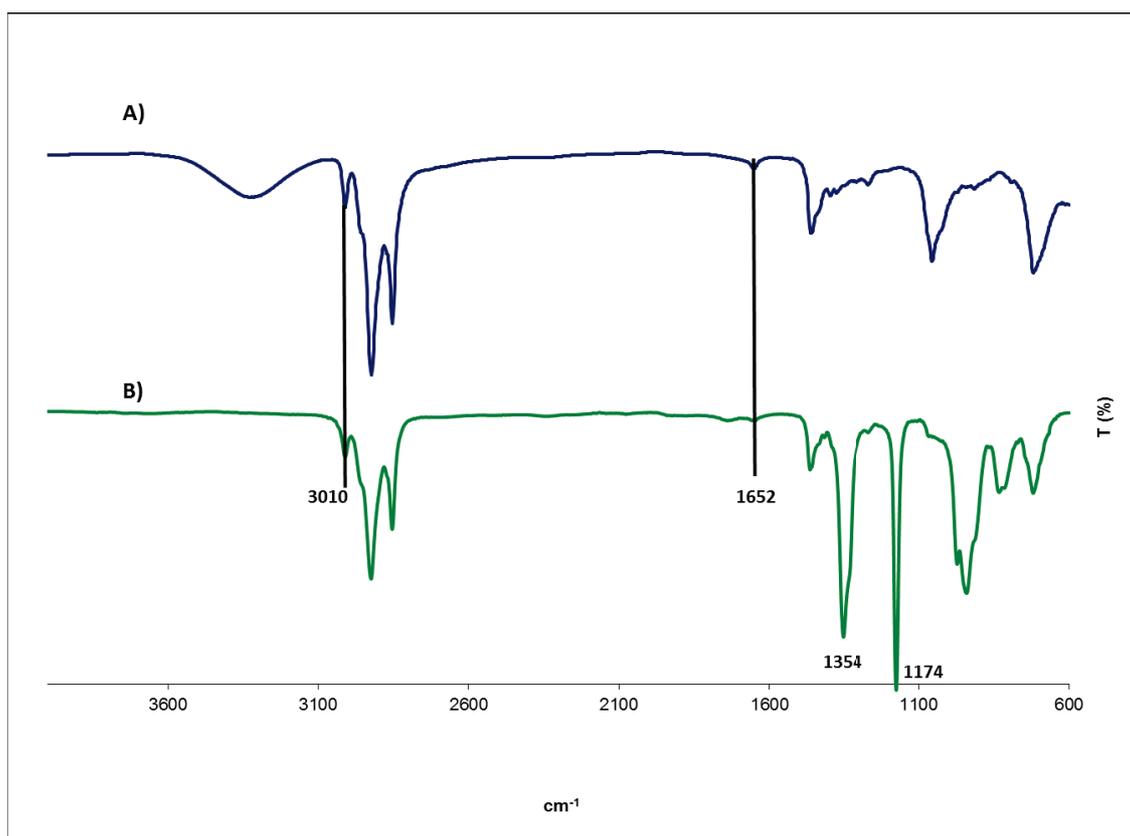


Figure II - 11 : Spectres IR de A) de l'alcool gras et B) du lipoamorceur 2

La RMN  $^1\text{H}$  (Figure II - 12) confirme également la structure obtenue via l'apparition d'un signal à 3 ppm correspondant au groupement méthyle introduit et le déplacement du signal du  $\text{CH}_2$  en  $\alpha$  de la fonction mésyle introduite de 3,7 ppm à 4,2 ppm ainsi que celui en  $\beta$  de 1,5 ppm à 1,75 ppm.

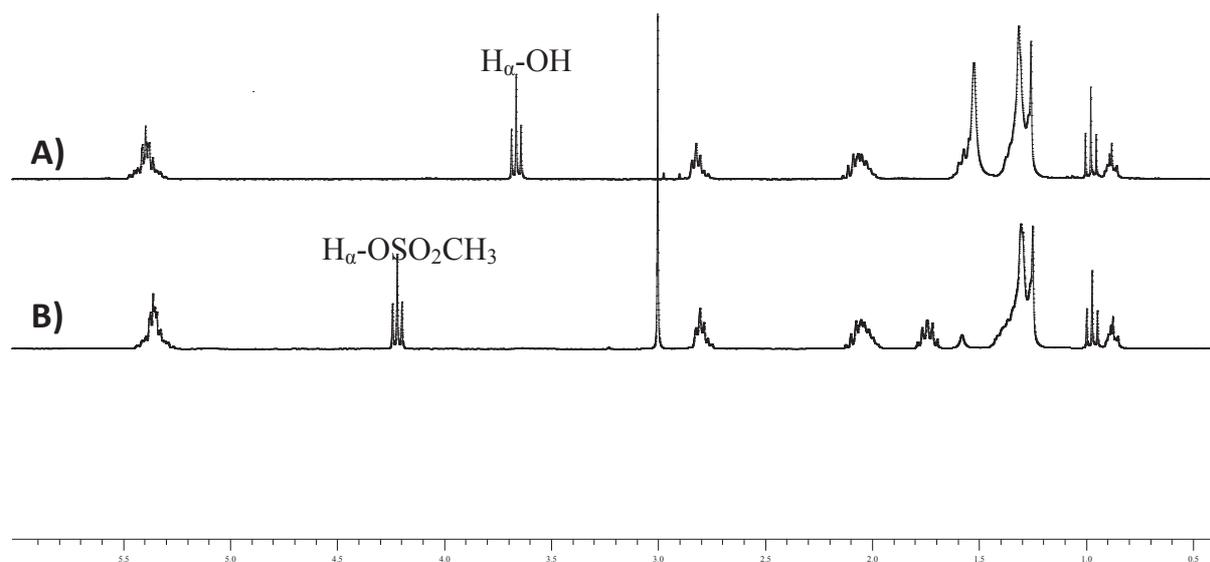


Figure II - 12 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  de A) l'alcool gras et B) du lipoamorceur 2

### 3. Conservation des insaturations

Comme pour le lipoamorceur 1, il est important de s'assurer de la pérennité des insaturations au cours de la synthèse.

Tout d'abord, les analyses en IR et en RMN prouvent la présence des doubles liaisons. En effet nous pouvons voir deux bandes caractéristiques en IR à  $1652\text{ cm}^{-1}$  et à  $3010\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ ). En RMN, les pics correspondant aux doubles liaisons se situent entre 5,2 – 5,6 ppm.

L'analyse du spectre RMN permet de déterminer le nombre d'insaturations en moyenne du lipoamorceur final. Le **tableau II - 9** présente l'évolution de l'indice d'iode et du nombre d'insaturations par molécule à chaque étape de la synthèse.

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

**Tableau II - 9 : Suivi des doubles liaisons par RMN au cours de la synthèse du lipoamorceur 2**

**Suivi RMN <sup>1</sup>H**

	<b>Indice d'iode</b>	<b>Nbre insaturations/molécule</b>
<b>Huile de lin</b>	178	6,1
<b>Alcool gras</b>	171	1,8
<b>Lipoamorceur 2</b>	147	2,0

Comme pour le lipoamorceur 1, le lipoamorceur final comporte 2 doubles liaisons par chaîne en moyenne. Ceci est tout à fait cohérent avec le nombre initial d'insaturations sur le triglycéride.

Il est également possible de suivre les proportions de chaque chaîne par analyse en RMN <sup>1</sup>H. Le **tableau II - 10** compare les proportions de chaînes linoléique, linoléique, oléique et saturée pour l'huile de lin, l'alcool gras et le lipoamorceur 2.

**Tableau II - 10 : Proportions de chaque chaîne à chaque étape de la synthèse du lipoamorceur 2**

	<b>Huile de lin</b>	<b>Alcool gras</b>	<b>Lipoamorceur 2</b>
<b>chaînes linoléiques</b>	54%	52%	54%
<b>chaînes linoléiques</b>	10%	7%	4%
<b>chaînes oléiques</b>	23%	21%	29%
<b>chaînes saturées</b>	13%	20%	13%

Pour finir, les analyses des spectres de masse viennent corroborer les analyses IR et RMN. En effet, les cinq chaînes alkyles sont bien présentes. Leurs masses molaires respectives sont répertoriées dans le **tableau II - 11**.

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

Tableau II - 11 : Masses molaires des différents lipoamorceurs présents

Nom de la chaîne grasse correspondante	Structure	m/z
Linoléique	$C_{19}H_{34}O_3S$	342,3
Linoléique	$C_{19}H_{36}O_3S$	344,3
Oléique	$C_{19}H_{38}O_3S$	346,3
Stéarique	$C_{19}H_{40}O_3S$	348,3
Palmitique	$C_{17}H_{36}O_3S$	320,3

### D. Synthèse du lipide-*b*-polyoxazoline par amorçage avec le lipoamorceur 2

La synthèse du lipide-*b*-poly(2-isopropyl oxazoline) selon cette voie est donc réalisée par amorçage de la polymérisation par le lipoamorceur 2 et terminaison par ajout d'eau en présence de triéthylamine. Différents rapports [Monomère]/[amorceur] de 20, 25 et 30 ont été testés afin de faire varier la longueur des chaînes POx (**Annexe II - 5**).

Les copolymères finaux sont purifiés par dialyse contre un mélange eau/éthanol puis lavés à l'hexane. L'analyse RMN  $^1H$  confirme bien la présence de doubles liaisons.

L'étude du spectre RMN  $^1H$  (**Figure II - 13**) du copolymère final permet de déterminer le degré de polymérisation via les intégrations respectives des signaux de la chaîne lipidique et de la chaîne polyoxazoline à partir de la formule suivante :

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{4n}{6n + 21}$$

Avec  $I_1$  = valeur de l'intégration de a et a'

$I_2$  = valeur de l'intégration de b+d+g

n = nombre d'unités 2-isopropyl-2-oxazoline

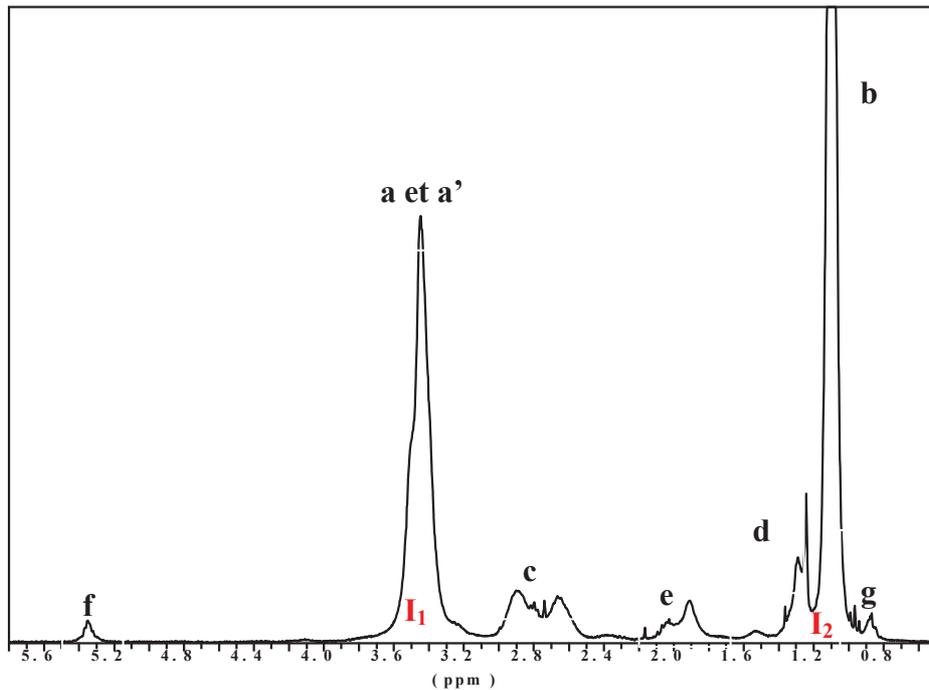
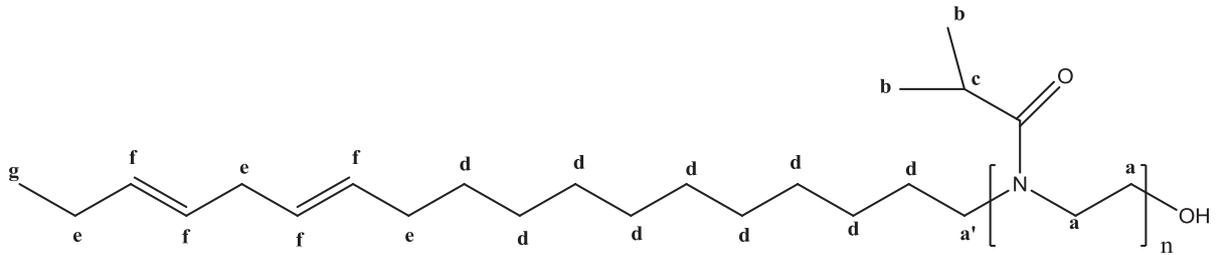


Figure II - 13 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un copolymère LPOx

La polymérisation avec un rapport initial  $[M]/[A]$  de 25 a été réalisée trois fois dans les mêmes conditions. Les copolymères obtenus présentent les caractéristiques regroupées dans le **tableau II - 12**. Les écarts importants observés d'un essai à l'autre montrent que dans les conditions utilisées, le procédé de synthèse est peu reproductible. De plus les indices de polymolécularité restent voisins de 2 traduisant un manque de contrôle de la polymérisation.

**Tableau II - 12 : Caractéristiques des différents copolymères synthétisés**

	$\overline{Xn}_{théo}$ <sup>a)</sup>	$\overline{Xn}_{RMN}$ <sup>b)</sup>	$\overline{Mn}_{théo}$ <sup>c)</sup> (g/mol)	$\overline{Mn}_{RMN}$ <sup>d)</sup> (g/mol)	$\overline{Mp}_{SEC}$ <sup>e)</sup> (g/mol)	$\overline{Mn}_{SEC}$ <sup>f)</sup> (g/mol)	Ip <sup>f)</sup>	HLB <sup>g)</sup>
<b>LPOx19</b>	25	27	3100	3340	3260	1400	2,4	18,9
<b>LPOx20</b>	25	15	3100	2000	2750	950	2,5	18,8
<b>LPOx21</b>	25	32	3100	3900	3640	2100	1,9	19,3

a)  $\overline{Xn}_{théo} = \frac{[Monomère]}{[Amorceur]}$

b)  $\overline{Xn}_{RMN}$  déterminé par RMN

c), d)  $\overline{Mn}_{n,RMN} = M_{amorceur} + \overline{Xn}_{n,RMN} \times M_{Ox}$

e,f) déterminés en SEC en utilisant un étalonnage PMMA. Au vu du Ip important, les masses molaires au pic ont été notées.

g)  $HLB = 20 \times \frac{Mn_{partie\ hydrophile}}{Mn_{totale}}$

Les masses molaires au pic sont similaires aux masses molaires obtenues par analyse RMN. Le copolymère LPOx 20 montre un degré de polymérisation bien plus faible que les autres, ce qui est confirmé par les analyses par RMN et SEC qui révèlent une masse molaire moyenne en nombre plus faible.

Le contrôle de la réaction n'est pas acquis. Ceci peut aussi s'expliquer par un manque de contrôle de la pression qui a été observé durant la procédure de polymérisation dû à une défaillance de l'appareil. Malheureusement, cette synthèse étant réalisée en Angleterre, il n'a pas été possible de réitérer plusieurs fois la polymérisation.

L'analyse en SEC révèle une trainée vers les faibles masses pour tous les copolymères. Une trainée vers les fortes masses est également visible pour le LPOx20 (**Figure II - 14**). C'est pourquoi nous travaillerons par la suite essentiellement avec le LPOx19 et le LPOx21 dont les masses molaires moyennes en nombre, l'Ip et l'analyse SEC sont les meilleures.

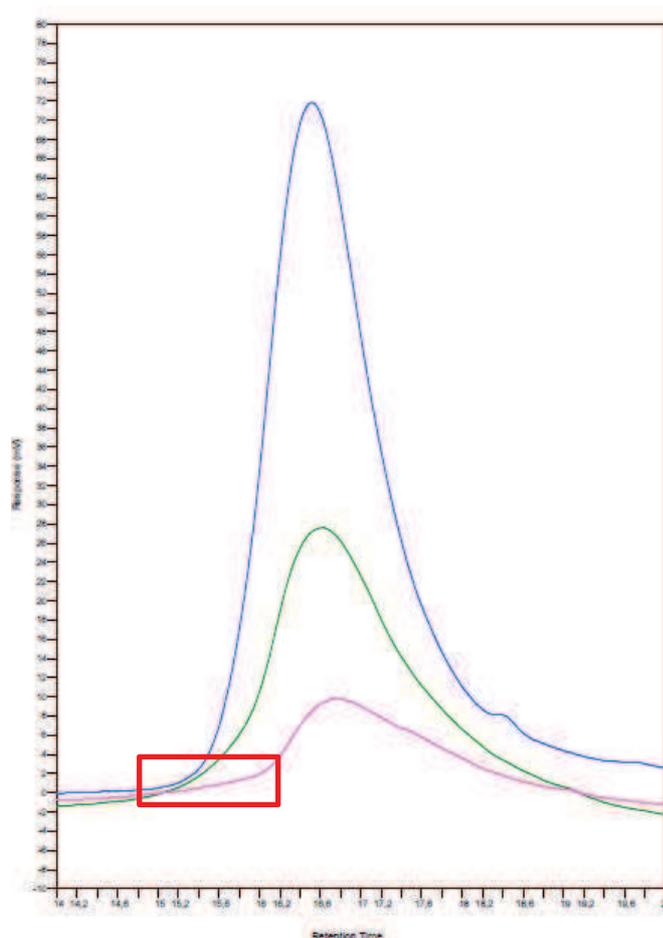


Figure II - 14 : Le chromatogramme du LPOx19 (en vert) et LPOx21 (en bleu) présentent une belle gaussienne alors que le LPOx20 (en rose) traîne vers les fortes masses.

### E. Pérennité des insaturations au cours de la synthèse du LPOx

La RMN  $^1\text{H}$  du copolymère final permet de déterminer le nombre d'insaturations présentes via le rapport des intégrations des signaux des  $\text{CH}_2$  de la chaîne  $\text{POx}$  à  $\delta = [3,2 - 3,8]$  et des doubles liaisons à  $\delta = [5,2 - 5,5]$  ppm.

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

Tableau II - 13 : Nombre de doubles liaisons par molécule

Copolymères	Nbre de dbl/molécule
LPOx19	1,3
LPOx20	0,8
LPOx21	1

Les résultats semblent montrer la perte d'une insaturation en moyenne par molécule. Toutefois, comme pour le LPAA, il est possible que le signal des doubles liaisons ressorte trop faiblement en RMN, entraînant des incertitudes dans le calcul du nombre d'insaturations. De plus, une étude menée en 2006 sur la polymérisation d'un monomère oxazoline contenant une chaîne alkyle avec une insaturation a mis en évidence que la polymérisation par micro-ondes n'affecte pas les doubles liaisons<sup>32</sup>.

### Conclusion

Deux lipoamorceurs originaux ont été synthétisés à partir d'huile de lin native par réduction des triglycérides naturels puis modification chimique de la fonction alcool terminale des acides gras.

Le premier lipoamorceur a été synthétisé avec un rendement global de 58%. Il s'agit, à notre connaissance, du premier exemple rapporté de synthèse d'un amorceur d'ATRP à partir d'huile végétale. Le lipoamorceur 1 a été ensuite engagé en ATRP et a permis d'obtenir une gamme de copolymères LP*t*BA présentant des masses allant de 1100 g.mol<sup>-1</sup> à 3200 g.mol<sup>-1</sup> et d'architecture bien contrôlée, démontrant par là-même l'efficacité de notre lipoamorceur original. Ces copolymères ont finalement été soumis à une acidolyse afin d'obtenir les copolymères LPAA amphiphiles finaux. La préservation des doubles liaisons de la chaîne lipidique a par ailleurs été vérifiée tout au long de cette synthèse.

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

Les essais de polymérisation par ATRP du NIPAM n'ayant pas conduit à un contrôle satisfaisant de la polymérisation, nous nous sommes intéressés à la synthèse de lipide-*b*-POx par CROP en collaboration avec l'université de Southampton. Cette nouvelle voie de synthèse a nécessité la synthèse d'un second lipoamorceur. Celui-ci a été obtenu avec 60% de rendement à partir de l'huile de lin. Le déclenchement de la polymérisation d'oxazoline à partir de celui-ci a permis d'obtenir les copolymères visés LPOx. Cependant le contrôle ne s'est pas avéré parfait et les indices de polymolécularité finaux restent proches de 2.

L'étude approfondie du comportement en milieu aqueux de ces deux familles de copolymère fait l'objet du chapitre suivant.

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

1. Xu, F. J., Neoh, K. G. & Kang, E. T. Bioactive surfaces and biomaterials via atom transfer radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **34**, 719–761 (2009).
2. Guillén, M. D. & Ruiz, A. Edible oils: discrimination by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 338–346 (2003).
3. Miyake, Y., Yokomizo, K. & Matsuzaki, N. Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**, 1091–1094 (1998).
4. Sacchi, R., Addeo, F. & Paolillo, L. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR of Virgin Olive Oil . An Overview. *Magn. Reson. Chem.* **35**, 133–145 (1997).
5. Guillén, M. D. & Ruiz, A. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 502–507 (2003).
6. Blayo, A., Gandini, A. & Le Nest, J.-F. Chemical and rheological characterizations of some vegetable oils derivatives commonly used in printing inks. *Ind. Crops Prod.* **14**, 155–167 (2001).
7. Letchford, K. & Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65**, 259–69 (2007).
8. Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S. & Shakesheff, K. M. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem. Rev.* **99**, 3181–98 (1999).
9. Qiu, J., Charleux, B., Matyjaszewski, K., Pierre, Â. & Curie, M. Controlled / living radical polymerization in aqueous media : homogeneous and heterogeneous systems. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 2083–2134 (2001).
10. Lacík, I., Beuermann, S. & Buback, M. Aqueous Phase Size-Exclusion-Chromatography Used for PLP–SEC Studies into Free-Radical Propagation Rate of Acrylic Acid in Aqueous Solution. *Macromolecules* **34**, 6224–6228 (2001).
11. Davis, K. A. & Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization of tert-Butyl Acrylate and Preparation of Block Copolymers. *Macromolecules* **33**, 4039–4047 (2000).
12. Patten, T. E. & Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization and the Synthesis of Polymeric Materials. *Adv. Mater.* **10**, 901–915 (1998).
13. Zhang, X., Xia, J. & Matyjaszewski, K. End-Functional Poly( tert -butyl acrylate) Star Polymers by Controlled Radical Polymerization. *Macromolecules* **33**, 2340–2345 (2000).

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

14. Connal, L. a. *et al.* pH-Responsive Poly(acrylic acid) Core Cross-Linked Star Polymers: Morphology Transitions in Solution and Multilayer Thin Films. *Macromolecules* **41**, 2620–2626 (2008).
15. Sato, Y., Hashidzume, A. & Morishima, Y. Self-Association in Water of Copolymers of Acrylic Acid and N-Dodecylmethacrylamide As Studied by Fluorescence, Dynamic Light Scattering, and Rheological Techniques. *Macromolecules* **34**, 6121–6130 (2001).
16. Heskins, M. & Guillet, J. E. Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Part A* **2**, 1441–1455 (1968).
17. De Tang, X., Liang, X. C. & Han, N. F. Y-shaped block copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(N-isopropylacrylamide) synthesized by ATRP. *Chinese Chem. Lett.* **20**, 1353–1356 (2009).
18. Virtanen, J., Baron, C. & Tenhu, H. Grafting of Poly ( N -isopropylacrylamide ) with Poly ( ethylene oxide ) under Various Reaction Conditions. 336–341 (2000).
19. Patrizi, M. L., Piantanida, G., Coluzza, C. & Masci, G. ATRP synthesis and association properties of temperature responsive dextran copolymers grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *Eur. Polym. J.* **45**, 2779–2787 (2009).
20. Xia, Y., Yin, X., Burke, N. A. D. & Sto, H. D. H. Thermal Response of Narrow-Disperse Poly ( N-isopropylacrylamide ) Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **38**, 5937–5943 (2005).
21. Masci, G., Giacomelli, L. & Crescenzi, V. Atom Transfer Radical Polymerization of N-Isopropylacrylamide. *Macromol. Rapid Commun.* **25**, 559–564 (2004).
22. Teodorescu, M. & Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization of (Meth)acrylamides. *Macromolecules* **32**, 4826–4831 (1999).
23. Rademacher, J. T., Baum, M., Pallack, M. E., Brittain, W. J. & Simonsick, W. J. Atom Transfer Radical Polymerization of N,N -Dimethylacrylamide. *Macromolecules* **33**, 284–288 (2000).
24. Huber, S., Hutter, N. & Jordan, R. Effect of end group polarity upon the lower critical solution temperature of poly(2-isopropyl-2-oxazoline). *Colloid Polym. Sci.* **286**, 1653–1661 (2008).
25. Weber, C., Hoogenboom, R. & Schubert, U. S. Temperature responsive bio-compatible polymers based on poly(ethylene oxide) and poly(2-oxazoline)s. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 686–714 (2012).
26. Huber, S. & Jordan, R. Modulation of the lower critical solution temperature of 2-Alkyl-2-oxazoline copolymers. *Colloid Polym. Sci.* **286**, 395–402 (2007).

## Chapitre II : Synthèse des copolymères amphiphiles

27. Giardi, C. & Lapinte, V. Synthesis of Polyoxazolines Using Glycerol Carbonate Derivative and End Chains Functionalization via Carbonate and Isocyanate Routes. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **48**, 4027–4035 (2010).
28. Adams, N. & Schubert, U. S. Poly(2-oxazolines) in biological and biomedical application contexts. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1504–20 (2007).
29. Woodle, M. C., Engbers, C. M. & Zalipsky, S. New amphipatic polymer-lipid conjugates forming long-circulating reticuloendothelial system-evading liposomes. *Bioconjug. Chem.* **5**, 493–6 (1994).
30. Einzmann, M. & Binder, W. H. Novel functional initiators for oxazoline polymerization. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **39**, 2821–2831 (2001).
31. Zalipsky, S., Hansen, C. B., Oaks, J. M. & Allen, T. M. Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of poly(2-oxazoline)-grafted liposomes. *J. Pharm. Sci.* **85**, 133–7 (1996).
32. Huang, H. *et al.* Solvent-Induced Morphological Transition in Core-Cross-Linked Block Copolymer Micelles. *JACS* **128**, 3784–3788 (2006).
33. Giardi, C., Lapinte, V., Charnay, C. & Robin, J. J. Nonionic polyoxazoline surfactants based on renewable source: Synthesis, surface and bulk properties. *React. Funct. Polym.* **69**, 643–649 (2009).
34. Giardi, C. Synthèse de surfactifs à base de polyoxazoline Propriétés physicochimiques et formulation. 200 (2011).

## *Chapitre III*

### *Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux*

## Introduction

Dans cette nouvelle partie, nous allons nous attacher à étudier et à comprendre le comportement en milieu aqueux des deux copolymères amphiphiles synthétisés.

L'auto-organisation des copolymères en milieu aqueux étant primordiale pour une application en tant que vecteur de médicament, nous nous intéressons tout particulièrement à déterminer les conditions (concentration, température, pH) conduisant à l'auto-association des copolymères ainsi que les limites de stabilité des objets formés.

Dans cette optique, différentes analyses en solution ont été réalisées : spectrométrie de fluorescence, tension de surface, QELS (quasi elastic light scattering).

Dans un premier temps, le comportement en milieu aqueux du copolymère LPAA et l'influence du pH sur son auto-association sont étudiés.

Dans une deuxième partie, le comportement en milieu aqueux du copolymère LPOx et sa dépendance à la température sont étudiés.

Enfin, dans le but d'obtenir des systèmes à la fois pH et thermo-sensibles, nous nous sommes intéressés au mélange des deux copolymères LPAA et LPOx.

## I. Le système pH-sensible

Comme expliqué dans le chapitre précédent, toute une gamme de copolymères amphiphiles LPAA a été synthétisée. Ces copolymères possèdent différentes HLB avec une partie hydrophile plus longue que la partie hydrophobe.



Figure III - 1 : Représentation d'un unimère LPAA en milieu aqueux.

Afin de pouvoir quantifier l'hydrophilie d'un système, la balance hydrophile-lipophile (HLB) est le plus souvent utilisée. Elle est calculée grâce à la formule suivante :

$$HLB = 20 \times \frac{M_{\text{partie hydrophile}}}{M_{\text{totale}}}$$

Toutefois, notre système LPAA étant un polyélectrolyte, à HLB constante, il ne présente pas la même hydrophilie à pH acide et à pH basique. Il faut donc être prudent lorsqu'on utilise le critère de HLB car celui-ci est variable selon l'environnement dans lequel se trouve le copolymère. La différence hydrophile-lipophile (HLD)<sup>1</sup> est une grandeur qui prend en compte la nature et la quantité d'électrolyte. Toutefois, elle est complexe à déterminer. Même imparfaite, la HLB donne une information très importante sur la proportion du bloc hydrophile sur le copolymère total. C'est donc dans ce sens que nous l'utiliserons.

### A. Auto-association en milieu aqueux et influence du pH

#### 1. Observation qualitative des propriétés tensioactives

Du fait de son amphiphilie, le copolymère LPAA doit présenter un comportement proche d'un tensioactif et se positionner aux interfaces hydrophile/hydrophobe. Afin de vérifier cela, le LPAA 3c est introduit dans l'eau. Celui-ci se solubilise spontanément et conduit à une solution transparente. L'agitation de cette solution provoque l'apparition d'une mousse à la surface (**Figure III - 2, A**). Par ailleurs, l'introduction du copolymère dans un mélange eau/dichlorométhane permet de former une émulsion stable plusieurs jours (**Figure III - 2, B**). Le copolymère LPAA présente donc bien des propriétés tensioactives intéressantes. Ces résultats démontrent bien l'aptitude du copolymère à stabiliser des interfaces et sont donc encourageants quant à l'auto-organisation du système en milieu aqueux.

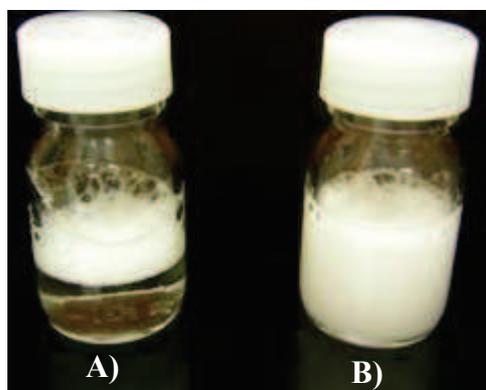


Figure III - 2 : A) LPAA 3c dans l'eau, B) Emulsion dichlorométhane/eau stabilisée par LPAA 3c

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

Trois questions se posent ici :

- 1- A partir de quelle concentration le copolymère s'auto-organise-t-il ?
- 2- Sous quelle forme (agrégats, micelles) ?
- 3- Quelle est l'influence de l'environnement (pH, température) sur les objets formés ?

### 2. Détermination de la concentration d'agrégation critique (cac)

Pour déterminer la cac, nous avons utilisé la technique de spectrométrie par fluorescence en utilisant le pyrène comme sonde. Le pyrène est une molécule très utilisée pour réaliser les analyses de fluorescence<sup>2-7</sup>. En effet, les spectres d'émission et d'excitation de cette molécule sont très sensibles à son environnement (**Schéma III - 1**). La solubilité du pyrène dans l'eau étant très faible, il migre naturellement au cœur des agrégats hydrophobes dès leur apparition. Ainsi, la présence de clusters hydrophobes est facilement observable grâce au changement des spectres d'émission et d'excitation du pyrène permettant ainsi de déterminer la concentration d'agrégation critique (cac).

Des analyses de fluorescence ont été réalisées, en émission et en excitation. Bien que donnant des résultats similaires, les spectres d'émission ( $\lambda_{exc} = 334 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 360-420 \text{ nm}$ ) sont plus difficilement exploitables que les spectres en excitation. En effet, les pics aux longueurs d'onde indiquées dans la littérature ( $I_1 = 372 \text{ nm}$  et  $I_3 = 383 \text{ nm}$ ) ne sont pas toujours bien distincts<sup>6,7</sup>. Les spectres d'excitation ( $\lambda_{exc} = 330-360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 374 \text{ nm}$ ) se sont révélés plus précis et lisibles que ceux en émission. Dans ce cas, le pic se déplace de 333 nm vers 338 nm lorsque le pyrène migre d'un environnement polaire à apolaire<sup>4</sup> (**Schéma III - 1**). Nous avons donc opté pour ce mode d'analyse afin de réaliser toutes nos expériences.

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

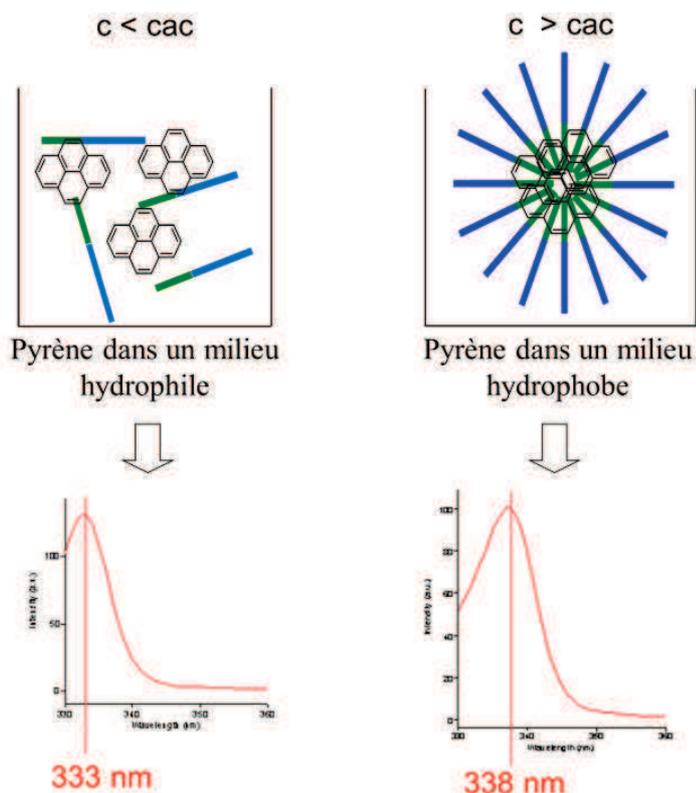


Schéma III - 1 : Principe de la détermination de la cac par fluorescence du pyrène en excitation

En traçant le ratio  $I_{338}/I_{333}$  en fonction de la concentration, il est possible de suivre la formation d'agrégats hydrophobes correspondant à une augmentation du ratio.

L'objectif de l'analyse est double :

- Détecter la présence d'agrégats
- Déterminer le caractère pH-sensible du copolymère

C'est pourquoi, plusieurs solutions avec une gamme de concentration croissante en copolymère sont préparées à trois pH différents : 4,6 ; 7 et 10. De plus, toutes les solutions contiennent 0,1 mol/L de NaCl afin d'écranter toutes les charges.

Afin de présenter les résultats, nous nous appuyerons sur le copolymère 3c,  $M_n = 1630$  g/mol.

La **figure III - 3** représente  $I_{338}/I_{333}$  en fonction de la concentration en copolymère.

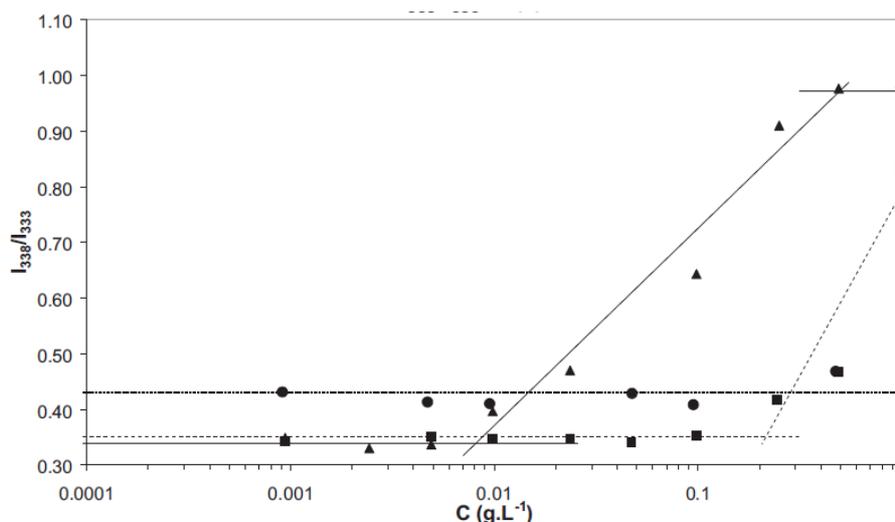


Figure III - 3:  $I_{338}/I_{333}$  en fct de la concentration pour le copolymère 3c dans une solution tampon à (▲) pH = 4,6, (■) pH = 7 et (●) pH = 10 contenant [NaCl] = 0,1 mol/L.

A pH = 4,6, la formation de clusters hydrophobes résultant de la formation d'agrégats ou de micelles est observée à 8,6 mg/L ( $5,6 \cdot 10^{-6}$  mol/L). A ce pH, nous pouvons considérer que la quasi-totalité de la chaîne est protonée puisque  $pK_a = 5,7$  (Schéma III - 2). Nous sommes donc en présence d'une chaîne sous la forme d'acide carboxylique dont l'hydrophilie est faible, ce qui explique la faible valeur de cac obtenue.

Pour des masses molaires similaires, la cmc des systèmes PEG-PE décrits dans le chapitre I est supérieure ( $cmc = 1,1 \cdot 10^{-5}$  mol/L)<sup>8</sup>. Pour ces systèmes, la cmc obtenue garantit la stabilité des micelles et donc la conservation de leur intégrité à forte dilution comme lors de l'injection dans le système sanguin. La cac du LPAA étant plus faible à pH acide, la probabilité d'une bonne conservation des micelles à forte dilution est forte.

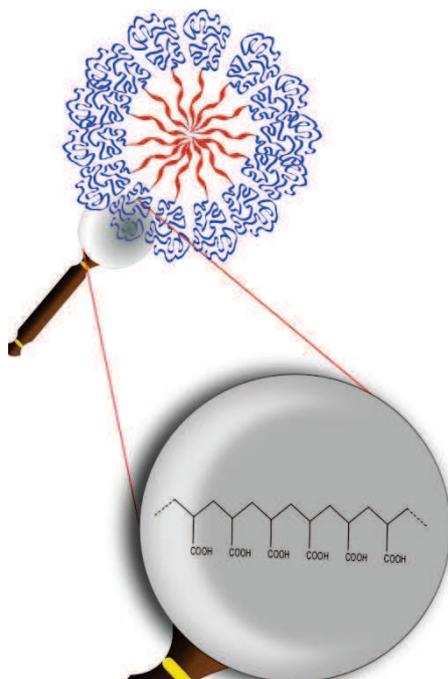


Schéma III - 2 : Zoom sur l'intérieur de la partie hydrophile à pH= 4,6

En revanche, la cac est quasiment multipliée par 15 (cac = 120 mg/L) quand le pH atteint la valeur de 7. A pH = 7, la chaîne de LPAA est partiellement déprotonnée. La présence de charges négatives le long de la chaîne favorise les répulsions électrostatiques entre elles. La cac s'en trouve donc augmentée. Toutefois, la présence de sel rend négligeable ce phénomène car le NaCl est introduit en quantité suffisante pour écranter toutes les charges. L'augmentation de la cac peut s'expliquer ici par la modification de la HLB lorsque le pH augmente. En effet, l'hydrophilie du système augmentant, le comportement de l'objet s'en trouve modifié et la cac augmente jusqu'à 120 mg/L ( $7,3 \cdot 10^{-5}$  mol/L).

A pH = 10, plus aucune agrégation n'est détectée sur la gamme de concentration étudiée. Il semble donc que la forte hydrophilie apportée par le groupement carboxylate soit telle que les chaînes ne s'associent pas à ce pH.

Nous savons maintenant que le système LPAA présente une cac sensible au pH. Nous allons observer ce qui se passe à l'interface eau/air afin de compléter ces informations.

### 3. Comportement du copolymère aux interfaces

Afin de confirmer les propriétés tensioactives du LPAA, nous avons étudié le comportement du copolymère à l'interface eau/air. Une gamme de solutions à différentes concentrations et à trois pH différents a été réalisée en présence de 0,1 mol/L de NaCl. Nous

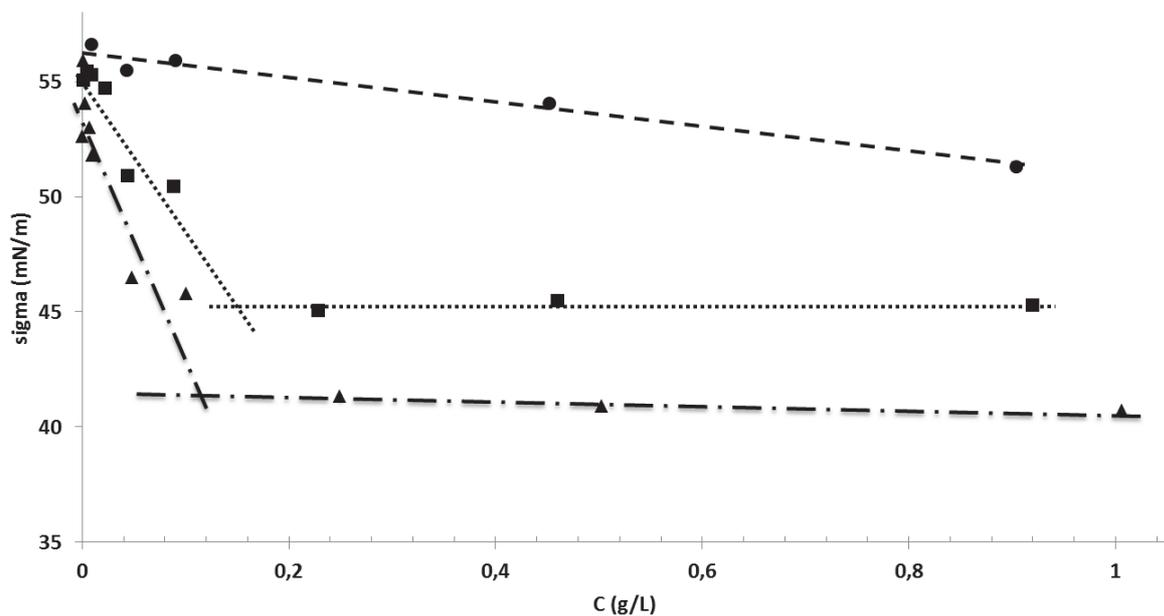
### Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

avons opté pour la méthode du plateau de Wilhelmy pour déterminer la tension de surface de chaque solution. La **figure III - 3** présente l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration en copolymère et ce à différents pH.

A pH = 4,6, la tension de surface décroît rapidement, prouvant la rapide adsorption du copolymère à l'interface eau/air. Ensuite la tension de surface se stabilise à 40 mN/m. Ceci correspond à la saturation de la surface en copolymère. La tension de surface de 40 mN/m est équivalente, selon la littérature, à celle d'un copolymère poly(méthacrylate de méthyle)-*b*-poly(acide acrylique) présentant une courte chaîne hydrophobe<sup>9</sup>.

A pH = 7, on observe le même type de comportement. Toutefois l'adsorption à l'interface est un peu plus lente et la tension de surface au plateau est légèrement plus élevée (45 mN/m), ce qui indique une moins bonne stabilisation.

A pH = 10, aucun plateau de tension de surface n'est atteint pour une gamme de concentration inférieure à 1 g/L et l'abaissement de la tension de surface reste très faible sur la gamme de concentration étudiée.



**Figure III - 3 : Evolution de la tension de surface en fonction de la concentration en LPAA en solution tamponnée à (—) pH = 4,6, (····) pH = 7 et (---) à pH = 10 et contenant [NaCl] = 0,1 mol/L**

### Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

Pour des tensioactifs classiques, l'adsorption des (macro)molécules à la surface se produit préférentiellement, et ce n'est qu'après saturation de l'interface eau-air que la micellisation se produit. La concentration à la saturation de l'interface,  $C_s$  correspond alors à la cac. Ce n'est pas le cas ici. En effet, à  $\text{pH} = 4,6$ , la  $C_s$  est beaucoup plus élevée que la cac détectée ( $C_s = 120 \text{ mg/L}$  contre  $\text{cac} = 8 \text{ mg/L}$ ) (**Tableau III - 1**). Ce phénomène tend à montrer que le LPAA commence à s'auto-associer en milieu aqueux bien avant la saturation de l'interface. Un comportement similaire a déjà été décrit dans la littérature pour un polymère amphiphile à base de polysaccharide<sup>10</sup>. De même, une étude menée sur un copolymère amphiphile ionique poly(isoprène hydrogéné)-*b*-poly(styrène sulfonate) a montré que ce copolymère s'adsorbe moins à l'interface eau/air lorsque la chaîne hydrophobe est courte<sup>11</sup>. Dans des cas extrêmes, des copolymères amphiphiles ne montrent aucune activité de surface alors que des micelles sont détectées en solution<sup>11</sup>. Ce phénomène est généralement observé pour des copolymères amphiphiles faiblement ionisés tels que ceux contenant des groupements acide carboxylique<sup>12</sup>. Ainsi il n'est pas étonnant d'observer une faible activité de surface avec le LPAA sous forme acide.

**Tableau III - 1 : Comparaison entre les cac et  $C_s$  en solution tampon à  $\text{pH} = 4,6$  et 7 et contenant  $[\text{NaCl}] = 0,1 \text{ mol/L}$**

pH	cac (mg/L)	$C_s$ (mg/L)
4,6	8	120
7	120	150

A  $\text{pH} = 7$ , on retrouve le comportement d'un tensioactif classique. En effet, la cac et la  $C_s$  sont du même ordre de grandeur (120 contre 150 mg/L). Le copolymère migre dans un premier temps à la surface avant de former des clusters hydrophobes dans l'eau.

A  $\text{pH} = 10$ , nous n'atteignons pas de plateau de tension de surface sur la gamme de concentration étudiée. A ce pH, le copolymère LPAA semble assez hydrophile pour inhiber l'adsorption à l'interface eau/air.

Les analyses de fluorescence et de tension de surface démontrent l'aptitude du LPAA à s'auto-associer et à stabiliser des interfaces. Nous allons maintenant déterminer la nature des objets formés en solution en mesurant leur taille. En effet, notre objectif est d'obtenir des

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

micelles en milieu aqueux. Or les micelles ont la caractéristique d'être des objets relativement petits de l'ordre de la dizaine de nanomètres.

### 4. Détermination de la nature des objets en solution

Afin de déterminer le diamètre hydrodynamique ( $D_h$ ) de nos objets en solution et ainsi confirmer la présence de micelles, une analyse QELS (Quasi Elastic Light Scattering) est réalisée à différents pH (**Figure III - 4**). Les résultats présentés donnent les populations en nombre.

A pH = 4,6, les objets observés ont une taille inférieure à 10 nm. Cette taille est compatible, selon la littérature<sup>13, 14</sup>, avec celle de micelles et est similaire au système PEG-PE<sup>8</sup> ( $750 < M_n < 2000$  g/mol). Dans le précédent paragraphe, le terme de concentration d'agrégation critique était utilisé. Il peut être maintenant remplacé par concentration micellaire critique.

A pH = 10, la taille des objets est fortement réduite, de l'ordre de 2 à 3 nm. Cela correspondrait à la présence d'unimères isolés ou associés en petit nombre dans la solution.

A pH = 7, le système se trouve dans une phase de transition, avec une polydispersité plus importante des populations. A ce pH, le copolymère n'est pas totalement déprotoné ( $pK_a = 5,7$ ). Il semble donc y avoir, à ce pH, persistance d'unimères associés.

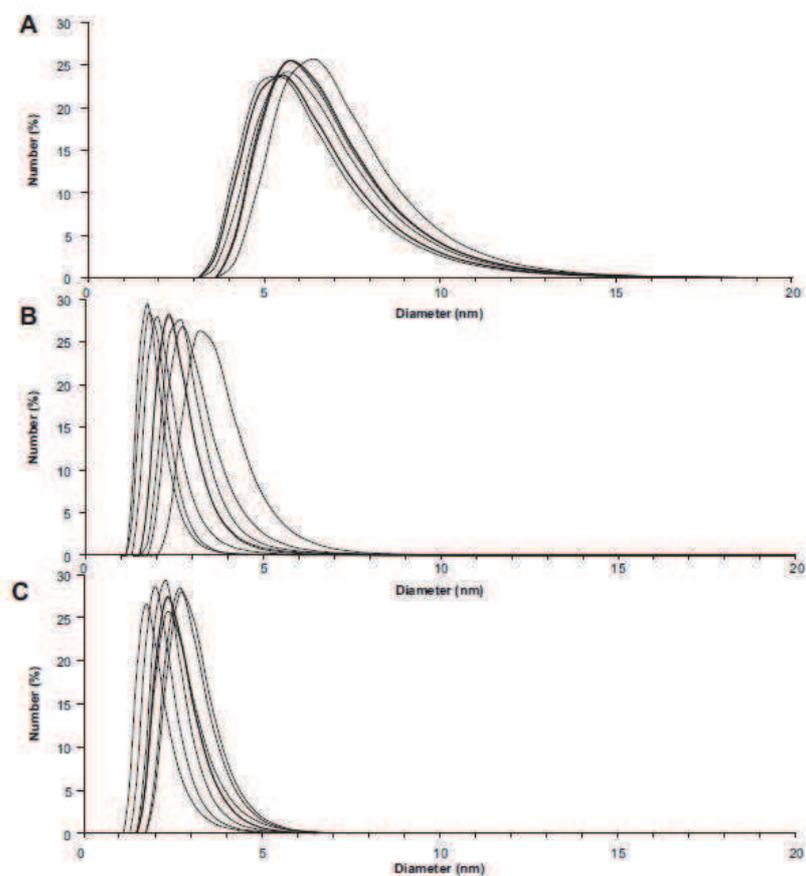
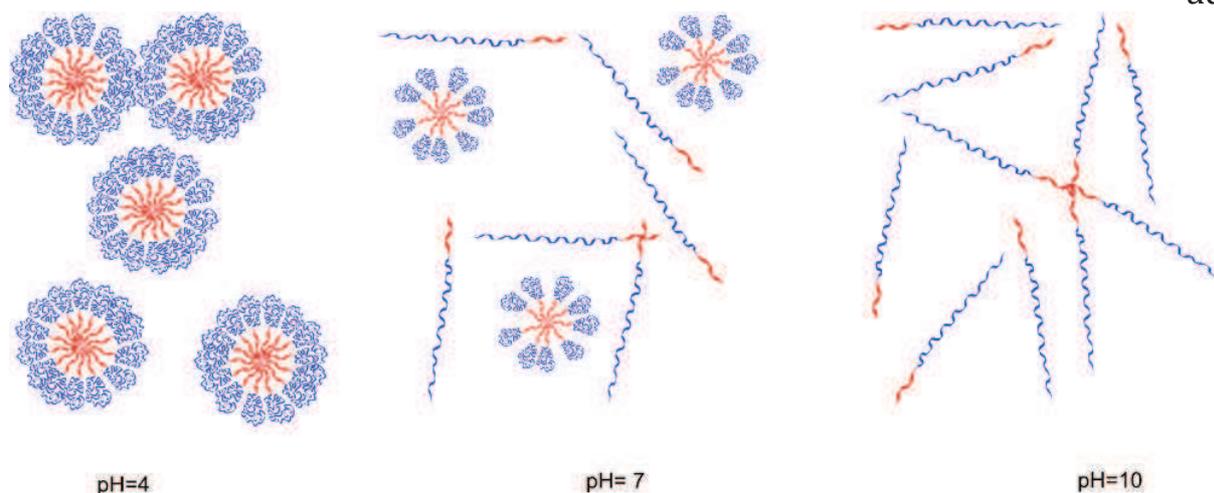


Figure III - 4 : QELS du copolymère en solution à 1 g/L en solution tampon à pH = 4,6 (A), pH = 7 (B) et pH = 10 (C) et contenant [NaCl] = 0,1 mol/L

Les transitions de taille observées confirment bien le caractère pH-sensible de ce système.

Nous pouvons résumer le comportement du système LPAA en solution aqueuse par le **Schéma III – 3**.

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux



**Schéma III - 3 : Résumé du comportement en milieu aqueux du système pH-sensible LPAA**

Le système LPAA présente donc une cmc faible d'environ 8 mg/L à pH= 4,6. De plus, les objets obtenus sont de petite taille, d'environ 10 nm, ce qui correspond à des micelles. La cmc basse, la petite taille des objets et un équilibre thermodynamique favorable aux micelles sont autant d'avantages pour une bonne conservation du système.

Des analyses en chromatographie d'exclusion stérique ont été tentées dans l'eau afin de déterminer la masse molaire moyenne en nombre d'une micelle et donc le nombre d'unimères présents dans une micelle. Toutefois, les forces de cisaillement dans la colonne empêchent de conserver l'intégrité des micelles. L'analyse n'a donc pas été concluante.

Des essais d'extinction par fluorescence ont également été réalisés en utilisant comme quencher le chlorure de cétylpyridinium afin de déterminer le nombre d'unimères ( $N_{agg}$ ) formant une micelle à pH acide<sup>15,16</sup>. Toutefois, les données obtenues n'ont pas permis de parvenir à un résultat fiable. La littérature rapporte des  $N_{agg}$  entre 6 et 30 pour des systèmes similaires<sup>15</sup>. Une étude sur un système micellaire PBA-PAA (5000 g/mol) montre des résultats très supérieurs, autour de 200 unimères par micelle<sup>17</sup>.

Des analyses par cryoTEM ont été réalisées au laboratoire IMPMC (Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés) à l'université de Pierre et Marie Curie afin d'observer la morphologie des objets en solution.

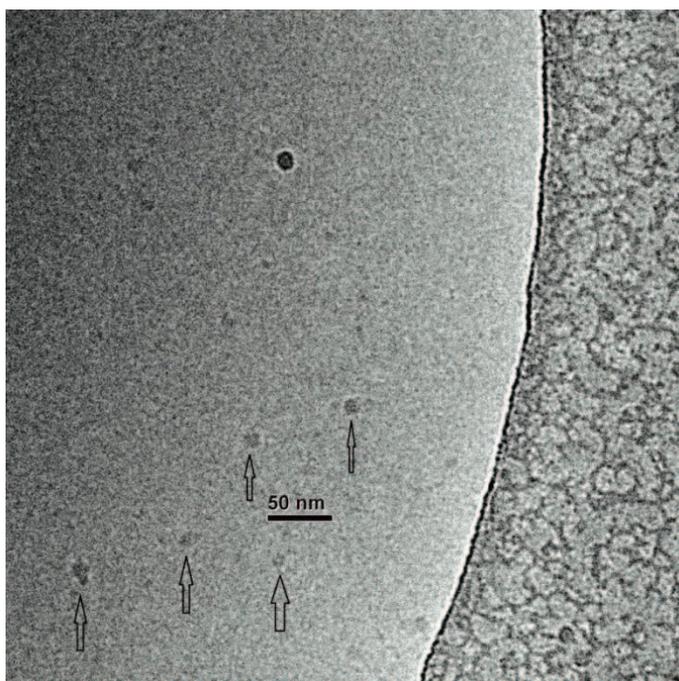


Figure III - 5 : Image obtenue par cryoTEM d'une solution de LPAA à 1 g/L à pH acide avec 0,1 mol/L de NaCl

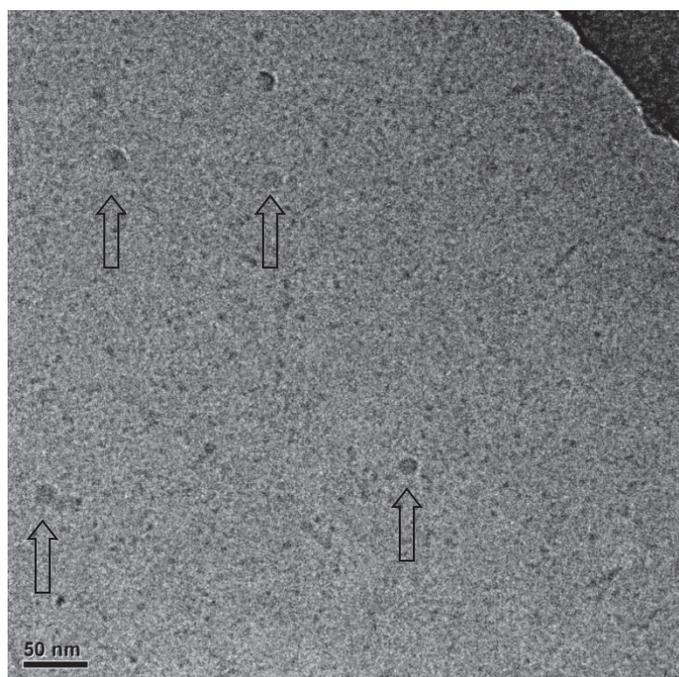


Figure III - 6 : Image obtenue par cryoTEM d'une solution de LPAA à 10 g/L à pH acide avec 0,1 mol/L de NaCl

Les clichés obtenus révèlent des objets sphériques d'environ 10 nm (flèches **Figures III - 5** et **III - 6**) ce qui correspond parfaitement aux dimensions attendues. Une étude menée en cryoTEM sur les micelles de poly(oxyde d'éthylène)-poly( $\beta$ -benzyl aspartate) (PEO-PBLA) a révélé des objets similaires d'environ 10 nm<sup>18</sup>. Toutefois ces objets apparaissent peu

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

nombreux et leur nombre n'augmente pas de façon significative lorsque la concentration de la solution est multipliée par 10 (**Figure III - 6**). Ces images sont donc à prendre avec précaution.

Les difficultés rencontrées pour observer les micelles par cryoTEM pourraient s'expliquer par la faible densité des micelles et la similitude des éléments chimiques constituant les micelles et l'environnement (grille de carbone, azote liquide, oxygène). L'utilisation d'un agent de contraste encapsulé dans le cœur hydrophobe a été envisagée mais n'a pas pu être réalisée faute de temps.

Bien qu'il faille rester prudent quant à l'analyse de ces clichés, l'ensemble des analyses réalisées permet d'affirmer que le LPAA s'auto-organise sous forme de micelles sphériques d'environ 10 nm en milieu aqueux. De plus, son caractère pH-sensible a été mis en évidence.

### **B. Influence de la température sur la structure du système**

L'un des objectifs de notre travail étant la formation de micelles mixtes par association de copolymères pH et thermo-sensibles, nous avons souhaité vérifier l'influence de la température sur le système LPAA. Cette étude a pour objectif de vérifier qu'un changement de température ne provoque pas une augmentation de la taille des micelles ou/et un changement de structure.

La **figure III - 7** montre que les tailles des micelles (déterminées par QELS) restent relativement constantes lorsque la température varie de 5 à 50°C. Seule une légère contraction des objets (de 9 à 7 nm) est observée mais ceci n'est pas révélateur d'une réelle influence de la température. La température a donc très peu d'influence sur la taille et la structure du système.

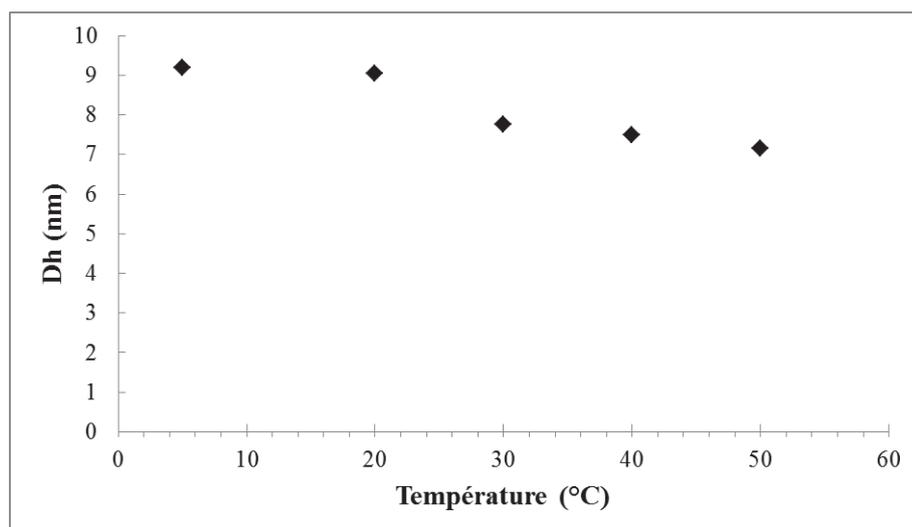


Figure III - 7: Influence de la température sur la taille des micelles de LPAA en solution tampon à pH = 4,6 et [NaCl] = 0,1 mol/L

### C. Influence de la longueur de la chaîne hydrophile sur la cmc

Comme détaillé dans le chapitre précédent, la méthode de synthèse des copolymères LPAA choisie (ATRP) permet de moduler la longueur de la chaîne hydrophile. Nous nous sommes intéressés à l'évolution des propriétés associatives du LPAA en fonction de sa composition.

L'étude de l'influence de la longueur de la chaîne hydrophile sur la cmc a été menée sur 4 copolymères en milieu tampon à pH = 4,6 et en présence de 0,1 mol/L de NaCl. La cmc a été déterminée, comme précédemment, par spectrométrie par fluorescence en utilisant le pyrène comme sonde.

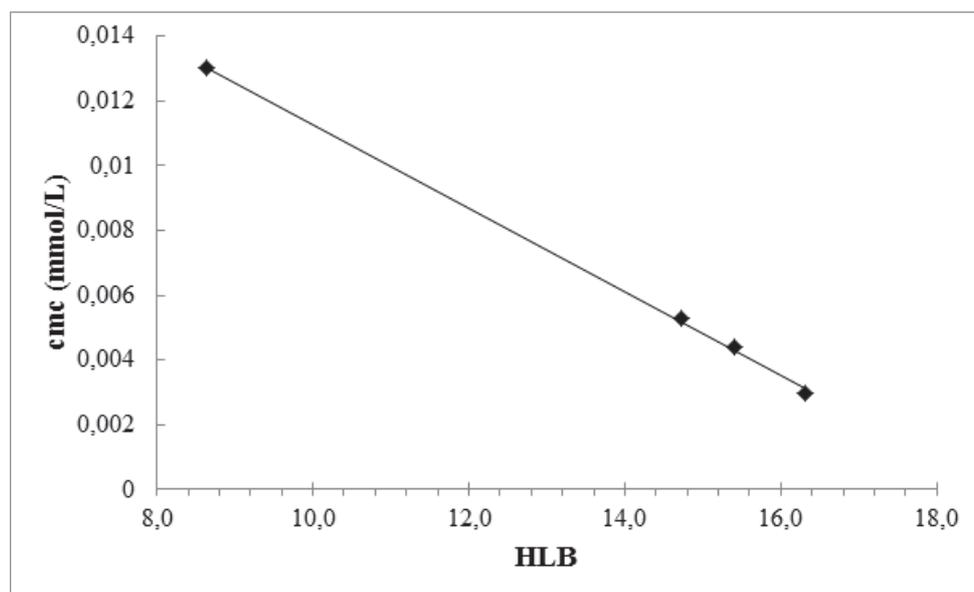


Figure III - 8 : Relation linéaire décroissante entre la HLB et la cmc en solution tampon à pH = 4,6 et [NaCl] = 0,1 mol/L

Tableau III - 2 : Classement des différents copolymères synthésés en fonction de leur Mn, leur HLB et leur cmc à pH = 4,6 et 7.

Copolymère	Mn (g/mol)	HLB	pH = 4,6		pH = 7	
			cmc (mmol/L)	cmc (mg/L)	cmc (mmol/L)	cmc (mg/L)
3a	660	8,6	0,013	8,6	/	/
3b	1420	14,7	0,0053	7,5	0,05	57
3c	1630	15,4	0,0044	7,1	0,073	85
3d	2030	16,3	0,00295	6	0,084	115

A pH = 4,6, une relation linéaire décroissante est obtenue entre la HLB et la cmc (Figure III - 8). Cette évolution ne correspond pas au comportement généralement rapporté dans la littérature. En effet, plus la longueur de la partie hydrophile augmente, plus la solubilité du copolymère dans l'eau augmente. Il en résulte donc classiquement une augmentation de la cmc. Dans le cas du LPAA et à pH = 4,6, la chaîne PAA est complètement protonée. Son hydrophilie reste donc modérée. Ceci a déjà été décrit pour le système PMMA-*b*-PDMAEMA<sup>19</sup>. Par ailleurs, la chaîne de PAA étant plus longue, elle occupe plus d'espace à la surface des micelles, ce qui peut provoquer la diminution du nombre d'unimères requis pour former une micelle. Il semble donc que l'effet stérique prenne ici le pas sur l'augmentation de l'hydrophilie, diminuant ainsi la cmc.

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus à  $\text{pH} = 7$ , lorsque la chaîne PAA est en grande partie déprotonée. L'augmentation de l'hydrophilie du copolymère lorsque la longueur du bloc PAA augmente, est, dans ce cas, plus marquée (**tableau III – 2**). Il en résulte un comportement classique d'augmentation de la cmc avec la HLB.

L'utilisation de l'ATRP offre donc un levier intéressant afin de moduler les propriétés des copolymères finaux via un contrôle précis de la HLB.

### D. Conclusion

Nous avons mis en évidence le comportement tensioactif du copolymère LPAA (détermination de la cmc et comportement à l'interface eau/air). De plus, le système LPAA s'auto-associe en milieu acide et présente une faible cmc, démontrant une bonne stabilité du système.

Le caractère pH-sensible a également été déterminé. En effet, à pH acide, le LPAA s'auto-associe sous forme de micelles qui se dissocient à pH basique, conférant ainsi une propriété de relargage de substances actives.

Il s'agit ici du premier exemple rapporté de synthèse d'un système micellaire bien défini à partir d'huile végétale hétérogène en composition.

## II. Le système thermosensible

Le second système auquel nous nous sommes intéressés est basé sur des copolymères lipide-*b*-P(IpOx).

### A. Auto-association en milieu aqueux

#### 1. Observations qualitatives des propriétés tensioactives

Comme détaillé dans le chapitre précédent, le LPOx est constitué d'une partie hydrophobe issue de l'huile de lin et d'une partie hydrophile composée de  $n$  unités oxazoline. Afin de vérifier qualitativement les propriétés tensioactives de ce copolymère, celui-ci a été introduit dans l'eau. L'agitation de cette solution conduit à l'apparition d'une mousse persistante à l'interface eau/air. Au contraire, une solution aqueuse d'homopolymère POx ne forme aucune mousse (**figures III - 9 A) et B**). Par ailleurs, l'introduction du copolymère

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

LPOx dans un mélange eau/dichlorométhane permet d'obtenir une émulsion (Figure III – 9 C)).

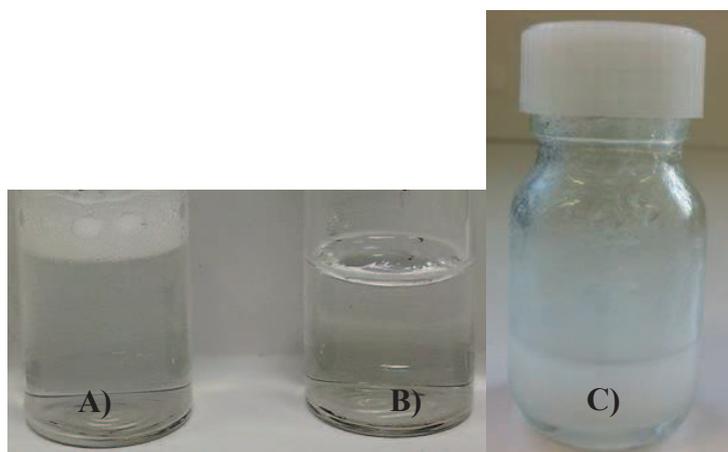


Figure III - 9 : A) Copolymère LPOx dans l'eau, B) homopolymère POx dans l'eau, C) stabilisation d'une émulsion H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> par le copolymère LPOx

Le copolymère LPOx montre donc bien des propriétés tensioactives. Une caractérisation de son comportement en milieu aqueux a donc été réalisée.

### 2. Influence de la température sur la structure du système

#### a) La LCST versus point de trouble

Les copolymères thermosensibles ont la particularité de présenter une LCST (lower critical solution temperature). En dessous de cette température, le copolymère est totalement soluble dans l'eau. Lorsque la LCST est atteinte, le copolymère devient hydrophobe et s'agrège (Schéma III - 4).

Définir précisément la LCST pour un copolymère donné nécessite d'établir un diagramme de phases du mélange binaire copolymère-solvant. Comme le présente le schéma III - 4, la LCST est le minimum de la courbe, c'est-à-dire la température en-dessous de laquelle il n'existe qu'une seule phase quelle que soit la composition du mélange.

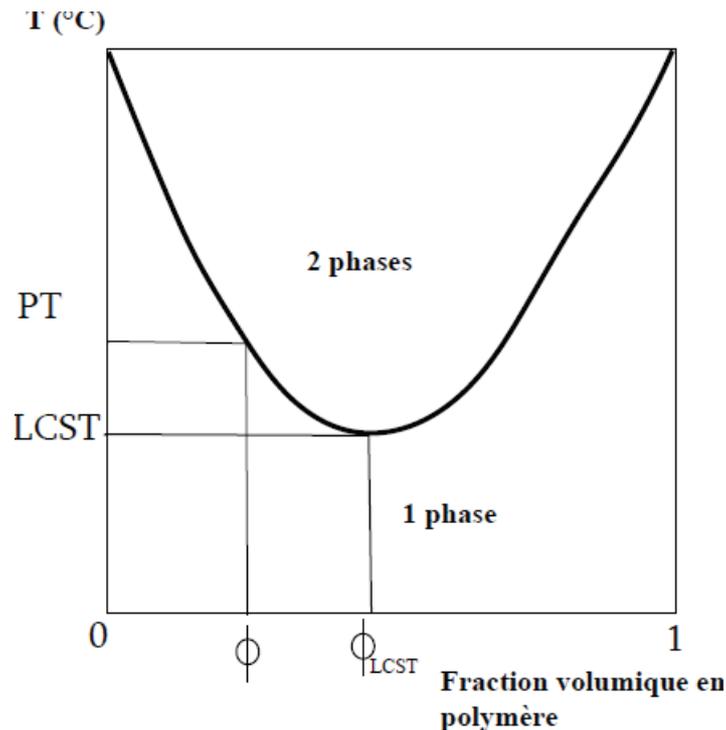


Schéma III - 4 : Diagramme de phase d'un mélange binaire copolymère thermosensible/solvant

La mise au point de ce diagramme de phase étant long et nécessitant une quantité importante de produit, nous ne déterminerons pas la LCST des copolymères synthétisés. En effet, nous nous placerons toujours à une seule et même composition. Nous ne parlerons donc pas de LCST mais plutôt de température de point de trouble ( $T_{PT}$ ).

Plusieurs facteurs influencent la LCST et donc la température de point de trouble :

- La polarité du groupement terminal : l'ajout d'un groupement hydrophobe tend à diminuer la  $T_{PT}$ <sup>20</sup>.
- La longueur de la chaîne de polymère : plus la chaîne est longue, plus la masse molaire sera importante et plus la température de point de trouble est basse.
- La présence de sel : la présence et la nature du sel dans la solution ont une nette influence sur la solubilité du copolymère<sup>21</sup>. Pour prévoir leur effet, il faut se référer à la série de Hofmeister<sup>22</sup>.

Lorsque les sels ont un effet lyotrope (qui retient l'eau), ils ont tendance à favoriser les interactions eau-eau et par ce fait empêche la solubilisation, ce qui provoque une diminution de la température de point de trouble. Au contraire, lorsque les sels ont un effet chaotrope

### Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

(destructeur de l'ordre spatial), ils ont tendance à augmenter la température de point de trouble.

Il faudra donc être vigilant à ces différents paramètres par la suite dans la mesure où les analyses seront réalisées en présence de NaCl et d'un milieu tampon.

#### b) Une allure de courbe de turbidité révélatrice d'un copolymère

Le point de trouble est déterminé par suivi de la transmittance par spectrométrie UV en fonction de la température.

Il est à noter l'allure particulière des courbes obtenues. En effet, lorsqu'on trace la transmittance en fonction de la température, une pente douce débute suivie par une chute brutale. Dans le cas d'un homopolymère, l'évolution de la transmittance en fonction de la température ne présente pas de pente. Celle-ci est remplacée par un plateau suivi d'une chute brutale (Figure III - 10).

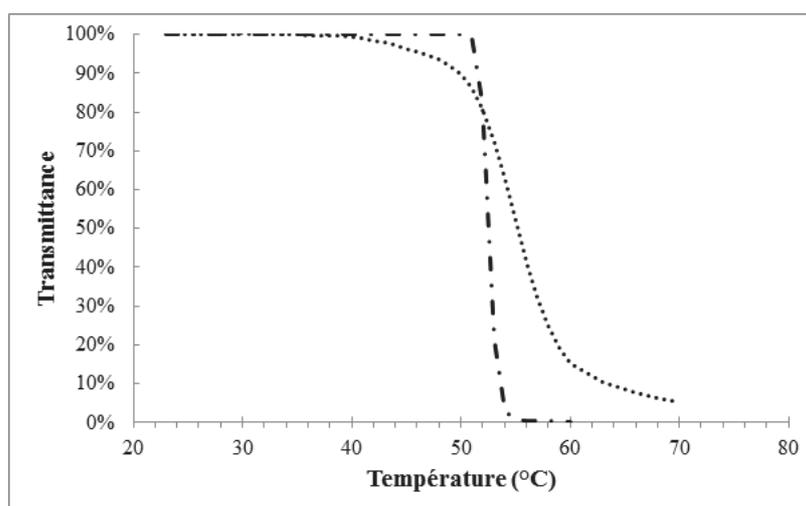


Figure III - 10 : Influence de la nature du polymère sur l'allure des courbes de turbidité (.....) LPOx19 (-.-.-) POx

Une possible explication à ce phénomène est la polymolécularité des copolymères et la présence de la chaîne hydrophobe. Ce phénomène confirme l'obtention d'un copolymère dibloc.

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

- c) Des points de troubles proches de la température du corps humain

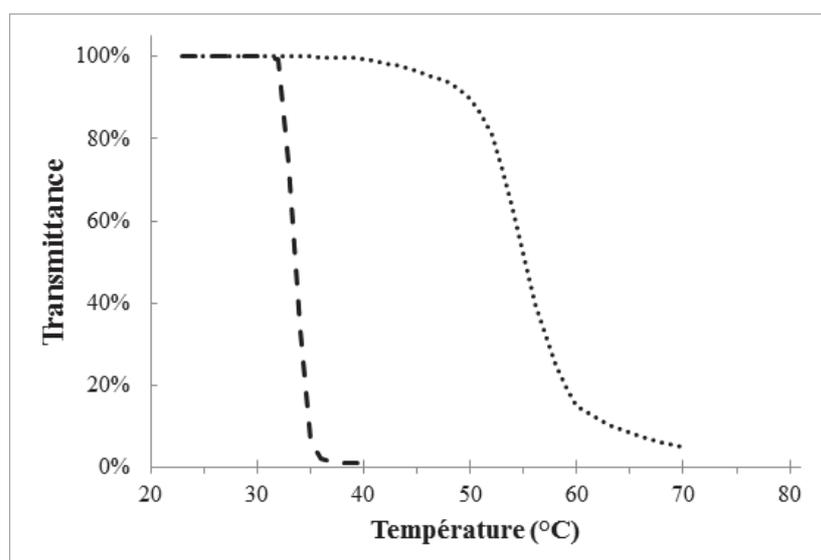
Différentes conditions (concentration en copolymère, présence de sel, pH) ont été testées afin de comparer le point de trouble des différents copolymères. Selon la littérature, l'homopolymère poly(2-isopropyl-2-oxazoline) présente une LCST entre 35 et 47°C<sup>23</sup>. Nous retrouvons ici les mêmes ordres de grandeur pour les températures de point de trouble, le LPOx 19 et le LPOx20 présentant une  $T_{PT}$  similaire autour de 50 °C à 1 g/L dans de l'eau distillée (**Tableau III – 3**).

Afin de rester dans les mêmes conditions de pH que celles utilisées avec le copolymère pH-sensible, nous avons réalisé des essais à pH = 4,6 ; 7 et 10, en présence de sel (NaCl à 0,1 mol/L) avec une concentration en copolymère de 1 g/L (**Tableau III – 3**).

**Tableau III - 3 : Influence de l'environnement (présence et nature du sel) sur la  $T_{PT}$**

Copolymère 1 g/L	$M_{n,exp}$ (g/mol)	$T_{PT}$ dans l'eau distillée	$T_{PT}$ à pH = 4,6 ( $CH_3COOH/$ $CH_3COONa$ ) [NaCl] = 0,1 M	$T_{PT}$ à pH = 7 ( $H_2PO_4Na/HPO_4Na_2$ ) [NaCl] = 0,1 M	$T_{PT}$ à pH = 10 ( $HCO_3Na/CO_3Na_2$ ) [NaCl] = 0,1 M
---------------------	------------------------	--	---	--	--

LPOx19	3400	52°C	32°C	30°C	31°C
LPOx20	2000	51°C	32°C	29°C	30°C



**Figure III - 11 : Influence de la présence de sel sur l'allure des courbes de turbidité du LPOx19 (....) en absence de sel et ( - - ) en présence de sel**

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

Le système est ici d'une grande complexité. En effet, les sels ajoutés afin d'ajuster le pH ont une influence sur la solubilité du copolymère. Toutefois le NaCl reste très majoritaire avec une concentration de 0,1 mol/L contre 0,01 mol/L pour les autres. On peut donc considérer son effet comme prépondérant. Le NaCl étant un sel lyotrope, il diminue donc la solubilité du copolymère d'où une  $T_{PT}$  fortement diminuée (**Tableau III - 3** et **Figure III - 3**). L'influence de différents sels sur la LCST de copolymères thermosensibles a fait l'objet de plusieurs études notamment sur le NIPAM<sup>22</sup>. Dans cette étude, la présence de NaCl diminue bien la LCST du NIPAM.

Par ailleurs, nous n'observons pas de nette différence de  $T_{PT}$  entre les solutions à différents pH (**Tableau III - 4**) malgré la présence de sels de nature différente. Ceci s'explique par la présence majoritaire de NaCl.

### 3. Auto-association du LPOx sous forme de micelles

#### a) Détermination de la cac et de la nature des objets en solution

De même que pour le LPAA, nous avons utilisé la technique de spectrométrie par fluorescence en utilisant le pyrène comme sonde pour déterminer la cac du système LPOx. Les mesures ont également été réalisées en excitation. Afin de pouvoir comparer avec le LPAA et dans l'optique de la préparation d'un système mixte, nous nous sommes placés dans les mêmes conditions opératoires c'est-à-dire en présence de NaCl à 0,1 mol/L et à pH = 4,6. Afin d'éviter l'agrégation du système, nous nous sommes également placés à une température inférieure à la  $T_{PT}$  à température ambiante pour réaliser toutes les analyses.

**Tableau III - 4 : Principales caractéristiques des copolymères LPOx synthétisés**

Copolymère	$\overline{Xn}^a)$	$\overline{Mn}_{exp}$ (g/mol) <sup>a)</sup>	HLB <sup>b)</sup>	cac (mg/L) <sup>c)</sup>	cac (mmol/L) <sup>d)</sup>
LPOx20	15	2000	17,3	8,5	0,0042
LPOx19	27	3340	18,4	13,3	0,004

a) déterminé par RMN

$$b) \text{ HLB} = 20 \times \frac{M_{\text{partie hydrophile}}}{M_{\text{totale}}}$$

c) déterminée par spectrométrie de fluorescence du pyrène

$$d) \text{ cac (mmol/L)} = \frac{\text{cac (mg/L)}}{Mn_{exp}}$$

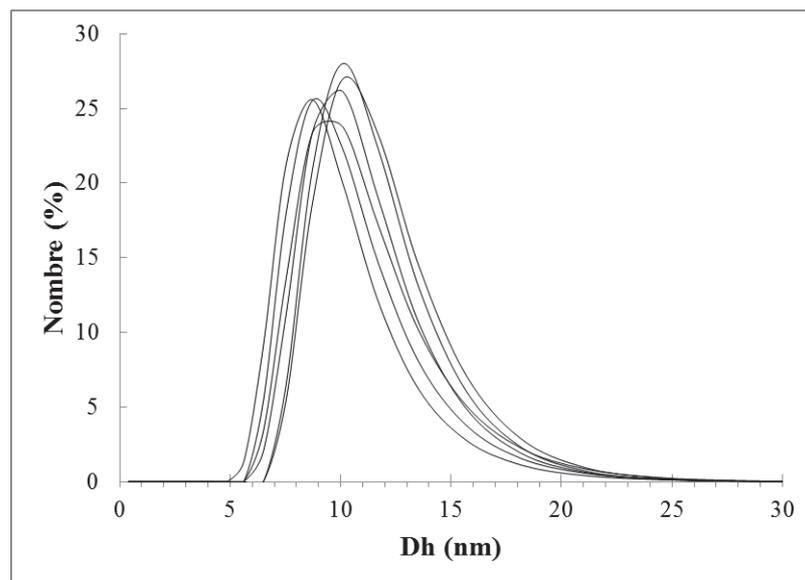
## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

Comme pour le LPAA, les cac avoisinent les 10 mg/L soit  $4.10^{-6}$  mol/L (**Tableau III - 6**). Il s'agit d'une cac relativement basse démontrant une bonne stabilité du système.

Les cac en concentrations molaires restent stables entre les deux copolymères. La HLB ne semble donc pas avoir d'influence sur la cac de ce copolymère à pH acide.

Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature pour le copolymère poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-*b*-poly(2-n-nonyl-2-oxazoline) ( $M_n = 3000$  g/mol) qui forme des micelles stables avec une cmc d'environ  $1.10^{-5}$  mol/L<sup>23</sup>. Nous pouvons donc supposer une bonne stabilité des systèmes LPOx. Nous allons maintenant déterminer la nature des objets formés en solution grâce à des analyses QELS.

Les mesures ont été réalisées avec le LPOx19 en présence de NaCl à 0,1 mol/L à pH = 4,6 (**Figure III - 12**).



**Figure III - 12 : Taille du LPOx19 en solution tampon à pH = 4,6 contenant [NaCl] = 0,1 mol/L et à T = 25°C**

Des objets relativement petits d'environ 10 nm et présentant une faible dispersion en taille sont observés. Les dimensions sont compatibles avec la formation de micelles.

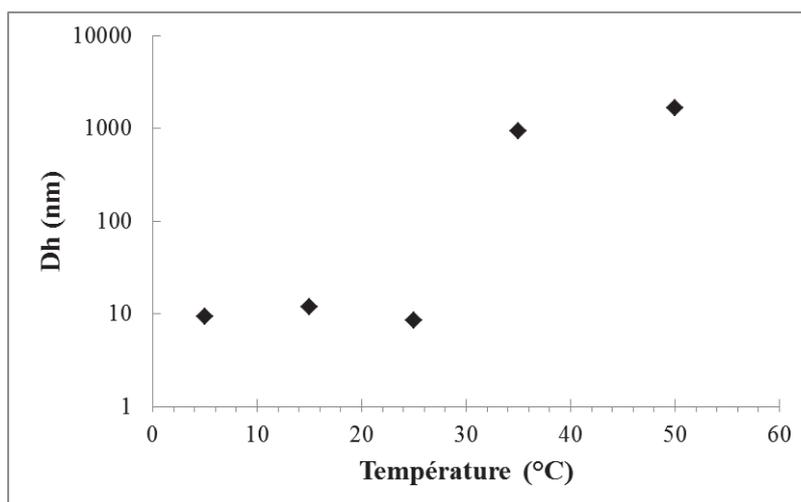
### b) Evolution de la taille des objets en solution avec la température

Nous avons également mené une étude sur l'évolution des tailles des objets en solution avec la température. En effet, nous savons qu'à température ambiante et à pH=4,6, la taille

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

des objets est d'environ 10 nm. Nous allons déterminer les limites de stabilité de ce système en réponse à un changement de température.

Les essais menés confirment le phénomène de point de trouble (**Figure III - 13**). En effet, à une température inférieure ou égale à 25°C, les objets en solution sont sous forme de micelles avec des tailles d'environ 10 nm. Lorsque la  $T_{PT}$  est atteinte, le copolymère devient insoluble dans l'eau et s'agrège d'où l'apparition d'objets de taille beaucoup plus importante.



**Figure III - 13 : Evolution de la taille des objets en solution en fonction de la température**

Il est à noter que ce phénomène est totalement réversible. En effet, un retour à 25°C entraîne instantanément une dissociation des agrégats et le retour à des objets de petite taille (10 nm).

### **B. Influence du pH sur la structure du système**

Le copolymère amphiphile LPOx présentant uniquement des groupements amides sur la chaîne pendante, il ne devrait pas présenter d'activité acido-basique. On ne s'attend donc pas à une influence du pH sur le comportement en milieu aqueux du copolymère. Cependant, toujours dans l'optique de la préparation et de l'étude d'un système mixte, nous avons souhaité le vérifier.

Pour cela une solution de LPOx19 a été préparée à pH basique. Nous avons ensuite observé en QELS l'évolution de la taille des objets en fonction de la température sur cette nouvelle solution (**Figure III - 14**).

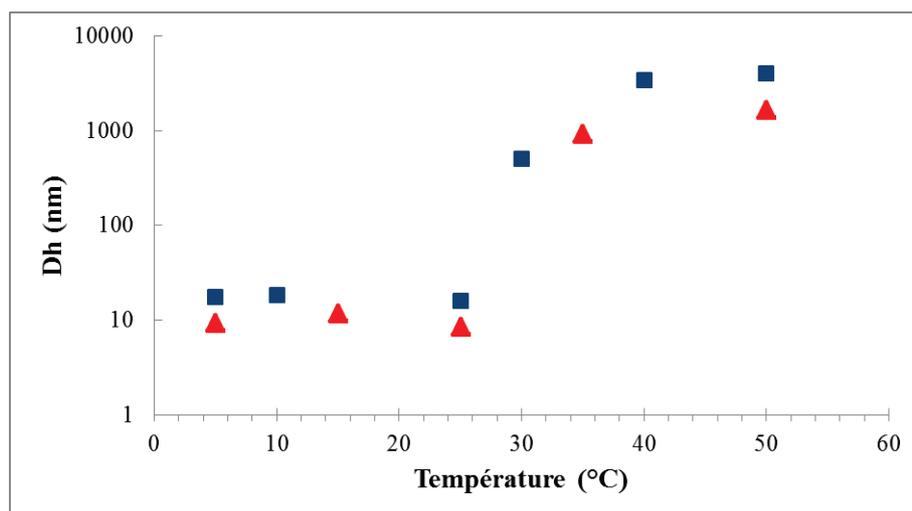


Figure III - 14 : Evolution de la taille des objets en solution tampon à (▲) pH acide et (■) pH basique avec 0,1 mol/L de NaCl en fonction de la température

Globalement, le pH n'influence pas la taille des objets en solution. Toutefois les essais QELS à pH basique ont révélé un manque d'homogénéité de la solution qui n'apparaît pas à pH acide.

Bien que, la taille des objets soit similaire à pH acide et basique, on ne peut pas dire que le changement de pH n'a pas eu d'influence sur le système puisqu'il a provoqué une perte d'homogénéité. La solution a été réalisée dans un milieu tampon en présence de 0,1 mol/L de NaCl, et d'un mélange de bicarbonate de sodium et de carbonate de sodium à 0,01 mol/L. Le sel étant présent également dans la solution à pH acide, seul le mélange de bicarbonate de sodium et de carbonate de sodium peut avoir influencé ce phénomène.

### C. Conclusion

L'étude du comportement du copolymère LPOx est tout aussi complexe que celle du LPAA. En plus de son comportement thermosensible, il faut ajouter l'influence des sels en présence sur la solubilité du copolymère. En effet, lorsque la température dépasse le point de trouble, les micelles s'agrègent. L'ajout de sels pour ajuster le pH provoque une diminution de la solubilité du copolymère. Ceci pourrait être la cause de l'apparition d'un manque d'homogénéité des solutions observée par analyse QELS sans pour autant avoir une nette influence sur la  $T_{PT}$ .

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

En résumé, comme le souligne le **tableau III - 5**, les systèmes LPOx et LPAA présentent les mêmes caractéristiques générales. En effet, les cmc et la taille des objets sont similaires.

**Tableau III - 5 : Comparaison des principales caractéristiques des deux systèmes synthétisés**

Système	$\overline{Mn}_{exp}$ <sup>a)</sup> (g/mol)	cmc <sup>b)</sup> (mg/L)	Taille des objets <sup>c)</sup> (nm)	Nature des objets en solution	Sensibilité au pH	Sensibilité à la température
LPAA	<2000	~10	~10	micelles	Oui	Non
LPOx	2000<Mn<3500	~10	~10	micelles	Légère	Oui

a) Déterminée par RMN

b) Déterminée par spectrométrie par fluorescence du pyrène

c) Déterminée par QELS

D'après cette étude, le système LPOx forme des micelles stables à pH = 4,6 et à T < 30°C. Les micelles de LPOx et de LPAA présentent des tailles avoisinant les 10 nm qui sont considérées comme idéales pour que le système de vectorisation puisse accéder à différents tissus et même pénétrer dans les cellules.<sup>24</sup>

### III. Le système mixte

Les caractères pH-sensible du LPAA et thermosensible du LPOx ont été mis en évidence dans les paragraphes précédents. Dans le but d'obtenir des systèmes de vectorisation « intelligents » répondant à un double stimuli, nous nous sommes intéressés à la préparation d'un système mixte composé des deux copolymères.

Plusieurs voies existent pour former des micelles mixtes<sup>25</sup>. L'une d'elles repose sur les interactions hydrophobes. Dans notre cas, le bloc hydrophobe des deux copolymères étant identique, cela devrait favoriser la formation de micelles mixtes.

Dans cette partie, nous allons étudier la formation des micelles mixtes et le changement de comportement en milieu aqueux lors des modifications de l'environnement (pH, température).

### A. Auto-association en milieu aqueux à pH acide

Les systèmes isolés LPAA et LPOx forment aisément des micelles à pH acide et à température ambiante. Nous nous sommes placés donc dans ces conditions pour réaliser les systèmes mixtes. Comme les blocs hydrophobes sont identiques, nous nous attendons à de fortes interactions hydrophobes, favorisant ainsi la formation des micelles mixtes. Toutefois, le LPAA étant un polyélectrolyte, il défavorise la solubilité du LPOx. C'est pourquoi, nous nous sommes placés à une concentration massique en chacun des copolymères relativement faible (0,5 g/L). La cmc des deux systèmes étant similaire, la cmc du système mixte sera équivalente. En effet, la cmc du système mixte peut se calculer grâce à la formule suivante <sup>24</sup>:

$$\frac{1}{cmc} = \frac{M_1}{cmc_1} + \frac{M_2}{cmc_2}$$

avec  $M_1$  et  $cmc_1$ , respectivement, la fraction molaire et la cmc du copolymère 1,

et  $M_2$  et  $cmc_2$ , respectivement, la fraction molaire et la cmc du copolymère 2.

#### 1. Etude de l'évolution de la taille des objets en fonction du pH et de la température

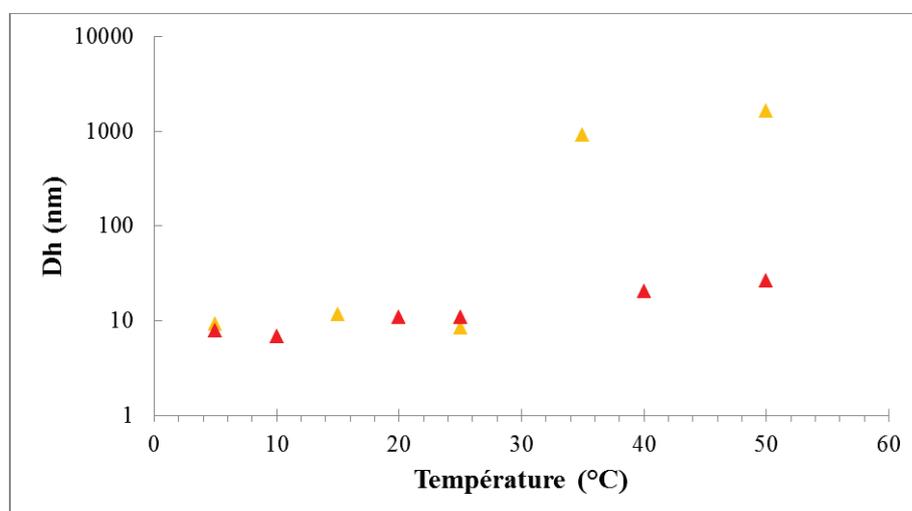
Nous avons réalisé une solution contenant 0,5 g/L de chaque copolymère, soit, en molaire, un ratio de 60/40 LPAA 3d/LPOx 20 en présence de 0,1 mol/L de NaCl à pH = 4,6. Les micelles mixtes ont été préparées soit par mélange d'une solution de LPOx avec une solution de LPAA soit par addition d'un copolymère en poudre à une solution micellaire de l'autre copolymère. L'influence de la méthode de préparation a été étudiée. Les résultats sont **annexe III – 1**. Nous retiendrons pour la suite, que les tendances concernant l'évaluation des tailles et leur évolution en fonction de la température et du pH sont identiques quel que soit la méthode de préparation.

##### a) A pH acide

A ce pH et à  $T < T_{PT}$ , une seule population apparaît lors des analyses QELS. La taille de cette population avoisine les 10 nm. Les deux systèmes seuls formant des micelles de 10 nm, nous ne pouvons pas savoir à ce stade si nous sommes en présence de micelles mixtes ou de micelles isolés de chaque copolymère. Toutefois lorsque la  $T_{PT}$  est dépassée, aucune

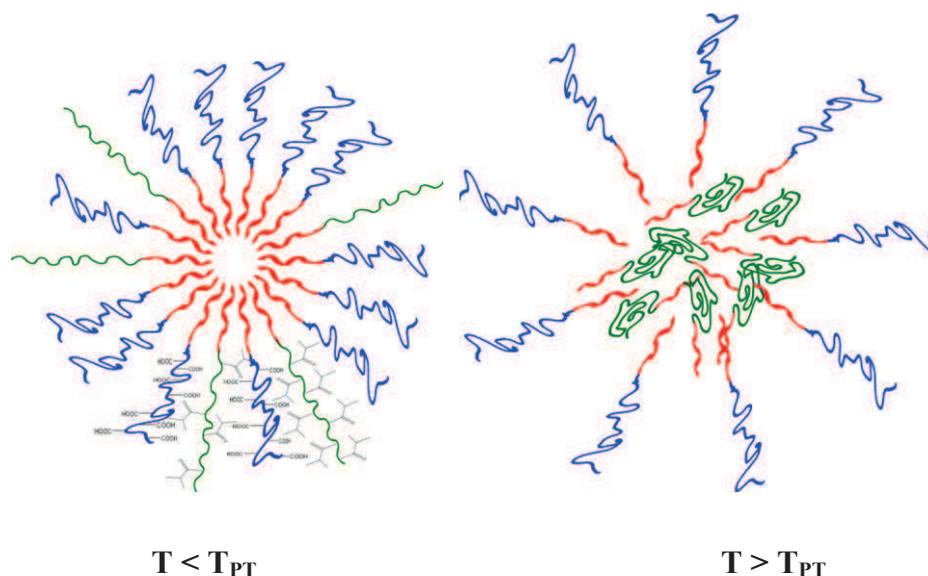
### Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

agrégation n'est visible (**Figure III – 15**). Le système reste stable quelle que soit la température.



**Figure III - 15 : Influence de la température sur la structure en solution tampon à pH acide et 0,1 mol/L de NaCl (▲) du LPOx seul et (▲) du système mixte**

L'absence de  $T_{PT}$  tend à prouver que nous sommes bien en présence d'un système mixte et non de deux systèmes isolés qui n'interagissent pas. En effet, l'absence d'agrégation indique que la présence du copolymère LPAA stabilise le système et permet sa cohésion à pH acide et à température élevée. Effectivement le LPOx devient totalement hydrophobe au-dessus de la  $T_{PT}$ . Mais la température n'a aucune influence sur le LPAA. On peut faire l'hypothèse que le LPOx, devenant totalement hydrophobe, migre vers l'intérieur de la structure mais ne s'agrége pas (**Schéma III – 5**). Ceci peut également expliquer l'apparent gonflement des micelles à 40 °C. Afin de mieux comprendre les phénomènes en jeu, nous proposons le schéma suivant.



**Schéma III - 5 : Comportement des micelles mixtes à pH acide en fonction de la température**

Afin de confirmer ces hypothèses, deux analyses ont été réalisées. Tout d’abord, le potentiel zêta a été déterminé afin de connaître les charges présentes à la surface des micelles. Le deuxième essai consiste en la détermination de la taille des micelles de LPAA quand elles ont encapsulé une molécule hydrophobe.

i. Détermination du potentiel zêta ( $\zeta$ )

Le LPAA seul à 5°C et à pH acide présente un potentiel zêta d’environ -34 mV. Ainsi, même à pH acide, le LPAA possède encore des charges négatives.

**Tableau III - 6 : Evolution du potentiel zêta à pH acide avec la température**

$\zeta$ (mV)	T = 5°C	T = 40°C
<b>LPAA seul</b>	-34	Non déterminé
<b>Système mixte LPAA/LPOx</b>	-24	-28

A pH acide et T = 5°C, le potentiel zêta du système mixte tend à augmenter par rapport au système LPAA seul. Ceci tend à prouver la mixité du système, la présence d’unimères LPOx neutres dans la micelle provoque une diminution de la densité de charges autour de la micelle.

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

A 40°C, une légère diminution du potentiel zêta a lieu. Ceci tend également à concorder avec une encapsulation du LPOx dans le système LPAA. La densité de charges en surface augmente avec le repliement du LPOx dans le cœur des micelles.

- ii. Influence de l'encapsulation d'une molécule hydrophobe sur la taille du système LPAA

La vitamine K1 a été choisie pour cet essai. Comme représenté sur le **schéma III - 6**, la vitamine K1 possède une longue chaîne carbonée. Ceci va favoriser l'affinité avec le cœur des micelles contenant des chaînes alkyles en C18.

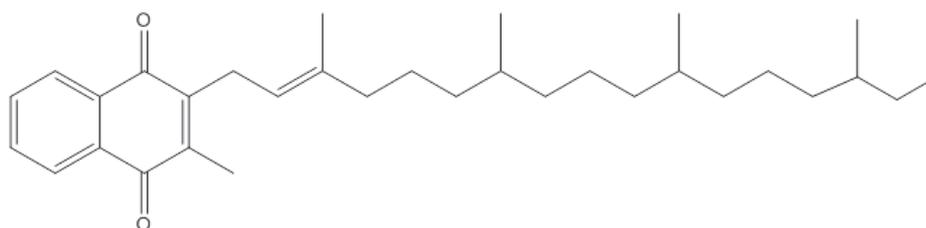


Schéma III - 6 : Structure de la vitamine K1

La taille des micelles a été analysée en QELS après encapsulation de la molécule.

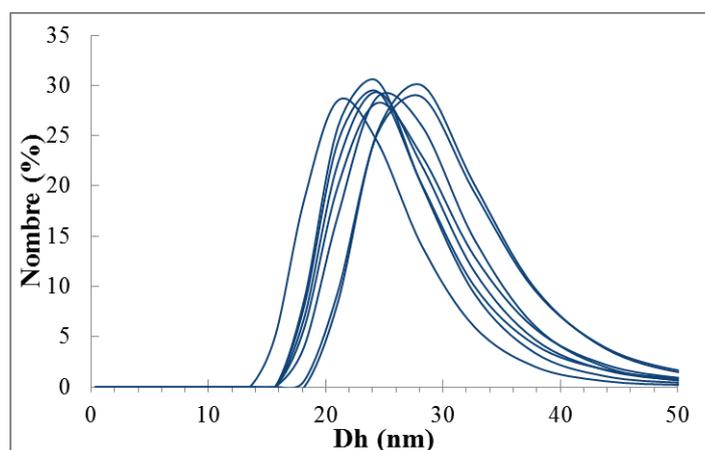


Figure III - 16 : Analyse QELS du système micellaire LPAA encapsulant de la vitamine K1

Les micelles de LPAA passent d'une dizaine de nanomètres à environ 25 nm lorsque la vitamine K1 est encapsulée à l'intérieur (**Figure III - 16**). Cette variation de taille peut sembler importante mais cela a déjà été observé notamment avec un système PEG-PE<sup>26</sup>.

Cette nouvelle taille correspond à celle obtenue à 40°C pour le système mixte. Cette analyse va donc dans le sens d'une contraction des unimères de LPOx vers le cœur des micelles.

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

### b) A pH basique

Une partie de la solution à pH = 4,6 est prélevée et son pH est ajusté à 12 par ajout d'une solution de soude.

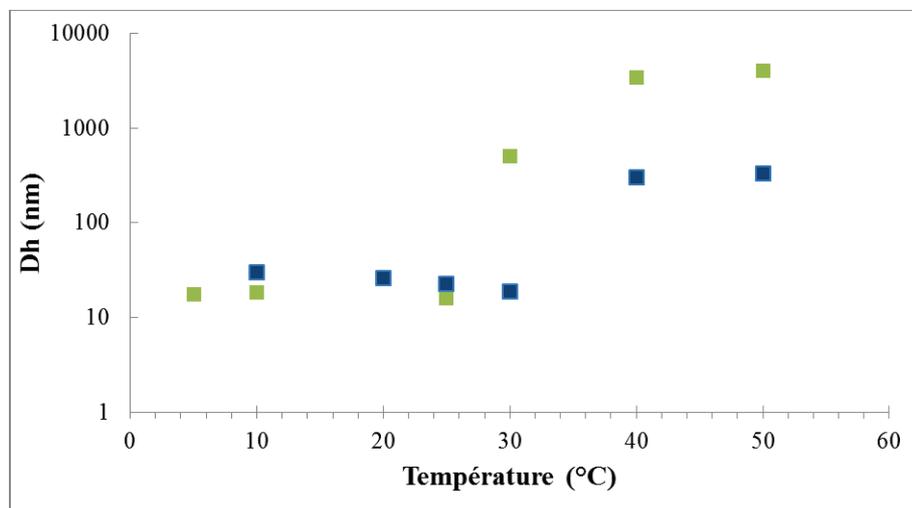


Figure III - 17 : Influence de la température sur la structure à pH basique du (■) LPOx seul et du (■) système mixte

A une température inférieure à la  $T_{PT}$ , les objets présentent des tailles très légèrement supérieures à celles observées à pH acide (~30 nm contre ~10 nm). De même, les tailles des objets sont également légèrement plus importantes que celles du système LPOx seul à pH basique ( $Dh_{LPOx} = 16$  nm). Nous sommes toujours en présence de micelles. Il est important de noter que, la présence d'objets à ce pH de taille un peu plus importante étaye la mixité du système. En effet, les copolymères de LPAA totalement déprotonnés provoquent le gonflement de la couronne. Il a été précédemment mis en évidence que le système LPAA seul ne s'auto-associe pas à ce pH et à cette concentration. Dans ce cas, c'est donc le LPOx qui permet de maintenir la cohésion du système et qui stabilise le LPAA lors du passage en milieu basique.

Un phénomène d'agrégation est de nouveau observé à ce pH lorsque la température augmente. Cependant, la  $T_{PT}$  est atteinte à une température plus élevée que pour le LPOx seul ce qui étaye l'hypothèse de la mixité du système.

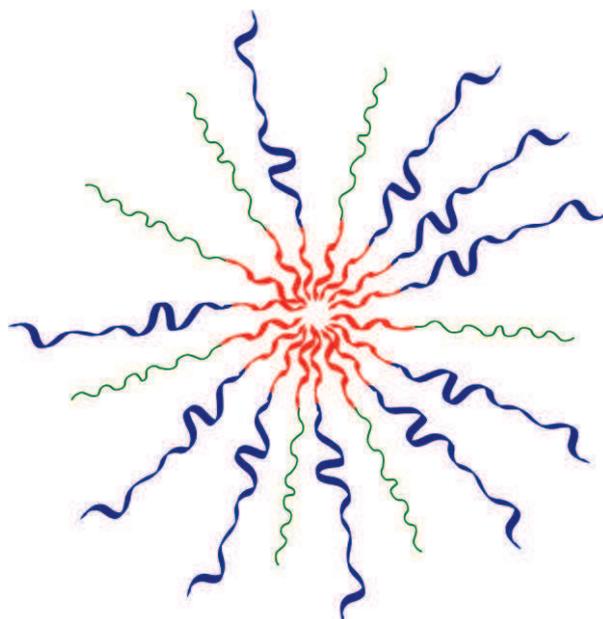


Schéma III - 7 : Système mixte à pH basique et  $T < T_{PT}$

Lorsque la température atteint la  $T_{PT}$ , le LPOx devient hydrophobe. Cependant la forte hydrophilie du LPAA à ce pH ne lui permet plus de stabiliser le système comme à pH acide. Cette inhibition du caractère tensioactif du LPAA à pH basique a notamment été mise en évidence lors des mesures de tension de surface. C'est pourquoi, le système s'agrège.

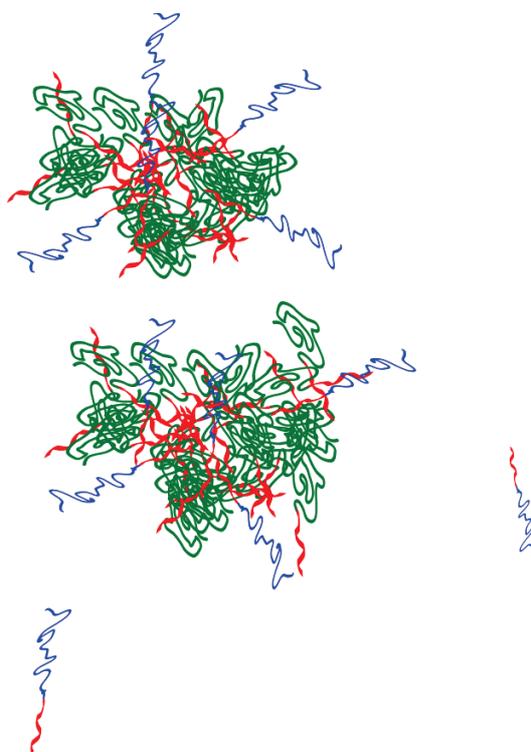


Schéma III - 8 : Agrégation du système à pH basique et  $T > T_{PT}$

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

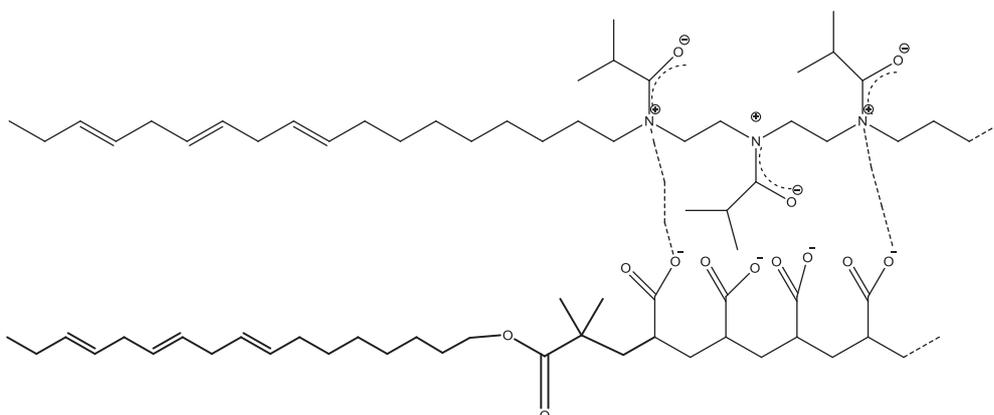
Afin de confirmer nos hypothèses, le potentiel zêta a été déterminé à pH basique pour les deux températures extrêmes du système.

**Tableau III - 7 : Evolution du potentiel zêta à pH basique avec la température**

$\zeta$ (mV)	T = 5°C	T = 40°C
<b>Système mixte LPAA/LPOx</b>	-4	-22

A  $T < T_{PT}$ , le potentiel zêta est neutre. Les charges négatives du LPAA présentes autour de la micelle n'apparaissent plus. Nous nous sommes donc interrogés sur la possibilité d'être en présence de micelles de LPOx « pures » et d'unimères de LPAA relargués dans la solution du fait de leur forte hydrophilie. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré le potentiel zêta d'une solution d'unimères de LPAA seuls à pH = 12,6. Celui-ci est de -30 mV à 20 °C. On s'attendrait donc à un potentiel zêta global, somme des micelles de LPOx neutres et des unimères de LPAA, négatif. Or celui-ci est neutre. L'hypothèse de relargage du LPAA dans la solution ne tient donc pas.

Une interaction ionique est ici impossible puisque, seul le LPAA est ionisé à pH basique. Si nous représentons deux unimères de LPOx et de LPAA à ce pH (**Schéma III - 9**), nous nous apercevons que des interactions dipôle-dipôle peuvent s'établir entre les deux.



**Schéma III - 9 : Interactions dipôle-dipôle entre la partie poly(acide acrylique) et la partie poly(oxazoline)**

Ainsi il est possible que le système mixte LPOx – LPAA soit stabilisé à la fois par l'affinité des parties hydrophobes et par la création d'interactions de Van der Waals entre les deux parties hydrophiles. Les charges négatives du LPAA sont alors masquées par la présence du LPOx d'où un potentiel zêta neutre à pH basique et  $T < T_{PT}$ .

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

A  $T > T_{PT}$ , le potentiel zêta est de nouveau négatif. Comme schématisé plus haut, à cette température et ce pH, le système s'agrège. Le LPAA se retrouve soit libéré sous forme d'unimères, soit en surface des agrégats de LPOx. Dans tous les cas, les charges en surface des objets en solution sont négatives. Il faut noter que les unimères de LPAA n'ont pas été observés en QELS même après filtration de la solution pour séparer les agrégats du reste de la solution. Il semblerait donc que les unimères de LPAA soient en surface des agrégats de LPOx ou emprisonnés à l'intérieur.

### B. Conclusion

Le système mixte LPAA + LPOx montre un comportement en milieu aqueux très intéressant. En effet chacun stabilise l'autre. Ainsi à pH acide et à une température supérieure au point de trouble, le LPAA stabilise la structure en encapsulant le LPOx hydrophobe. De même qu'à pH basique et à une température inférieure au point de trouble, le LPOx stabilise la structure en retenant le LPAA complètement hydrophile.

Afin de collapser le système, il faut se trouver dans les conditions défavorables de chaque système isolé, c'est-à-dire à pH basique et à  $T > T_{PT}$ .

## Conclusion

Au cours de ce chapitre, le comportement en milieu aqueux de trois systèmes différents a été étudié :

- LPAA
- LPOx
- LPAA + LPOx

Le comportement tensioactif des deux premiers systèmes a été mis en évidence. Chacun présente une cmc d'environ 10 mg/L et des tailles d'objet d'une dizaine de nanomètres ce qui correspond à des systèmes micellaires. Une faible cmc et une taille d'une dizaine de nanomètres sont des paramètres idéaux pour les systèmes de vectorisation car cela favorise la stabilité des micelles, l'accès à différents tissus et l'effet EPR.

Les caractères pH et thermo-sensibles ont été démontrés. En effet, les micelles de LPAA se désassocient à pH basique tant dis que les micelles de LPOx s'agrègent lorsque la

### Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

température augmente. Ces deux systèmes montrent donc des propriétés de libération contrôlée de principes actifs.

Le troisième système consiste en des micelles composées à la fois des copolymères LPAA et LPOx. La mixité du système a pu être démontrée par notamment une meilleure stabilité du système lorsque la température augmente ou lorsque le pH augmente. La désorganisation du système mixte a lieu lorsque les deux conditions défavorables sont présentes ( $T > T_{PT}$  et pH basique). Ce système offre donc des nouvelles perspectives dans le contrôle de la libération.

Afin de compléter l'étude sur l'amélioration de la stabilité des systèmes micellaires, nous proposons d'utiliser les doubles liaisons présentes sur les chaînes hydrophobes afin de réticuler le cœur des micelles.

## Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

1. Salager, J.-L., Anton, R., Andérez, J. M. & Aubry, J.-M. Formulation des microémulsions par la méthode du HLD. *Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés* 1–20
2. Kalyanasundaram, K. & Thomas, J. K. Environmental Effect on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *JACS* **99**, 2039–2044 (1977).
3. Ananthapadmanabhan, K. P., Goddard, E. D. & Turro, N. J. in Fluorescence Probes for Critical Micelle Concentration. *Langmuir* **1**, 352–355 (1985).
4. Astafieva, I., Zhong, X. F. & Eisenberg, A. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules* **26**, 7339–7352 (1993).
5. Astafievaj, I., Khougaz, K. & Eisenberg, A. Micellization in Block Polyelectrolyte Solutions . 2 . Fluorescence Study of the Critical Micelle Concentration as a Function of Soluble Block Length and Salt Concentration. *Macromolecules* **28**, 7127–7134 (1995).
6. Manfred, W., Zhao, C., Wang, Y., Xu, R., Winnik, M.A., Mura, J-L., Riess, G., Croucher, M.D. Poly(styrene-ethylene oxide) Block Copolymer Micelle Formation in Water: A Fluorescence Probe Study'. *Macromolecules* **24**, 1033–1040 (1991).
7. Zhao, C., Winnik, M. A., Riess, G. & Croucher, M. D. Fluorescence Probe Techniques Used To Study Micelle Formation in Water-Soluble Block Copolymers. *Langmuir* **6**, 514–516 (1990).
8. Lukyanov, A. N. & Torchilin, V. P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Advanced drug delivery reviews* **56**, 1273–89 (2004).
9. Rager, T., Meyyer, W.H., Wegner, G., Mathauer, K., Mächte, W., Schrof, W., Urban, D. Block copolymer micelles as seed in emulsion polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics* **200**, 1681–1691 (1999).
10. Duval-Terrié, C., Huguet, J. & Muller, G. Self-assembly and hydrophobic clusters of amphiphilic polysaccharides. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **220**, 105–115 (2003).
11. Kaewsaiha, P., Matsumoto, K. & Matsuoka, H. Non-surface activity and micellization of ionic amphiphilic diblock copolymers in water. Hydrophobic chain length dependence and salt effect on surface activity and the critical micelle concentration. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **21**, 9938–45 (2005).
12. Theodoly, O., Jacquin, M., Muller, P. & Chhun, S. Adsorption kinetics of amphiphilic diblock copolymers: from kinetically frozen colloids to macrosurfactants. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **25**, 781–93 (2009).

### Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

13. Letchford, K. & Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* **65**, 259–69 (2007).
14. Lorin, A., Flore, C., Thomas, A. & Brasseur, R. Les liposomes : description , fabrication et applications. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement* **8**, 163–176 (2004).
15. Volet, G., Chanthavong, V., Wintgens, V. & Amiel, C. Synthesis of Monoalkyl End-Capped Poly(2-methyl-2-oxazoline) and Its Micelle Formation in Aqueous Solution. *Macromolecules* **38**, 5190–5197 (2005).
16. Turro, N. J. & Yekta, A. Luminescent probes for detergent solutions. A simple procedure for determination of the mean aggregation number of micelles. *J. Am. Chem. Soc* **100**, 5951–5952 (1978).
17. Jacquin, M., Muller, P., Talingting-Pabalan, R., Cottet, H., Berrt, J-F., Futterer, T., Théodoly, O. Chemical analysis and aqueous solution properties of charged amphiphilic block copolymers PBA-b-PAA synthesized by MADIX. *Journal of colloid and interface science* **316**, 897–911 (2007).
18. Yu, B. G., Okano, T., Kataoka, K. & Kwon, G. Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B. *Journal of controlled release* **53**, 131–136 (1998).
19. Xiao, G., Hu, Z., Zeng, G., Wang, Y., Huang, Y., Hong, X., Xia, B., Zhang, G. Effect of Hydrophilic Chain Length on the Aqueous Solution Behavior of Block Amphiphilic Copolymers. *Journal of Applied Polymer Science* **124**, 202–208 (2012).
20. Chung, J. E., Yokoyama, M., Suzuki, K., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T. Reversibly thermo-responsive alkyl-terminated poly(N-isopropylacrylamide) core-shell micellar structures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **9**, 37–48 (1997).
21. Weber, C., Hoogenboom, R. & Schubert, U. S. Temperature responsive bio-compatible polymers based on poly(ethylene oxide) and poly(2-oxazoline)s. *Progress in Polymer Science* **37**, 686–714 (2012).
22. Zhang, Y., Furyk, S., Bergbreiter, D. E. & Cremer, P. S. Specific ion effects on the water solubility of macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister series. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 14505–10 (2005).
23. Huber, S. & Jordan, R. Modulation of the lower critical solution temperature of 2-Alkyl-2-oxazoline copolymers. *Colloid and Polymer Science* **286**, 395–402 (2007).
24. Torchilin, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of controlled release* **73**, 137–72 (2001).

### Chapitre III : Etude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

25. Ebrahim Attia, A. B., Ong, Z.Y., Hedrick, J.L., Lee, P.P., Ee, P.L.R., Hammond, P.T., Yang, Y-Y. Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **16**, 182–194 (2011).
26. Wang, J., Dimitry, M. & Torchilin, V. P. Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: Preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. *Journal of Drug Targeting* **13**, 73–80 (2005).

## *Chapitre IV*

### *Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieu aqueux*

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

### Introduction

Les copolymères lipide-*b*-poly(acide acrylique) et lipide-*b*-poly(oxazoline), dont la synthèse a été développée dans le chapitre II, nous ont permis d'accéder à trois systèmes micellaires distincts. L'étude de leur comportement en milieu aqueux dans le chapitre précédent a conduit aux conclusions suivantes.

Le système pH-sensible, constitué uniquement du copolymère LPAA, est stable en milieu acide mais se dissocie très rapidement à partir de  $\text{pH} = 7$ . Le système thermosensible, formé du copolymère LPOx, est stable en-dessous de  $30^\circ\text{C}$  mais s'aggrave au-delà. Quant au système mixte, composé d'un mélange LPAA et LPOx, il ne se déstabilise qu'en présence simultanée des deux stimuli, c'est-à-dire à pH basique et à une température supérieure à celle du point de trouble de  $30^\circ\text{C}$ .

Nous disposons donc de systèmes présentant des capacités de contrôle du relargage. En revanche, l'éclatement des objets étant très rapide en présence du stimulus requis, cela se traduirait par un relargage quasi instantané de la totalité de la substance encapsulée. Or un relargage progressif peut être souhaitable afin d'éviter une trop forte dose d'exposition.

Cet objectif peut être atteint en liant de façon covalente le cœur hydrophobe afin de fixer la structure obtenue et d'obtenir des micelles réticulées (**schéma IV – 1**). Ainsi, le système restera stable quelle que soit la dilution, et la modification des conditions environnementales ne conduira plus à l'éclatement des objets mais à une modification du comportement de la couronne qui pourra influencer sur le relargage.

Dans ce chapitre, nous allons donc voir comment il est possible d'exploiter la présence des doubles liaisons sur la chaîne hydrophobe afin de stabiliser les micelles.

La voie que nous avons privilégiée est une réticulation par voie photochimique en présence d'une molécule contenant des groupements thiol. La réaction mise en jeu sera donc une addition de type thiol-ène.

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

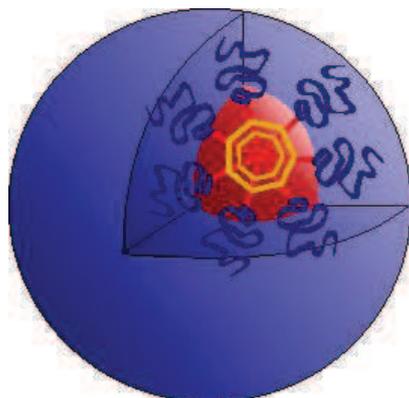


Schéma IV - 1 : Représentation d'une micelle dont le cœur est réticulé

Une des contraintes et difficultés de ce projet est l'environnement dans lequel se déroule la photo-réticulation. En effet, il faut parvenir à réticuler les micelles dans l'eau en incorporant un agent réticulant au cœur des micelles.

Ce chapitre présente donc tout d'abord une courte revue sur la réticulation des systèmes micellaires dans la littérature, puis une étude préliminaire réalisée en masse sur des molécules modèles afin de déterminer la faisabilité du projet et les conditions nécessaires à l'addition thiol-ène.

Enfin, la réticulation est conduite en solution aqueuse sur les trois systèmes précédemment décrits : le système pH-sensible, le système thermosensible et enfin le système mixte.

### I. La réticulation de systèmes micellaires dans la littérature

Les micelles présentent en général un état d'équilibre thermodynamique entre les unimères et les micelles. Bien que présentant des cmc très basses, les systèmes à base de copolymères évoluent vers la formation d'unimères lors d'une dilution. Ceci provoque donc la libération prématurée du principe actif<sup>1</sup>. Afin d'éviter la désorganisation des micelles, les réticuler apparaît comme la méthode la plus efficace<sup>1</sup>. La réticulation peut s'effectuer à trois endroits : dans le cœur, à l'interface cœur/couronne ou dans la couronne (**schéma IV – 2**).

## Réticulation



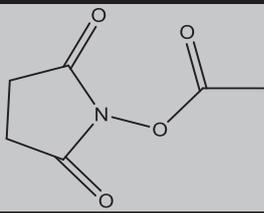
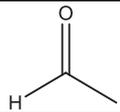
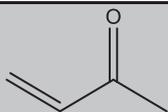
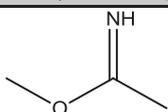
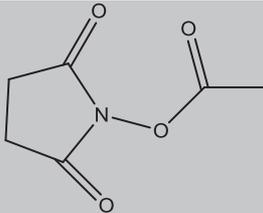
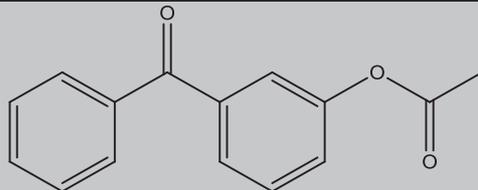
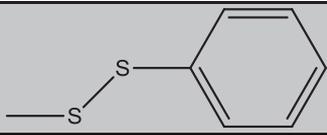
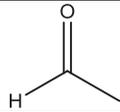
Schéma IV - 2 : Les trois types de micelles réticulées

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons essentiellement au premier cas, les micelles réticulées au cœur.

Lorsque la partie hydrophobe contient des groupes fonctionnels, la méthode la plus courante est l'utilisation d'un agent difonctionnel pour stabiliser le cœur. De nombreux exemples existent dans la littérature. Le **tableau IV – 1**, reproduit à partir de la revue de Cornelus F. van Nostrum<sup>1</sup>, répertorie les différentes combinaisons groupe fonctionnel/agent de réticulation.

# Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

**Tableau IV - 1 : Les différentes combinaisons groupements fonctionnels / agent réticulant <sup>1</sup>**

Groupe fonctionnel	Agent de réticulation
-NH <sub>2</sub>	
	
	
	
	-NH <sub>2</sub>
-N=C=O	-NH <sub>2</sub>
—C≡C—H	-N <sub>3</sub>
-N <sub>3</sub>	—C≡C—H
-OH	
-COOH	-NH <sub>2</sub>
	HS-
	-NH <sub>2</sub>
-NR <sub>2</sub>	I-

Dans notre cas, les chaînes hydrophobes présentent des doubles liaisons. Toutefois, il n'y a pas d'étude mentionnant l'utilisation d'agent difonctionnel pour réticuler entre elles des

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

doubles liaisons. En effet, la polymérisation radicalaire est, dans ce cas, plus utilisée. On distingue alors deux voies pour polymériser les doubles liaisons dans le cœur des micelles :

- 1) La polymérisation par voie thermique en utilisant un amorceur de type azobisisobutyronitrile (AIBN)<sup>2-4</sup>.
- 2) La polymérisation par voie photochimique en utilisant un photoamorceur<sup>5-7</sup>.

Dans chacune des études présentées, les résultats obtenus sont prometteurs. En effet, les micelles réticulées montrent une meilleure stabilité et une libération plus lente que les micelles « libres » tout en conservant de bonnes capacités d'encapsulation. Il est intéressant de souligner qu'une de ces études concerne des micelles PEG-lipide<sup>2</sup>. Les auteurs ont synthétisé des copolymères amphiphiles PEG-lipide avec une masse molaire moyenne en nombre de 2000 et 5000 g/mol pour la partie hydrophile et une partie hydrophobe en C11 présentant un groupement vinyle en extrémité de chaîne. Les micelles sont réticulées par polymérisation radicalaire des groupements vinyliques en présence d'AIBN comme amorceur. Les micelles réticulées présentent une meilleure stabilité à la température et aux solvants. Cette meilleure stabilité s'accompagne d'une amélioration notable de la capacité d'encapsulation de 16 à 78% (en masse).

Toutefois, ces deux méthodes ont l'inconvénient de nécessiter l'ajout d'un amorceur souvent toxique. Cela requiert donc une étape de purification pour séparer l'amorceur résiduel des micelles réticulées.

Huang *et al.* ont pu s'affranchir de ce problème lors de la synthèse d'un copolymère lipide-POx à partir d'huile de soja<sup>8</sup> (**Schéma IV – 3**). En effet, les auteurs rapportent la réticulation des doubles liaisons par simple irradiation UV sans ajout de photoamorceur ni d'agent réticulant. Le succès de la réticulation est prouvé par la conservation des micelles dans différents solvants.

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

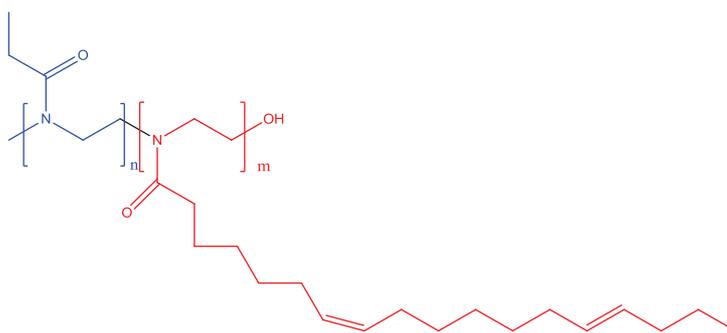


Schéma IV - 3 : Copolymère amphiphile dont la partie hydrophobe est issue d'huile de soja et contient deux doubles liaisons.

Dans notre cas, les copolymères amphiphiles synthétisés précédemment présentent en moyenne deux doubles liaisons par chaîne hydrophobe. A partir des données de la littérature, nous allons étudier la possibilité de stabiliser les micelles constituées de ces copolymères en utilisant ces doubles liaisons.

## II. Etude de la réticulation des doubles liaisons lipidiques

### A. Essais préliminaires de réticulation en masse de l'huile de lin

Avant toute chose, nous avons souhaité vérifier la capacité de l'huile de lin à réticuler sous UV. Nous avons procédé à plusieurs essais préliminaires :

- 1) Irradiation de l'huile de lin seule
- 2) Irradiation d'un mélange huile de lin + Irgacure 819 comme photo-amorceur (3% en masse).

L'Irgacure 819<sup>®</sup> (BASF) ou oxyde de bis(2,4,6-triméthylbenzoyl)-phénylphosphine (**Schéma IV – 4**) a la particularité d'absorber dans les UV proches et le visible et est donc compatible avec une utilisation en milieu aqueux.

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

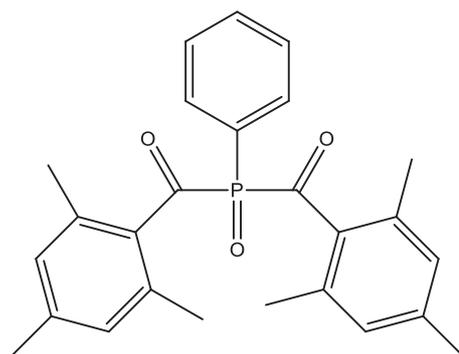


Schéma IV - 4 : Irgacure 819®

Chaque mélange est irradié à  $T = 20^{\circ}\text{C}$  à l'aide d'une lampe Hg-Xe (Hamamatsu, LC-L8) émettant un rayonnement polychromatique d'intensité  $120 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  à  $365 \text{ nm}$ . La réaction est suivie par spectrométrie FTIR résolue dans le temps.

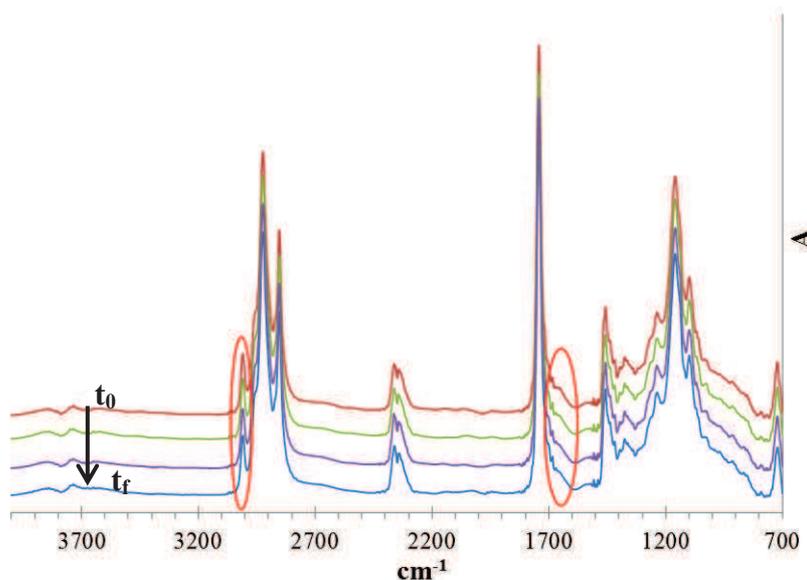


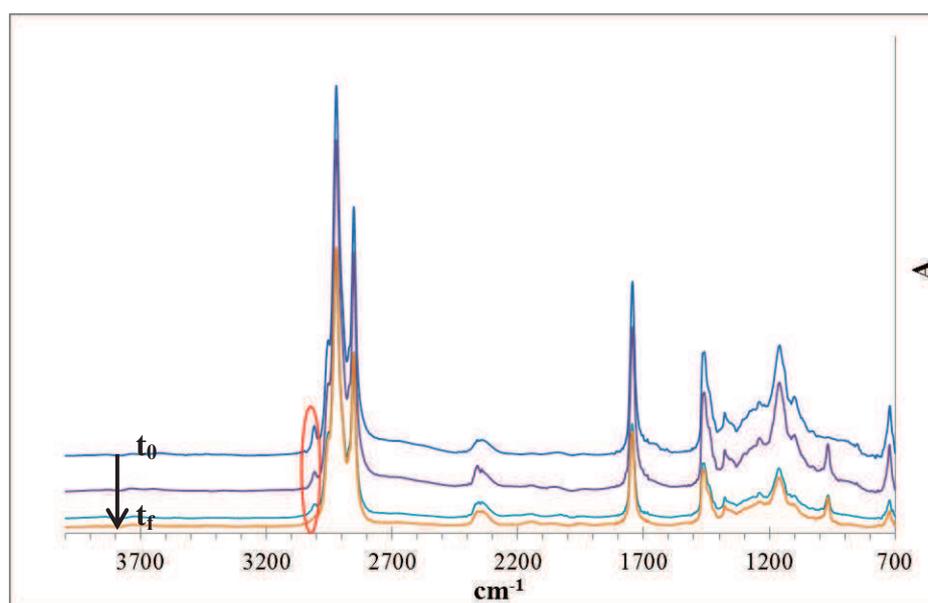
Figure IV - 1 : Suivi par analyse IR des insaturations de l'huile de lin soumise aux rayonnements UV en présence d'un photoamorceur, l'Irgacure 819

D'après les analyses par IR (**Figure IV – 1**), les insaturations ne sont pas affectées lors de l'irradiation de l'huile de lin en présence ou non d'un photoamorceur (**Annexe IV - 1**). En effet, les bandes correspondant aux doubles liaisons sont toujours présentes à  $3009 \text{ cm}^{-1}$  et  $1652 \text{ cm}^{-1}$ . Les insaturations de l'huile de lin sont donc trop peu réactives pour pouvoir être réticulées sans agent réticulant.

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

Les molécules contenant des groupements -SH étant connues pour être très réactives vis-à-vis des insaturations, notre choix s'est porté sur des agents réticulants renfermant des fonctions thiol. Un premier test a donc été réalisé sur un mélange constitué d'huile de lin, d'Irgacure 819 (3% en masse) et de 1-dodécane-thiol (2 eq par insaturation) (**Figure IV - 2**).

Cette fois, la réaction est très rapide et totale. En effet, au bout de 10 min, les bandes à  $3009\text{ cm}^{-1}$  et  $1652\text{ cm}^{-1}$  ont totalement disparu (**Figure IV - 2**).



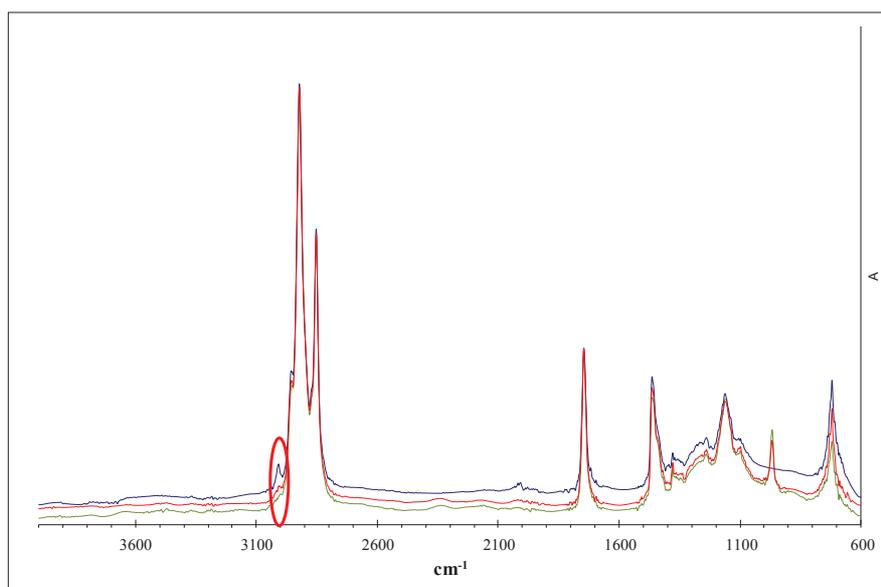
**Figure IV - 2 : Suivi par analyse IR des insaturations de l'huile de lin soumise aux rayonnements UV en présence d'un photoamorceur et de dodécane-thiol**

Au vu de ce résultat, la réticulation de l'huile de lin semble donc possible. Pour le vérifier, un agent réticulant poly-fonctionnel est nécessaire.

Pour la réalisation d'un film, un agent réticulant comportant deux fonctions thiol a été choisi, le 1,6-hexane dithiol. Un mélange composé d'huile de lin, d'hexane dithiol (0,5 eq par insaturation) et d'Irgacure 819 (3% en masse) a donc été irradié pendant 5 min à  $T = 20^{\circ}\text{C}$  et sous atmosphère d'azote. Le suivi de la réaction par photoDSC a révélé la présence d'un pic exothermique, confirmant la réticulation. L'enthalpie théorique de la réaction n'étant pas connue, nous n'avons pu évaluer le rendement de la réaction. Néanmoins, nous avons pu obtenir un film solide et cassant suite à l'irradiation. La réticulation de l'huile de lin a donc bien eu lieu.

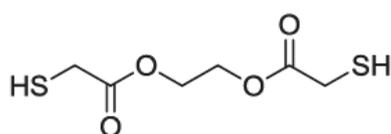
## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

Au vu de ces résultats, l'utilisation d'un dithiol semble conduire à une excellente réactivité en masse sur les doubles liaisons, permettant leur réticulation en quelques minutes. Cette réactivité s'est même révélée présente en l'absence totale de photoamorceur (**Figure IV – 3**), ce qui est extrêmement intéressant dans notre cas puisque cela évitera des étapes de purification et ainsi les risques de toxicité liés au photoamorceur.



**Figure IV - 3 : Consommation des doubles liaisons de l'huile de lin par un composé thiolé en l'absence de photoamorceur.**

Enfin, les composés contenant des groupements thiol sont souvent toxiques, ce qui pourrait être problématique pour les applications visées. Toutefois, l'éthylène glycol dithioacétate (**Schéma IV – 5**) est dit biodégradable<sup>9</sup>. Il est possible qu'il ne présente pas la même réactivité que le dodécanthiol. Toutefois, les thiols sont des composés tellement réactifs qu'une diminution relative de réactivité ne devrait pas poser de problème. Nous l'avons donc choisi pour la suite de l'étude.

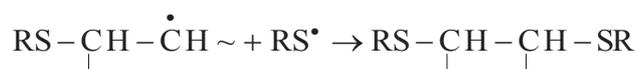
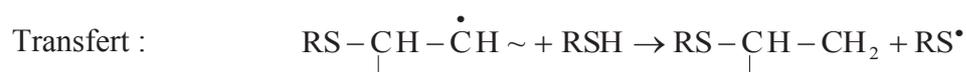
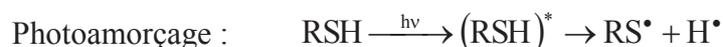


**Schéma IV - 5 : Ethylène glycol dithioacétate (EGD)**

## B. Optimisation des conditions de photoréticulation en masse de l'alcool gras

Une addition thiol-ène est un processus radicalaire nécessitant, en premier lieu, la création de radicaux dans le milieu. Ce processus se poursuit ensuite par l'arrachement de l'hydrogène de la fonction thiol par ces radicaux et addition du radical thyl formé sur la double liaison. Dans le cas d'une activation photochimique, les radicaux thyl peuvent être formés soit par réaction entre les radicaux primaires issus de la photolyse d'un photoamorceur et le monomère thiol, soit directement par irradiation du composé soufré<sup>10-12</sup>. Dans notre cas, pour les raisons mentionnées précédemment (amorçage de la réaction observé en l'absence de photoamorceur, pas de purification), nous avons choisi de ne pas utiliser de photoamorceur. Il est à noter que, dans ce cas, la réaction photochimique se déroule plus lentement qu'en présence de photoamorceur en raison du faible coefficient d'absorption de la molécule soufrée<sup>13</sup>.

Le mécanisme de la réaction thiol-ène peut s'écrire de la façon suivante<sup>14</sup> :



## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

Sur la base de ce mécanisme, on peut supposer que, dans le cas d'un mélange stœchiométrique en fonctions thiol et ène, les deux groupements seront consommés à la même vitesse.

L'optimisation des conditions de photoréticulation se fera donc au travers de l'étude de l'influence de 2 paramètres :

- la quantité d'EGD
- l'intensité du rayonnement UV.

En effet, ces deux paramètres conditionneront la quantité de radicaux thyl formés et donc la vitesse et le rendement de la réaction d'addition.

Cette étude d'optimisation a été réalisée sur le mélange d'alcools gras initialement obtenu suite à la réduction de l'huile de lin, sa composition étant identique à celle du cœur des micelles.

L'irradiation est effectuée au moyen d'une lampe Hg-Xe (Hamamatsu, LC-L8) (rayonnement polychromatique). L'intensité donnée est mesurée à l'aide d'un radiomètre (Vilber VLX-3W) à 365 nm. La réaction a été suivie par spectrométrie IR résolue dans le temps. Seul le suivi de la disparition des doubles liaisons éthyléniques à  $3007\text{ cm}^{-1}$  a été possible, l'intensité de la bande d'absorption des fonctions thiol à  $2567\text{ cm}^{-1}$  étant trop faible.

### 1. Influence de la quantité d'éthylène glycol dithioacétate

Quatre mélanges ont été réalisés à 1 ; 0,75 ; 0,5 et 0,25 eq de fonction thiol par rapport aux insaturations (1 eq correspond donc à 1 fonction thiol pour 1 insaturation). Chaque mélange a ensuite été irradié 10 min à  $170\text{ mW/cm}^2$  à 365 nm.

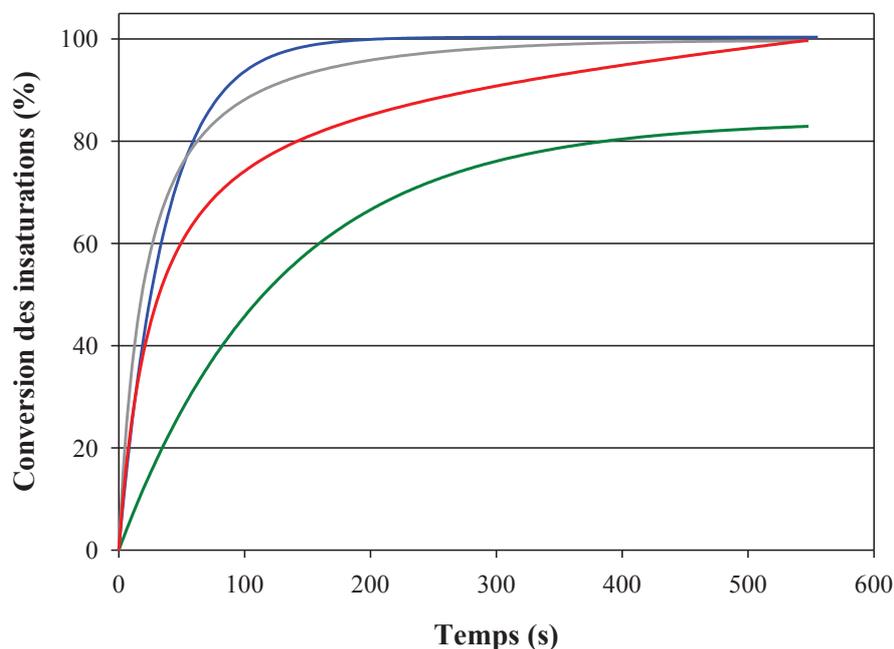


Figure IV - 4 : Suivi cinétique de la photoréticulation en fonction de la quantité de thiol, 1 eq (bleu), 0,75 eq (gris), 0,5 eq (rouge) et 0,25 eq (vert)

La vitesse de consommation augmente logiquement avec la quantité de dithiol. En revanche, il semble que toutes les courbes tendent vers un rendement de 100% et ce, quelle que soit la quantité de dithiol initialement introduite. Alors que, compte tenu de la faible réactivité des doubles liaisons éthyléniques, on se serait attendu à une simple addition thiol-ène, c'est-à-dire qu'une fonction thiol soit consommée par double liaison, ces rendements élevés obtenus pour de faibles teneurs en thiol supposent que la réaction peut se propager, permettant une conversion élevée en doubles liaisons malgré la faible présence de fonctions thiol.

Chaque mélange a été analysé par SEC après irradiation (**Figure IV – 5**). Les analyses en SEC prouvent que la réticulation est effective par l'apparition de différentes populations de plus grande masse molaire. Les masses molaires moyennes en nombre obtenues sont difficilement exploitables car les analyses en SEC sont réalisées avec un étalonnage PMMA. Toutefois, on peut penser que les différentes populations correspondent à la formation de

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

dimères, trimères et tétramères. La réticulation semble donc plus efficace en présence d'1 eq de thiol.

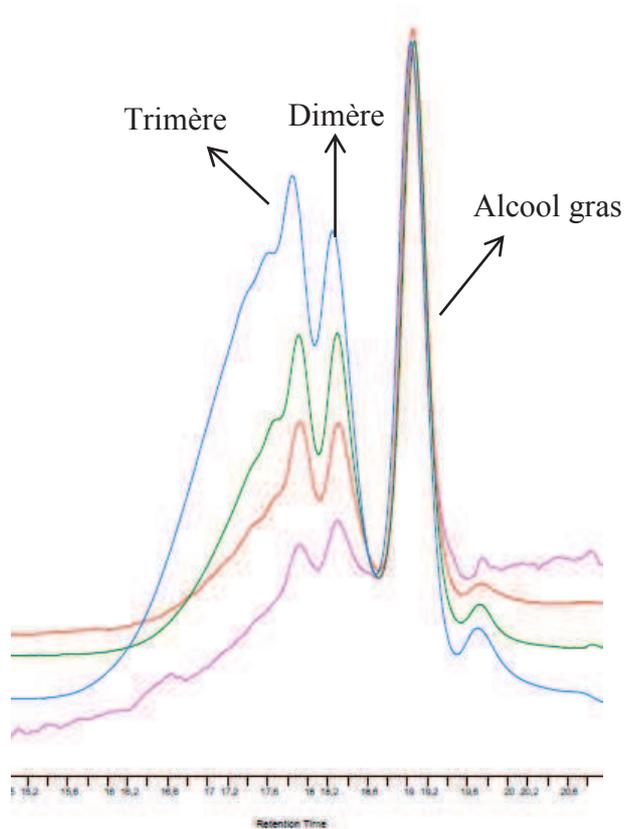


Figure IV - 5 : Evolution des chromatogrammes par analyse SEC pour 0,25 eq (rose), 0,5 eq (rouge), 0,75 eq (vert) et 1 eq (bleu)

### 2. Influence de l'intensité du rayonnement

Le mélange réalisé avec 0,75 eq d'EGD est soumis à différentes intensités de rayonnement (170 mW/cm<sup>2</sup>, 130 mW/cm<sup>2</sup>, 85 mW/cm<sup>2</sup>).

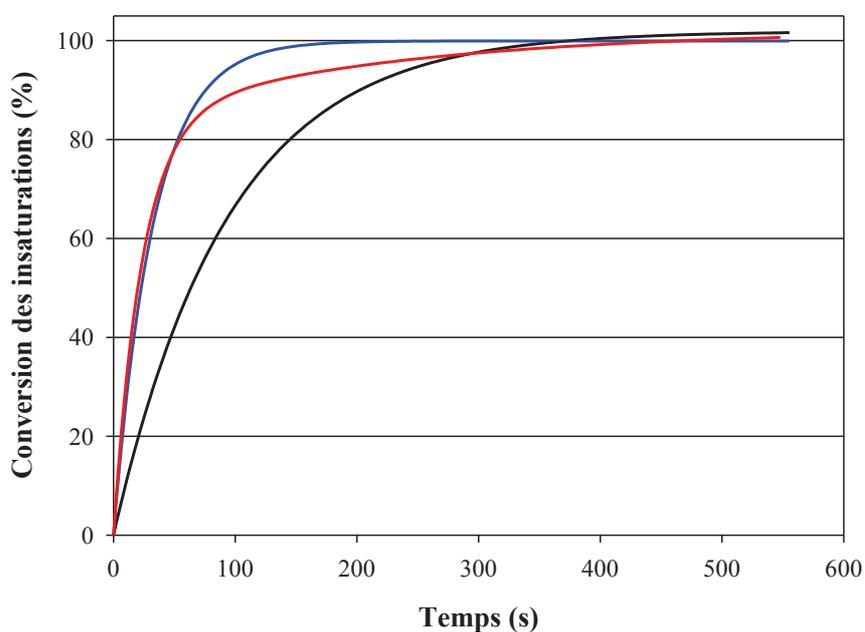


Figure IV - 6 : Consommation des doubles liaisons avec 0,75 eq d'EGD à 170 mW/cm<sup>2</sup>, 130 mW/cm<sup>2</sup> et 85 mW/cm<sup>2</sup>

Nous voyons ici que la vitesse de la réaction augmente avec l'intensité de rayonnement jusqu'à 130 mW/cm<sup>2</sup>. Au-delà, on n'observe plus d'effet, ce qui peut être expliqué par un phénomène de saturation en radicaux (d'où des cinétiques similaires avec les intensités de rayonnement de 130 et 170 mW/cm<sup>2</sup>). Dans tous les cas, un rendement de la réaction des doubles liaisons de 100 % est obtenu.

### 3. Conclusion

L'étude de la photoréticulation en masse des alcools gras a montré que les conditions optimales de réaction sont :

- 0,75 à 1 eq en fonction thiol par rapport aux insaturations
- une intensité du rayonnement supérieure ou égale à 130 mW/cm<sup>2</sup>
- un temps d'irradiation de 10 min.

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

Toutefois, la grande réactivité du système en masse rend difficile une optimisation plus poussée des conditions opératoires de réaction. Nous allons donc maintenant étudier la photoréticulation en solution aqueuse.

### C. Photoréticulation d'un copolymère amphiphile en solution aqueuse

Face aux quantités importantes de copolymère requises pour cette étude, nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur une molécule modèle : le tween 80.

Le tween 80 est un tensioactif couramment utilisé. Sa HLB de 15 est proche de celle du LPAA 3d (HLB = 16). De plus, le tween 80 présente une chaîne hydrophobe en C18 avec une insaturation en milieu de chaîne (**Schéma IV – 6**). Enfin, la cmc du tween 80 se situe entre 13 et 15 mg/L et est donc similaire au système LPAA (environ 10 mg/L).

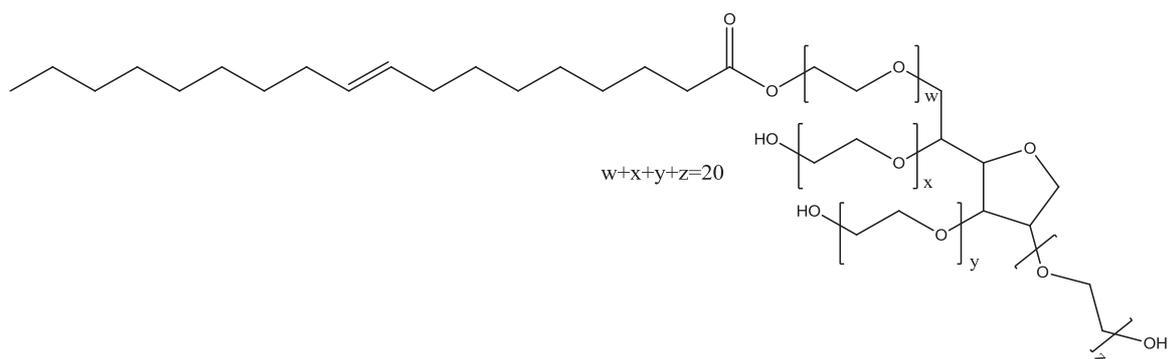


Schéma IV - 6 : Structure du tween 80

Le tween 80 contenant une seule insaturation par chaîne hydrophobe, il est difficile de réticuler efficacement les micelles. Sa présence va toutefois nous permettre, de déterminer si la réaction peut avoir lieu en solution aqueuse et quelles sont les méthodes d'analyse appropriées pour le suivi de cette réaction.

#### 1. Méthodes de suivi de la réaction

La réaction de réticulation doit se produire en milieux aqueux par incorporation du dithiol dans le cœur des micelles puis déclenchement de la réaction sous irradiation UV. Afin de s'assurer du bon déroulement de l'addition thiol-ène, un suivi de la disparition des

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

insaturations lipidiques semble tout indiqué. Différentes techniques ont alors été mises en œuvre afin d'observer ces insaturations.

La présence du milieu aqueux rend l'analyse IR impossible du fait de la superposition du pic de l'eau à celui des doubles liaisons. En analyse par spectrométrie d'absorption UV, plusieurs signaux se superposent empêchant un suivi précis de la consommation des doubles liaisons.

Des essais RAMAN ont également été réalisés en collaboration avec Benoit Lefez de l'université de Rouen et avec Fabienne Lagarde de l'université du Maine. En masse, le pic des doubles liaisons à  $1652\text{ cm}^{-1}$  est bien visible sur le spectre RAMAN du tween 80 (**Figure IV – 7**). En solution aqueuse, l'analyse de deux solutions aqueuses de tween 80 à  $8\text{ g/L}$  et  $16\text{ g/L}$  montre que seul le pic allant de  $700$  à  $1500\text{ cm}^{-1}$  varie proportionnellement à la concentration de tween 80 (**Figure IV – 7**). Les pics à  $1620\text{ cm}^{-1}$  et  $3200\text{ cm}^{-1}$ , attribués à l'eau car ils ne varient pas, recouvrent les pics caractéristiques des doubles liaisons, rendant à nouveau impossible tout suivi.

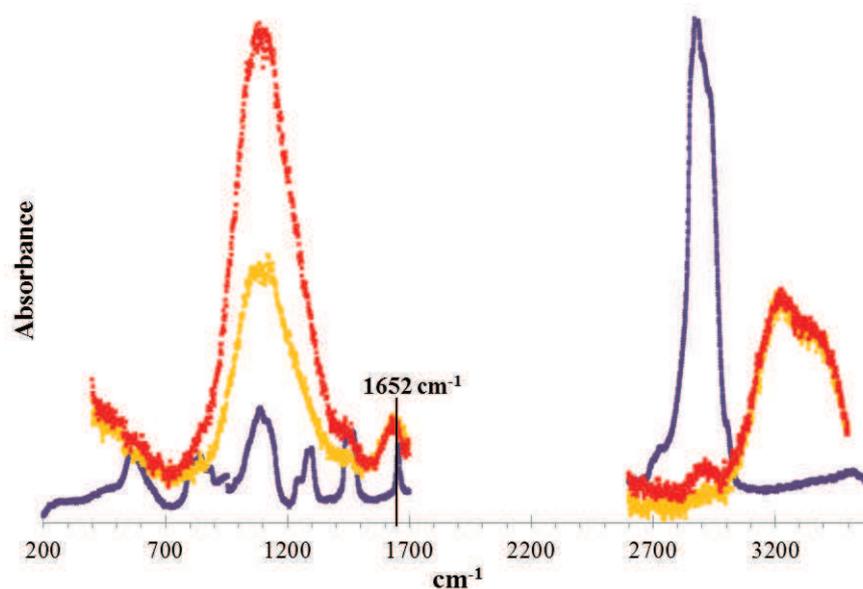


Figure IV - 7 : Spectre RAMAN du (⋈) tween 80 en masse, (⋈) tween 80 à  $8\text{ g/L}$  et (⋈) tween 80 à  $16\text{ g/L}$  en solution aqueuse

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

Ces essais infructueux démontrent bien les difficultés rencontrées pour suivre le déroulement in situ d'une réaction en phase aqueuse. Pour la suite de l'étude, seul un suivi a posteriori, par analyse des objets formés (en QELS ou en SEC) par les copolymères amphiphiles, est envisageable.

### 2. Influence de l'encapsulation de l'EGD sur la taille des objets en solution

Afin d'optimiser la réaction de photoréticulation en phase aqueuse, l'influence du mode d'introduction de l'EGD a été étudiée. Selon qu'il soit introduit directement en masse ou en solution dans un solvant volatil peut influencer l'efficacité de la réticulation. L'objectif ici est d'encapsuler de façon efficace l'EGD au cœur des micelles. En effet, l'avantage de réaliser la réaction en solution aqueuse est la meilleure proximité de l'agent réticulant avec les insaturations par rapport aux essais en masse du fait de leur confinement dans le cœur hydrophobe. Cette proximité devrait améliorer l'efficacité de la réticulation.

L'EGD a été introduit dans la solution aqueuse de tween 80 de deux manières :

- Directement en masse agité à 750 tr/min pendant 12h
- En solution dans un solvant organique volatil comme le dichlorométhane. La solution est ensuite agitée à 750 tr/min pendant 12h ce qui assure l'évaporation complète du solvant.

Les solutions sont irradiées pendant 30 min à 170 mW/cm<sup>2</sup> (à 365 nm) puis analysées en QELS (**Tableau IV – 2**) et SEC (**Figure IV – 8**).

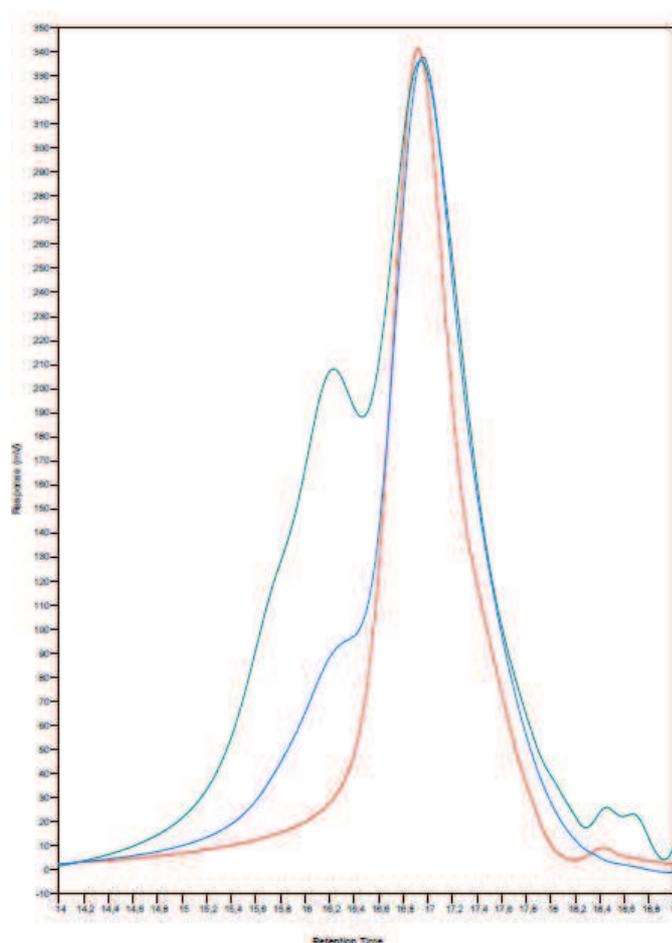
Les analyses QELS ne montrent aucune variation du diamètre hydrodynamique entre les deux méthodes d'introduction testées (**Tableau IV – 2**).

**Tableau IV - 2 : Influence de la méthode d'introduction de l'EGD sur la taille des micelles**

Méthode d'introduction	Dh (nm)	Largeur du pic (nm)
En masse	7,8	2,4
En solution dans du CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8,5	1,5

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

Les chromatogrammes (**Figure IV – 8**) montrent l'apparition d'un épaulement vers les fortes masses prouvant une réaction avec l'EGD. Les analyses SEC démontrent une meilleure efficacité de la réaction lorsque l'EGD est ajouté en solution dans du dichlorométhane. En effet, la deuxième population de masse plus élevée est plus importante et le pic de tween 80 a fortement diminué. Au contraire, lorsqu'il est ajouté en masse, la deuxième population commence tout juste à apparaître après 30 min d'irradiation.



**Figure IV - 8 : Evolution du spectre SEC du tween 80 réticulé en fonction de la méthode d'introduction du dithiol : tween 80 seul (rouge), tween 80 + dithiol en masse (bleu), tween 80 + dithiol en solution dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (vert)**

Selon les analyses SEC, l'introduction de l'EGD en solution dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> semble être la méthode la plus efficace pour réticuler le cœur des micelles.

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

### 3. Conclusion

Grâce à ces essais, il a été prouvé que la photoréticulation des doubles liaisons est possible même en milieu aqueux. En effet, les analyses SEC montrent l'apparition de populations de plus hautes masses molaires.

De plus, il a été mis en évidence l'importance de la méthode d'introduction de l'agent réticulant. Il s'avère que l'introduction de l'EGD en solution dans un solvant organique volatil est plus efficace que l'introduction en masse. Aucune influence de la vitesse d'agitation n'a été détectée sur la structure du système micellaire.

Nous allons maintenant pouvoir adapter cette méthode de photo-réticulation sur les micelles de LPAA, LPOx et mixtes et étudier le changement de comportement en milieu aqueux que cela induit.

## III. Réticulation du cœur des micelles en milieu aqueux

### A. Système pH-sensible

#### 1. Stabilisation des micelles de LPAA 3d à pH basique

Au vu des résultats précédents, nous avons opté pour le mode opératoire suivant. Le LPAA 3d ( $M_n = 2030$  g/mol) a été choisi comme copolymère amphiphile car en quantité suffisante pour réaliser tous les essais. Une solution de copolymère amphiphile LPAA 3d à 1 g/L est préparée à pH acide. L'éthylène glycol dithioacétate en solution dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est ajouté sous agitation (750 tr/min). L'agitation est maintenue jusqu'à évaporation complète du solvant organique. La solution est ensuite irradiée pendant 30 min ( $170$  mW/cm<sup>2</sup> à 365nm). Une partie de la solution est lyophilisée pour être analysée en RMN dans le DMSO, l'autre partie est analysée en QELS.

Le spectre RMN (**Figure IV – 9**) montre bien la disparition totale des doubles liaisons à  $\delta = 5,2$  ppm et des  $\text{CH}_3$  linoléiques à  $\delta = 1,1$  ppm. La réticulation est donc bien effective. De plus, les  $\text{CH}_2$  en  $\beta$  du soufre et de la fonction ester apparaissent bien à  $\delta = [1,3-1,61]$  ppm<sup>15</sup>.

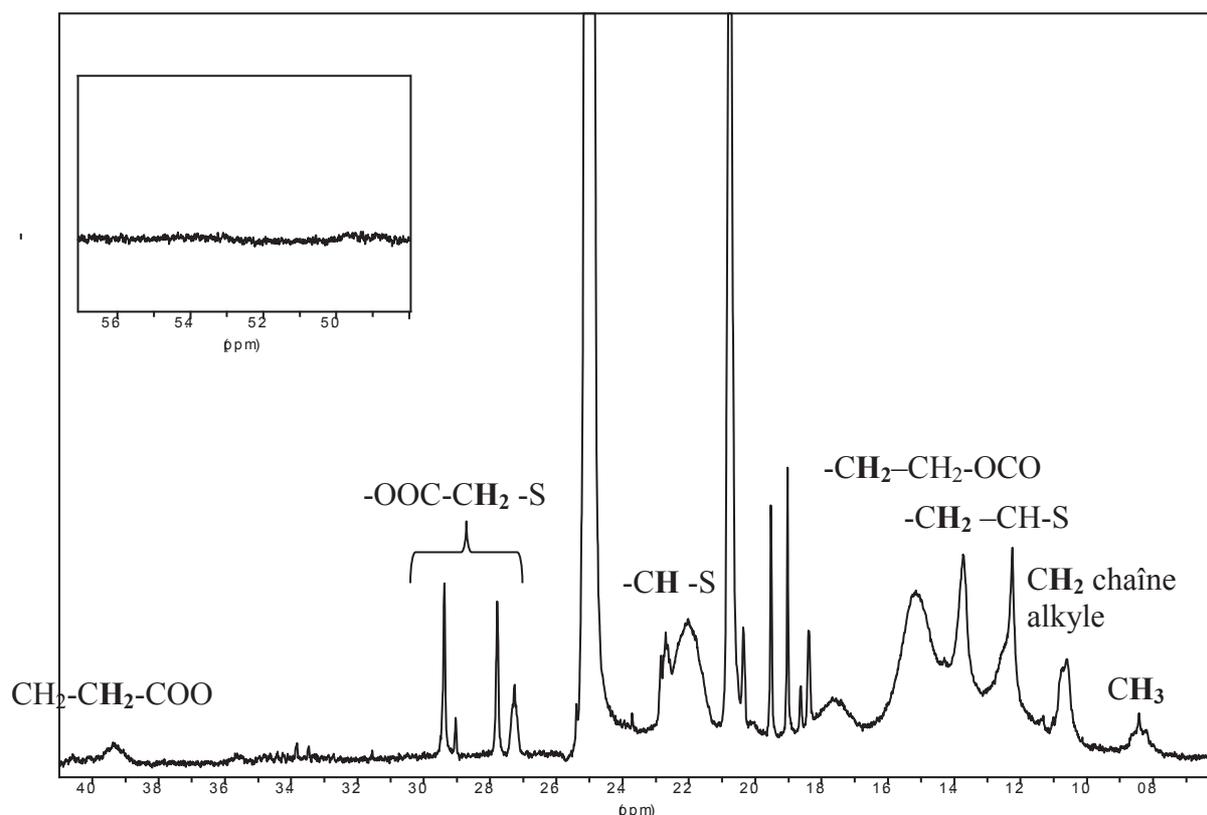


Figure IV - 9 : Spectre RMN du LPAA 3d réticulé

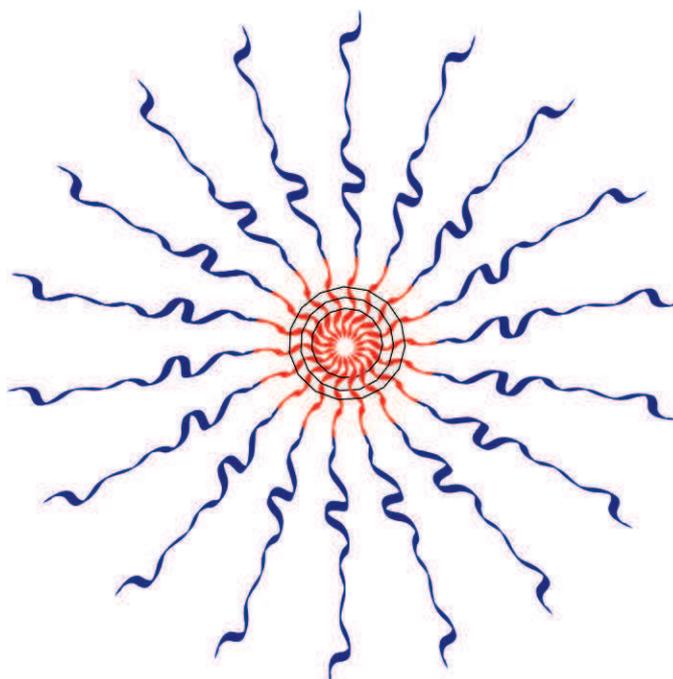
Comme observé dans le chapitre III, les micelles « libres » de LPAA se désorganisent à pH basique. Les analyses QELS permettent, entre autres, de bien visualiser ce phénomène. En effet, les objets d'une dizaine de nanomètres à pH acide ne font plus que quelques nanomètres à pH basique. Si les micelles sont réticulées, leur structure doit être conservée à pH basique. Aussi, après avoir irradié une solution de LPAA à pH acide en présence d'éthylène glycol dithioacétate, le pH de la solution est ajusté à pH basique. Les solutions sont analysées par diffusion de la lumière (Tableau IV – 3).

Tableau IV - 3 : Evolution de la taille des micelles après irradiation à pH acide et basique

	pH acide		pH basique	
	Dh (nm)	Largeur du pic (nm)	Dh (nm)	Largeur du pic (nm)
LPAA	6,8	1,7	[2-4]	0,7
LPAA réticulé	7,5	1,9	14,8	3,8

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

A pH basique, les micelles sont toujours présentes en solution prouvant la réticulation effective du cœur des micelles. Par ailleurs, le diamètre hydrodynamique des micelles a augmenté à pH basique. A ce pH, les chaînes de PAA sont complètement déprotonées et très hydrophiles. Les chaînes vont donc avoir tendance à s'étendre dans la solution aqueuse provoquant ainsi un gonflement des micelles (**Schéma IV – 7**).



**Schéma IV - 7 : Micelles de LPAA réticulées conservées à pH basique**

L'analyse en cryoTEM de la solution à pH basique (**Figure IV – 10**) montre des objets sphériques d'environ 15 nm. Ceci tendrait à appuyer la conservation des micelles réticulées à pH basique. Toutefois, comme dans le chapitre III, il faut prendre ce cliché avec précautions.

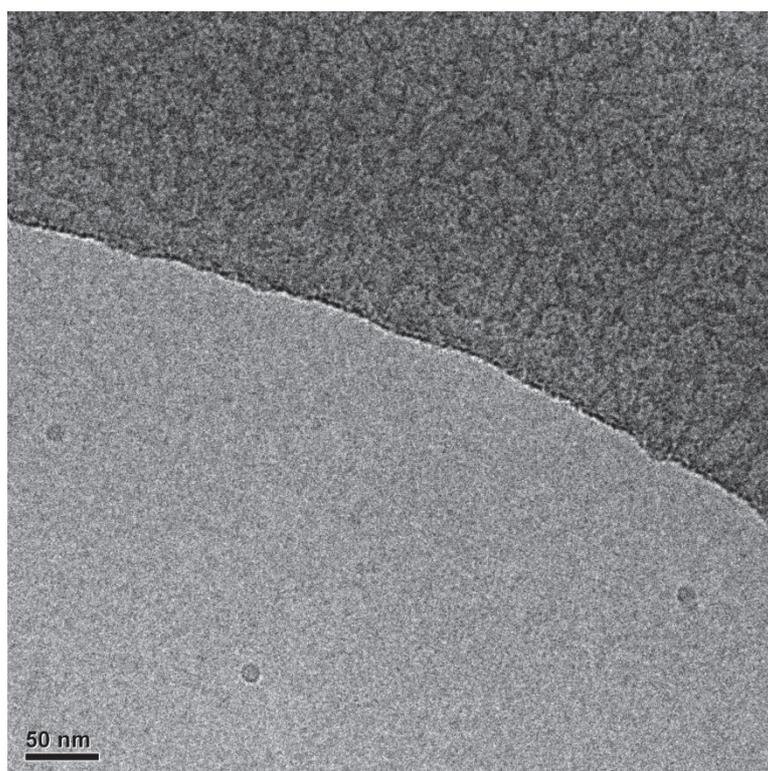


Figure IV - 10 : Image obtenue par cryoTEM d'une solution à pH basique de micelles LPAA 3d réticulées

## 2. Optimisation de la photoréticulation

### a) Agent de réticulation di ou tétra-fonctionnel

Nous avons souhaité déterminer l'influence de la fonctionnalité de l'agent réticulant sur le comportement en milieu aqueux des micelles réticulées. Pour cela, nous avons à notre disposition deux agents réticulants : l'éthylène glycol dithioacétate (difonctionnel) et le pentaérythritol tétrakis(2-mercaptoacétate) (tétrafonctionnel) (**Schéma IV – 8**).

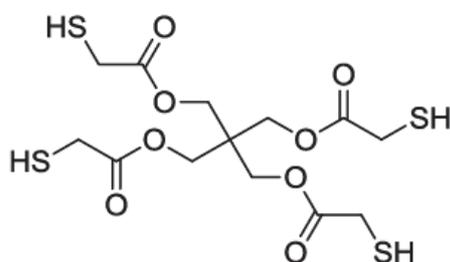


Schéma IV - 8 : Le pentaérythritol tétrakis(2-mercaptoacétate)

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

Deux solutions de LPAA ont été irradiées en présence d'éthylène glycol dithioacétate ou de pentaérythritol tétrakis(2-mercaptoacétate) puis analysées en QELS.

**Tableau IV - 4 : Influence de la fonctionnalité de l'agent réticulant sur les micelles**

Agent réticulant	Fonctionnalité	N eq	pH acide		pH basique	
			Dh (nm)	Largeur du pic (nm)	Dh (nm)	Largeur du pic (nm)
Ethylène glycol dithioacétate	2	1	7,5	1,9	14,8	3,8
Pentaérythritol tétrakis(2-mercaptoacétate)	4	1	92	28	104	32
Pentaérythritol tétrakis(2-mercaptoacétate)	4	0,5	7,1	1,8	4,1	1,2

A nombre d'équivalent identique, les objets obtenus sont beaucoup plus gros (**tableau IV – 4**) avec le composé tétra-fonctionnel qu'avec le difonctionnel. En effet, la taille des objets passe de 7,5 nm à 92 nm. Il est possible qu'en présence du pentaérythritol tétrakis(2-mercaptoacétate), le système se fige sous forme d'agrégats plutôt que de micelles, d'où des tailles plus importantes. Il est intéressant de noter que les objets sont toujours conservés à pH basique et que le gonflement de la couronne est bien observé. A 0,5 eq de pentaérythritol tétrakis(2-mercaptoacétate), des tailles de micelles standards sont obtenues. Toutefois, la densité de réticulation n'est pas suffisante pour stabiliser les micelles à pH basique.

Cette étude montre qu'il est possible de contrôler la nature et la taille des objets en solution. Toutefois, dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons particulièrement aux micelles. La suite de l'étude est donc réalisée avec l'éthylène glycol dithioacétate.

### b) Temps d'irradiation

L'influence du temps d'irradiation a également été étudiée. Pour cela, une solution de copolymère LPAA en présence d'éthylène glycol dithioacétate à 1 eq a été irradiée pendant 10 et 30 min (170 mW/cm<sup>2</sup> à 365 nm). Le pH est ensuite ajusté à pH = 10 puis les solutions sont analysées en QELS.

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

**Tableau IV - 5 : Influence du temps d'irradiation sur la réticulation des micelles**

<b>Tps d'irradiation (min)</b>	<b>Dh des objets en solution (nm) à pH basique</b>
<b>10</b>	Hétérogène
<b>30</b>	14,8

Les résultats en QELS pour un temps d'irradiation de 10 min révèlent une grande hétérogénéité de la solution et sont difficilement exploitables, alors que pour 30 min d'irradiation, les résultats obtenus sont bien homogènes. Ainsi, un temps d'irradiation de 30 min semble être nécessaire pour obtenir des systèmes stables à pH basique.

### c) Conclusion

Les conditions idéales pour réticuler le cœur des micelles semblent être les suivantes :

- Nature de l'agent réticulant : éthylène glycol dithioacétate
- Quantité de l'agent réticulant : 1 eq en fonction thiol par rapport aux doubles liaisons
- Méthode d'introduction de l'agent réticulant : en solution dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
- Vitesse d'agitation : 750 tr/min
- Intensité du rayonnement UV : 170 mW/cm<sup>2</sup> à 365 nm
- Temps d'irradiation : 30 min

Dans ces conditions, les analyses QELS et RMN montrent que la réticulation a bien eu lieu et que nous obtenons des systèmes stables à pH basiques. Le cœur des micelles est donc bien réticulé (**Schéma IV - 10**).

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

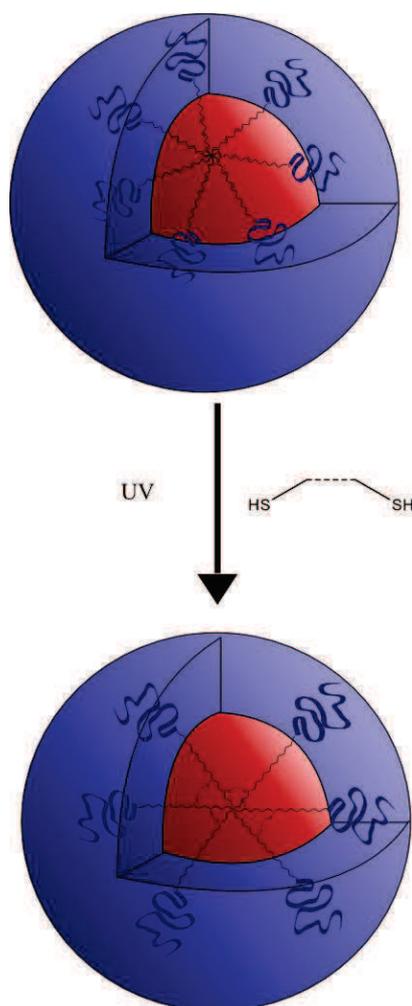


Schéma IV - 9 : Réticulation du cœur des micelles par l'éthylène glycol dithioacétate

Cette méthode de réticulation est donc retenue pour réticuler le cœur des systèmes thermosensibles et des systèmes mixtes.

### B. Système thermosensible

Nous avons souhaité appliquer la même méthode pour réticuler le cœur des micelles de LPOx. La réticulation d'une solution de LPOx19 a donc été réalisée dans des conditions identiques à celles adoptées pour le LPAA. Toutefois, le système étant thermosensible, il s'agrège à cause de la chaleur apportée par la lampe polychromatique. Les analyses QELS ont montré une grande polydispersité du milieu après irradiation. La corrélation étant trop mauvaise, ces analyses n'ont pas pu être exploitées. Toutefois, il est fort probable que le LPOx ait été réticulé sous une forme agrégée. Il n'a donc pas été possible de le réticuler sous

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

forme micellaire. Il serait nécessaire pour y parvenir de travailler avec une lampe monochromatique de type LED n'émettant pas de rayonnement IR.

### C. Système mixte

La méthode de réticulation a été appliquée aux micelles mixtes. Comme démontré dans le chapitre III, à pH acide, les micelles mixtes ne présentent plus d'agrégation à la température de point de trouble du LPOx du fait de la stabilisation du système par la couronne PAA. Le problème d'agrégation (lié à la chaleur apportée par la lampe) rencontré avec les micelles de LPOx seul n'a pas lieu dans ce cas.

Les micelles mixtes sont donc réticulées dans les conditions déterminées précédemment. Le comportement en milieu aqueux des micelles mixtes réticulées est ensuite analysé en QELS.

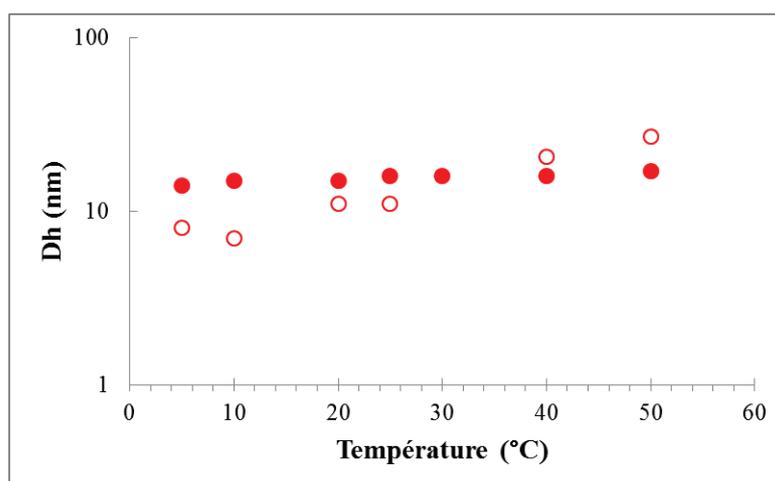


Figure IV - 11 : Comparaison de l'évolution à pH acide et  $[NaCl] = 0,1 \text{ mol/L}$  de la taille des micelles (○) non réticulées et (●) réticulées

A pH acide, les micelles mixtes réticulées présentent des tailles d'environ 16 nm. Elles sont donc légèrement plus grosses que les micelles mixtes non réticulées d'environ 10 nm. Ceci peut s'expliquer par l'écartement des chaînes les unes des autres suite à leur réticulation, augmentant de ce fait le volume global de la micelle.

En revanche, non seulement aucune  $T_{PT}$  n'est observée, mais plus aucune variation de taille n'apparaît avec l'augmentation de température (Figure IV – 11). Le cœur étant réticulé,

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

les unimères de LPOx ne peuvent pas rentrer à l'intérieur du cœur hydrophobe et restent donc sans doute à l'interface cœur-couronne (Schéma IV – 11).

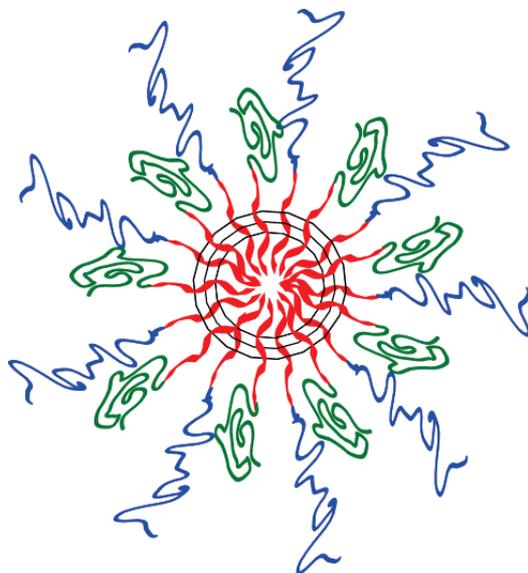


Schéma IV - 10: Micelles mixtes réticulées à pH acide et  $T > T_{PT}$

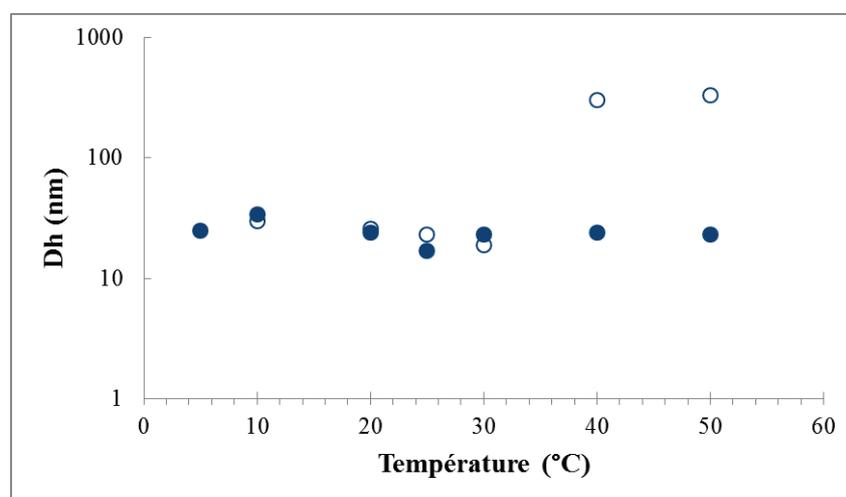


Figure IV - 12 : Comparaison de l'évolution à pH basique et  $[NaCl] = 0,1$  mol/L de la taille des micelles (○) non réticulées et (●) réticulées

A pH basique, la taille des objets augmente de 16 à 24 nm par rapport à celle mesurée à pH acide. Comme pour les micelles non réticulées de LPAA, la couronne gonfle à pH basique (Figure IV -12 et Schéma IV – 12). De même qu'à pH acide, la réticulation empêche les copolymères de LPOx de s'agréger et de migrer dans le cœur lorsque la température arrive à la  $T_{PT}$ . Ils restent donc à l'interface cœur/couronne (Schéma IV – 13). La réticulation du

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

cœur évite la désorganisation des unimères de LPAA. Aucune variation de taille n'est alors observée.

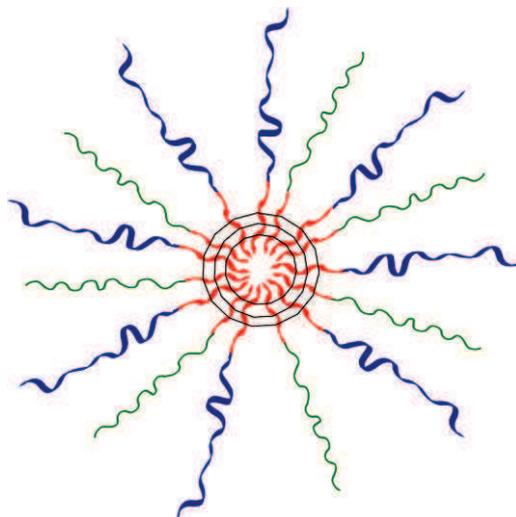


Schéma IV - 11 : Micelles mixtes réticulées à pH basique et  $T < T_{PT}$

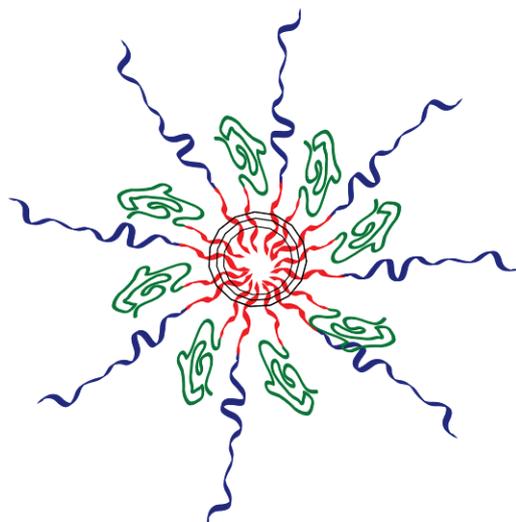


Schéma IV - 12 : Micelles mixtes réticulées à pH basique et  $T > T_{PT}$

### Conclusion

La réticulation des doubles liaisons par voie photochimique en présence d'un dithiol a été étudiée et optimisée en masse et en solution. Les micelles de LPAA ont été réticulées à pH acide ce qui leur permet de rester stable à pH basique. De plus, un gonflement des micelles

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

réticulées est observé à pH basique. Ceci devrait permettre une libération lente des principes actifs et va donc en faveur d'une libération progressive et contrôlée.

Bien qu'il n'ait pas été possible de réticuler les micelles de LPOx à cause de leur propriété thermosensible, les micelles mixtes ont été réticulées avec succès. Comme pour les micelles réticulées pH-sensibles, elles présentent des tailles plus importantes que les micelles mixtes libres. Non seulement aucune  $T_{PT}$  n'est observée, mais aucune variation de taille n'apparaît en fonction de la température prouvant la réticulation effective du cœur des micelles. Par ailleurs, un gonflement de la couronne provoqué par l'extension des chaînes de PAA dans la solution est observé à pH basique.

A ce stade, nous disposons de trois systèmes micellaires : un système pH-sensible réticulé ou non, un système thermosensible non réticulé, et un système mixte réticulé ou non, dont le comportement en milieu aqueux a été déterminé. Nous allons donc poursuivre notre étude par la détermination de leur capacité d'encapsulation et de relargage.

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

1. Van Nostrum, C. F. Covalently cross-linked amphiphilic block copolymer micelles. *Soft Matter* **7**, 3246 (2011).
2. Tian, L., Yam, L., Wang, J., Tat, H. & Uhrich, K. E. Core crosslinkable polymeric micelles from PEG-lipid amphiphiles as drug carriers. *Journal of Materials Chemistry* **14**, 2317–2324 (2004).
3. Iijima, M., Nagasaki, Y., Okada, T., Kato, M. & Kataoka, K. Core-Polymerized Reactive Micelles from Heterotelechelic Amphiphilic Block Copolymers. *Macromolecules* **32**, 1140–1146 (1999).
4. Hu, X., Chen, X., Wei, J., Liu, S. & Jing, X. Core crosslinking of biodegradable block copolymer micelles based on poly(ester carbonate). *Macromolecular bioscience* **9**, 456–63 (2009).
5. Rijcken, C. J., Snel, C. J., Schiffelers, R. M., van Nostrum, C. F. & Hennink, W. E. Hydrolysable core-crosslinked thermosensitive polymeric micelles: synthesis, characterisation and in vivo studies. *Biomaterials* **28**, 5581–93 (2007).
6. Walther, A., Goldamn, E.S., Yelamanchili, R.S., Drechsler, M., Schmalz, H., Eisenberg, A., Müller, A.H.E. Multiple Morphologies, Phase Transitions, and Cross-Linking of Crew-Cut Aggregates of Polybutadiene- block -poly(2-vinylpyridine) Diblock Copolymers. *Macromolecules* **41**, 3254–3260 (2008).
7. Lee, W.-C., Li, Y.-C. & Chu, I.-M. Amphiphilic poly(D,L-lactic acid)/poly(ethylene glycol)/poly(D,L-lactic acid) nanogels for controlled release of hydrophobic drugs. *Macromolecular bioscience* **6**, 846–54 (2006).
8. Huang, H., Hoogenboom, R., Leenen, M.A.M, Guillet, P., Jonas, A.M., Schubert, A.M., Gohy, J-F. Solvent-Induced Morphological Transition in Core-Cross-Linked Block Copolymer Micelles. *JACS* **128**, 3784–3788 (2006).
9. Baudis, S., Wilhelm, H., Bergmeister, H. & Stampfl, J. Additive manufactured photoelastomers as tailor-made biomaterials for vascular tissue restoration. in *European Symposium of Photopolymer Science* (2010).
10. Cramer, N. B., Scott, J. P. & Bowman, C. N. Photopolymerizations of Thiol–Ene Polymers without Photoinitiators. *Macromolecules* **35**, 5361–5365 (2002).
11. Lee, T. ., Roper, T. M., Jonsson, E. S., Guymon, C. A. & Hoyle, C. E. Thiol–Ene Photopolymerization Kinetics of Vinyl Acrylate/Multifunctional Thiol Mixtures. *Macromolecules* **37**, 3606–3613 (2004).

## Chapitre IV : Réticulation du cœur des micelles et étude du comportement en milieux aqueux

12. O'Brien, A. K., Cramer, N. B. & Bowman, C. N. Oxygen inhibition in thiol–acrylate photopolymerizations. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **44**, 2007–2014 (2006).
13. Cramer, N. B., Reddy, S. K., Cole, M., Hoyle, C. E. & Bowman, C. N. Initiation and kinetics of thiol–ene photopolymerizations without photoinitiators. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **42**, 5817–5826 (2004).
14. Jacobine, A. F. in *Radiation Curing in Polymer Science and Technology, vol III* (Fouassier, J. P. & Rabek, J. F.) 219–264 (1993).
15. Hrsic, E. Zografou, I., Schulte, B., Pich, A., Keul, H., Möller, M. Amphiphilic block copolymers with pendant thiol groups in side chains by RAFT polymerization. *Polymer* **54**, 495–504 (2013).

## *Chapitre V*

# *Etude de l'encapsulation et suivi de libération*

### Introduction

A partir de la synthèse de deux copolymères amphiphiles, l'un pH-sensible et le second thermosensible, plusieurs systèmes micellaires peuvent être obtenus. Ainsi le comportement de cinq systèmes micellaires distincts a été étudié dans les chapitres précédents :

- 1- Des micelles pH-sensibles : LPAA
- 2- Des micelles thermosensibles : LPOx
- 3- Des micelles mixtes pH et thermosensibles : MM
- 4- Des micelles réticulées pH-sensibles : LPAAR
- 5- Des micelles mixtes réticulées : MMR

Tous ces systèmes réagissent différemment à un (ou plusieurs) stimulus(i) de l'environnement. Toutefois ils ont tous en commun un même cœur hydrophobe, cœur qui se trouve figé dans le cas des micelles réticulées.

Comme mentionné dans le chapitre I, I., A), les systèmes de vectorisation doivent être capables :

- D'encapsuler un principe actif hydrophobe et d'améliorer de ce fait sa solubilité dans l'eau
- De libérer le principe actif par ciblage passif et/ou actif.

L'objectif est aussi de libérer de façon contrôlée le principe actif. Bien que les systèmes intelligents (pH et/ou thermosensible) permettent déjà de libérer le médicament face à un stimulus donné, leur dissociation conduit à une libération très rapide du principe encapsulé. Les micelles réticulées montrent dans la littérature<sup>1,2</sup> une libération plus lente que les micelles simples car la cohésion de la structure est maintenue et la diffusion se fait alors à travers la couronne.

Afin de déterminer l'efficacité des différents systèmes obtenus en tant que vecteur de médicament, nous allons donc nous attacher à étudier leur capacité d'encapsulation et de relargage de produits hydrophobes.

## Chapitre V : Etude de l'encapsulation et suivi de libération

Ce présent chapitre est divisé en deux parties. La première se concentre sur une étude qualitative de la capacité d'encapsulation et de libération d'un colorant et du pyrène par les différents systèmes micellaires.

Une étude quantitative est ensuite décrite dans une deuxième partie. Plusieurs principes actifs ont été choisis afin de quantifier les capacités d'encapsulation et libération des différents systèmes.

La benzophénone est une molécule très hydrophobe qui présente une faible solubilité dans l'eau. De plus, cette molécule absorbe fortement dans l'UV. Deux autres molécules utilisées en médecine ont été choisies pour leur application médicale et leur hydrophobie : la vitamine K1 et la progestérone. Ces deux molécules absorbent également dans l'UV. C'est pourquoi, les analyses en spectrométrie d'absorption dans l'UV et la chromatographie en phase liquide haute performance équipée d'un détecteur UV (HPLC-UV) ont été utilisées.

### **I. Capacité d'encapsulation et de relargage : étude qualitative**

#### **A. Mise en évidence de la capacité d'encapsulation et de relargage à l'aide d'un colorant**

Nous avons vu précédemment que le système LPAA est capable de stabiliser des émulsions de type huile dans eau pendant plusieurs jours. De plus, si les copolymères LPAA et LPOx sont agités fortement dans une solution aqueuse, de la mousse se forme à l'interface eau/air. Par ailleurs, la détermination de la cmc par fluorescence du pyrène repose sur le principe de la migration du pyrène à l'intérieur des micelles. Tout ceci va donc dans le sens d'une encapsulation effective de molécules hydrophobes dans le cœur des micelles. Afin d'en apporter la preuve irrévocable, nous avons choisi d'encapsuler un colorant hydrophobe, le rouge de soudan.

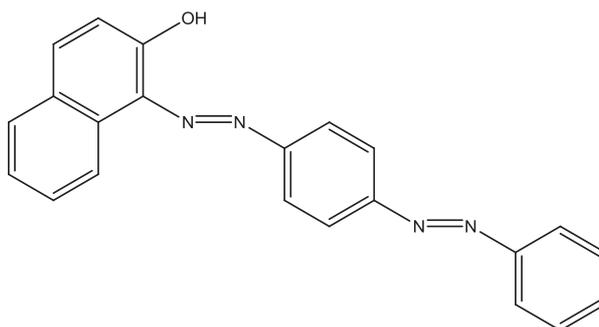


Schéma V- 1 : Structure du rouge de soudan

Le rouge de soudan (**Schéma V - 1**) a la particularité d'être complètement hydrophobe. En effet, lorsqu'il est mélangé dans une solution tampon à pH = 4 en présence de NaCl à 0,1 mol/L, il ne se solubilise pas et après filtration, la solution reste totalement incolore (**Figure V - 1**).

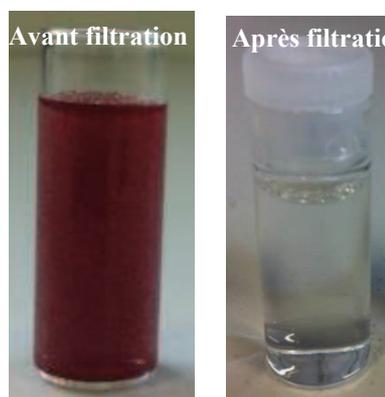


Figure V-1 : Une solution tampon à pH = 4 et renfermant NaCl à 0,1 mol/L reste incolore après ajout de rouge de soudan, agitation pendant 24h et filtration

### 1. Encapsulation d'un colorant par les différents systèmes

Avant toute chose, nous avons vérifié qu'une solution de PAA ( $M_n = 1800$  g/mol) reste bien incolore après ajout de rouge de soudan, agitation et filtration. Cela signifie que la couronne de PAA ne solubilise pas le rouge de soudan. L'encapsulation du rouge de soudan a ensuite été testée pour les systèmes suivants :

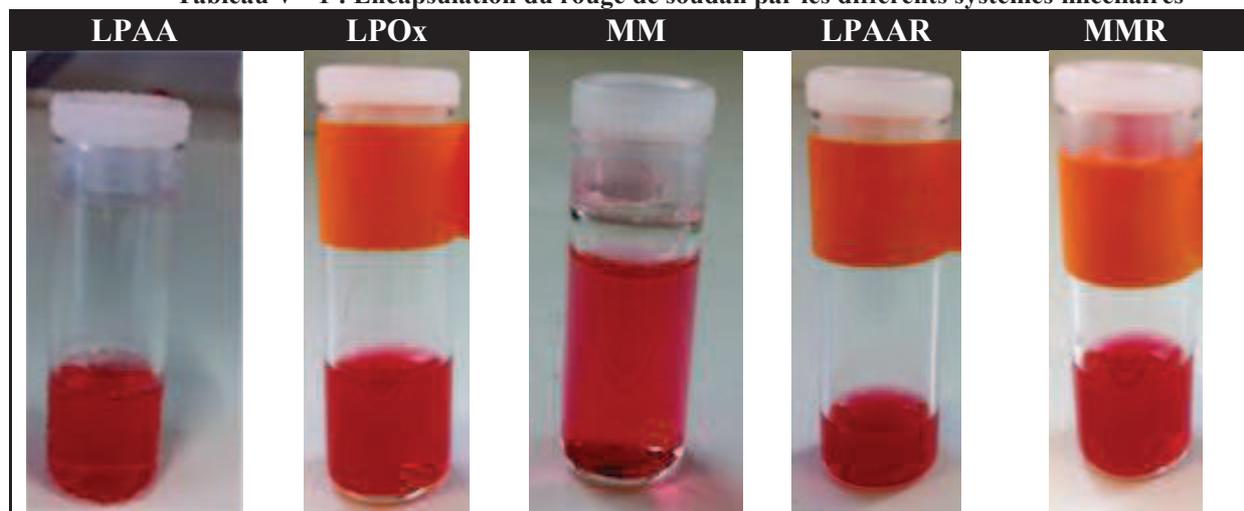
- LPAA à 1 g/L à pH acide
- LPOx à 0,5 g/L à pH acide
- LPAA+LPOx (MM) à 1g/L à pH acide
- LPAA réticulé (LPAAR) à 1 g/L à pH acide
- LPAA+LPOx réticulé (MMR) à 1 g/L à pH acide

## Chapitre V : Etude de l'encapsulation et suivi de libération

Pour ce faire, le colorant est ajouté en masse dans chaque solution soumise à une agitation de 750 tr/min. Après 2 à 3h d'agitation, le mélange est filtré afin d'éliminer le colorant non soluble et photographié. Nous obtenons les résultats répertoriés dans le **tableau V - 1**.

Nous pouvons voir que, pour chaque système, une intense coloration rouge est obtenue après filtration démontrant bien la solubilisation effective de la molécule hydrophobe par les systèmes micellaires.

**Tableau V - 1 : Encapsulation du rouge de soudan par les différents systèmes micellaires**



### 2. Libération d'un colorant par les différents systèmes non réticulés

#### a) Les systèmes isolés

Afin de visualiser la libération du principe actif, le rouge de soudan a été encapsulé dans des micelles de LPOx et de LPAA, ce qui conduit, de ce fait, à une solution de couleur rouge. Chaque solution est ensuite maintenue dans des conditions défavorables (pH basique pour le LPAA et  $T > T_{PT}$  pour le LPOx).

Nous n'avons pas pu visualiser la libération du colorant par le LPAA à pH basique. En effet, la solution reste toujours rouge. Or, nous savons que la couronne de PAA n'aide pas à la solubilisation du rouge du soudan. En revanche, les analyses QELS (chapitre III) révèlent toujours la présence de petits objets à pH basique. Ces objets peuvent être composés de 2 ou 3 unimères, ce qui suffirait à encapsuler le rouge de soudan à ce pH.

## Chapitre V : Etude de l'encapsulation et suivi de libération

Pour le LPO<sub>x</sub>, la solution très colorée devient quasiment incolore après filtration (Tableau V - 2) prouvant ainsi la libération du colorant.

### b) Les systèmes mixtes

Cette méthode a également été utilisée pour étudier les conditions de libération du système mixte. Les résultats QELS semblent démontrer une bonne conservation globale des micelles lorsqu'une seule condition défavorable est présente (pH acide et  $T > T_{PT}$  ou pH basique et  $T < T_{PT}$ ) et une désorganisation du système quand les deux conditions défavorables sont réunies (pH basique et  $T > T_{PT}$ ). L'encapsulation de rouge de soudan est donc réalisée sur le système mixte à pH acide et pour une température inférieure à celle du point de trouble. Le pH et/ou la température sont ensuite modifiés.

Les trois conditions sont testées afin de vérifier la stabilité ou la libération du rouge de soudan.

**Tableau V - 2 : Libération de colorant pour le LPO<sub>x</sub> et le système mixte non réticulé dans différentes conditions environnementales**

LPO <sub>x</sub> $T > T_{PT}$	Système mixte : LPO <sub>x</sub> + LPAA			
	pH acide et $T < T_{PT}$	pH acide et $T > T_{PT}$	pH basique et $T < T_{PT}$	pH basique + $T > T_{PT}$
				

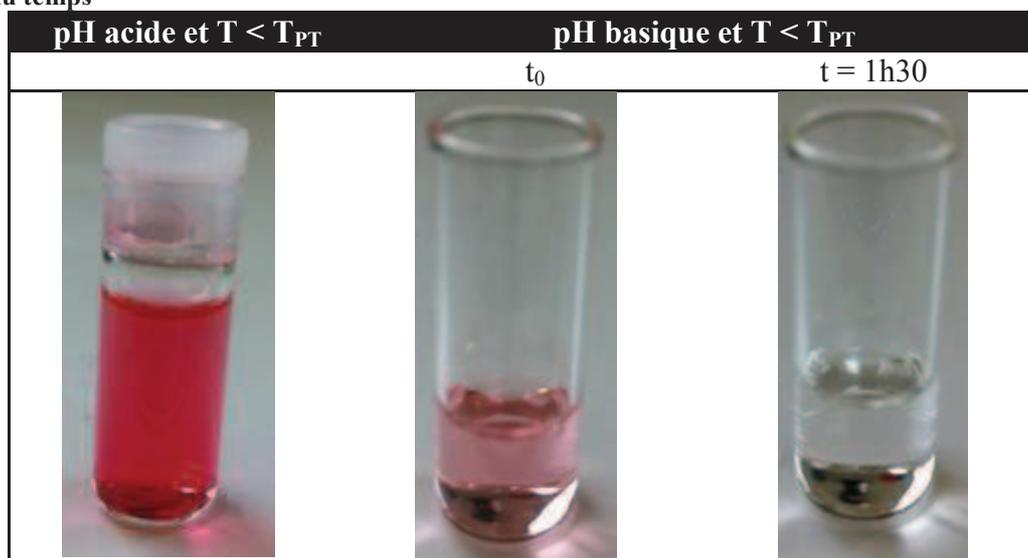
Lorsque les deux conditions défavorables sont réunies, la solution devient quasiment incolore (Tableau V - 2) prouvant, ainsi, la libération du colorant.

Lorsque la température augmente à pH acide, la coloration rouge subsiste, démontrant ainsi la conservation des systèmes micellaires.

## Chapitre V : Etude de l'encapsulation et suivi de libération

Toutefois, à pH basique et  $T < T_{PT}$ , la coloration est nettement moins prononcée après filtration. Au bout d'une heure trente, une nouvelle filtration révèle une solution totalement incolore (**Tableau V - 3**). Les filtrations successives peuvent provoquer une perte de coloration mais ne justifient pas la décoloration totale de la solution.

**Tableau V - 3 : Libération du rouge de soudan par système mixte non réticulé à pH basique au cours du temps**



Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. La première est une désorganisation du système au cours du temps conduisant à une libération progressive du colorant. Ceci paraît étonnant dans la mesure où, à pH basique, le système LPOx forme toujours des micelles lorsqu'il est seul en solution et qu'il n'a pas été observé de libération du colorant par le système LPAA isolé à pH basique.

Toutefois il est possible qu'à pH basique, l'extension des chaînes de PAA dans les micelles mixtes permettent la libération du colorant. Etant toujours en présence de micelles, cette libération se produit par diffusion lente à travers la couronne.

### c) Les systèmes mixtes réticulés

Dans le cas des micelles mixtes réticulées (MMR), quelles que soient les conditions de pH et de température, les solutions restent colorées à  $t_0$  (**Tableau V - 4**). Le rouge de soudan n'est donc jamais libéré instantanément. Un plus haut degré de contrôle de relargage est obtenu. Ceci met en évidence des perspectives prometteuses concernant la libération contrôlée et progressive de principe actif hydrophobe par les MMR.

Tableau V - 4 : Libération du rouge de soudan par le système mixte réticulé en fonction de la température et du pH

pH acide		pH basique	
T < T <sub>PT</sub>	T > T <sub>PT</sub>	T < T <sub>PT</sub>	T > T <sub>PT</sub>
			

### B. Mise en évidence de la capacité d'encapsulation et de relargage du LPAA par fluorescence du pyrène

Les essais avec le rouge de soudan n'ont pas pu mettre en évidence les capacités de libération du LPAA à pH basique. Le pyrène est une molécule hydrophobe dont le spectre d'émission en fluorescence change selon son environnement. Lorsque son environnement est polaire (comme dans l'eau),  $\frac{I_{338}}{I_{333}} \approx 0,5$  alors qu'en milieu apolaire, il devient supérieur à 1. Il est donc aisé de suivre la localisation du pyrène grâce à cette méthode. C'est pourquoi, nous l'avons appliquée pour confirmer la libération du principe actif à pH basique. Pour cela, une solution de LPAA contenant du pyrène est préparée à pH acide. Cette solution est successivement passée à pH basique et pH acide par ajout de soude et d'acide chlorhydrique concentrés. A chaque fois, une analyse par spectrométrie de fluorescence est réalisée. La **figure V - 1** montre bien le changement d'environnement du pyrène à chaque modification de pH. Celui-ci est donc successivement libéré et encapsulé en fonction du pH. Il s'agit d'un phénomène très rapide. En effet, seulement 10 min suffisent à la libération et l'encapsulation du pyrène. Non seulement, le système LPAA libère bien le principe actif à pH basique, mais il s'agit également d'un processus réversible.

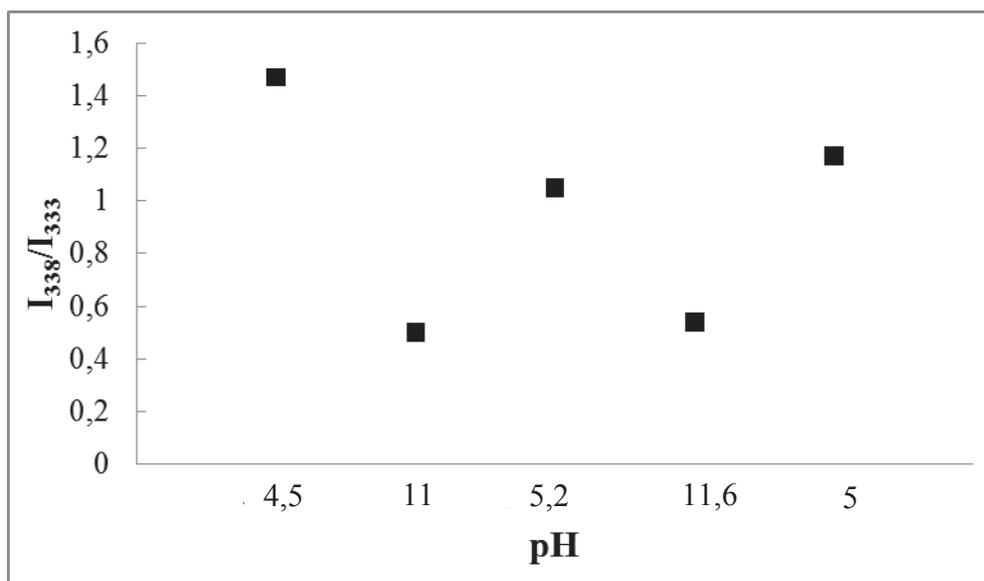


Figure V - 1 : Libération et encapsulation successives du pyrène dans le système LPAA en fonction du pH.

## II. Capacité d'encapsulation et de relargage : étude quantitative

### A. Quantification de la capacité d'encapsulation

#### 1. Description des principes actifs

Afin de mettre en place la méthode d'analyse, nous avons tout d'abord choisi de travailler avec la benzophénone (Schéma V - 2). La benzophénone (BZ) est une molécule hydrophobe qui possède une faible solubilité dans l'eau (0,14 g/L à T = 25°C).

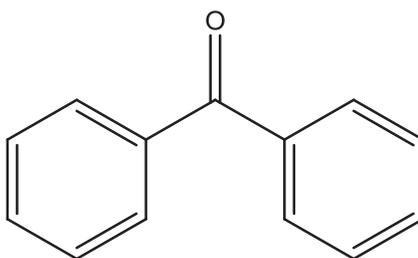


Schéma V - 2 : Structure de la benzophénone

Son spectre d'absorption UV (Figure V - 2) dans un mélange MeOH/eau (90/10 v/v) présente deux pics intenses à 203 et 254 nm.

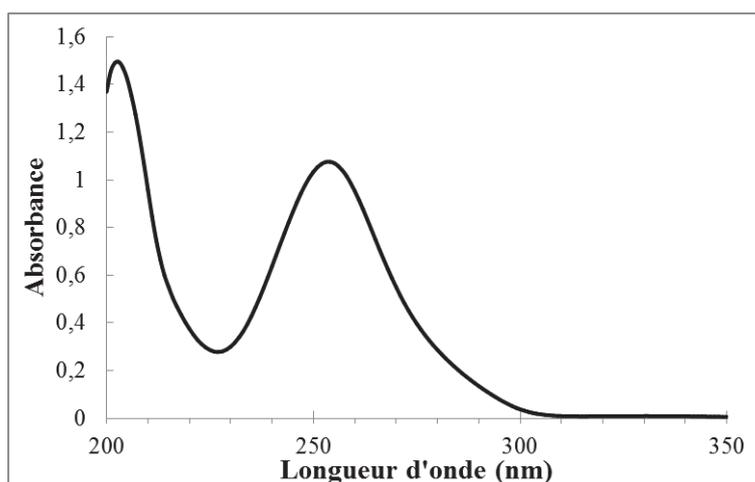


Figure V - 2 : Spectre UV de la benzophénone dans un mélange MeOH/eau (90/10 v/v)

La vitamine K1 (**Schéma V - 3**) (VK1) est indispensable à la synthèse hépatique de la prothrombine essentielle à la coagulation<sup>3</sup>. La VK1 a la particularité de comporter une longue chaîne alkyle avec 16 carbones. Cette chaîne ressemble donc fortement à la chaîne lipidique des deux copolymères. Ceci devrait augmenter l'affinité cœur/principe actif et donc favoriser l'encapsulation.

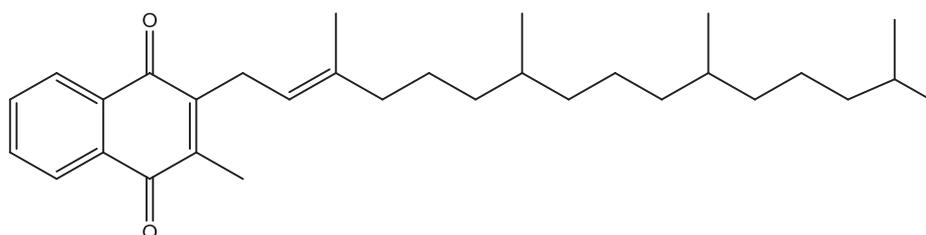


Schéma V- 3 : La Vitamine K1 contient une longue chaîne alkyle

La VK1 est totalement insoluble dans l'eau. Le spectre UV (**Figure V - 3**) de la VK1 dans un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O (90/10 v/v) montre plusieurs pics à 201, 246, 271 et à 329 nm.

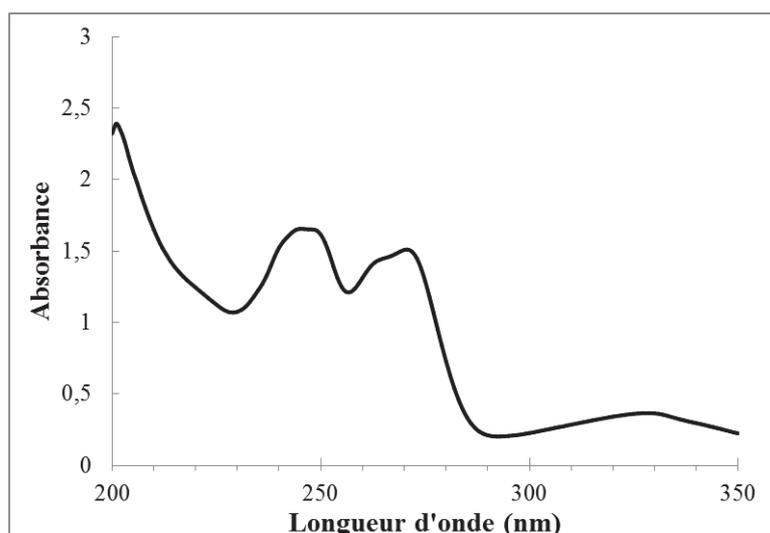


Figure V - 3 : Spectre UV de la vitamine K1 dans un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O (90/10 v/v)

La fiche de données de sécurité indique que cette molécule est photosensible. Il faudra donc prendre les précautions nécessaires afin qu'elle ne soit pas exposée à la lumière.

La progestérone (P) est une hormone bien connue faisant partie de la famille des stéroïdes. Au niveau de sa structure chimique (**Schéma V - 4**), cette molécule est très proche de l'œstrogène, la testostérone et le cholestérol, et peut donc ainsi représenter une large famille de molécules hydrophobes utilisées en médecine. Sa solubilité est d'exactement 8,81 mg/L à T = 25°C<sup>4</sup>. Elle est donc quasiment insoluble dans l'eau.

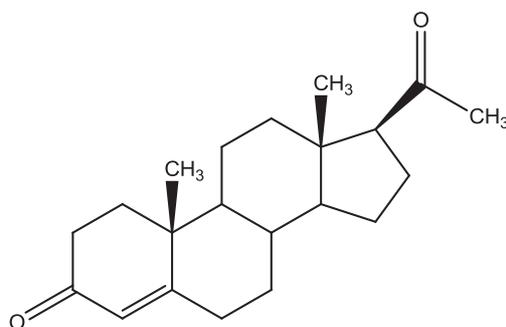


Schéma V - 4 : La structure de la progestérone est très proche de celle de la testostérone, du cholestérol et de l'œstrogène.

Le spectre UV de la progestérone solubilisée dans un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O (90/10 v/v) présente une large bande dont le maximum est atteint à 242 nm.

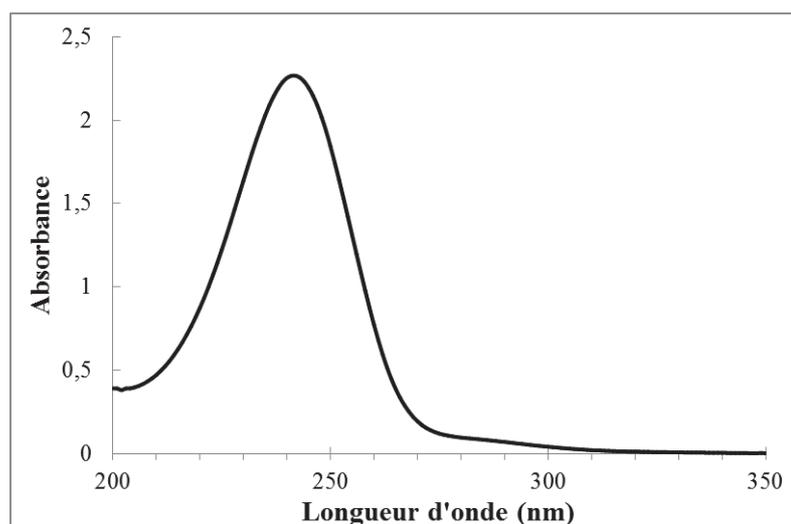


Figure V - 4 : Le spectre UV de la progestérone présente un large pic à 242 nm

### 2. Description de la méthode d'analyse

Pour chaque système, le protocole d'analyse est couramment décrit dans la littérature<sup>5</sup> et se déroule de la façon suivante.

Dans un premier temps, un étalonnage est réalisé pour chaque principe actif en solution dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (90/10 v/v) pour la benzophénone et EtOH/H<sub>2</sub>O pour la VK1 et la progestérone. Le choix du MeOH ou de l'EtOH est simplement lié à la solubilité des principes actifs dans ces solvants.

Selon la loi de Beer-Lambert, nous avons la relation suivante entre l'absorbance (A) et la concentration (C) en principe actif :

$$A = kC \quad \text{avec} \quad k = \epsilon_{\lambda} \ell$$

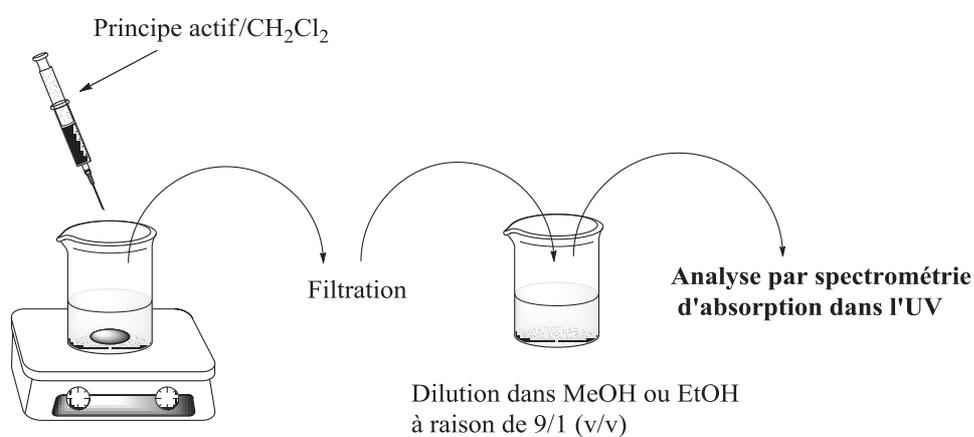
où C est la concentration du principe actif (mol.L<sup>-1</sup>),  $\epsilon_{\lambda}$  est le coefficient d'extinction molaire (L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) et  $\ell$  est la longueur du trajet optique (cm<sup>-1</sup>).

**Tableau V - 5 : Etalonnage des différents principes actifs**

Principe actif	$r^2$	$\epsilon_\lambda$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
<b>Benzophénone</b>	0,9983	24,1
<b>Vitamine K1</b>	0,9996	7,0
<b>Progestérone</b>	0,996	14,0

Dans un deuxième temps, une quantité connue de principe actif en solution dans du dichlorométhane est ajoutée goutte à goutte à une solution de copolymères amphiphiles à une concentration connue sous une agitation de 750 tr/min. Le mélange est agité pendant toute une nuit pour s'assurer de l'évaporation complète du dichlorométhane et ainsi de l'encapsulation du principe actif à l'intérieur des micelles. La solution est finalement filtrée afin de retirer le principe actif non encapsulé.

Enfin, 1 mL de la solution est prélevé et mélangé avec 9 mL d'éthanol ou de méthanol. Ceci permet de « casser » les micelles et de libérer le principe actif encapsulé qui se retrouve donc dans un environnement similaire à l'étalonnage. Cette solution est alors analysée en spectrométrie d'absorption dans l'UV.



**Schéma V- 5 : Méthode d'analyse de la capacité d'encapsulation des systèmes micellaires**

## 3. Des bonnes capacités d'encapsulation dépendants du principe actif

La capacité massique d'encapsulation est déterminée à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ encapsulation} = \frac{m_{\text{principeactif encapsulé}}}{m_{\text{copolymèreamphiphile}}} \times 100$$

**Tableau V - 6 : Les capacités d'encapsulation de trois composés hydrophobes pour les différents systèmes.**

	Benzophénone	Vitamine K1	Progestérone
<b>Solubilité dans la solution tampon</b>	29 mg/L	0	12 mg/L
<b>PAA</b>	13%	0%	Non déterminée
<b>LPAA</b>	7% ± 1%	21% ± 6%	0,4%
<b>POx</b>	6%	0%	Non déterminée
<b>LPOx</b>	30% ± 5%	6% ± 2%	1,0%
<b>MM</b>	29%	43% ± 6%	0,6%
<b>LPAAR</b>	17% ± 1%	[6 – 27]%	0,3%
<b>MMR</b>	14%	12% ± 6%	0,6%

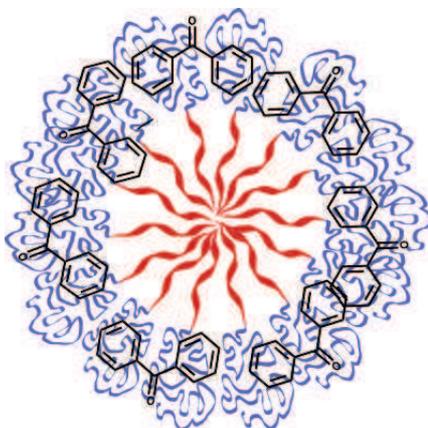
*\* Les valeurs inscrites dans le tableau sont des moyennes sur 2 à 3 mesures sauf pour les homopolymères et la progestérone pour lesquelles une seule mesure a été réalisée. Dans tous les cas, le nombre de mesures n'est pas suffisant pour quantifier de façon précise la capacité d'encapsulation de chaque système. Toutefois, ces mesures permettent de souligner une tendance et de comparer les différents systèmes entre eux.*

### a) Pour les systèmes isolés

Concernant la benzophénone (BZ), le LPOx et le LPAA améliorent nettement sa solubilité dans l'eau. Nous pouvons noter que le LPOx semble beaucoup plus efficace que le LPAA alors que les deux systèmes possèdent le même cœur. Ceci peut s'expliquer par une contribution plus importante des chaînes hydrophiles à solubiliser la BZ. De plus, la chaîne POx est plus longue que la chaîne PAA ( $\overline{Mn}_{LPOx} = 3340 \text{ g/mol}$  et  $\overline{Mn}_{LPAA} = 2030 \text{ g/mol}$ ). Ceci pourrait donc expliquer une différence de solubilisation de la BZ.

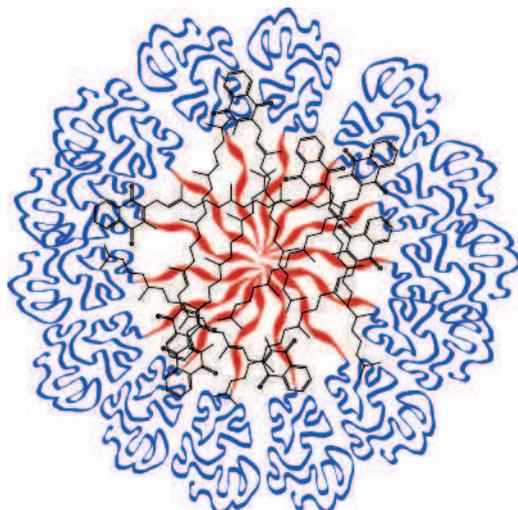
## Chapitre V : Etude de l'encapsulation et suivi de libération

Un essai de solubilisation de la benzophénone en présence des homopolymères POx et PAA montre une augmentation notable de la solubilité de la benzophénone dans l'eau. Toutefois, la capacité d'encapsulation de la BZ par le LPOx est très supérieure à celle du POx seul et du LPAA. La BZ semble donc migrer de façon plus importante dans le cœur des micelles de LPOx que dans celles de LPAA. Il est possible qu'il existe une meilleure affinité entre la benzophénone et les chaînes de PAA qu'avec le cœur. La benzophénone reste donc préférentiellement dans la couronne, d'où une contribution unique de la couronne à la solubilisation dans ce cas (**Schéma V – 6**). A ceci peut s'ajouter un manque d'affinité entre le cœur de la micelle et la benzophénone. Ceci montre l'importance de la couronne dans le processus d'encapsulation<sup>6</sup>.



**Schéma V - 6 : Encapsulation de la benzophénone par la couronne de la micelle**

Contrairement à la benzophénone, la vitamine K1 (VK1) est encapsulée plus efficacement par le LPAA que par le LPOx. De même que précédemment, les deux homopolymères sont comparés afin de comprendre la contribution de la couronne dans l'encapsulation de la VK1. Il se révèle que les homopolymères POx et PAA ne solubilisent absolument pas la VK1. Ainsi, la couronne hydrophile n'intervient pas dans l'encapsulation de ce composé. Il existerait donc une bonne affinité entre le cœur et la vitamine K1. Ceci est cohérent avec la littérature qui indique une encapsulation efficace de la vitamine K3 (même famille que la vitamine K1) par des micelles PEG-PE<sup>5,7</sup>. Toutefois, il est possible que les chaînes de polymères freinent la migration de la VK1 vers le cœur des micelles par effet stérique. Les chaînes de POx étant plus grandes que celles de PAA, cela peut être une explication de la différence d'encapsulation entre les deux systèmes.



**Schéma V - 7 : Encapsulation de la vitamine K1 dans le cœur de la micelle**

La taille des systèmes de LPAA et de LPOx a été déterminée par analyse QELS après encapsulation de, respectivement, la VK1 et la BZ. Les micelles de LPAA chargées VK1 présentent une taille d'environ 30 nm tandis que les micelles de LPOx chargées en BZ sont d'environ 120 nm. La taille des micelles augmente donc de façon notable lorsqu'elles sont chargées en principe actif. Cette augmentation de taille lors de l'encapsulation a déjà été observée dans la littérature et est due à l'accumulation des principes actifs dans le centre de la micelle qui «poussent» les blocs hydrophobes<sup>6,8</sup>. Les micelles de LPOx chargées en BZ sont de taille plus importante que celles de LPAA chargées en VK1 alors que la BZ est plus petite que la VK1 et que les micelles « libres » sont de même taille. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le LPOx semble encapsuler plus de BZ que le LPAA de VK1. De plus, une partie de la BZ se situerait dans la couronne. Le cœur et la couronne augmenterait donc de taille alors que la VK1 ne se situerait que dans le cœur des micelles de LPAA limitant le gonflement au cœur.

Nous pouvons remarquer que les différents systèmes micellaires encapsulent très peu de progestérone, sans doute en raison d'une mauvaise affinité cœur/principe actif. Toutefois, même si l'augmentation de solubilité est faible, elle est bien présente. De plus, la capacité d'encapsulation de la progestérone par ces systèmes équivaut à celle du paclitaxel dans des micelles PEG-PE (1,2% en masse)<sup>9,10</sup>.

En général, la capacité d'encapsulation des micelles de polymère composées d'une partie lipide se situe entre 1,5 et 50% en masse<sup>5</sup>. Bien que faiblement encapsulée, la

## Chapitre V : Etude de l'encapsulation et suivi de libération

progestérone voit sa solubilité augmenter en présence des micelles de copolymère. Quant aux résultats obtenus pour la benzophénone et la vitamine K1, ils sont très prometteurs.

### b) Pour les systèmes mixtes

Les systèmes mixtes présentent, dans tous les cas, les capacités d'encapsulation maximales, équivalentes à la capacité d'encapsulation la plus haute des systèmes isolés (**Tableau V – 6**). Nous aurions pu croire que la capacité d'encapsulation des systèmes mixtes serait limitée par le copolymère présentant les moins bons résultats. En réalité, c'est le contraire qui est observé ici mettant en évidence le rôle complexe de la couronne. Les systèmes mixtes présentent donc une meilleure capacité d'encapsulation que les systèmes isolés.

### c) Pour les systèmes réticulés

La réticulation des micelles (de LPAA et mixte) a globalement tendance à diminuer la capacité d'encapsulation tout en gardant une bonne performance. Ceci est cohérent avec la diminution en volume libre du cœur due à la réticulation. On peut toutefois noter que la réticulation des micelles de LPAA améliore la capacité d'encapsulation de la benzophénone. Ceci s'explique sans doute par une augmentation de l'affinité cœur/principe actif qui permet une meilleure stabilité de la benzophénone dans le cœur<sup>11</sup>. Pour tous les systèmes réticulés, aucun ne dépasse les 16% de capacité d'encapsulation en moyenne. Il s'agit sans doute de la capacité maximale de ces systèmes.

## **B. Suivi de libération**

Nous avons montré précédemment que le contrôle effectif de la libération d'un colorant dans des conditions environnementales données était très rapide. En empêchant la désorganisation des systèmes, la réticulation devrait permettre de ralentir la libération du principe actif. En effet, celui-ci sera libéré progressivement par diffusion à travers la couronne hydrophile. Afin de pouvoir vérifier cela expérimentalement, nous avons mis en place une méthode de suivi de libération pour comparer chaque système.

### 1. Mise en place d'une méthode d'analyse

Afin de suivre la libération du principe actif, celui-ci est tout d'abord encapsulé par un des systèmes micellaires à pH acide et à température ambiante. La solution est ensuite introduite dans une membrane à dialyse et dialysée dans les conditions de libération (selon le système testé). Un prélèvement de l'eau de dialyse est effectué à des temps donnés et analysé en chromatographie liquide à haute performance munie d'un détecteur UV, HPLC-UV<sup>12</sup>.

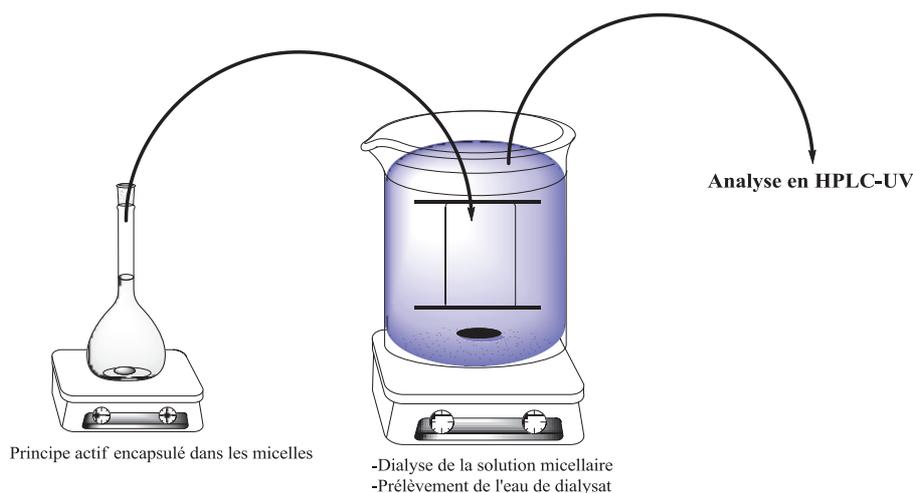
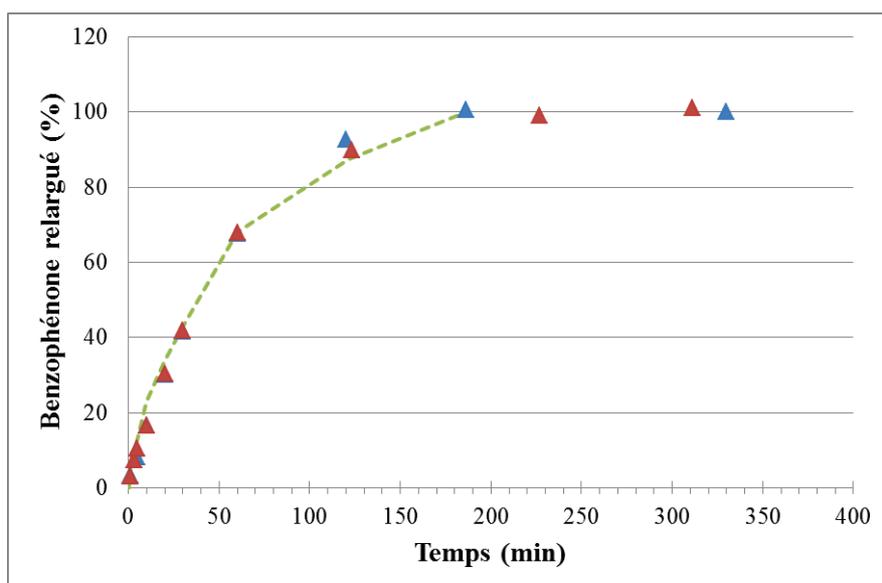


Schéma V- 8 : Méthode de suivi de libération du principe actif

### 2. Suivi de la libération de la benzophénone

#### a) Essais préliminaires

Dans un premier temps, les suivis de libération de la BZ sont réalisés en milieu basique pour les systèmes LPAA et LPAAR avec une membrane présentant un cut-off de 1 kDa. La concentration en benzophénone est déterminée par analyse en HPLC-UV. Les conditions de l'analyse et l'étalonnage de la benzophénone sont en **annexe V - 2**. Le pourcentage de benzophénone relargué est tracé en fonction du temps (**Figure V - 5**).



**Figure V - 5 : Suivi de libération de la benzophénone pour les systèmes micellaires LPAA (▲), LPAA réticulé (▲) et pour la solution témoin (---)**

Les deux systèmes présentent, selon cette méthode, un profil de relargage parfaitement identique. Cela est en contradiction avec la stabilité bien différente de ces deux systèmes en milieu basique mise en évidence dans les chapitres précédents. Nous nous sommes donc interrogés sur l'impact de la membrane de dialyse sur ces profils. Afin de comprendre ce phénomène, le suivi de libération de la benzophénone est réalisé avec une solution témoin en absence de systèmes micellaires.

D'après la **figure V – 5**, les différents suivis de libération correspondent à la libération de la BZ dans l'eau de dialyse par la membrane. Le retard de libération précédemment observé est simplement lié à la membrane.

### b) Choix d'une membrane de dialyse

Plusieurs membranes avec des cut-off allant de 0,1 à 3,5 kDa ont été testées afin d'utiliser celle qui retardera le moins la libération du produit tout en ayant le cut-off le plus petit (afin de s'assurer que les micelles restent bien dans la membrane). Pour cela, une solution saturée en benzophénone (une solution tampon à pH = 4,6 et avec 0,1 mol/L de NaCl) est introduite dans une membrane de dialyse et dialysée dans un grand volume de solution tampon à pH = 4,6 contenant [NaCl] = 0,1 mol/L.

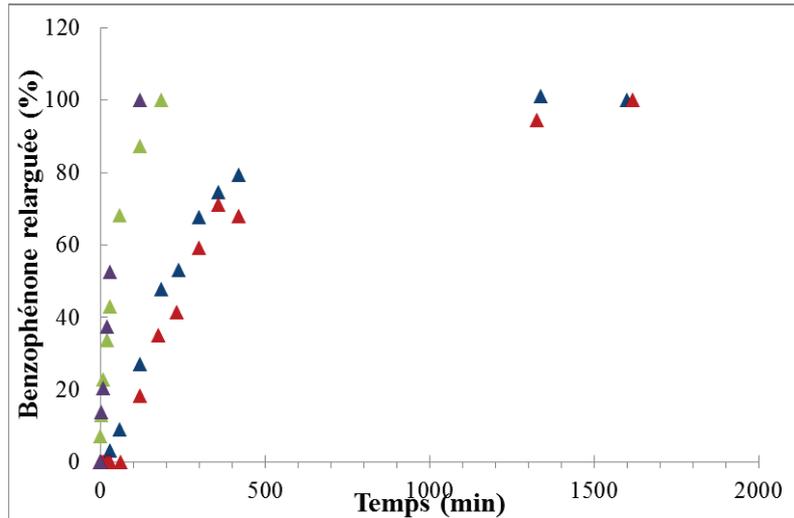
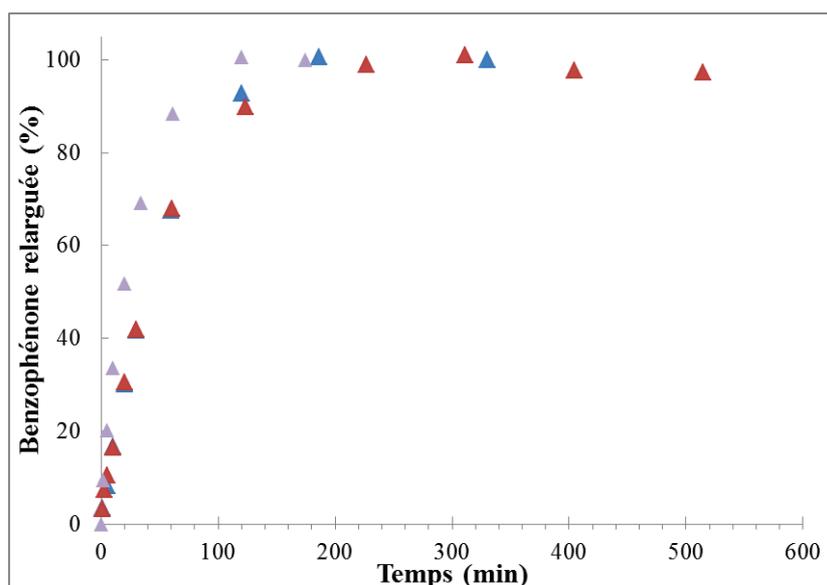


Figure V - 6 : Retard à la libération dû à la membrane 0,1 kDa (▲), 0,5 kDa (▲), 1 kDa (▲) et 3,5 kDa (▲)

La **figure V - 6** montre l'influence de la membrane sur le retard à la libération des principes actifs. En toute logique, plus la membrane possède un faible cut-off, plus le retard à la libération est important. Les membranes de dialyse avec le cut-off de 1 et 3,5 kDa sont celles qui occasionnent le moins de retard à la libération. La membrane de dialyse de 1kDa est donc le meilleur compromis entre un faible cut-off et un minimum de retard à la libération. La suite des suivis de libération est donc finalement réalisée avec cette membrane.

c) Réalisation des essais de suivi de libération

Les suivis de libération sont donc réalisés avec une membrane de dialyse présentant un cut-off de 1 kDa sur les systèmes suivants : LPAA, LPOx et LPAAR.



**Figure V - 7 : Suivi de libération de la benzophénone pour les systèmes micellaires LPAA (▲), LPAA réticulé (▲), LPOx (▲)**

Les profils de relargage correspondent ici au retard dû à la membrane. Il paraît plus rapide pour le LPOx mais ceci est sans doute dû à la température à laquelle se déroule l'essai ( $T = 40^{\circ}\text{C}$ ). En effet, l'augmentation de la température peut avoir une influence sur la taille des pores de la membrane et également sur le mouvement brownien des molécules favorisant les échanges. Ceci provoque une accélération artificiellement la libération.

Pour le LPOx et le LPAA, on peut donc supposer que la benzophénone est libérée plus rapidement qu'elle ne migre à travers la membrane et qu'il s'agit d'un phénomène instantané.

Le profil de libération ne change pas avec les micelles de LPAA réticulées. Ceci conforte l'hypothèse qu'il n'existe aucune affinité cœur/benzophénone et que la benzophénone est solubilisée juste par la couronne. En effet, les principes actifs solubilisés dans la couronne ne possèdent généralement pas une forte association avec celle-ci et sont libérés très rapidement<sup>6</sup>. Dans ces conditions, la réticulation du cœur ne peut pas avoir d'influence sur le profil de relargage.

### d) Stabilité de la benzophénone à pH acide dans les micelles de LPAA

Afin de confirmer que la benzophénone est située dans la couronne et non dans le cœur des micelles, la stabilité de l'encapsulation à pH acide est vérifiée. En effet, si aucune

affinité entre le cœur et la benzophénone n'existe, la benzophénone doit être « libérée » par diffusion à travers la couronne dans le cas d'une simple dilution même à pH acide.

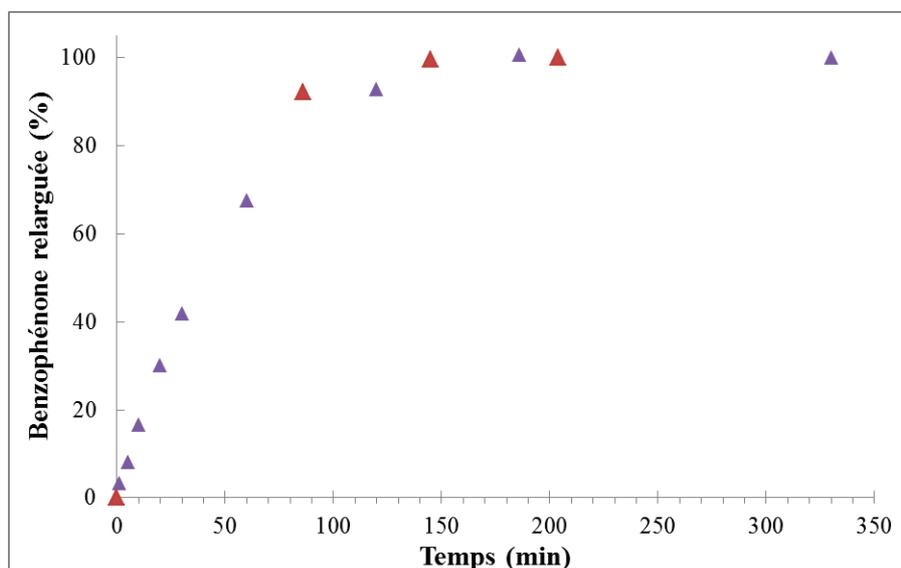


Figure V - 8 : Comparaison du profil de relargage de la benzophénone à pH acide (▲) et pH basique (▲)

Que ce soit à pH acide ou basique, le profil de relargage de la benzophénone est identique. Ceci va dans le sens de la non-encapsulation de la benzophénone dans le cœur des micelles. La solubilité de la benzophénone est améliorée grâce à la présence de la couronne hydrophile. La benzophénone se retrouve donc libérée par simple dilution.

### 3. Suivi de la libération de la vitamine K1

Au contraire de la benzophénone, la couronne hydrophile des micelles n'intervient pas dans la solubilisation de la vitamine K1. Dans ce cas, une affinité cœur/principe actif semble exister. Il serait donc intéressant d'obtenir les profils de relargage de la vitamine K1 avec les différents systèmes micellaires car nous pouvons espérer, dans ce cas, un relargage plus lent que la vitesse de migration à travers la membrane.

Toutefois, malgré des conditions d'analyses en HPLC extrêmes (débit = 1,5 mL/min, 100% acétonitrile, T = 50°C), le signal obtenu ( $t_r = 10,5$  min) n'est pas assez intense pour réaliser un étalonnage précis à des concentrations très faibles. La vitamine K1 possédant une chaîne C16, il est difficile de la faire passer à travers la colonne.

## Chapitre V : Etude de l'encapsulation et suivi de libération

Néanmoins, la stabilité de l'encapsulation de la vitamine K1 à pH = 4 a été vérifiée pour les micelles de LPAA à l'aide d'analyse par spectrométrie d'absorption dans l'UV. Bien qu'aucune quantification n'ait été possible, la vitamine K1 est toujours détectée dans les micelles même après une semaine de dialyse ce qui va dans le sens d'une encapsulation efficace de la vitamine K1 par le cœur des micelles.

### Conclusion

La capacité d'encapsulation des différents systèmes micellaires a été qualitativement mise en évidence par un colorant et déterminée par analyse UV pour trois principes actifs : la benzophénone, la vitamine K1 et la progestérone.

Pour chaque système, la solubilité du principe actif dans l'eau se trouve améliorée. La progestérone est très faiblement encapsulée par rapport à la benzophénone et la vitamine K1. La comparaison des résultats obtenus pour la benzophénone et la vitamine K1 permet de mettre en évidence l'importance, non seulement de l'affinité cœur/principe actif mais aussi de l'action de la couronne hydrophile. Ainsi, la benzophénone ne semble pas être encapsulée par le cœur des micelles mais par la couronne hydrophile. Au contraire, la vitamine K1 ne semble pas avoir d'affinité avec la couronne qui jouerait au contraire un rôle de frein, par effet stérique, à sa migration dans le cœur des micelles.

Les suivis de libération de la benzophénone confirment cette hypothèse. En effet, la benzophénone est libérée très rapidement dans le milieu par diffusion à travers la couronne que les micelles soient réticulées ou non.

Malheureusement, la méthode d'analyse mise en place pour la benzophénone n'a pas pu être appliquée pour la vitamine K1 à cause de sa forte hydrophobie. Toutefois, de premiers essais de suivi UV semblent aller dans le sens d'une bonne stabilité de l'encapsulation de la VK1 dans le cœur des micelles au cours du temps. Il reste à confirmer et à quantifier le suivi de libération de la vitamine K1 pourrait être réalisé par suivi en analyse par spectrométrie d'absorption dans l'UV.

## Chapitre V : Etude de l'encapsulation et suivi de libération

1. Lin, W. & Kim, D. pH-Sensitive micelles with cross-linked cores formed from polyaspartamide derivatives for drug delivery. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **27**, 12090–7 (2011).
2. Lee, W.-C., Li, Y.-C. & Chu, I.-M. Amphiphilic poly(D,L-lactic acid)/poly(ethylene glycol)/poly(D,L-lactic acid) nanogels for controlled release of hydrophobic drugs. *Macromolecular bioscience* **6**, 846–54 (2006).
3. *Dictionnaire Vidal*. (1985).
4. Yalkowsky, S. & Dannenfelser, R. Aquasol database of aqueous solubility. *College of Pharmacy* (1992).
5. Lukyanov, A. N. & Torchilin, V. P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Advanced drug delivery reviews* **56**, 1273–89 (2004).
6. Torchilin, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of controlled release* **73**, 137–72 (2001).
7. Musacchio, T. & Torchilin, V. P. Recent developments in lipid-based pharmaceutical nanocarriers. *Frontiers in Bioscience* **16**, 1388–1412 (2011).
8. Wang, J., Dimitry, M. & Torchilin, V. P. Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: Preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. *Journal of Drug Targeting* **13**, 73–80 (2005).
9. Gaucher, G., Satturwar, P., Jones, M.-C., Furtos, A. & Leroux, J.-C. Polymeric micelles for oral drug delivery. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **76**, 147–58 (2010).
10. Torchilin, V. P. Lipide-Core Micelles for Targeted Drug Delivery. *Current Drug Delivery* **2**, 319–327 (2005).
11. Tian, L., Yam, L., Wang, J., Tat, H. & Uhrich, K. E. Core crosslinkable polymeric micelles from PEG-lipid amphiphiles as drug carriers. *Journal of Materials Chemistry* **14**, 2317–2324 (2004).
12. Inoue, T., Chen, G., Nakamae, K. & Hoffman, A. S. An AB block copolymer of oligo (methyl methacrylate) and poly (acrylic acid) for micellar delivery of hydrophobic drugs. **51**, 221–229 (1998).

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail de thèse était d'élaborer des micelles pouvant répondre à un ou plusieurs stimulus(i) à partir de copolymères amphiphiles intelligents et originaux, et ce en vue d'une application potentielle comme système de vectorisation de médicament. Nous avons donc choisi de synthétiser des copolymères présentant une partie hydrophile sensible à un paramètre environnemental : le pH ou la température, et une partie hydrophobe issue de l'huile de lin. Le choix de l'huile de lin a été guidé par la présence d'insaturations éthyléniques sur les chaînes grasses, offrant la possibilité de réticuler le cœur des micelles et ainsi d'améliorer leur stabilité. Enfin, l'utilisation de techniques de polymérisation contrôlées, et plus particulièrement l'ATRP et la CROP, a été envisagée afin de contrôler la HLB des copolymères finaux.

Afin de mener à bien ce projet, la synthèse de deux lipoamorceurs issus de l'huile de lin a, dans un premier temps, été mise au point. Ces deux lipoamorceurs possèdent une chaîne grasse linéaire dont la structure est variable puisque dérivée des différents acides gras contenus dans l'huile de lin.

Ces lipomamorceurs ont par la suite été engagés dans l'ATRP de l'acrylate de *tert*-butyle (*t*BA) et du N-isopropylacrylamide (NIPAM) et dans la CROP de l'isopropyl-2-oxazoline (IPOx) afin d'obtenir trois copolymères amphiphiles :

- le lipide-*b*-poly(acide acrylique) (LPAA) obtenu après hydrolyse des fonctions ester des groupements *t*-BA : copolymère pH-sensible
- le lipide-*b*-poly(N-isopropylacrylamide) (LPNIPAM) : copolymère thermo-sensible
- le lipide-*b*-poly(Isopropyl-2-oxazoline) (LPOx) : copolymère thermo-sensible.

Le suivi cinétique de la polymérisation par ATRP du *t*-BA a montré un excellent contrôle de la réaction, rendant possible l'obtention de copolymères amphiphiles avec une architecture bien définie à partir d'un lipoamorceur hétérogène en structure. De plus, la conservation des insaturations des chaînes grasses pendant la synthèse a été démontrée.

En revanche, la polymérisation par ATRP du NIPAM s'est révélée plus complexe. Malgré une nette amélioration du contrôle de la réaction, des réactions de terminaison et de transfert n'ont pu être éliminées et les conversions restent trop élevées.

La polymérisation par CROP de l'IpOx n'a pas permis d'atteindre un excellent niveau de contrôle de la réaction à cause d'une défaillance du réacteur à micro-ondes. Toutefois, la structure finale obtenue (linéarité, présence des insaturations, faibles masses molaires) est satisfaisante pour la suite de l'étude.

Dans un deuxième temps, l'étude du comportement en milieu aqueux de deux copolymères amphiphiles a été réalisée :

- le LPAA :  $M_n = 1630 \text{ g/mol}$
- le LPOx :  $M_n = 3400 \text{ g/mol}$

Ces copolymères présentent tous les deux une cmc de l'ordre de 10 mg/L et des tailles d'environ 10 nm ce qui correspond à la formation de micelles stables.

Le copolymère LPAA montre un comportement pH-sensible. En effet, il s'auto-assemble à pH acide et se désorganise à pH basique. Ceci a pu être prouvé via des analyses par fluorescence du pyrène et par diffusion de la lumière. Le copolymère LPOx montre, quant à lui, un comportement thermo-sensible. En effet, lorsque la température dépasse 32°C, il s'agrège.

Afin d'obtenir des micelles répondant aux deux stimuli (pH et température), les deux copolymères ont été mélangés en solution aqueuse. Le système mixte obtenu présente un comportement très différent des systèmes LPAA et LPOx isolés. En effet, les micelles restent stables lorsque le pH devient basique ou lorsque la température est supérieure à  $T_{PT}$ . De plus, la température de point de trouble semble plus élevée pour les micelles mixtes que pour les micelles de LPOx. La stabilisation des micelles dans ces conditions prouve la mixité des objets. La désorganisation n'a lieu que lorsque les deux conditions défavorables sont présentes, c'est-à-dire à pH basique et  $T > T_{PT}$ .

La réticulation par voie photochimique des doubles liaisons a pu être réalisée par réaction thiol-ène et a permis de stabiliser efficacement le cœur des micelles. En effet, les micelles réticulées de LPAA gonflent à pH basique du fait de l'hydrophilie importante de la couronne à ce pH mais restent stables. En revanche, la réticulation du cœur des micelles de LPOx n'a pas été possible en raison de son caractère thermo-sensible qui s'est manifesté suite à l'échauffement de la solution lors de son irradiation. Toutefois, la réticulation ne devrait pas poser de souci avec une lampe de type LED n'émettant pas de rayonnement IR. Malgré cela,

les micelles mixtes ont pu être photoréticulées, les rendant stables à pH acide quelle que soit la température du milieu. Un gonflement des micelles mixtes réticulées a été observé à pH basique et attribué à une élongation des chaînes de PAA dans l'eau. Ainsi, grâce à la réticulation du cœur des micelles, nous avons pu répondre à l'inconvénient majeur des micelles, c'est-à-dire la stabilité.

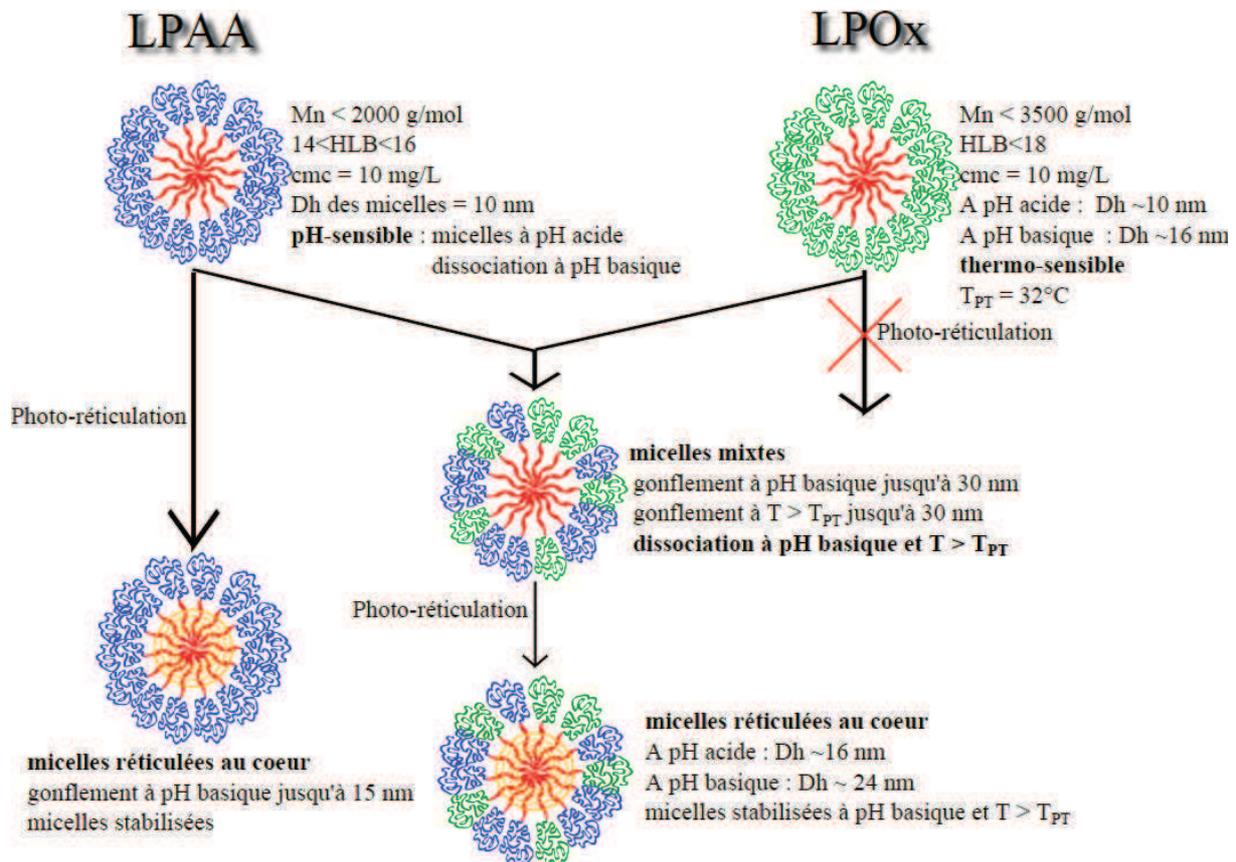


Schéma 1 : Résumé des différents systèmes micellaires synthésés et leurs caractéristiques

L'efficacité des systèmes en terme de capacité d'encapsulation a ensuite été évaluée. Trois principes actifs ont été testés : la progestérone, la benzophénone et la vitamine K1. Il apparaît que tous les systèmes micellaires améliorent la solubilité dans l'eau des trois principes actifs. Bien que la progestérone soit faiblement encapsulée, de bonnes capacités d'encapsulation sont obtenues avec la benzophénone et la vitamine K1.

Nous avons pu mettre en évidence le rôle important de la couronne à la fois comme acteur dans la solubilisation de certains composés hydrophobes mais aussi comme frein à la migration des principes actifs vers le cœur. Nous avons également mis en évidence l'importance de l'affinité cœur/principe actif.

Enfin, la libération des principes actifs s'est révélée être très rapide lorsque les systèmes ne sont pas réticulés et quand le principe actif est solubilisé majoritairement dans la couronne de la micelle. Les premières investigations dans ce domaine ont révélé une bonne stabilité de la vitamine K1 dans les micelles de LPAA à pH acide. Toutefois nous n'avons pas pu pousser nos investigations plus loin faute de temps.

Ainsi, nous avons obtenu des systèmes micellaires issus de l'huile de lin comportant une chaîne grasse (in)saturée qui présentent des propriétés similaires aux systèmes PEG-PE contenant deux chaînes grasses. En effet, les cmc obtenus sont équivalentes de l'ordre du  $\mu\text{mol/L}$ , la taille des objets en solution est proche et les capacités d'encapsulation sont également similaires.

Plusieurs perspectives sont envisageables pour ce travail. Dans un premier temps, il est indispensable de compléter l'étude sur la libération des principes actifs afin de déterminer l'influence des paramètres pH et température sur la vitesse de libération et de pouvoir conclure sur l'intérêt de ces systèmes. En effet, la réticulation du cœur des micelles de LPAA devraient permettre une libération beaucoup plus lente du principe actif. D'autre part, les micelles mixtes sont également très prometteurs quant au contrôle du relargage qu'elles soient réticulées ou non. En effet, il semble que les micelles mixtes non réticulées soient capables de libérer lentement un colorant à pH basique et  $T < T_{PT}$ . On peut alors imaginer qu'une fois réticulées, la libération ait lieu à pH basique et  $T < T_{PT}$  mais qu'elle s'arrête si la température augmente à cause du repliement des chaînes POx sur le cœur.

Dans un second temps, il serait également intéressant d'utiliser les fonctions terminales des chaînes de polymères afin de fixer des molécules cibles, comme des sucres, des anticorps ou des agents d'imagerie médicale. Des premiers essais ont été réalisés avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) sans, pour le moment, donner des résultats probants. Cette piste mérite d'être développée.

Enfin, la photoréticulation du cœur des micelles ouvre des perspectives séduisantes. En effet, il serait alors possible de fixer de façon covalente une « pro-drogue » dans le cœur des micelles lors de cette étape. Ceci assurera la stabilité du principe actif qui pourrait également jouer le rôle d'agent réticulant, ce qui aura pour avantage supplémentaire de s'affranchir de l'utilisation d'un agent réticulant potentiellement toxique. Le principe actif

serait alors libéré lors d'un évènement précis (exposition aux UV, augmentation de la température).

## **Partie expérimentale**

**Annexe II – 1 : Caractérisation de l'huile de lin.**

**Annexe II – 2 : Caractérisation de l'alcool gras et du lipoamorceur.**

**Annexe II – 3 : Méthode de Wijs.**

**Annexe II – 4 : Optimisation des conditions d'ATRP du tBA.**

**Annexe II – 5 : Optimisation de la CROP du IPOx.**

**Annexe III – 1 : Influence de la méthode de préparation sur la taille des objets en solution.**

**Annexe IV – 1 : Suivi IR de l'irradiation de l'huile de lin seule.**

**Annexe V – 1 : Etalonnage des différents principes actifs en vue de la quantification de la capacité d'encapsulation des différents systèmes micellaires.**

**Annexe V – 2 : Etalonnage des différents principes actifs en vue du suivi de libération**

## I. Produits Utilisés

### A. Solvants

Les solvants organiques sont distillés sur sodium/benzophénone pour le tétrahydrofurane (THF) et l'éther diéthylique (Et<sub>2</sub>O) et sur hydrure de calcium pour le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) et l'acétonitrile (CH<sub>3</sub>CN), selon des méthodes décrites dans la littérature <sup>[1]</sup>.

Le cyclohexane (VWR, 99%), l'isopropanol (VWR, 99,5%), le toluène (VWR, 100%), l'anisole (Acros, 99%), le méthanol (VWR, 99,8%), la pyridine (Acros, 99%), la triéthylamine (VWR, 99,5%) et les solvants deutérés CDCl<sub>3</sub> (Merck, 99,8%), DMSO-d<sub>6</sub> (Merck, 99,8%), MeOD (VWR, 99,8%) et D<sub>2</sub>O (VWR, 99,96%) utilisés en RMN sont des produits commerciaux utilisés sans purification préalable.

### B. Réactifs pour la synthèse du lipoamorceur 1

L'huile de lin, gracieusement fournie par Novance (Compiègne, France), est utilisée sans purification préalable. L'aluminohydrure de lithium (LiAlH<sub>4</sub>) est fourni par Sigma-Aldrich et le 2-bromo-2-méthylpropionyl bromide par Alfa-Aesar.

### C. Réactifs pour la synthèse du lipoamorceur 2

L'huile de lin est utilisée telle quelle sans purification préalable. Le LiAlH<sub>4</sub> et le chlorure de mésyle (98%) sont fournis par sigma-Aldrich.

### D. Réactifs pour l'ATRP

#### 1. Monomères et ligands d'ATRP

L'acrylate de *tert*-butyle (*t*BA, Acros, 99%, T<sub>eb,7 mbar</sub> = 36 °C) a été distillé en présence de 2,5-di-*tert*-butylhydroquinone (Aldrich). La *N,N,N',N',N''*-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA, Acros, 99%) est un produit commercial utilisé sans purification préalable.

[1] Perrin DD & Armarego WLF. Purification of Laboratory Chemicals. BERLIN, 1988.

Le N-isopropylacrylamide (NIPAM, Sigma-Aldrich, 97%) est purifié par recristallisation dans l'hexane. Le tris[2-(diméthylamino)éthyl]amine (Me<sub>6</sub>TREN) est un produit commercial utilisé sans purification préalable.

### **2. Catalyseurs d'ATRP**

Les sels de cuivre CuBr (99,99%), CuBr<sub>2</sub> (99%), CuCl (99%) et CuCl<sub>2</sub> (99%) sont commerciaux et utilisés sans purification préalable.

Le CuBr (99,99%) est fourni par Aldrich et le CuBr<sub>2</sub> (99%) par Alfa Aesar.

### **E. Les réactifs pour la CROP**

Le méthyl p-toluène sulfonate (98%, Sigma-Aldrich) et le triéthylamine (TEA) (99%, VWR) sont des produits commerciaux utilisés tels quels.

### **F. Autres réactifs**

Les produits suivants sont commerciaux et ont été utilisés sans purification préalable : l'acide trifluoroacétique (Acros, 99%), l'aluminohydru de lithium (Aldrich, 95 %), le bromure de 2-bromo-2-méthylpropionyle (Acros, 98%), le carbonate de potassium, le chlorure de sodium, l'acide acétique anhydre, l'acétate de sodium, l'hydrogénocarbonate de sodium, le carbonate de sodium, la benzophénone, le tween 80, l'éthylène glycol dithioacétate, le rouge de soudan, le pentaérytritol tétrakis, l'hydrogénophosphate de sodium, le dihydrogénophosphate de sodium, le sulfate de sodium, l'anisole.

## **II. Méthodes d'analyse :**

### **A. Chromatographie sur colonne**

Les purifications sur colonne ont été effectuées sur gel de silice et suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque Merck prête à l'emploi. La révélation a été effectuée à l'aide d'une lampe UV.

## B. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton  $^1\text{H}$  (300 MHz) et du carbone  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) ont été enregistrés sur des appareils Bruker. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont indiqués en partie par million (ppm) par rapport aux solvants deutérés. Les multiplicités sont désignées par singulet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q) et multiplet (m).

## C. Spectroscopie infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés en mode ATR (Attenuated Total Reflection) dans la région  $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  avec un spectromètre Perkin Elmer Spectrum 2000 FTIR équipé d'un cristal.

L'absorbance est reportée en fonction du nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ ).

## D. Spectroscopie IR résolue dans le temps

Les suivis cinétiques ont été enregistrés avec un spectromètre VERTEX 70 Brüker dans la région  $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  piloté par le logiciel OPUS 6.5.

Le mélange est préalablement préparé dans un pilulier. Une goutte est prélevée et déposée sur le cristal. Deux films de polyéthylène et un filtre en quartz sont disposés au-dessus afin de former une fine couche homogène du mélange. L'irradiation est effectuée au moyen d'une lampe Hg-Xe (Hamamatsu, LC-L8) (rayonnement polychromatique). L'intensité donnée est mesurée à l'aide d'un radiomètre (Vilber VLX-3W) à 365 nm. La méthode d'intégration est définie selon les paramètres suivants :

- les pics correspondant aux doubles liaisons et au thiol sont intégrés en fonction de leur aire ( $\nu_{\text{C}=\text{C}} = 3007\text{ cm}^{-1}$  et  $\nu_{\text{SH}} = 2567\text{ cm}^{-1}$ )
- le pic correspondant à la référence est intégré en fonction de sa hauteur ( $\nu_{\text{ref}} = 1452\text{ cm}^{-1}$ )

La conversion des insaturations est déterminée par la formule suivante :

$$\chi = \frac{\left(\frac{A_{3007}}{A_{ref}}\right)_{t_0} - \left(\frac{A_{3007}}{A_{ref}}\right)_t}{\left(\frac{A_{3007}}{A_{ref}}\right)_{t_0}} \times 100$$

### E. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Les masses molaires expérimentales et la polymolécularité sont déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) Varian PL-GPC50 équipé d'une colonne PLgel 5  $\mu\text{m}$  MIXED-C (60 $\times$ 1,1 cm), d'une pré-colonne PLgel 5 $\mu\text{m}$  (5  $\times$  2,5 cm), d'une pompe SpectraSeries P100, d'un réfractomètre Shimadzu RID-10A et d'un dégazeur DEGAZIS DG 1310. La phase mobile utilisée est le dichlorométhane (99,8%, Acros) préalablement filtré. L'étalonnage a été établi à partir de standards poly(méthacrylate de méthyle). Avant d'être injectés, les échantillons sont filtrés sur des pré-filtres de taille de pores de 450 nm. Le débit du solvant est de 1 mL/min.

### F. Spectroscopie de fluorescence

Les mesures de spectroscopie de fluorescence ont été réalisées sur un appareil Cary Eclipse Varian.

Une solution mère de pyrène à  $10^{-3}$  mol.L $^{-1}$  est tout d'abord préparée dans l'acétone. Une quantité précise de cette solution est ensuite introduite dans une fiole jaugée afin que la concentration finale en pyrène soit  $4 \cdot 10^{-7}$  mol.L $^{-1}$ . L'acétone est ensuite évaporée puis une solution aqueuse à pH précis et avec  $[\text{NaCl}] = 0,1$  mol.L $^{-1}$  est ajoutée.

Des solutions aqueuses de concentration variable en copolymère ( $C = 10^{-4}$  à 1g.L $^{-1}$ ) sont préparées avec la solution de pyrène préalablement préparée dans des fioles jaugées.

Pour les mesures en émission,  $\lambda_{\text{exc}} = 333 \text{ nm}$  et les spectres d'émission sont enregistrés entre 360 et 460 nm. Pour les mesures en excitation,  $\lambda_{\text{em}} = 374 \text{ nm}$  et les spectres d'excitation sont enregistrés entre 300 et 360 nm.

### **G. Quasi elastic light scattering (QELS)**

Les analyses de QELS sont effectuées sur un Malvern Zetasizer.

Une gamme de concentration de copolymère (de 0 à 1 g/L) est préparée dans une solution tampon à pH connu et à 0,1 mol/L de NaCl. Les solutions à analyser sont préalablement filtrées sur un filtre de porosité de 0,45  $\mu\text{m}$ . 8 acquisitions sont enregistrées pour chaque analyse.

### **H. Tension de surface**

Les mesures de tension de surface ont été réalisées sur un tensiomètre Krüss K12 en utilisant la méthode du plateau de Wilhelmy. Les paramètres d'analyse sont les suivants :

- Detection speed = 6 mm/min
- Detection sensitivity = 0,01 g
- Immersion depth = 2 mm
- Values = 10
- Acquisitions : linear
- Times = 1000 s

Les conditions de fin sont que, sur une moyenne de 5 valeurs, la déviation standard doit être de 0 mN/m.

Une gamme de concentration de copolymère (de 0 à 1g/L) est préparée dans une solution tampon à pH connu contenant 0,1 mol/L de NaCl. Après 2h d'agitation, les mesures de tension de surface sont réalisées.

## **I. ESI-MS**

Les analyses par spectrométrie de masses ont été réalisées par le Dr. C. Loutellier-Bourhis à l'IRCOF, Université de Rouen, sur un spectromètre de masse constitué d'un piège ionique quadripolaire couplée à une source ESI (Esquire-LC, Bruker Daltonics). Des solutions de lipoamorceur à 10 ng/ $\mu$ L dans un mélange LiI aqueux (1 mmol/L) / acétonitrile (50/50) ont été préparées.

## **J. Spectrophotomètre Ultra-violet**

Le spectrophotomètre UV est un Cary 100 VARIAN piloté par le logiciel Cary WinUV

## **K. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)**

L'HPLC est équipé d'une colonne Phenomenex luna 5 $\mu$ m C18 100A de taille 150 $\times$ 4,6mm. La température de la colonne est fixée à 25 °C et le débit à 1 ml/min. La phase mobile est un mélange constitué de 50% d'eau et de 50% d'acétonitrile. Le temps d'analyse est de 15 min. L'appareil est équipé d'un détecteur UV fixé à la longueur d'onde de 254 nm pour les besoins de l'analyse.

## **L. photoDSC**

L'appareil que nous avons utilisé est un appareil Perkin Elmer DSC7.

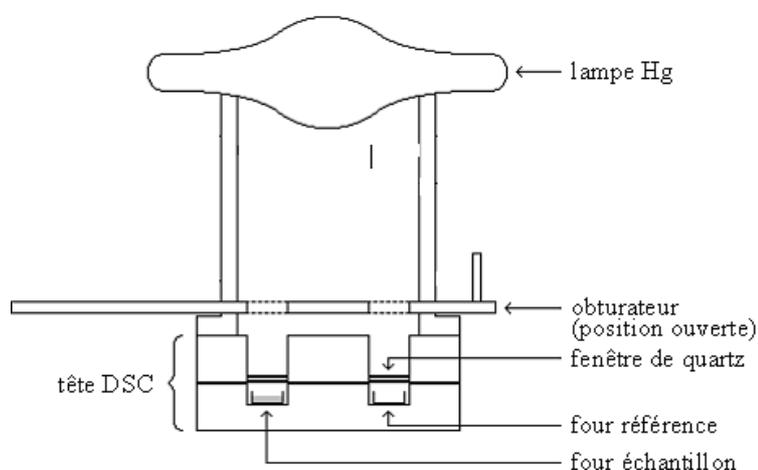
Un signal proportionnel à la différence de chaleur fournie à l'échantillon et à la référence,  $dH/dt$ , est enregistré.

Le refroidissement du bloc est assuré par de l'eau permettant de travailler à partir de 30°C. L'étalonnage en température et en énergie (seulement par l'indium) a été effectué avec deux standards :

Indium :  $T_f = 156,6^\circ\text{C}$ Zinc :  $T_f = 419,5^\circ\text{C}$ 

$$\Delta H_f = 28,45 \text{ J/g}$$

Pour utiliser l'appareil comme photoDSC, le bloc de couverture standard a été remplacé par un couvercle avec deux fenêtres de quartz de manière à ce que le rayonnement UV puisse pénétrer dans les 2 fours de la tête de mesure. Les fenêtres en quartz permettent de ne pas modifier la circulation du gaz inerte.



**Figure 1:** Extension optique du calorimètre DSC 7 Perkin Elmer.

Le radiomètre employé pour mesurer l'intensité de la lampe UV, en  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ , est un VLX-3W de Vilber équipé de sondes centrées sur 365 nm et positionnées à hauteur de l'échantillon.

## M. cryoTEM

Les analyses par cryoTEM ont été réalisées à l'IMPMC à l'université Pierre et Marie Curie avec l'aide de Jean-Michel Guigner sur une cryoTEM JEOL 2100 équipé d'un canon à émission thermo-ionique LaB6.

### III. Protocoles expérimentaux

#### A. Synthèse des lipoamorceurs

##### 1. Alcool gras 1

Une solution d'huile de lin (2 g) dans 45 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte à un mélange de  $\text{LiAlH}_4$  (1,4 g) dans 45 mL de THF anhydre sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est agité pendant une nuit à température ambiante. Après hydrolyse du  $\text{LiAlH}_4$  restant par addition goutte à goutte de 20 mL d'eau, le milieu réactionnel est filtré et le THF évaporé. La phase organique est solubilisée dans du dichlorométhane et lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et le solvant est évaporé pour obtenir l'alcool gras final. Le produit obtenu est jaune clair. Le rendement de la réaction est de 89%.

RMN  $^1\text{H}$  :  $\delta$  (ppm) 5,3 (m, 4H,  $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 3,6 (t,  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 2,75 (m,  $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{-HC}=\text{CH}-$ ), 2,0 (m,  $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1,5 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ ), 1,25 (m,  $\text{CH}_2$  aliphatique), 0,9 (t,  $\text{CH}_3$  acide linoléique), 0,8 (m,  $\text{CH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) = 131,9-127,1 ( $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 63,0 ( $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 32,7-20,5 ( $\text{CH}_2$  aliphatique), 14,2 ( $\text{CH}_3$  chaîne alkyle).

MS  $[\text{M-Li}^+]$  :  $m/z=271$  (linoléique), 273 (linoléique), 275 (oléique), 277 (stéarique).

IR :  $\nu_{\text{O-H}} = 3329 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C=C}} = 3010$  et  $1652 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 2924$  et  $2853 \text{ cm}^{-1}$

##### 2. Lipoamorceur 1

L'alcool gras 1 (1,2 g) est mélangé avec de la triéthylamine (1,9 mL, 3 eq) dans du dichlorométhane anhydre (30 mL) sous atmosphère inerte. Le mélange est refroidi dans un bain de glace et le bromure de 2-bromo-2-méthylpropionyle (1,1 mL, 2 eq) est ajouté goutte à goutte sous agitation. Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures. Il est ensuite successivement lavé par une solution d'HCl (0,1 M, 15 mL), une solution d'hydrogénocarbonate (0,1M, 15mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (15 mL). La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et filtrée. Après avoir évaporé le solvant, le produit

est purifié sur colonne de silice (silicagel pour chromatographie, 0,06-0,2 mm, 60 Å) en utilisant un mélange diéthyléther/cyclohexane (10/90, v/v) comme éluant ( $R_f = 0,59$ ). Le produit final obtenu est un liquide incolore. Le rendement final (après purification) est de 65%.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 5,3 (m, 2H,  $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 4,1 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{OCO}$ ), 2,75 (m,  $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 2,0 (m,  $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1,85 (s,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$ ), 1,6 (m,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 1,25 (m,  $\text{CH}_2$  aliphatique), 0,9 (t,  $\text{CH}_3$  acide linoléique), 0,8 (m,  $\text{CH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) = 171,7 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 131,9-127,0 ( $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 66,1 ( $-\text{CH}_2-\text{OCO}$ ), 55,9 ( $\text{C}-\text{Br}$ ), 31,8-22,6 ( $\text{CH}_2$  aliphatique), 30,7 ( $\text{Br}(\text{CH}_3)_2\text{C}-$ ), 14,1 ( $\text{CH}_3$  chaîne alkyle).

MS  $[\text{M}-\text{Li}^+]$  :  $m/z=421$  (linoléique), 423 (linoléique), 425 (oléique), 427 (stéarique)

IR :  $\nu_{\text{C}=\text{C}} = 3010$  et  $1652 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 2924$  et  $2853 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$  ( $\text{C}=\text{O}$  de la fonction ester) =  $1735 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}-\text{Br}) = 646 \text{ cm}^{-1}$ .

### 3. Lipoamorceur 2

L'alcool gras 1 (1 g, 1 eq) est introduit dans un bicol muni d'un réfrigérant et d'une agitation mécanique. Le diéthyl éther anhydre (10,8 mL, 100 eq) est ajouté sous atmosphère inerte. La triéthylamine (0,146 mL, 1 eq) puis le chlorure de mésyle (0,084 mL, 1,05 eq) sont introduits goutte à goutte dans le bicol. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à température ambiante et est ensuite lavé avec  $4 \times 5\text{mL}$  d'eau distillée. Le produit obtenu est séché sur  $\text{MgSO}_4$  et concentré. Le rendement de la réaction est de 77,4%.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 5,3 (m, 2H,  $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 4,2 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{OS}$ ), 3,00 (s,  $\text{S}-\text{CH}_3$ ), 2,81 (m,  $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 2,0 (m,  $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1,74 (m,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OS}$ ), 1,29 (m,  $\text{CH}_2$  aliphatique), 0,9 (t,  $\text{CH}_3$  acide linoléique), 0,8 (m,  $\text{CH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) = 132-127,0 ( $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 70 ( $-\text{CH}_2-\text{OS}$ ), 37,3 ( $\text{CH}_3-\text{OS}$ ), 32-20,5 ( $\text{CH}_2$  aliphatique), 14,1 ( $\text{CH}_3$  chaîne alkyle).

MS [ $M-Li^+$ ] :  $m/z = 342$  (linoléique),  $344$  (linoléique),  $346$  (oléique)

IR :  $\nu_{C=C} = 3010$ ,  $\nu_{CH_2,CH_3} = 2924$  et  $2853$   $cm^{-1}$ ,  $\nu(S=O) = 1353$   $cm^{-1}$ ,  $\nu(S=O)=1174$   $cm^{-1}$ .

## B. Synthèse du copolymère amphiphile Lipide-*b*-poly(acide acrylique)

### 1. Synthèse du Lipide-*b*-poly(acrylate de *tert*-butyle) par ATRP

Le bromure de cuivre (I) (52,5mg, 0,5 eq) et le bromure de cuivre (II) (4,1 mg, 0,025 eq) sont introduits dans un schlenk scellé ensuite par un septum. Le schlenk est alors soumis à trois cycles vide/argon afin de retirer l'oxygène. Dans un deuxième schlenk, le toluène (15,9 mL), le lipoamorceur 1 (0,3 g, 1eq), l'anisole (1,1 mL, référence interne), et le *t*BA (5,31 mL, 50 eq) sont introduits.

Les conditions sont les suivantes :

- [*t*BA]:[lipoamorceur1]:[Cu(I)Br]:[Cu(II)Br<sub>2</sub>]:[PMDETA] = 50 : 1 : 0,5 : 0,025 : 0,525
- toluène : 75% v/v, anisole 5% v/v
- T=60°C

Le milieu réactionnel est dégazé par 3 cycles congélation/décongélation et transféré dans le schlenk contenant le catalyseur métallique via une canule. Le schlenk est placé dans un bain d'huile à 60°C. A  $t = 0$ , le ligand est ajouté. Des échantillons sont prélevés périodiquement grâce une seringue dégazée afin de suivre la cinétique de polymérisation. Les prélèvements sont solubilisés dans du THF puis filtrés à travers une colonne d'alumine afin de retirer les traces de catalyseur avant de les analyser en SEC. Le polymère final est isolé par filtration à travers une colonne d'alumine. Le solvant est ensuite évaporé.

- Suivi cinétique :

Pour mesurer la conversion, des spectres RMN <sup>1</sup>H ont été réalisés dans du CDCl<sub>3</sub> (99,8% D, Acros), sur un spectromètre Bruker 300 MHz et analysés par le logiciel WinNMR.

Pour cela, l'anisole est utilisé comme étalon interne. Un pic correspondant apparaît à 3,8ppm et représente 3 protons. Les 3 protons de l'acrylate apparaissent entre 5,7 et 7,4 ppm. Ainsi pour établir le degré de conversion à chaque instant, nous avons la formule suivante :

$$conv = \frac{r_{ti}}{r_{t0}}$$

Avec

$$r_{ti} = \frac{\frac{(I_{CH_2=CH})_i}{3}}{\frac{(I_{anisole})_i}{3}}$$

Et

$$r_{t0} = \frac{\frac{(I_{CH_2=CH})_0}{3}}{\frac{(I_{anisole})_0}{3}}$$

Les analyses SEC permettent d'obtenir la masse molaire moyenne en nombre et la polymolécularité.

## 2. Lipide-*b*-poly(acide acrylique)

L'acide trifluoroacétique (TFA) (1,2 mL, 2 eq selon le nombre d'unités *t*BA) est ajouté à une solution de copolymère (1 g) dans du dichlorométhane (20 mL). Le mélange est agité à température ambiante jusqu'à précipitation du copolymère déprotégé. Le copolymère obtenu est isolé par simple filtration et lavé avec du dichlorométhane avant d'être séché.

RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 300 MHz): δ (ppm) = 5,42 (m, 2H, -HC=CH-), 4,0 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-OCO), 3,55 (m, -COOH), 2, (m, -HC=CH-CH<sub>2</sub>-HC=CH-), 2,1 (m, -HC=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1,6 (m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>OCO), 1,33 (m, CH<sub>2</sub> aliphatique), 0,99 (t, CH<sub>3</sub> acide linoléique), 0,95 (m, CH<sub>3</sub>).

IR: ν(-OH de la fonction acide carboxylique) = bande large à 3100 cm<sup>-1</sup>, ν<sub>C=C</sub> = 3002cm<sup>-1</sup>, ν<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>3</sub></sub>=2924 et 2853 cm<sup>-1</sup>, ν (C=O) = 1723 cm<sup>-1</sup>, ν (-OH) = 1366 cm<sup>-1</sup>.

### 3. Dosage conductimétrique du lipide-*b*-PAA

#### a. Détermination du pKa du copolymère lipide-*b*-PAA

Le pKa du copolymère est déterminé par un dosage conductimétrique et pH-métrie.

A 25 mL d'une solution du copolymère à 1g/L, 1mL d'une solution de HCl à 0,1 mol/L est ajoutée. Le mélange est ensuite dosé par ajout d'une solution aqueuse de soude à 0,1 mol/L. Le pH et la conductivité sont mesurés après chaque ajout.

#### b. Détermination du nombre de motifs introduits dans la chaîne

Le dosage par conductimétrie nous permet de déterminer le nombre  $n$  de motifs présents dans la chaîne de polymère.

Effectivement, cela nous permet de connaître précisément la concentration en poly (acide acrylique).

D'après les relations suivantes :

$$(1) M_{copo} = M_{AMORCEUR} + DP_n \times M_{AA}$$

$$(2) DP_n = \frac{n_{acide}}{m_{ech}} \times M_{copo}$$

Nous pouvons en déduire DPn

$$(3) DP_n = \frac{n_{acide}}{m_{ech}} \times (M_{AMORCEUR} + DP_n \times M_{AA})$$

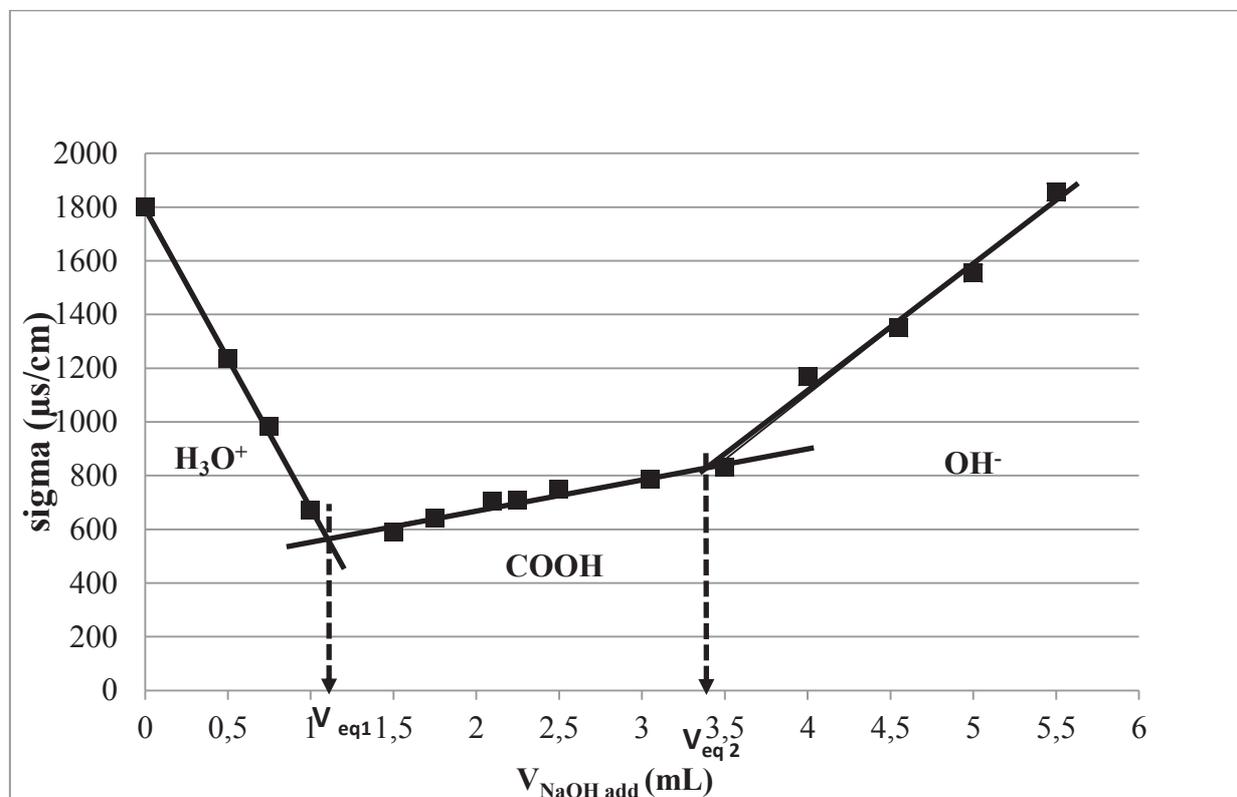
$$(4) DP_n = \frac{n_{acide} \times M_{AMORCEUR}}{m_{ech} - n_{acide} \times M_{AA}}$$

Or en lisant le graphe ci-dessus,

$$n_{acide} = (V_{eq2} - V_{eq1}) \times [NaOH]$$

$V_{eq1}$  correspondant au volume au premier changement de pente (fin du dosage des ions  $H^+$ ).

$V_{eq2}$  correspondant au deuxième changement de pente (fin du dosage des  $COOH$ ).



Pour le copolymère 3a, nous obtenons  $n_{acide}=19$  pour  $n_{acide,theo}=17$ .

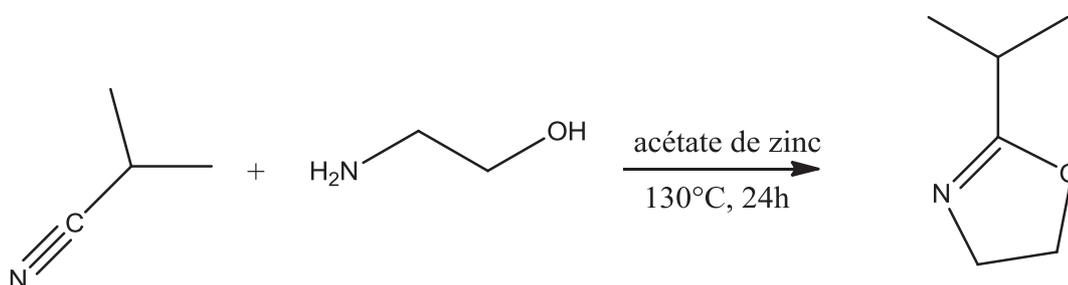
### C. Réticulation des micelles

Dans une fiole jaugée de 20 mL, une solution du copolymère pH-sensible à 1 g/L est préparée à  $pH = 4,5$ . 10 mL de cette solution sont introduits dans un pilulier de 25 mL. Une solution d'éthylèneglycol dithioacétate dans du chloroforme à la concentration de 3,5 g/L est ajoutée sous agitation (1 eq par rapport à la quantité de doubles liaisons en mol). La solution est agitée jusqu'à évaporation totale du solvant organique. Le milieu est alors soumis pendant 30 min à un rayonnement UV provenant d'une lampe polychromatique (Hamamatsu LC-L8) délivrant un rayonnement d'intensité  $I_0 = 170\ mW/cm^2$  à 365 nm.

## D. Synthèse du copolymère amphiphile lipide-*b*-poly(2-isopropyle-2-oxazoline)

### 1. Synthèse du monomère : 2-isopropyle-2-oxazoline

La 2-isopropyle-2-oxazoline est synthétisée par réaction entre l'éthanolamine (3 mol) et l'isobutyronitrile (5 mol) avec de l'acétate de zinc comme catalyseur. Le milieu réactionnel est mis à reflux à 130°C sous atmosphère inerte pendant 24h. Le milieu réactionnel est ensuite distillé à 50°C sous pression réduite afin d'isoler le monomère pur <sup>1</sup>.



RMN <sup>1</sup>H :  $\delta$  (ppm) = 4,21 (2H, t, -O-CH<sub>2</sub>), 3,81 (2H, t, -CH<sub>2</sub>-N-), 2,56 (1H, m, CH), 1,2 (3H, d, CH<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C :  $\delta$  (ppm) = 172,6 (C quaternaire, C), 67,2 (C secondaire, -O-CH<sub>2</sub>), 54,3 (C secondaire, -CH<sub>2</sub>-N-), 28,06 (C tertiaire, CH), 19,66 (C primaire, CH<sub>3</sub>).

### 2. lipide-*b*-Poly(2-isopropyle-2-oxazoline)

Le lipoamorceur (0,076 g, 1 eq), la 2-isopropyl-2-oxazoline (0,5 mL, 20 eq) et l'acétonitrile distillé (2 mL) sont introduits dans un vial pour micro-onde. Avant de sceller le réacteur, un balayage à l'azote est effectué. Le réacteur est alors soumis à une irradiation microonde (200 w, 130 psi, 135°C, ramp time 20 min) pendant 15 min.

Pour stopper la réaction, de l'eau (4,7  $\mu$ L, 1,2 eq) et de la TEA (96  $\mu$ L, 2 eq) sont ajoutés dans le réacteur et la solution est agitée à 70 °C pendant 1 nuit.

Le milieu est ensuite transféré dans une membrane de dialyse (cut off = 500 Da) et dialysé contre de l'eau distillée pendant 3 à 4 jours en changeant l'eau 2 fois par jour. Le copolymère est isolé par lyophilisation.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5,42 (m, 2H,  $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), [3,8-3,2] (m, 4H,  $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), [3 - 2,4] (m,  $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ), 1,9, (m,  $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 1,33 (m,  $\text{CH}_2$  aliphatique), 1,15 (s,  $\text{CH}_3$  groupement isopropyle), 0,99 (t,  $\text{CH}_3$  acide linoléique), 0,95 (m,  $\text{CH}_3$ ).

IR :  $\nu_{\text{C}=\text{C}} = 3010$ ,  $\nu_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 2924$  et  $2853 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{O}$  de la fonction amide) =  $1636\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}-\text{N}$  de la fonction amide) =  $1216\text{cm}^{-1}$

### 3. LCST (Lower Critical Solution Temperature):

La température de point de trouble est déterminée par suivi de la transmittance dans le visible en fonction de la température.

Une solution de 4g/L du copolymère est préparée dans une solution aqueuse à  $\text{pH} = 4$  et  $[\text{NaCl}] = 0,1 \text{ mol/L}$ . La solution est ensuite introduite dans une cuve UV thermostatée. La transmittance est enregistrée lors de la montée en température.

La LCST est déterminée lorsque la transmittance subit une chute de 10%.

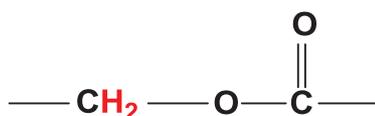
## Annexe II – 1 : Caractérisation de l'huile de lin

La proportion de chaque chaîne qui compose l'huile de lin peut être obtenue par analyse en RMN. Pour cela, les intégrations des différents groupements de l'huile de lin sont nécessaires (**tableau annexe II – 1**).

Tableau annexe II - 1 : Déplacements RMN des différents groupements de l'huile de lin

Groupements	Déplacements, $\delta$ (ppm)
CH <sub>3</sub> autres acides	0,87
CH <sub>3</sub> acide linoléique	0,97
$\begin{array}{c}   \qquad \qquad   \\ \text{--- C --- CH}_2 \text{--- C ---} \\   \qquad \qquad   \end{array}$	1,3
-CH <sub>2</sub> - en $\beta$ de -COO-	1,6
-CH <sub>2</sub> en $\alpha$ de -CH=CH-	2,05
-CH <sub>2</sub> en $\alpha$ de -COOH	2,3
CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH	2,8
$\begin{array}{c} \qquad \qquad \qquad \text{O} \\ \qquad \qquad \qquad    \\ \text{--- CH}_2 \text{--- O --- C ---} \end{array}$	4,2
-CH=CH- et $\begin{array}{c} \qquad \qquad \qquad \text{O} \\ \qquad \qquad \qquad    \\ \diagdown \text{ CH --- O --- C ---} \\ \diagup \end{array}$	5,34

Nous avons choisi de donner une valeur d'intégration égale à 4 au massif correspondant aux deux protons du groupement suivant et sortant à 4,2 ppm :



Pour chaque molécule d'huile de lin, il existe deux de ces groupements CH<sub>2</sub>, d'où quatre protons.

Nous pouvons déduire, d'après les intégrations des pics les informations suivantes :

- Nombre de molécule d'acide linoléique (L) par molécule d'huile de lin =

$$L = \frac{\text{Intégration}_{CH_3} \text{ d'acide linoléique} / 3}{\text{Intégration}_{totale} \text{ des } CH_3 / 9}$$

Nous allons à présent déterminer le nombre de molécules d'acide linoléique par molécule d'huile de lin. Pour cela, nous allons évaluer le nombre de groupements contenant des protons B (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-). Les H<sub>B</sub> sont présents entre deux insaturations, donc dans les acides linoléique et linolénique. Notons que l'acide linoléique comportant trois doubles liaisons, possède deux de ces CH<sub>2</sub>; l'acide linoléique quant à lui, comporte deux doubles liaisons et un seul de ces CH<sub>2</sub>. Nous pouvons donc en déduire le nombre de tels groupements par molécule en calculant le rapport de l'intégration d'un des protons B sur l'intégration d'un proton (quelconque) :

- ◆ Nombre de groupements (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) par molécule d'huile de lin =

$$CH_{2T} = \frac{\text{Intégration}_{d'un \ proton \ H_B} / 2}{\text{Intégration}_{d'un \ proton \ H}}$$

- ◆ Nombre de groupements (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) d'acide linoléique par molécule d'huile de lin =

$$CH_{2L} = 2 \times \text{Nombre de molécules d'acide linoléique}$$

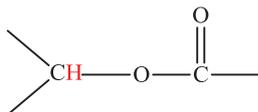
Nous pouvons donc à présent déterminer le nombre de groupements de protons B provenant de l'acide linoléique en retranchant à ce résultat le nombre de groupements provenant de protons B de l'acide linoléique :

- Nombre de molécule d'acide linoléique (l) par molécule d'huile de lin =

$$l = CH_{2T} - CH_{2L}$$

Nous allons maintenant déterminer le nombre total d'insaturations par molécule d'huile de lin pour en déduire le nombre de molécules d'acide oléique comportant une double liaison.

Pour calculer le nombre d'insaturations, on doit se référer à l'intégration des protons à 5,34 ppm. Pour ne prendre uniquement en compte que l'intégration correspondant au groupement (-CH=CH-), on doit retrancher à l'intégration totale, l'intégration d'un proton (= 0,25) présent dans le groupement :



D'où :

- ◆ Nombre d'insaturations par molécule d'huile de lin =

$$I = \frac{\text{Intégration des protons } (-CH = CH-)/2}{\text{Intégration d'un proton } H}$$

- ◆ Nombre d'insaturations provenant de l'acide linoléique par molécule d'huile de lin = nombre de molécule d'acide linoléique L multiplié par 3

$$I_L = L \times 3$$

De même :

- ◆ Nombre d'insaturations provenant de l'acide oléique par molécule d'huile de lin

$$I_1 = 1 \times 2$$

Nous pouvons donc en déduire le nombre d'insaturations provenant de l'acide oléique par simple différence. De plus, sachant que l'acide oléique ne comprend qu'une double liaison, le nombre d'insaturations provenant de l'acide oléique par molécule d'huile de lin est équivalent au nombre de molécules d'acide oléique :

- ◆ Nombre de molécules d'acide oléique (o) par molécule d'huile de lin =

$$o = I - I_L - I_1$$

Après avoir déterminé le nombre de molécules d'acides insaturés par molécule d'huile de lin, nous pouvons déterminer le nombre de molécules d'acides saturés, sachant que chaque molécule d'huile de lin est composée de trois molécules d'acides (saturés ou non). On en déduit donc :

- ◆ Nombre de molécules d'acides saturés (s) par molécule d'huile de lin =

$$s = 3 - L - 1 - o$$

*Remarque* : Il nous est impossible de distinguer les différents acides gras saturés car presque tous les groupements CH<sub>2</sub> ont des déplacements chimiques similaires. Nous n'avons donc pas pu différencier l'acide palmitique en C16 de l'acide stéarique en C18.

Ces derniers résultats nous ont ensuite permis de déterminer la masse molaire moyenne de l'huile de lin ainsi que la masse totale d'acides gras par molécule d'huile de lin.

Pour le calcul de la masse molaire, nous devons faire la somme des produits du nombre de chaque acide gras par molécule par sa masse molaire, et également pour le glycérol dont une molécule est présente dans chaque molécule de triester. Il est à noter que pour chaque valeur de masse molaire, il est nécessaire de retrancher la masse des extrémités, c'est-à-dire, la masse molaire d'un proton H pour chaque chaîne, et la masse molaire de trois OH pour le glycérol. On obtient alors avec M = Masse molaire en g/mol :

$$M_{\text{huile de lin}} = L \times (M_{\text{acide linoléique}} - 17) + 1 \times (M_{\text{acide linoléique}} - 17) + O \times (M_{\text{acide oléique}} - 17) + S \times (M_{\text{acide saturé}} - 17) + 92 - 3$$

Pour le calcul de la masse totale d'acides gras par molécule d'ester, nous procédons de la même manière que pour la masse molaire, mis à part que nous ne prenons pas en compte le glycérol. De plus, ici, nous devons prendre les masses molaires des huiles, extrémités comprises. On obtient :

- ♦ Masse totale d'acide gras par molécule d'huile de lin =

$$M_{\text{acide gras}} = L \times M_{\text{acide linoléique}} + 1 \times M_{\text{acide linoléique}} + O \times M_{\text{acide oléique}} + S \times M_{\text{acide saturé}}$$

Ce dernier calcul va maintenant nous permettre de déterminer les pourcentages massiques de chaque acide par rapport à la masse totale d'acide par molécule d'huile de lin.

$$\%_{\text{acide linoléique}} = L \times \frac{M_{\text{acide linoléique}}}{M_{T \text{ acide gras}}} \times 100$$

$$\%_{\text{acide linoléique}} = l \times \frac{M_{\text{acide linoléique}}}{M_{T \text{ acide gras}}} \times 100$$

$$\%_{\text{acide oléique}} = o \times \frac{M_{\text{acide oléique}}}{M_{T \text{ acide gras}}} \times 100$$

$$\%_{\text{acide saturé}} = s \times \frac{M_{\text{acide saturé}}}{M_{T \text{ acide gras}}} \times 100$$

- ♦ **L'indice d'iode peut être également déduit via cette formule :**

$$\text{Indice d'iode} = 100 \times \frac{I \times M_{I_2}}{M_{\text{huile de lin}}}$$

## Annexe II – 2 : Caractérisation de l'alcool gras et du lipoamorceur 1

La proportion de chaque chaîne qui compose l'alcool gras et le lipoamorceur 1 peut être déterminée par une méthode similaire à celle développée en annexe I pour l'huile de lin en l'adaptant à la molécule étudiée. Pour cela, les intégrations des différents groupements de l'alcool et des lipoamorceurs sont nécessaires (**tableau annexe II – 1**).

Tableau annexe II - 2 : Déplacements RMN des différents groupements de l'alcool gras et du lipoamorceur 1

Groupements alcool gras	Déplacements, $\delta$ (ppm)
CH <sub>3</sub> autres alcools	0,87
CH <sub>3</sub> alcool linoléique	0,97
$\begin{array}{c}   \\ \text{---C---CH}_2\text{---C---} \\   \qquad \qquad   \end{array}$	1,3
-CH <sub>2</sub> en $\beta$ de -OH	1,5
CH <sub>2</sub> en $\alpha$ de -CH=CH-	2,05
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-	2,8
-CH <sub>2</sub> en $\alpha$ de -OH	3,6
-CH=CH-	5,34

Groupements lipoamorceur 1	Déplacements, $\delta$ (ppm)
CH <sub>3</sub> autres alcools	0,87
CH <sub>3</sub> alcool linoléique	0,97
$\begin{array}{c}   \\ \text{---C---CH}_2\text{---C---} \\   \qquad \qquad   \end{array}$	1,3
CH <sub>2</sub> en $\beta$ de l'ester	1,6
-CH <sub>2</sub> en $\alpha$ de -CH=CH-	2,05
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-	2,3
-CH <sub>2</sub> en $\alpha$ de l'ester	4,1
-CH=CH-	5,34

Pour chaque, l'intégration est fixée à 2 pour les protons du CH<sub>2</sub> en  $\alpha$  respectivement de la fonction alcool et de la fonction ester.

Pour l'alcool gras, on définit :

- $N_{\text{alcool gras}}$  = le nombre de molécule d'alcool gras

$$N_{\text{alcool gras}} = \frac{\text{Intégration } (CH_3 \text{ autres acides}) + \text{Intégration } (CH_3 \text{ acide linoléique})}{3}$$

- $L_{\text{alcool gras}}$  = nombre de molécule d'alcool linoléique

$$L_{\text{alcool gras}} = \frac{\text{Intégration } (CH_3 \text{ acide linoléique})}{3}$$

Nous allons à présent déterminer le nombre de molécules d'alcool linoléique. Pour cela, nous allons évaluer le nombre de groupements contenant des protons B (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-). Les H<sub>B</sub> sont présents entre deux insaturations, donc dans les alcools linoléique et linoléique. Notons que l'alcool linoléique comportant trois doubles liaisons, possèdent deux de ces CH<sub>2</sub> ; l'alcool linoléique quant à lui, comporte deux doubles liaisons et un seul de ces CH<sub>2</sub>. Nous pouvons donc en déduire le nombre de tels groupements par molécule en calculant le rapport de l'intégration d'un des protons B sur l'intégration d'un proton (quelconque) :

- ♦ Nombre de groupements (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) totaux=

$$CH_{2T} = \frac{\text{Intégration d'un proton } H_B / 2}{\text{Intégration d'un proton } H}$$

- ♦ Nombre de groupements (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) d'alcool linoléique =

$$CH_{2L} = 2 \times \text{Nombre de molécules d'alcool linoléique}$$

Nous pouvons donc à présent déterminer le nombre de groupements de protons B provenant de l'alcool linoléique en retranchant à ce résultat le nombre de groupements provenant de protons B de l'alcool linoléique :

- Nombre de molécule d'alcool linoléique =

$$l_{\text{alcool gras}} = CH_{2T} - CH_{2L}$$

Nous allons maintenant déterminer le nombre total d'insaturations pour en déduire le nombre de molécules d'alcool oléique comportant une double liaison.

Pour calculer le nombre d'insaturations, on doit se référer à l'intégration des protons à 5,34 ppm.

- ◆ Nombre d'insaturations

$$I_{\text{alcool gras}} = \frac{\text{Intégration des protons } (-CH = CH-)/2}{\text{Intégration d'un proton } H}$$

- ◆ Nombre d'insaturations provenant de l'alcool linoléique par molécule d'huile de lin =

$$I_{\text{Lalcool gras}} = I_{\text{alcool gras}} \times 3$$

De même :

- ◆ Nombre d'insaturations provenant de l'alcool linoléique par molécule d'huile de lin

$$I_{\text{alcool gras}} = I_{\text{alcool gras}} \times 2$$

Nous pouvons donc en déduire le nombre d'insaturations provenant de l'alcool oléique par simple différence. De plus, sachant que l'alcool oléique ne comprend qu'une double liaison, le nombre d'insaturations provenant de l'alcool oléique est équivalent au nombre de molécules d'alcool oléique :

- ◆ Nombre de molécules d'alcool oléique =

$$O_{\text{alcool gras}} = I_{\text{alcool gras}} - I_{\text{Lalcool gras}} - I_{\text{alcool gras}}$$

Après avoir déterminé le nombre de molécules d'alcools insaturés, nous pouvons déterminer le nombre de molécules d'alcools saturés :

- ◆ Nombre de molécules d'alcools saturés =

$$S_{\text{alcool gras}} = 3 - I_{\text{alcool gras}} - I_{\text{alcool gras}} - O_{\text{alcool gras}}$$

*Remarque :* Il nous est impossible de distinguer les différents alcools gras saturés car presque tous les groupements CH<sub>2</sub> ont des déplacements chimiques similaires. Nous n'avons donc pas pu différencier l'alcool palmitique en C16 de l'alcool stéarique en C18.

A partir de ces résultats, nous pouvons déterminer la masse molaire moyenne de l'alcool gras.

$$\begin{aligned}
 - \quad M_{T \text{ alcool gras}} &= \text{masse molaire totale des alcools gras} \\
 M_{T \text{ alcool gras}} &= L_{\text{alcool gras}} \times M_{\text{alcool linoléique}} + l_{\text{alcool gras}} \times M_{\text{alcool linoléique}} \\
 &\quad + o_{\text{alcool gras}} \times M_{\text{alcool oléique}} + s_{\text{alcool gras}} \times M_{\text{alcool saturé}}
 \end{aligned}$$

Les proportions des différentes chaînes s'obtiennent alors grâce aux formules suivantes :

$$\%_{\text{alcool linoléique}} = L_{\text{alcool gras}} \times \frac{M_{\text{alcool linoléique}}}{M_{T \text{ alcool gras}}} \times 100$$

$$\%_{\text{alcool linoléique}} = l_{\text{alcool gras}} \times \frac{M_{\text{alcool linoléique}}}{M_{T \text{ alcool gras}}} \times 100$$

$$\%_{\text{alcool oléique}} = o_{\text{alcool gras}} \times \frac{M_{\text{alcool oléique}}}{M_{T \text{ alcool gras}}} \times 100$$

$$\%_{\text{alcool saturé}} = s_{\text{alcool gras}} \times \frac{M_{\text{alcool saturé}}}{M_{T \text{ alcool gras}}} \times 100$$

L'indice d'iode peut être également déduit via cette formule :

$$\text{Indice d'iode} = 100 \times \frac{I_{\text{alcool gras}} \times M_{I_2}}{M_{T \text{ alcool gras}}}$$

Les différentes formules sont adaptées ensuite pour le lipomorceur 1 et 2.

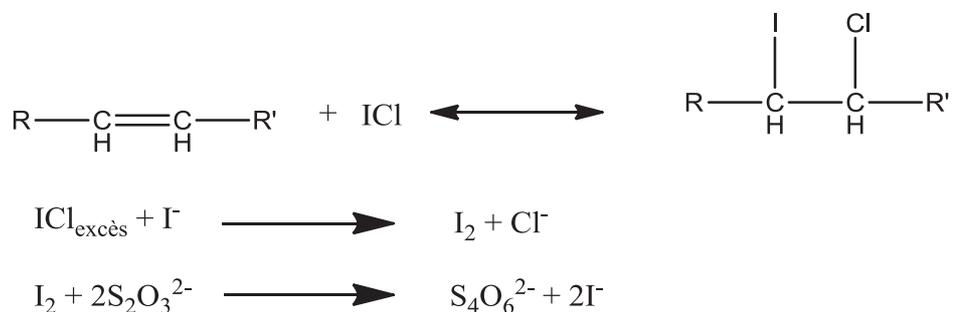
## Annexe II – 3 : Détermination de l'indice d'iode par la méthode de Wijs

La méthode de Wijs est la plus utilisée pour déterminer l'indice d'iode des huiles. Elle mesure la quantité d'iode (en mg) qui a réagi sur les doubles liaisons pour 100 g de produit.

Une masse connue d'huile de lin ( $m_{HL}$ ) est introduite sous agitation dans un erlenmeyer avec 20 mL de chloroforme. 20 mL du réactif de Wijs sont ensuite ajoutés. Le mélange est agité pendant 1 heure dans l'obscurité. En parallèle, une solution témoin est préparée sans huile de lin.

Pour chaque solution, 100 mL d'eau distillée et 20 mL d'une solution d'iodure de potassium (0,1% en masse) sont introduits sous agitation. Les mélanges sont ensuite dosés par une solution de thiosulfate de sodium à 0,2 mol/L afin de déterminer les volumes équivalents  $V_{eq T}$  et  $V_{eq HL}$ .

Les différentes réactions qui ont lieu au cours du dosage sont les suivantes :



$$\text{indice d'iode} = 100 \times \frac{[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]}{2} \times (V_{eq T} - V_{eq HL}) \times \frac{M_{\text{I}_2}}{m_{HL}}$$

La méthode est identique avec l'alcool gras et le lipoamorceur 1.

## Annexe II - 4 :

## Optimisation de la polymérisation par ATRP (Atom Transfert Radical Polymerization) de l'acrylate de *tert*-butyle tBA

Plusieurs essais ont été nécessaires afin d'optimiser les conditions de polymérisation par ATRP du tBA. Les différents essais sont répertoriés dans le tableau suivant.

**Tableau 1** : Optimisation de la synthèse par ATRP du LPtBA amorcé par le LA1

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5
LA1	1	1	1	1	1
tBA	100	100	50	50	50
CuBr	0,5	0,5	0,5	0,5	/
CuBr <sub>2</sub>	/	0,025	0,025	0,025	/
CuCl	/	/	/	/	0,5
CuCl <sub>2</sub>	/	/	/	/	0,025
PMDETA	0,5	0,525	0,525	0,525	0,525
Tolène	50% v:v	50% v:v	50% v:v	75% v:v	75% v:v
Anisole	5% v:v	5% v:v	5% v:v	5% v:v	5% v:v
Observations	Diminution des espèces propageantes à partir de 25% de conversion. I <sub>p</sub> = 1,24 pour ρ=58 %	Ln([M] <sub>0</sub> /[M]) vs temps non linéaire	I <sub>p</sub> élevé ρ >50% après 1h de polymérisation	Diminution des espèces propageantes à partir de 50% de conversion. I <sub>p</sub> =1,2 pour ρ=65%	I <sub>p</sub> très élevé (~1,6) Pas de contrôle

La polymérisation est suivie par RMN  $^1\text{H}$  et SEC (chromatographie d'exclusion stérique). Le suivi cinétique en RMN nous permet d'accéder au degré de conversion du polymère à chaque temps de prélèvement et ainsi à la masse molaire moyenne en nombre théorique à chaque instant. Pour cela, l'anisole est utilisé comme étalon interne. Un pic correspondant sort à 3,8 ppm et représente les trois protons de l'anisole. Les trois protons de l'acrylate sortent entre 5,7 et 7,4 ppm. Ainsi pour établir le degré de conversion à chaque instant, nous avons la formule suivante :

$$Conv = \frac{r_{ti}}{r_{t0}}$$

Avec

$$r_{ti} = \frac{\frac{I_{(CH_2=CH)i}}{3}}{\frac{I_{(anisole)i}}{3}}$$

Et

$$r_{t0} = \frac{\frac{I_{(CH_2=CH)0}}{3}}{\frac{I_{(anisole)0}}{3}}$$

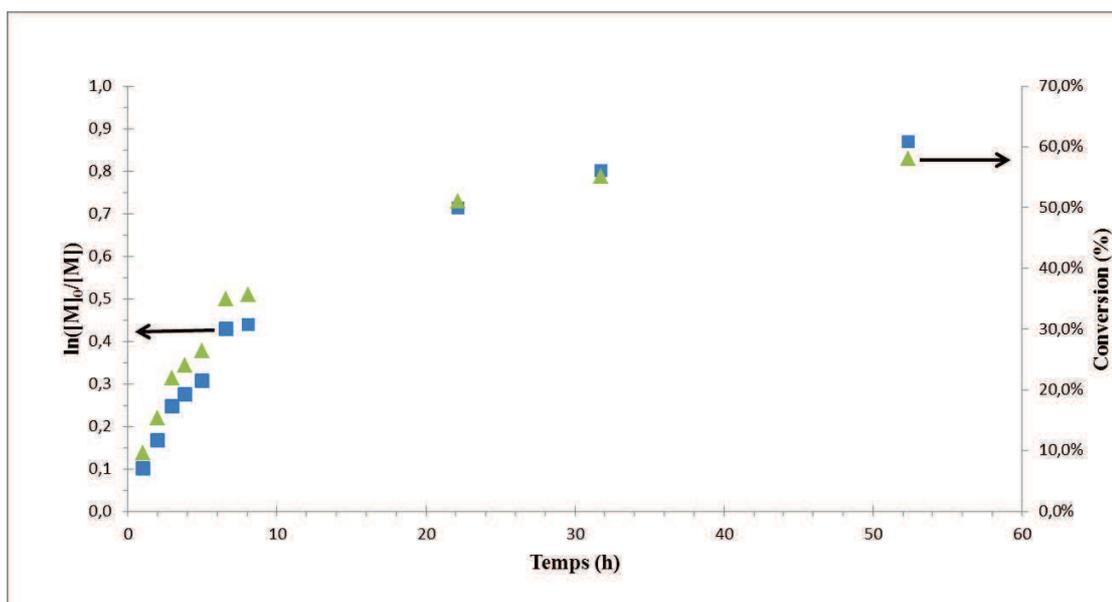
La conversion nous permet d'accéder au degré de polymérisation  $\overline{X}_n$  et donc à la masse molaire moyenne en nombre.

$$\overline{X}_{n,RMN} = \text{Conversion} \times [\text{Monomère}] / [\text{Amorceur}]$$

$$\overline{M}_{n,RMN} = M_{\text{amorceur}} + \overline{X}_{n,RMN} \times M_{\text{IBA}}$$

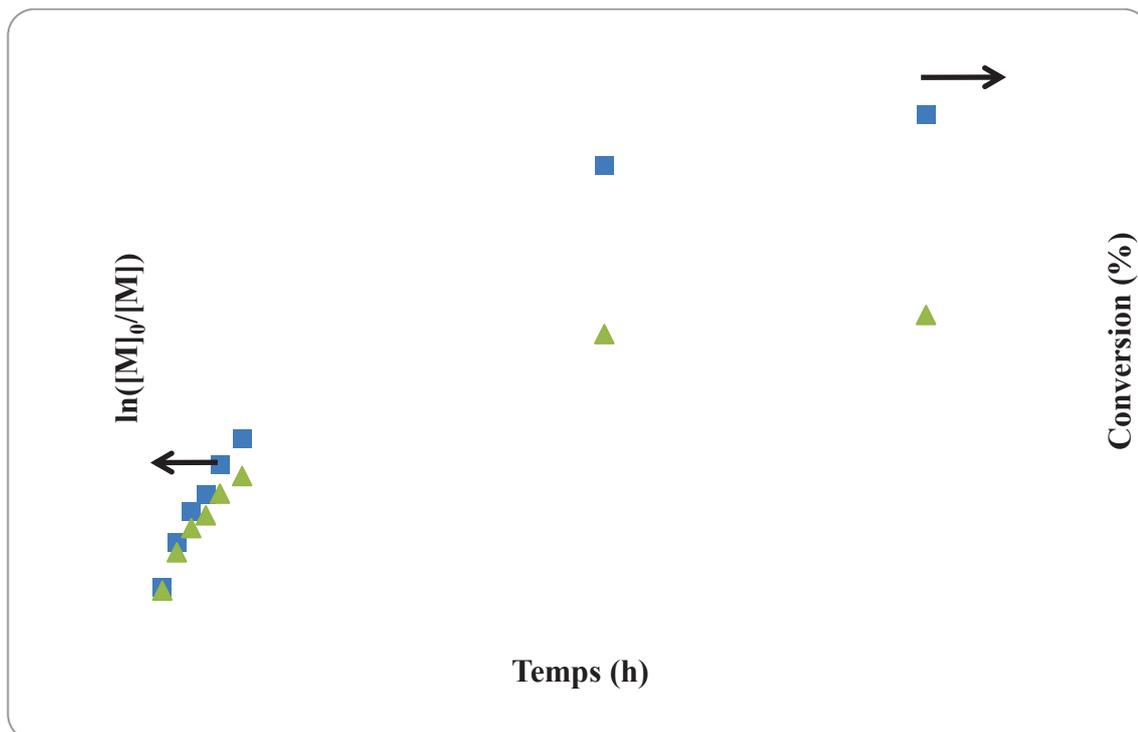
La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) nous donne des informations sur la masse molaire en équivalent PMMA et sur l'évolution de l'indice de polymolécularité au cours de la polymérisation.

Les courbes conversion versus temps et  $\ln([M]_0/[M])$  versus temps ont été tracées pour chaque essai.

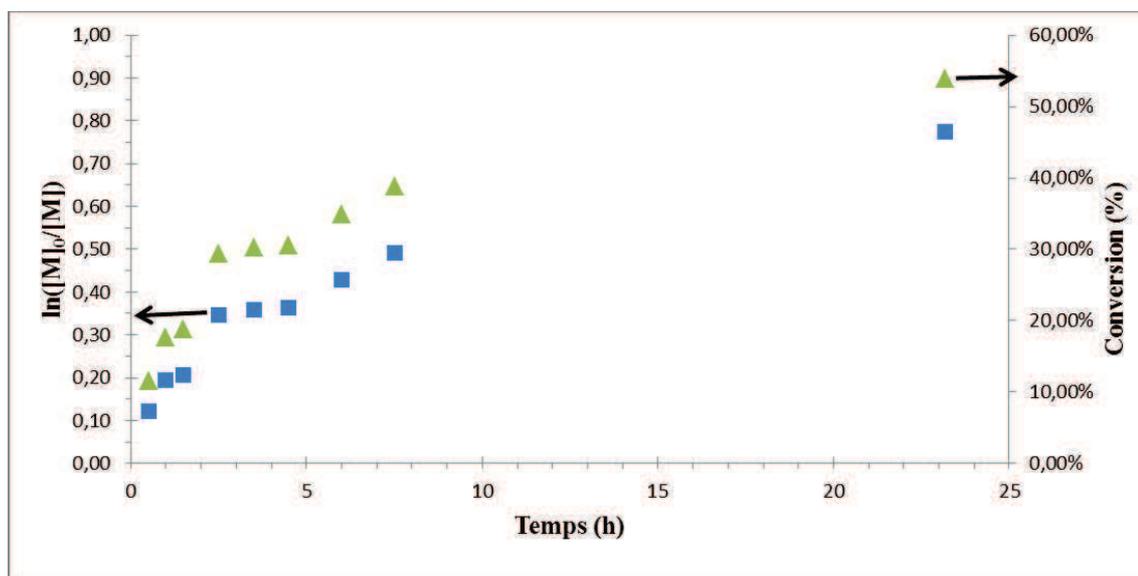


**Figure 1 :** Suivi cinétique de la polymérisation du *t*BA par ATRP pour l'essai 1, (■)  $\ln([M]_0/[M])$  vs temps et (▲) conversion vs temps

L'essai 1 montre une diminution de la concentration en espèce propageante à partir de 25% de conversion. Pour une conversion de 58%, l'indice de polymolécularité est de 1,24. Cet essai montre un contrôle de la polymérisation sur 5h. Nous souhaitons améliorer ces résultats.



**Figure 2 :** Suivi cinétique de la polymérisation du *t*BA par ATRP pour l'essai 2, (■)  $\ln([M]_0/[M])$  vs temps et (▲) conversion vs temps



**Figure 3 :** Suivi cinétique de la polymérisation du *t*BA par ATRP pour l'essai 5, (■)  $\ln([M]_0/[M])$  vs temps et (▲) conversion vs temps

Les essais 2 et 5 ne montrent pas de linéarité entre le  $\ln([M]/[M]_0)$  et le temps.

L'essai 5 présente une polymérisation contrôlée sur les quatre premières heures. Toutefois la réaction est beaucoup trop rapide car on atteint un degré de conversion de 90% dès cinq

heures de polymérisation. De plus, pour les hautes conversions, les masses molaires obtenues en SEC dévient des masses molaires théoriques (figure 5) ce qui démontre un contrôle relatif de la polymérisation. De plus, l'indice de polymolécularité reste assez élevé, environ 1,3 pour les plus hauts degrés de conversion.

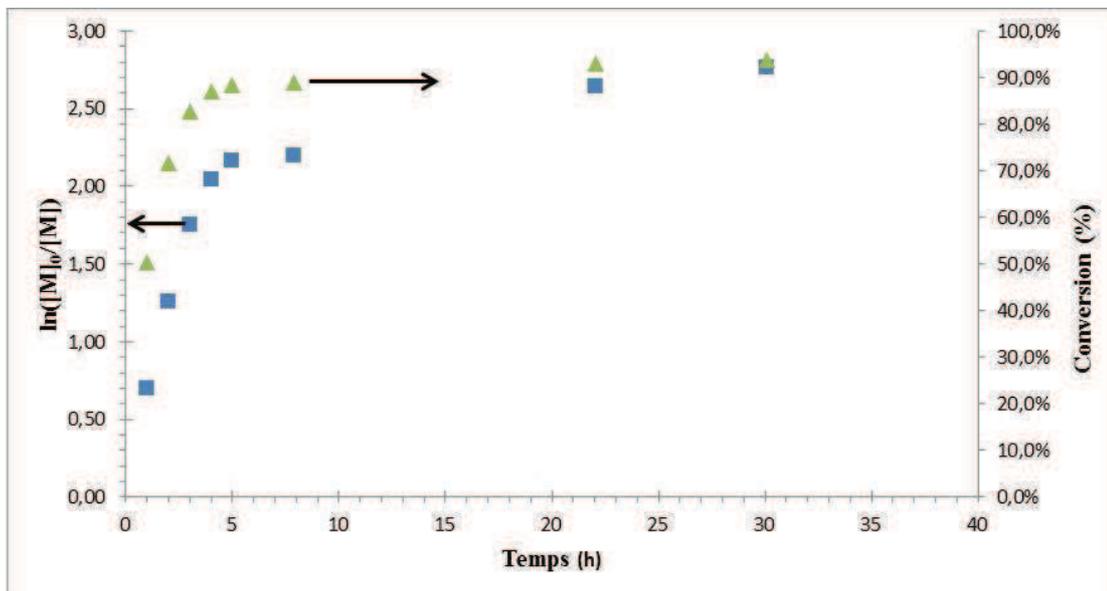
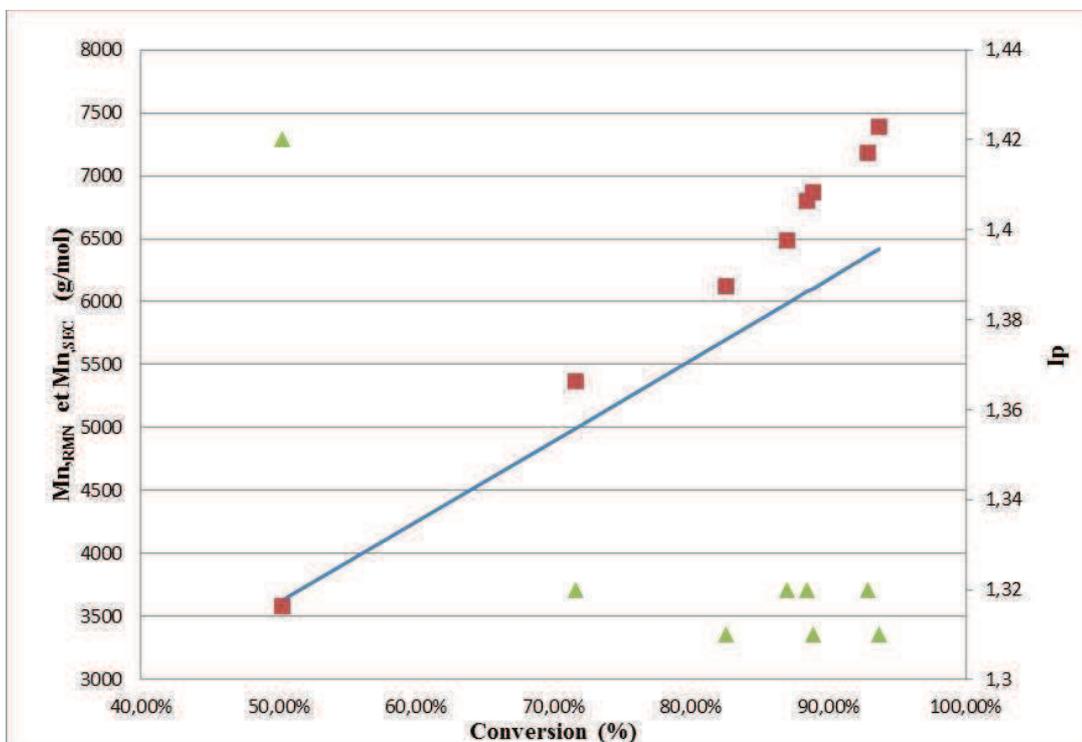
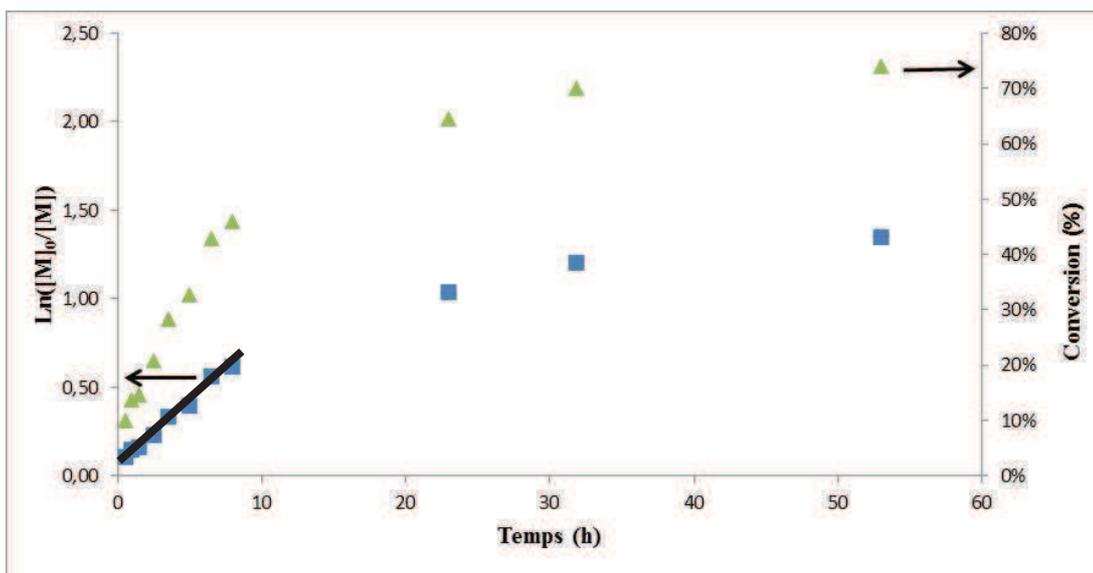


Figure 4 : Suivi cinétique de la polymérisation du tBA par ATRP pour l'essai 3, (■)  $\ln([M]_0/[M])$  vs temps et (▲) conversion vs temps

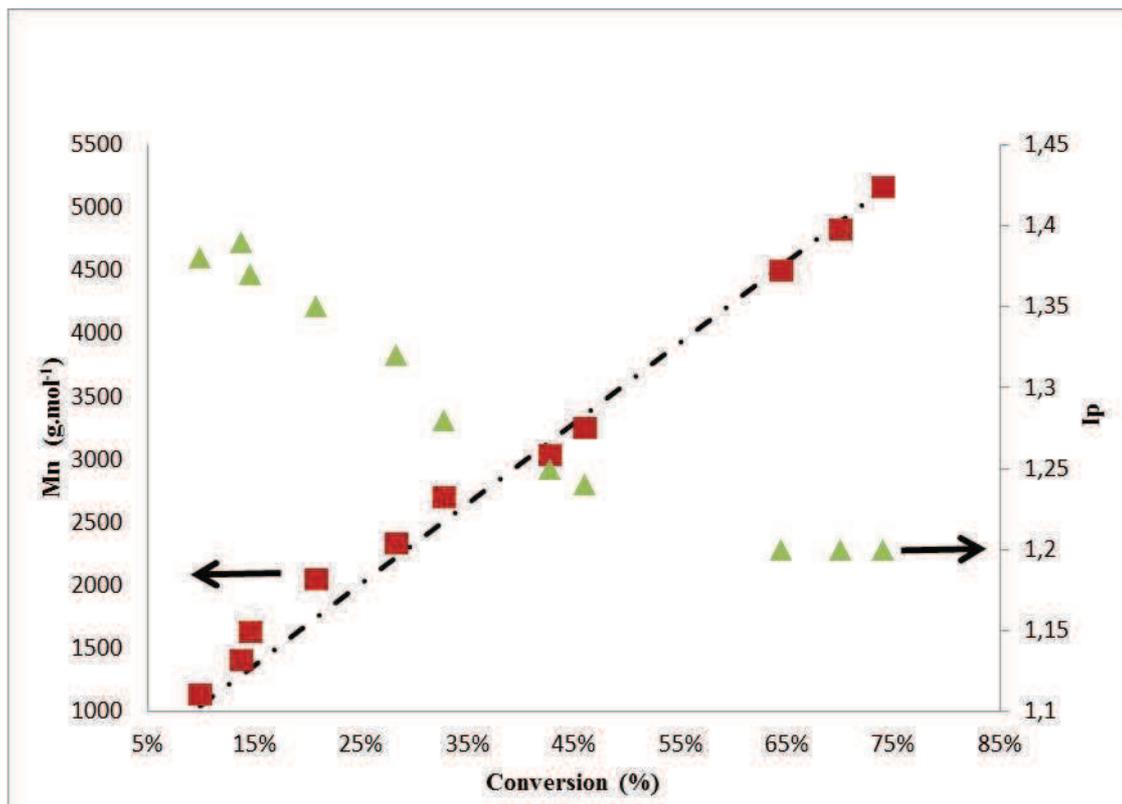


**Figure 5** : Relation entre la masse molaire (RMN —, SEC ■), la polymolécularité (▲) et la conversion

C'est pourquoi le volume de toluène introduit est deux fois plus important dans l'essai 4 afin de diluer le monomère et le lipoamorceur. Les deux réactifs ont donc moins de chance de se rencontrer et la réaction s'en trouve ralentie.



**Figure 6** : Suivi cinétique de la polymérisation du *t*BA par ATRP pour l'essai 4, (■)  $\ln([M]_0/[M])$  vs temps et (▲) conversion vs temps



**Figure 7:** Relation entre la masse molaire (■), la polymolécularité (▲) et la conversion

Le degré de conversion tracé en fonction du temps (Figure 7) montre une relation d'ordre 1 sur les dix premières heures prouvant une concentration en espèces actives constante jusqu'à 50% de conversion. La masse molaire moyenne en nombre tracée en fonction du degré de conversion (Figure 7) montre une bonne adéquation entre les résultats théoriques et expérimentaux. De plus l'indice de polymolécularité diminue progressivement avec la conversion pour atteindre un plateau à 1,2.

## Annexe II – 5

### Optimisation de la polymérisation par CROP (cationic ring-opening polymerization) des monomères oxazoline

Tableau 1 : Principaux essais de CROP réalisés par voie d'amorçage

	<b>n(IpOx)</b> <b>(mmol)</b>	<b>n(FATs)</b> <b>(mmol)</b>	<b>n(FAMs)</b> <b>(mmol)</b>	<b>n(eau)</b> <b>(mmol)</b>	<b>n(TEA)</b> <b>(mmol)</b>	<b>X<sub>n</sub>,th</b>
<b>Essai 1</b>	<b>4,33</b>	<b>0,16</b>	<b>/</b>	<b>0,26</b>	<b>0,43</b>	<b>27</b>
<b>Essai 2</b>	<b>4,33</b>	<b>0,14</b>		<b>0,17</b>	<b>0,29</b>	<b>30</b>
<b>Essai 3</b>	<b>4,33</b>	<b>0,10</b>		<b>0,13</b>	<b>0,22</b>	<b>43</b>
<b>Essai 4</b>	<b>4,33</b>	<b>/</b>	<b>0,22</b>	<b>0,26</b>	<b>0,43</b>	<b>20</b>
<b>Essai 5</b>	<b>4,33</b>	<b>/</b>	<b>0,14</b>	<b>0,17</b>	<b>0,29</b>	<b>30</b>
<b>Essai 6</b>	<b>8,66</b>	<b>/</b>	<b>0,35</b>	<b>0,42</b>	<b>0,69</b>	<b>25</b>

### *ANNEXE III -1 :*

#### *Influence de la méthode de préparation*

Il existe plusieurs méthodes pour préparer les micelles mixtes.

- Mélanger les deux copolymères en poudre et les solubiliser dans une solution tampon → P+P
- Ajouter le LPOx en poudre à une solution de LPAA préalablement préparée (et inversement) → P+S
- Mélanger une solution de LPOx avec une solution de LPAA → S+S

Nous avons comparé les deux dernières méthodes de préparation afin de déterminer l'existence ou non d'une influence notable de la méthode de préparation sur les systèmes mixtes. En effet il est assez différent physiquement de mélanger deux solutions contenant des micelles déjà formées et de mélanger un copolymère amphiphile en poudre à une solution contenant des micelles. Dans le premier cas, il n'est pas évident que les micelles se réorganisent si facilement pour former des micelles mixtes.

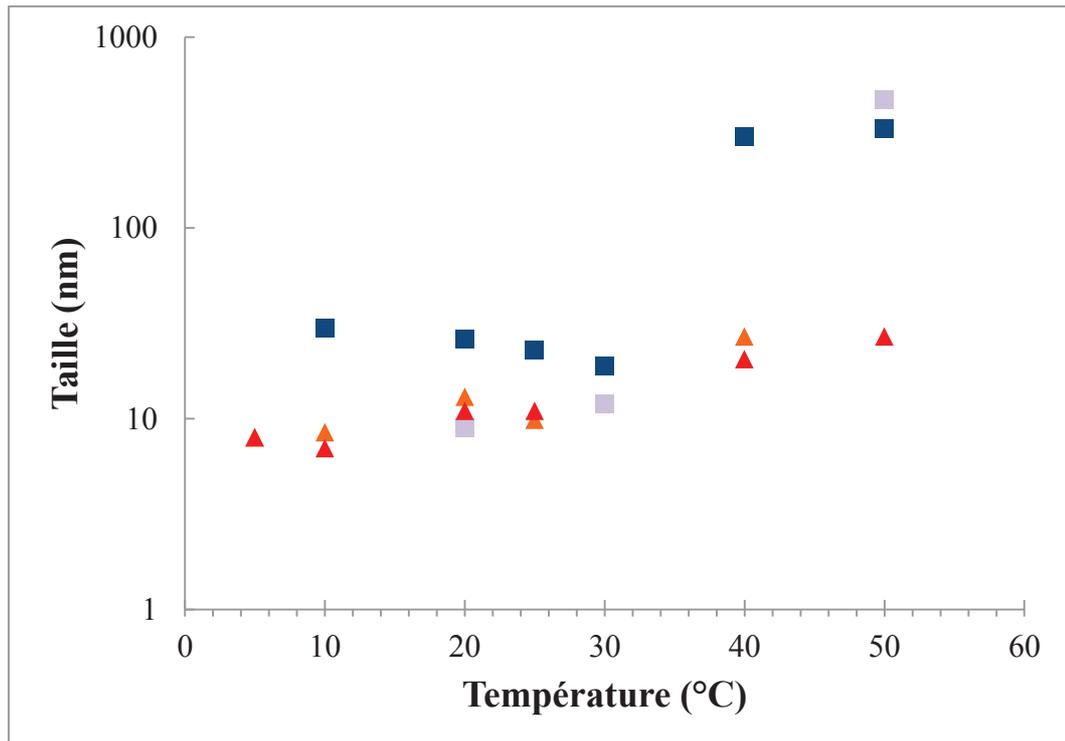


Figure 1 : Evolution de la taille des objets lors des méthodes de préparation (▲) P+ S à pH acide, (■) P+S à pH basique, (▲) S+S à pH acide et (■) S+S à pH basique.

Les tendances sont les mêmes entre les deux modes de préparation. Il n'y a donc pas d'influence de la méthode de préparation sur la taille des objets et leur structure. Toutefois on remarque une influence sur l'homogénéité du système. Afin de les mettre en évidence, nous avons répertorié dans un tableau les moyennes des tailles obtenues en nombre, le nombre de graphes exploitables et l'écart-type sur la mesure.

Tableau 1 : Résultats obtenus en QELS à pH acide de 5 à 50°C pour les différentes méthodes de préparation

pH acide	P+S			S+S		
Température (°C)	Taille moyenne en nombre (nm)	Nbre de mesures exploitables /8	Ecart-type	Taille moyenne en nombre (nm)	Nbre de mesures exploitables /8	Ecart-type
5	8	3	3,3	8	2	2,7
10	7	2	0,4	8,5	2	3,8
20	11	4	4	13	3	1,7
25	11	3	4,1	10	4	4,7
30	0	0	/	12	1	/
40	20,5	4	2,4	27	1	/
50	27	7	3,5	/	0	/

Tableau 2 : Résultats obtenus en QELS à pH basique de 5 à 50°C pour les différentes méthodes de préparation

pH basique	P+S			S+S		
Température (°C)	Taille moyenne en nombre (nm)	Nbre de mesures exploitables	Ecart-type	Taille moyenne en nombre (nm)	Nbre de mesures exploitables	Ecart-type
10	30	6	10	/	0	/
20	26	8	9	9	2	0,7
25	23	8	12	23	2	6,4
30	19	2	6	12	2	4,9
40	300	4	21	300	2	3,5
50	330	8	62	470	8	11,1

Ces deux tableaux montrent que la méthode de préparation P+S tend à une meilleure homogénéité des résultats que la méthode S+S. En effet, même si les écart-types sont plus élevés, le nombre de mesures exploitables est bien plus grand. Toutefois il est important de rappeler que les tendances observées sont les mêmes pour les deux méthodes de préparation.

Il serait également intéressant d'étudier l'influence du type d'agitation sur l'homogénéité du système. Ici toutes les solutions ont été agitées via un agitateur magnétique. L'utilisation d'ultrasons permettrait peut-être également d'améliorer l'homogénéité du système.

***Influence de la température sur l'homogénéité du système***

Nous remarquons dans les deux tableaux précédents que l'homogénéité des systèmes s'améliore avec la montée en température. Nous nous sommes ici posé la question de déterminer l'influence des cycles de température sur l'homogénéité du système. Nous avons donc fait subir au mélange plusieurs allers-retours entre 25 et 50°C. La taille des objets en solution est suivie en QELS.

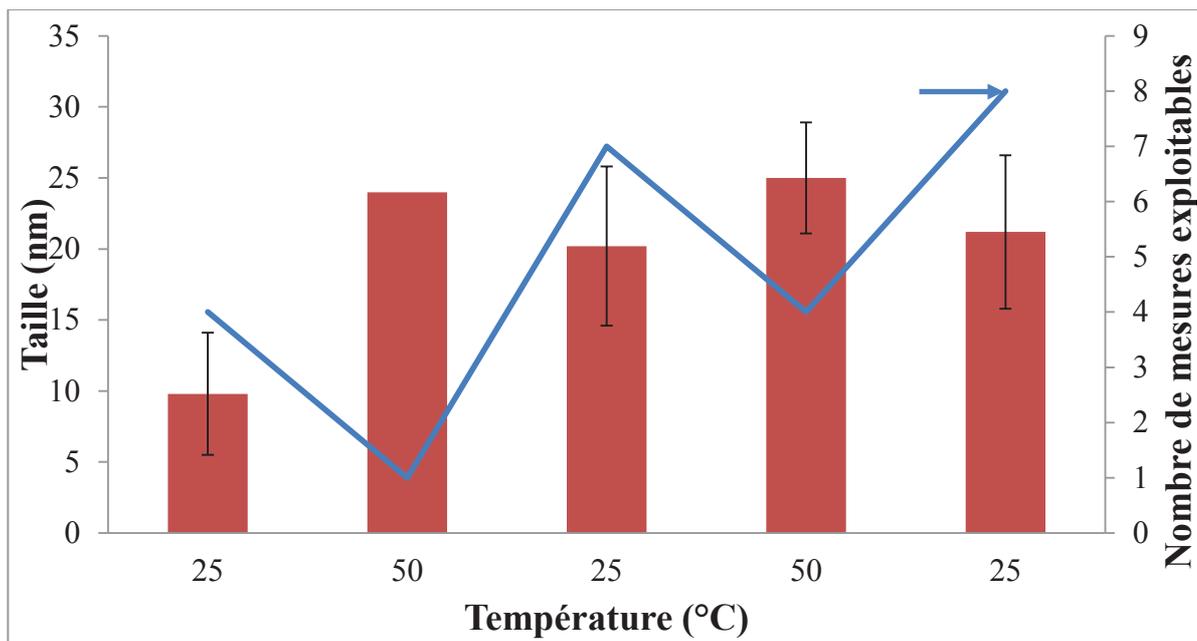
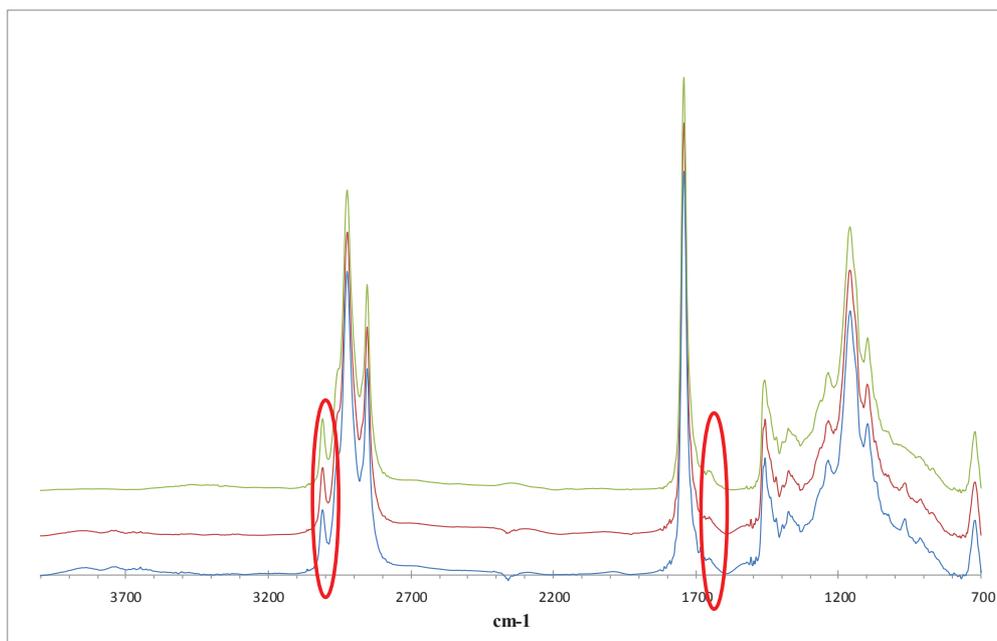


Figure 2 : Influence d'un cycle de température sur la structure du système mixte

La taille des objets reste similaire entre 50 et 25°C. Toutefois, l'homogénéité du système va en s'améliorant dès le premier cycle de température. En effet, bien que l'écart-type reste le même, le nombre de mesures exploitables augmente drastiquement.

**Annexe IV – 1****Irradiation de l'huile de lin seule sous UV**

De l'huile de lin est irradiée sous UV par une lampe polychromatique (200 à 400 nm) à 25% d'intensité à 20°C. La réaction est suivie par analyse IR.



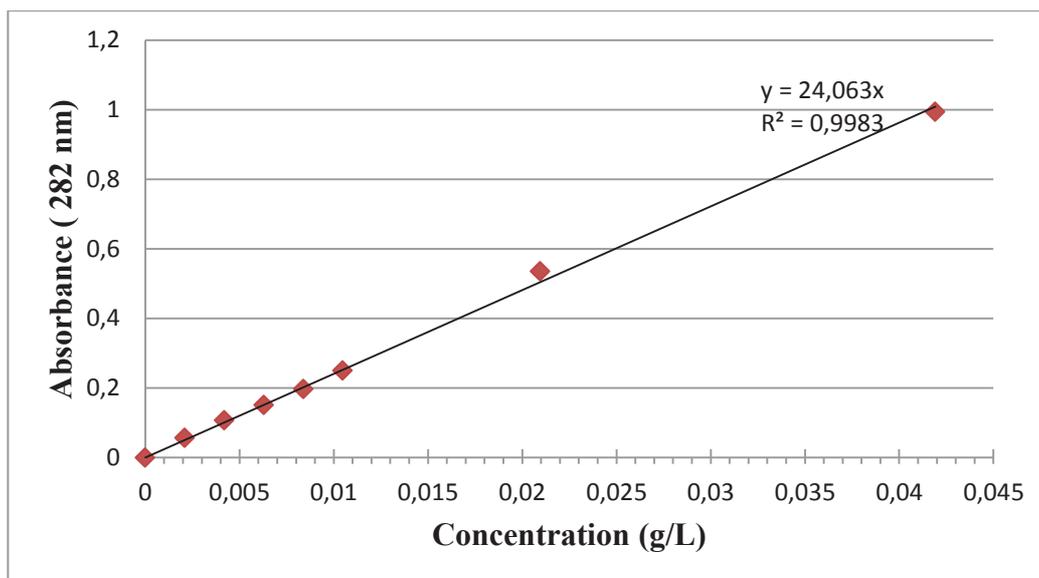
**Figure IV - 1 : Suivi par analyse IR des insaturations l'huile de lin soumis aux rayonnements UV**

Les pics caractéristiques des insaturations à 1652 et 3009  $\text{cm}^{-1}$  restent présents au cours de la réaction. Aucune réticulation ne se produit donc.

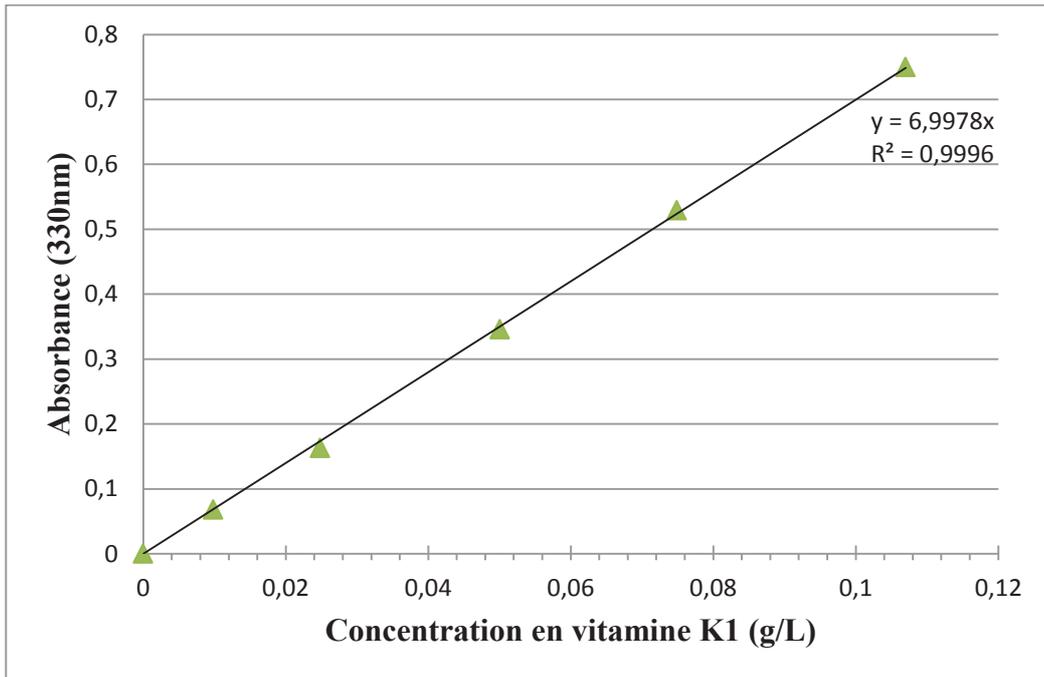
## Annexe V – 1

## Encapsulation des principes actifs

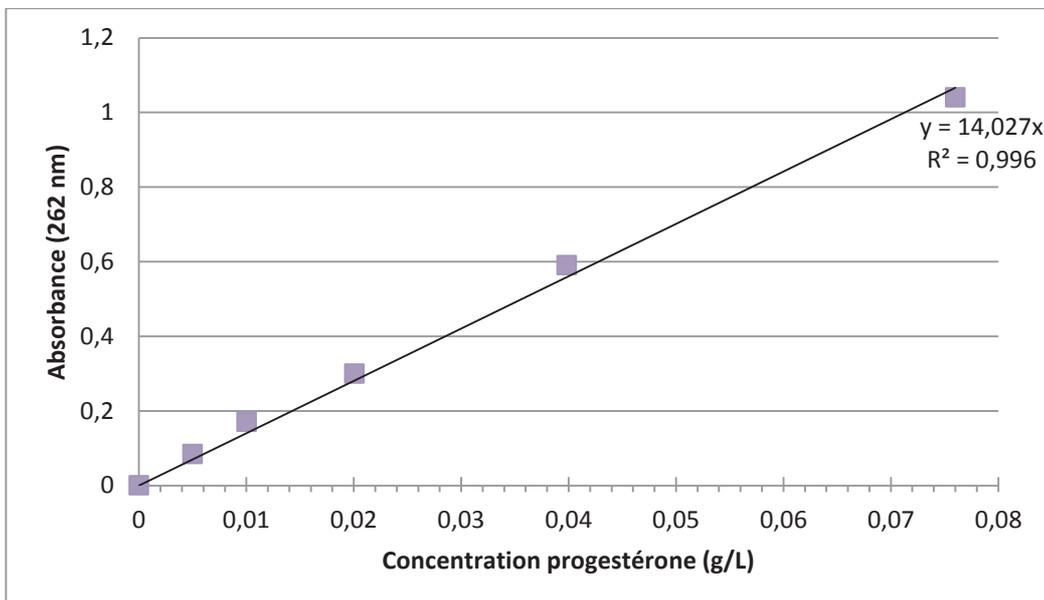
- Etalonnage de la benzophénone dans un mélange MeOH/solution tampon pH = 4, [NaCl] = 0,1 mol/L (90/10 v/v)



- Etalonnage de la vitamine K1 dans un mélange EtOH/solution tampon pH = 4, [NaCl] = 0,1 mol/L (90/10 v/v)



- Etalonnage de la progestérone dans un mélange EtOH/solution tampon pH = 4, [NaCl] = 0,1 mol/L (90/10 v/v)



## Annexe V – 2

**Méthode d'analyse et étalonnage de la benzophénone pour le suivi de libération**

La concentration en benzophénone est déterminée par analyse en HPLC-UV. Les conditions optimales de l'analyse sont : débit = 1 mL/min, 50%/50% (v/v) eau/acétonitrile, T = 20°C,  $\lambda$  = 254 nm. Le temps de rétention de la benzophénone est de 11,3 min. Un étalonnage de la benzophénone dans ces conditions et dans une solution tampon à pH = 10 est réalisé (**Figure 1**).

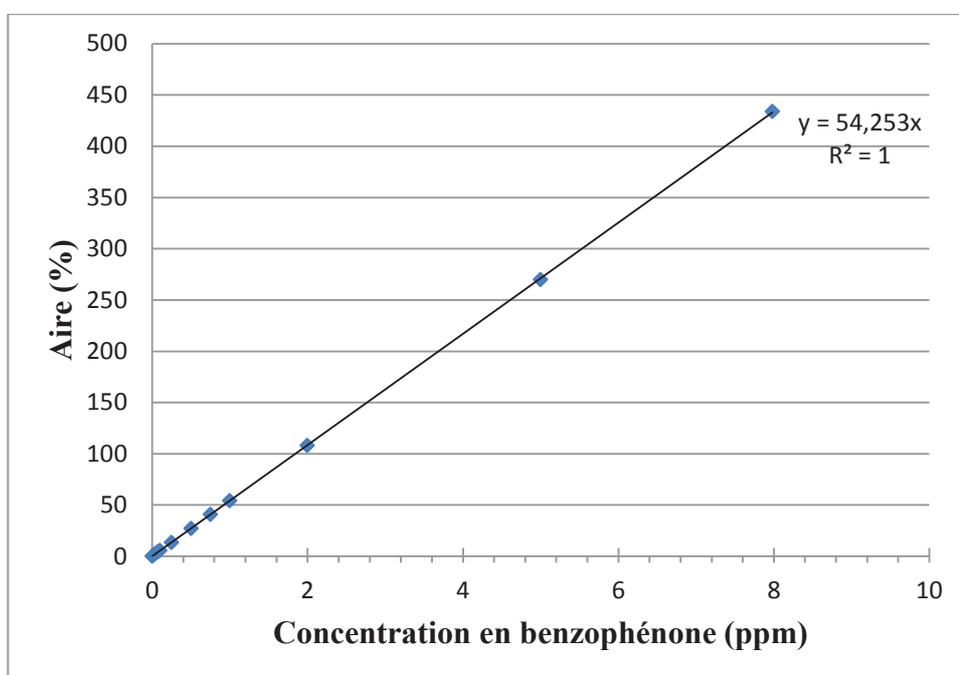


Figure-1 : Etalonnage de la benzophénone en HPLC-UV à pH=10

# LPAA



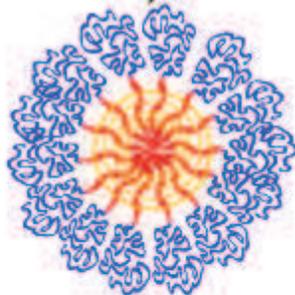
$M_n < 2000$  g/mol  
 $14 < HLB < 16$   
cmc = 10 mg/L  
taille des micelles = 10 nm  
**pH-sensible** : micelles à pH acide  
dissociation à pH basique

# LPOx



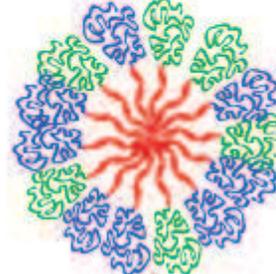
$M_n < 3500$  g/mol  
HLB < 18  
cmc = 10 mg/L  
taille = 10 nm  
**thermo-sensible**  
 $T_{PT} = 32^\circ\text{C}$

Photo-réticulation



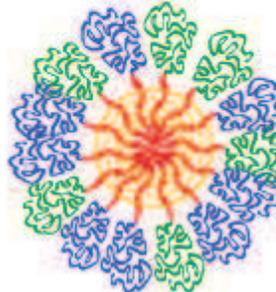
**micelles réticulées au coeur**  
gonflement à pH basique jusqu'à 15 nm  
micelles stabilisées

~~Photo-réticulation~~



**micelles mixtes**  
gonflement à pH basique jusqu'à 30 nm  
gonflement à  $T > T_{PT}$  jusqu'à 30 nm  
dissociation à pH basique et  $T > T_{PT}$

Photo-réticulation



**micelles réticulées au coeur**  
A pH acide : taille environ 16 nm  
A pH basique : taille environ 24 nm  
micelles stabilisées à pH basique et  $T > T_{PT}$