



Synthèse et caractérisation de systèmes micellaires stimuli-sensibles à partir d'huile de lin

Arlette El Asmar

► To cite this version:

Arlette El Asmar. Synthèse et caractérisation de systèmes micellaires stimuli-sensibles à partir d'huile de lin. Chimie organique. Normandie Université, 2017. Français. ⟨NNT : 2017NORMIR19⟩. ⟨tel-01759657⟩

HAL Id: tel-01759657

<https://theses.hal.science/tel-01759657v1>

Submitted on 5 Apr 2018

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.



HAL Authorization



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie Macromoléculaire

Préparée au sein de l'INSA de Rouen

Synthèse et caractérisation de systèmes micellaires stimuli-sensibles à partir d'huile de lin

**Présentée et soutenue par
Arlette EL ASMAR**

**Thèse soutenue publiquement le 03 novembre 2017
devant le jury composé de**

Mme Catherine AMIEL	Professeur des Universités, Université de Paris Est, ICMPE	Examineur
Mme Christelle DELAITE	Professeur des Universités, Université de Haute Alsace, LPIM	Rapporteur
M Olivier COLOMBANI	Maître de Conférences, Université du Maine, IMMM	Rapporteur
M Fabrice BUREL	Professeur des Universités, INSA de Rouen, PBS	Directeur de thèse
Mme Gaëlle MORANDI	Maître de Conférences, INSA de Rouen, PBS	Co-encadrante de thèse
M Didier Lecerf	Professeur des Universités, Université de Rouen, PBS	Membre invité

Thèse dirigée par Fabrice BUREL, laboratoire PBS

A ma famille,
A ma belle-famille,
A Nino

Remerciements

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du laboratoire Polymères Biopolymères et Surfaces (UMR 6270) dans l'équipe Matériaux Macromoléculaires.

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Christelle Delaite, M. Olivier Colombani et Mme Catherine Amiel d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Merci à Fabrice Burel, mon directeur de thèse. Il a pu être difficile de te faire changer d'avis rendant les discussions parfois longues mais tes idées et tes conseils ont toujours été précieux.

Je remercie vivement Gaëlle Morandi, mon encadrante de thèse. Ces trois années ont été grâce à toi, enrichissantes tant au niveau professionnel que personnel. Merci pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordée dans mon travail. Tu as toujours été disponible quand j'en avais besoin.

Merci à Didier Lecerf pour tes nombreux conseils tout au long de ces trois ans, pour m'avoir introduit dans l'équipe SCC et avoir toujours su trouver le temps afin de discuter de mon travail.

Je remercie Vincent Lapinte, Maître de conférences au sein de l'institut Charles Gerhart de Montpellier et qui m'a fait découvrir la polymérisation CROP par micro onde. Cette collaboration m'a permis de troquer les nuages gris de Rouen contre le soleil de Montpellier pendant deux mois. Merci également d'avoir répondu présent tout au long de ma thèse lorsque j'avais des questions.

Laurence, Daniela, Nass, Nico et Philippe, je vous remercie pour votre bonne humeur, vos aides et vos conseils.

Merci à Catherine et Jérémy, pour leur aide au labo et notamment sur la SEC, un casse-tête qui nous apportait sans cesse de nouvelles surprises et qui n'a pas toujours été facile à réparer.

Merci à Stéphane Marcotte pour son aide en HPLC ainsi qu'à toute l'équipe analytique.

Murielle, Giovana mais également Fatima et Axelle, je vous remercie pour votre aide précieuse concernant la partie administrative et aussi pour votre bonne humeur au quotidien.

Juan et Mounia, il serait difficile de résumer les remerciements en quelques mots...alors merci pour tout et surtout pour votre amitié. Cyrielle, Ghislain et Pierre, trois personnalités très différentes mais uniques, je vous remercie pour vos délires sans limites et votre soutien

Remerciements

inébranlable. La chasse au fauteuil est ouverte...bonne chance ! Merci à Ludo, Bo mais aussi aux nouvelles recrues Alice, Yuzhen, Xuelian, pour leur gentillesse.

Une pensée particulière aux autres doctorants et post-doc, Amandine, Célia, Marion, Tim, Kevin, Jo, Adeline, Clément...

Je tiens également à remercier toute l'équipe SCC : Luc, Virginie, Carole, Christophe...pour leur accueil chaleureux et particulièrement aux thésards Ali, Julie, Christophe, Marie-Carole, Ahdi, Hung, qui m'ont toujours très bien accueilli dans leur bureau.

Un grand merci à l'équipe BRICs également pour leur spectrophotomètre UV-visible.

Nino, comme promis je te remercie pour les RMN, mais surtout pour ton soutien, ta patience (ce qui n'est pas toujours facile avec moi), durant ces trois années et dans tout ce que j'ai pu entreprendre jusque là. Un grand merci pour tout.

Abréviations

AA	acide acrylique
AIBN	azobisisobutyronitrile
ARN	acide ribonucléique
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
cac	concentration d'agrégation critique
cmc	concentration micellaire critique
CROP	Cationic Ring-Opening Polymerization
CTA	Chain Transfer Agent
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
Dh	diamètre hydrodynamique
DLS	diffusion dynamique de la lumière
DMAEMA	méthacrylate de diméthyl(aminoéthyle)
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DOX	doxorubicine
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	infrarouge à transformée de fourrier
HLB	balance hydrophile lipophile
HMTETA	1,1,4,7,10,10-Hexaméthyltriéthylènetetramine
k_{act}	constante de vitesse d'activation
k_{deact}	constante de vitesse de désactivation
LBr	lipoamorceur bromé
LCTA	lipo-Chain Transfer Agent
LMs	lipoamorceur mésylé
LTs	lipoamorceur tosylé
LCST	Lower Critical Solution Temperature
L-PAA	lipide- <i>b</i> -poly(acide acrylique)
L-PDMAEMA	lipide- <i>b</i> -poly(méthacrylate de diméthyl(aminoéthyle))

Abréviations

L-PEtOx	lipide- <i>b</i> -poly(2-éthyle-2-oxazoline)
L-PiPrOx	lipide- <i>b</i> -poly(2-isopropyle-2-oxazoline)
L-PMeOx	lipide- <i>b</i> -poly(2-méthyle-2-oxazoline)
M	monomère
$\overline{Mn}_{exp}$	masse molaire moyenne en nombre expérimentale
$\overline{Mn}_{RMN}$	masse molaire moyenne en nombre déterminée par RMN
$\overline{Mn}_{SEC}$	masse molaire moyenne en nombre déterminée par SEC
$\overline{Mn}_{théo}$	masse molaire moyenne en nombre théorique
MOETAC	chlorure de 2-(méthacryloyloxy)éthyle triméthylammonium
NIPAM	<i>N</i> -isopropylacrylamide
PAA	poly(acide acrylique)
P(AA-co-NVA)	poly(acide acrylique-co- <i>N</i> -vinylacetamide)
PDEGA	poly(acrylate de diéthylène glycol éthyle éther)
PDI	polydispersité
PEG	poly(éthylène glycol)
PEtOx	poly(2-éthyle-2-oxazoline)
PG	progestérone
PiPrOx	poly(2-isopropyle-2-oxazoline)
PnBA	poly(acrylate de <i>n</i> -butyle)
PnBA _m	poly(<i>n</i> -butyle acrylamide) ^o
PNIPAM	poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)
POx	poly(oxazoline)
PVP	poly(vinyle pyridine)
RAFT	Reversible Addition-Fragmentation Transfer
RMN	résonance magnétique nucléaire
SEC	chromatographie d'exclusion stérique
TA	tensio-actif

Abréviations

tBA	acrylate de <i>tert</i> -butyle
UCST	Upper Critical Solution Temperature
$\overline{X}_{n,RMN}$	degré de polymérisation moyen en nombre déterminé par RMN

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

CHAPITRE I : Etude bibliographique

Introduction	3
I. Auto-assemblage de molécules amphiphiles	4
1. Généralités sur les micelles	4
2. Des micelles de TA aux micelles macromoléculaires	6
II. Auto assemblage de copolymères « intelligents »	10
1. pH-sensible	11
1.1. Polyacide	11
1.2. Polybase	13
1.3. Exemples de systèmes micellaires pH-sensibles.....	14
1.4. Modulation des propriétés pH-sensible.....	16
1.5. Conclusion.....	19
2. Thermo sensible.....	19
2.1. Introduction au comportement thermo-sensible.....	19
2.2. Copolymères diblocs thermo-sensibles	21
2.2.1 Copolymère dibloc présentant une seule thermo-sensibilité.....	21
2.2.2 Copolymères dibloc comportant deux blocs thermo-sensible	22
2.2.2.a. Copolymères avec différentes LCST.....	23
2.2.2.b. Copolymères avec une LCST et une UCST (copolymères thermosensibles schizophrènes).....	25
3. Double stimuli pH et thermo-sensibles	29
3.1. Introduction	29
3.2. Homopolymères pH et thermo-sensibles.....	30

TABLE DES MATIERES

3.3. Copolymères à blocs.....	32
4. Conclusion.....	32
III. Etat de l'art sur le mélange physique de copolymères diblocs.....	33
1. Travaux préliminaires sur le mélange physique de copolymères diblocs	34
2. Modulation du comportement par l'approche de mixité	36
3. Vers des systèmes mixtes pH et thermo-sensibles	38
4. Conclusion.....	39
Conclusion.....	41
Références.....	42

CHAPITRE II : Synthèses et caractérisations de Lipide-*b*-poly(oxazoline)s

Introduction	56
I. Présentation de la famille des poly(oxazoline)s	56
II. Synthèse par CROP de polyoxazoline	58
1. Synthèse des lipoamorceurs	59
2. Synthèse des copolymères lipide- <i>b</i> -poly(oxazoline).....	64
2.1. Comparaison de l'efficacité des deux amorceurs lipidiques.....	64
2.2. Polymérisation d'une gamme de 2-alkyl-2-oxazoline	69
2.3. Copolymérisation de l'EtOx et de l'iPrOx.....	71
III. Caractérisation physico-chimique des copolymères amphiphiles thermo-sensibles en milieu aqueux	75
1. Caractérisation des copolymères <i>L-PEtOx</i> (4) et <i>L-PiPrOx</i> (5)	75
2. Caractérisation des copolymères <i>L-P(EtOx_x-co-iPrOx_y)</i>	79
Conclusion.....	82
Références.....	83

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE III : Synthèses et caractérisations de lipide-b-poly(méthacrylate de diméthyle(aminoéthyle))

Introduction	87
I. Synthèse de copolymère lipide-b-poly(méthacrylate de diméthyle(aminoéthyle))....	88
1. Polymérisation par ATRP	88
1.1. Synthèse du lipoamorceur pour la polymérisation par ATRP	89
1.2. Synthèse par ATRP du lipide-b- poly(méthacrylate de diméthyle(aminoéthyle)).	90
2. Polymérisation par RAFT	94
2.1. Introduction de la technique de polymérisation par RAFT	94
2.2. Synthèse du LCTA pour la polymérisation par RAFT	97
2.3. Optimisation des conditions de polymérisation par RAFT du méthacrylate de diméthyle (aminoéthyle).....	98
2.4. Synthèse de copolymères amphiphiles lipide-b-poly(méthacrylate de diméthyle(aminoéthyle))	103
2.4.1. Etude cinétique de la polymérisation à partir du LCTA	103
2.4.2. Synthèses de différents copolymères amphiphiles	105
II. Caractérisation physico-chimique des copolymères amphiphiles en milieu aqueux	107
1. Etude du comportement pH-sensible	108
1.1. Influence de la longueur de la chaîne hydrophile	108
1.2. Etude des propriétés tensio-actives	110
1.3. Détermination de la nature des systèmes auto-associés en solution	112
2. Etude du comportement thermo-sensible en fonction du pH	115
Conclusion.....	118
Références	119

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE IV : Etudes de mélanges physiques de copolymères diblocs amphiphiles

Introduction	124
I. Etude de systèmes mixtes poly(oxazoline)s	125
1. Mélanges physiques de copolymères thermo-sensibles	125
1.1. Etude de la température de point de trouble.....	126
1.2. Etude du phénomène à deux transitions pour le mélange 79/2.....	129
1.3. Comparaison des micelles mixtes et des copolymères L-P(EtO _x -co-iPrO _y)...	134
1.4. Conclusion.....	135
2. Mélanges physiques de poly(oxazoline)s thermo-sensible et hydrophile	136
II. Etude de systèmes mixtes composés de chaines de natures différentes : L-PDMAEMA et L-PiPrOx	138
Conclusion.....	143
Références.....	145

CHAPITRE V : Etude de l'encapsulation et de relargage de molécules hydrophobes

Introduction	147
I. L'encapsulation de molécule dans les systèmes micellaires	148
II. Etude de l'encapsulation et du relargage de la VK1 par le système pH-sensible L-PAA.....	150
1. Capacité d'encapsulation du système	150
2. Etude du relargage	152
2.1. Protocole.....	152

TABLE DES MATIERES

2.2. Cinétique de relargage en fonction du pH.....	153
III. Etude de l'encapsulation et du relargage de la VK1 par le système thermo-sensible L-PiPrOx	155
1. Capacité d'encapsulation du système	155
2. Cinétique de relargage en fonction de la température	155
IV. Etude de l'encapsulation et du relargage de la VK1 par le système double stimuli L-PDMAEMA.....	157
1. Capacité d'encapsulation.....	157
2. Cinétique de relargage en fonction du pH et de la température	158
V. Etude de l'encapsulation et du relargage de la progestérone par le système L-PDMAEMA.....	160
1. Capacité d'encapsulation.....	160
2. Cinétique de relargage	163
Conclusion.....	167
Références	169
 CONCLUSION GENERALE.....	 171
Partie expérimentale.....	176

Introduction générale

Les efforts apportés par la science ont permis une avancée considérable dans la lutte contre le cancer, cependant les traitements proposés restent agressifs et douloureux pour le patient. Parmi ceux-ci, la chimiothérapie cause souvent des effets indésirables du fait de la toxicité de la substance administrée. Par ailleurs l'hydrophobie du principe actif peut entraîner sa précipitation et la formation d'agrégats menant à des complications telles que des embolies.

Dans le but de palier à ces problèmes, de nombreux efforts ont été faits afin de créer des vecteurs et ainsi permettre : 1) la protection du principe actif d'éventuelles dégradations et métabolisations, 2) son transport jusqu'aux cellules cibles, 3) la diminution des effets secondaires. L'utilité de cette stratégie a dans un premier temps été démontrée à travers l'utilisation de nanovecteurs de type liposomes, cependant ceux-ci sont rapidement éliminés par le système immunitaire, libérant de façon prématuré le principe actif encapsulé.

Ainsi, depuis plusieurs années les études se concentrent sur la conception de nouveaux systèmes nanoparticulaires. Récemment, l'auto-association de copolymères amphiphiles s'est révélée prometteuse en tant que système de vectorisation et a subi un essor important dans ce domaine. Composé d'un bloc hydrophobe et d'un second hydrophile, leur organisation micellaire en solution aqueuse induit une structure cœur/couronne. Tandis que le cœur hydrophobe permet de solubiliser des principes actifs, la couronne hydrophile peut stabiliser la micelle et améliorer sa biocompatibilité tout en assurant la protection de la molécule encapsulée.

L'objectif de ce projet est la conception de micelles polymériques originales pouvant être utilisées en tant que systèmes de vectorisation. Pour assurer l'efficacité de la délivrance du principe actif encapsulé, les vecteurs devront être capables de le libérer en réponse à une modification de leur environnement via l'utilisation de copolymères dits stimuli-sensibles. Dans ce but, deux stimuli ont été sélectionnés. D'une part, le pH en raison de la différence observée entre les cellules cancéreuses et saines. D'autre part, la température, puisqu'il est possible de l'élever localement lors de la thérapie (hyperthermie). Ces stimuli ont donc un intérêt important dans le domaine de la délivrance de principe actif, pouvant permettre un relargage contrôlé sur la zone cible.

Cette étude fait suite à une première thèse dans laquelle des micelles mixtes pH et thermosensibles ont été élaborées à partir de lipide-*b*-poly(acide acrylique) (L-PAA) et de lipide-*b*-poly(2-isopropyle-2-oxazoline) (L-PiPrOx). Ce système est stable en milieu acide quelle que soit la température et ne se déstabilise qu'en milieu basique au delà de 32 °C.

Les enjeux de ce travail de thèse sont donc multiples :

- Etudier la possibilité d'ajuster la température de déstabilisation des systèmes thermo-sensibles
- Faire varier la nature des blocs hydrophiles
- Obtenir un système qui serait stable en milieu basique et qui se déstabiliserait en milieu acide
- Obtenir des systèmes mixtes avec des chaînes hydrophiles de natures différentes

L'huile de lin modifiée a été choisie en tant que bloc hydrophobe afin de synthétiser des copolymères amphiphiles originaux car elle conduit à des systèmes dynamiques et devrait permettre d'améliorer la bioassimilation et la biocompatibilité des systèmes. De plus, le degré élevé d'insaturation présente dans les chaînes lipidiques qui la composent pourrait permettre ultérieurement la stabilisation du cœur des micelles via réaction de réticulation. De manière à favoriser la synthèse de systèmes bien définis, la polymérisation de monomères hydrophiles a été réalisée par RAFT et par CROP en raison du caractère vivant et contrôlé de ces techniques.

Ainsi, ce manuscrit est divisé en cinq chapitres. Dans le premier, une étude bibliographique portant sur les systèmes micellaires intelligents et les systèmes mixtes sera exposée afin de situer le contexte de ce projet.

Le chapitre deux sera consacré à la synthèse de copolymères thermo-sensibles de type polyoxazoline par CROP assistée par micro-onde et à l'étude de leur comportement en milieux aqueux.

L'étude de la synthèse et du comportement d'un second copolymère possédant un bloc hydrophile PDMAEMA et répondant à deux stimuli différents (pH et température) sera détaillée dans le chapitre trois.

Dans l'objectif de moduler ou de combiner les propriétés de chacun des copolymères synthétisés, la préparation de micelles mixtes et leur caractérisation fera l'objet du chapitre quatre.

Enfin le chapitre cinq portera sur l'étude de l'encapsulation et du relargage de molécules hydrophobes à partir d'une partie des systèmes précédemment synthétisés.

Chapitre I

Etude bibliographique

Introduction

A l'image des tensio-actifs conventionnels, les copolymères diblocs amphiphiles de composition adéquates peuvent s'auto-assembler en milieu aqueux sous forme d'objets de l'ordre du nanomètre, typiquement des micelles. Celles-ci se composent donc d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile. De nombreuses applications font appel à ce type de structure cœur-couronne telles que la stabilisation colloïdale, les systèmes de vectorisation ou encore les systèmes catalytiques. Cependant il est souvent difficile d'avoir un contrôle sur la désorganisation de ces micelles de polymères. Pour cela, une nouvelle classe de matériaux suscite beaucoup d'intérêt, les polymères dits « intelligents » ou encore stimuli-sensibles dont les propriétés physico-chimiques peuvent être adaptées en réponse à une modification de leur environnement. En particulier les copolymères pH- et thermo-sensibles, pour lesquels les conditions externes sont relativement faciles à modifier, peuvent être utilisés afin de créer des systèmes micellaires stimuli-sensibles. De plus, l'association des deux stimuli au sein d'un même système peut apporter un levier supplémentaire dans le contrôle de la stabilité des structures. Néanmoins la synthèse de copolymères à double stimulus peut parfois s'avérer fastidieuse. Ainsi, pour aller plus loin dans le contrôle des propriétés, une alternative novatrice consistant au mélange physique de copolymères présentant chacun une sensibilité à un stimulus donné permettrait de combiner sur un seul système micellaire à la fois des propriétés pH- et thermo-sensibles.

Cette étude bibliographique est donc divisée en trois parties, dans un premier temps, un rappel sur les généralités des systèmes micellaires sera effectué. La deuxième partie sera consacrée à l'auto-assemblage de copolymères « intelligents » et plus particulièrement, aux stimuli pH et thermique d'une part et à la combinaison de deux stimulus au sein d'un même copolymère d'autre part. Enfin, l'approche des micelles mixtes sera exposée au travers d'études théoriques sur la co-micellisation puis d'études expérimentales sur le mélange physique, notamment de systèmes pH et thermo-sensibles.

I. Auto-assemblage de molécules amphiphiles

1. Généralités sur les micelles

Les micelles classiques sont des systèmes colloïdaux dispersés formés par auto-assemblage de molécules amphiphiles appelées tensio-actifs (TA) (comportant une queue apolaire, hydrophobe et une tête polaire, hydrophile). En effet, en solution dans l'eau ces molécules adoptent une conformation qui vise à diminuer les interactions défavorables entre la partie hydrophobe et l'eau. Des systèmes généralement sphériques de l'ordre du nanomètre sont formés spontanément (Figure 1).

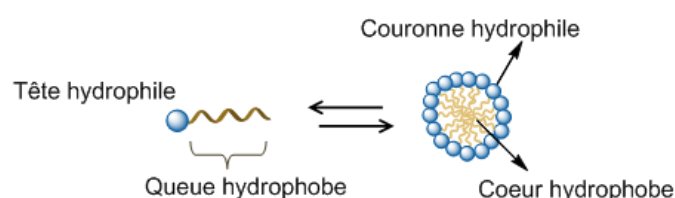


Figure 1 : Schéma d'un tensio-actif moléculaire et de son auto-assemblage en milieu aqueux

Ces systèmes appelés micelles de TA se composent d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile. Cependant, leur formation dépend de certaines conditions telles que la température et la concentration. Comme illustré dans la Figure 2, à faibles concentrations, les molécules amphiphiles sont dispersées de façon isolée dans l'eau. L'accumulation de TA à l'interface eau/air permet d'abaisser progressivement la tension de surface jusqu'à une valeur minimale correspondant à la saturation de l'interface. Au-delà de cette concentration, les TA vont s'organiser sous forme de micelles. Ainsi, on appellera cmc (concentration micellaire critique) la concentration à laquelle les micelles commencent à se former (Figure 2). [1] [2]

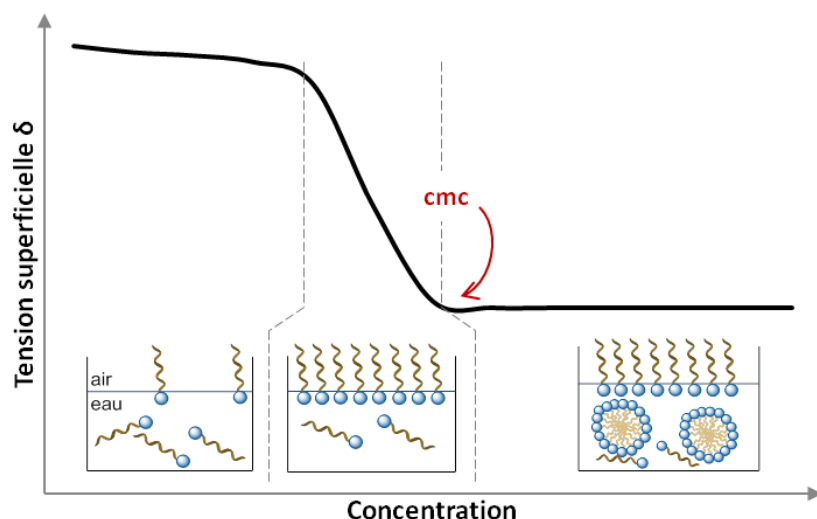


Figure 2 : Illustration de la formation des micelles de TA à partir d'une concentration appelée cmc et de l'évolution concomitante de la tension de surface.

L'intérêt des systèmes micellaires est leur capacité à solubiliser différents types de molécules (hydrophobe, hydrophile...). Leur application dans le domaine industriel est largement développée, notamment pour la solubilisation de corps gras ou de molécules hydrophobes par encapsulation au sein du cœur de la micelle (Figure 3).

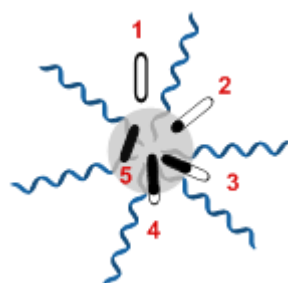


Figure 3 : Possibilité d'encapsulation d'une molécule dans une micelle. (1) Molécule hydrophile et soluble dans l'eau, (5) molécule hydrophobe et fortement insoluble dans l'eau, (2 à 4) molécule intermédiaire hydrophobe/hydrophile (position intermédiaire).

Leur capacité d'encapsulation est généralement de l'ordre de 5 à 25% en masse. Pour des applications pharmaceutiques, les micelles peuvent servir de cargo, mais doivent avoir certains prérequis tels que la taille. En effet pour la délivrance de principe actif au niveau intracellulaire, la taille des micelles de TA devra être autour de 10 nm afin de pénétrer dans les tissus et les cellules. [3]

Les cmc des micelles de TA classique sont de l'ordre du millimolaire, leur stabilité thermodynamique est faible et les micelles sont donc facilement dissociées par dilution. Ce phénomène engendre un problème pour leur utilisation en tant que système de vectorisation/utilisation *in vivo*. C'est pourquoi à l'image de l'auto-assemblage de petites molécules tensio-actives, de nombreuses recherches ont vu le jour afin de développer des macromolécules synthétiques capables de s'auto-assembler.

2. Des micelles de TA aux micelles macromoléculaires

Un copolymère amphiphile est issu de l'association de deux blocs de nature chimique différente, l'un hydrophile et l'autre hydrophobe. Par analogie avec des micelles de tensio-actifs, les copolymères amphiphiles sont capables de former des systèmes auto-associés de différentes formes dépendant de la masse molaire, de la taille des blocs et de leur rigidité, du solvant ou de la température. [4] Les polymères auto-associés sont eux aussi caractérisés par une cmc, les valeurs étant de l'ordre du micromolaire ou encore du nanomolaire ce qui leur confère une très bonne stabilité. [5]

Influence de la longueur des blocs : En fonction de la composition du copolymère, différentes structures peuvent être obtenues. Les longueurs relatives de la chaîne hydrophile et hydrophobe importent, c'est-à-dire la balance hydrophile/hydrophobe (HLB). En général, si la longueur du bloc hydrophile est plus grande que celle du bloc hydrophobe, il y a formation de particule sphérique de type cœur-couronne [5]. Si le bloc hydrophile est trop grand, il n'y a pas de formation de micelles, mais seulement existence d'unimère en solution. En revanche, une molécule possédant une chaîne hydrophobe longue va tendre vers une structure plutôt du type cylindrique ou lamellaire (Figure 4). [6]

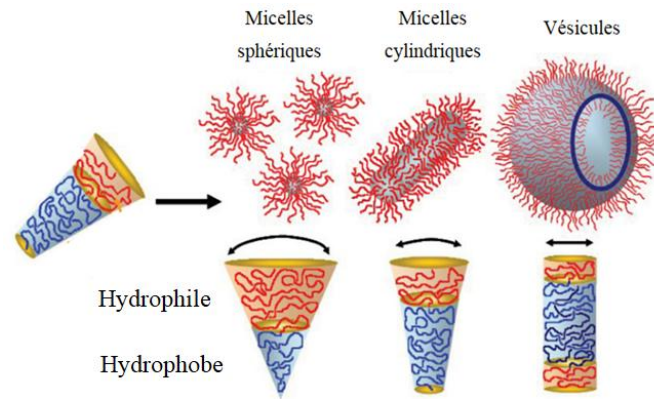


Figure 4 : Morphologies adoptées par les copolymères en solution en fonction de la longueur des blocs [7]

Influence de l'architecture du copolymère : La structure du copolymère va jouer un rôle important dans la formation finale des systèmes micellaires. Différentes structures capables de s'auto-assembler en milieu aqueux existent, la plus simple étant le copolymère dibloc de type A-B avec A la partie hydrophile (couronne) et B la partie hydrophobe (cœur). [8] Les copolymères triblocs de type A-B-A ou B-A-B existent aussi, historiquement un des plus connus est le poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(oxyde de propylène)-*b*-poly(oxyde d'éthylène) (PEO-*b*-PPO-*b*-POE). [4] Dans chacun des cas, les natures des micelles obtenues seront différentes (Figure 5).

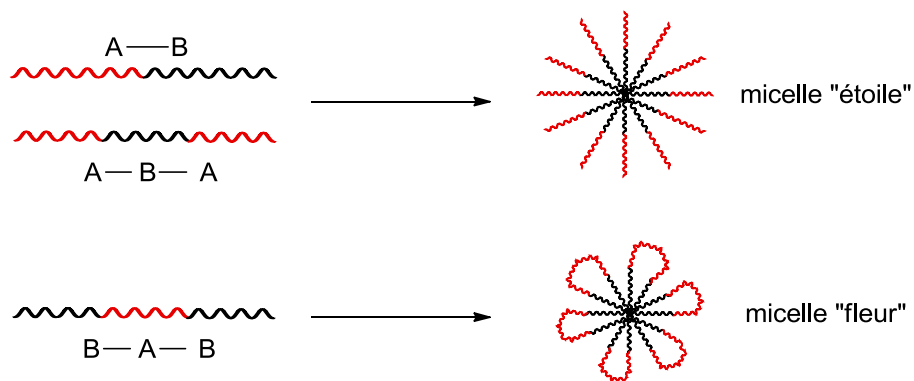


Figure 5 : Nature de micelle pouvant être obtenue

Les copolymères diblocs amphiphiles constituent les entités les plus simples et sont les plus étudiés. Cependant, une limitation réside quant à l'utilisation des micelles de copolymères comparées aux micelles de TA. Ces dernières étant des systèmes dits dynamiques, alors que les copolymères à bloc amphiphiles ne présentent pas toujours une dynamique d'échange unimères/micelles. Sans cet échange, les systèmes sont dits figés et les structures finales

obtenues dépendront fortement de la voie de préparation. Deux paramètres principaux déterminent la dynamique d'échange :

1) la température de transition vitreuse du cœur hydrophobe

Afin d'obtenir des systèmes dynamiques il est nécessaire d'utiliser un bloc hydrophobe possédant une T_g basse. En effet, si la T_g est trop élevée, le cœur des systèmes est vitreux figeant ainsi la structure (ex. avec le polystyrène (PS), $T_g = 104^\circ\text{C}$). Cependant, des études ont montré qu'une température de transition vitreuse faible était certes un paramètre nécessaire, mais non suffisant. Ainsi, à partir des copolymères amphiphiles à base de poly(acrylate de *n*-butyle) (PnBA) de $T_g = -55^\circ\text{C}$, [9] [10] ou encore de poly(éthylène propylène) (PEP) de $T_g = -56^\circ\text{C}$ [11] des structures gelées ont été obtenues.

2) La tension interfaciale ainsi que la longueur du bloc hydrophobe selon l'équation suivante introduit par Halperin *et al.* [12] :

$$E_a \propto \gamma_{B/\text{solvant}} N_B^{2/3}$$

Avec E_a la barrière énergétique associée au processus d'échange d'unimères, $\gamma_{B/\text{solvant}}$ la tension interfaciale entre le bloc hydrophobe et le solvant et N_B le nombre d'unités monomères consécutives du bloc hydrophobe.

Différents travaux confirment l'influence de la tension interfaciale sur la dynamique d'échange, on pourra citer en exemple ceux de Lund *et al.* [11] qui ont étudié l'équilibre d'échange du système poly(éthylène propylène)-*b*-poly(oxyde d'éthylène) (PEP-*b*-PEO). Ce dernier est rendu dynamique via l'ajout d'un solvant non sélectif (le DMF, 25%) permettant de diminuer la tension de surface entre le bloc hydrophobe PEP et l'eau (46 à 22 mN/m).

Une autre stratégie consiste à incorporer de façon contrôlée des motifs hydrophiles dans le bloc hydrophobe. Proposée dans un premier temps par Bendejacq *et al.* [13], [14] puis repris lors de plusieurs études notamment celles de Colombani *et al.*, [15] [16] cette stratégie permet la formation de systèmes dynamiques. En effet, l'incorporation de motifs d'acide acrylique (AA) (50%) dans le copolymère poly((acrylate de *n*-butyle)₅₀-*stat*-poly(acide acrylique)₅₀)₁₀₀-*b*-poly(acide acrylique)₁₀₀ permet la réorganisation du système en fonction du degré

d'ionisation du PAA. [16] De la même manière, l'ajout d'unité de méthacrylate de *N,N*-diméthylaminoéthyle (DMAEMA), dans le copolymère $P(nBMA_{50}\text{-}stat\text{-}DMAEMA_{50})_{100}\text{-}b\text{-}PDMAEMA_{235}$ permet la variation réversible du nombre d'agrégation en fonction du degré d'ionisation du DMAEMA (Figure 6). [15] Ainsi, le contrôle de la tension interfaciale entre le cœur hydrophobe et le solvant est possible en faisant varier l'hydrophobie du bloc insoluble.

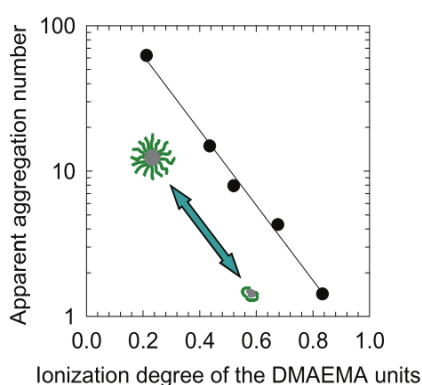


Figure 6 : Evolution du nombre d'agrégation apparent en fonction du degré d'ionisation des unités DMAEMA. [15]

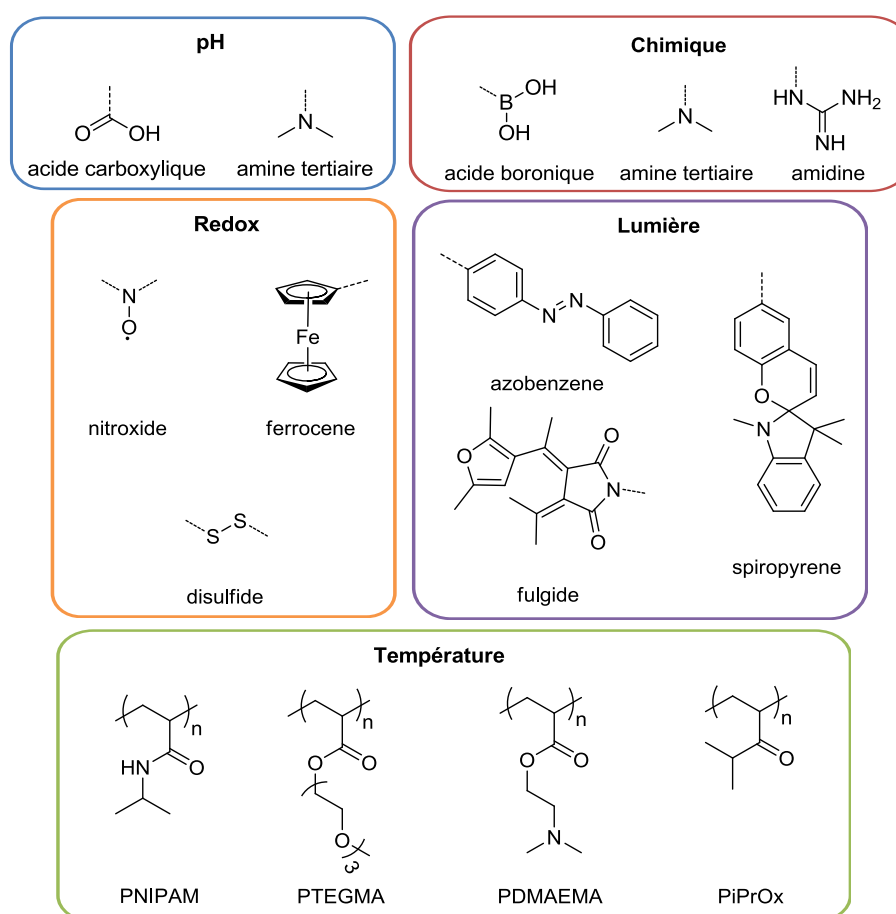
Depuis les premiers travaux de Strauss *et al.* sur l'étude de l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles via l'utilisation de la poly(2-vinyle pyridine) (P2VP) et sur leur capacité à solubiliser des molécules hydrophobes (aliphatique ou aromatique) en solution aqueuse [17], [18], les études sur les micelles de polymères se sont beaucoup développées. On les retrouve notamment dans le domaine biomédical pour la délivrance de principe actif du fait de leur excellente biocompatibilité, de leur faible toxicité, de l'amélioration du temps de circulation dans le sang et de leur capacité à encapsuler dans le cœur un grand nombre de principes actifs hydrophobes. [1] Dans une volonté d'aller toujours plus loin dans le contrôle des structures et donc des morphologies des systèmes, de nouveaux matériaux capables d'adapter leurs propriétés physico-chimiques en réponse à une modification de leur environnement suscitent beaucoup d'intérêt. Ces polymères stimuli-sensibles également appelés « intelligents » sont donc devenus une importante classe de polymères au cours de ces dernières décennies. En effet, le nombre de publications concernant les polymères intelligents a été multiplié par 10 sur ces 10 dernières années dans des domaines d'application variés tels que les capteurs chimiques, la biotechnologie et le biomédical. [19]

II. Auto assemblage de copolymères « intelligents »

La particularité d'un polymère stimuable est son changement de comportement lors d'une modification de son environnement. Ce changement qui peut être de nature physique ou chimique est le plus souvent réversible, il se traduit par une modification rapide de la microstructure du polymère (la forme, les caractéristiques de surface, la solubilité) par l'action d'un stimulus. [20] Il existe 2 grandes catégories de stimulus (Figure 7) : [21]

- Stimulus physique ou externe : température, lumière, champ magnétique ou électrique, ultrason...
- Stimulus chimique ou interne : pH, force ionique, molécules chimiques (réducteur par exemple le glucose)

Plus récemment, a été découvert un autre type de stimulus de nature biochimique qui agit de façon interne via l'action d'agent biochimique, d'enzyme, de ligand ou encore d'antigène. [22]



Généralement, l'utilisation des polymères intelligents peut se faire sous différentes formes: [23]

- en solution aqueuse (micelles, dendrimères...), les chaînes de polymères précipitent, s'agregent ou se dissocient sous l'action d'un stimulus
- adsorbés ou greffés sur une surface, le polymère peut s'étendre ou s'agréger sous l'action du stimulus et ce de façon réversible
- en réseau réticulé sous forme d'hydrogel, gonflement ou précipitation peuvent se produire. [21]

La littérature existante sur l'auto-association de copolymères amphiphiles « intelligents » est extrêmement vaste. Dans cette partie nous viserons donc plus à illustrer les différents types de comportement obtenus qu'à dresser un état de l'art exhaustif.

1. pH-sensible

Le pH est un stimulus chimique interne. Un polymère pH-sensible comporte une fonction acide (acide carboxylique ou sulfonique par exemple) ou basique (sels d'ammonium). Le groupement concerné est capable de se protoner ou déprotoner formant un polyélectrolyte de type polyanion ou polycation. Un changement du pH dans l'environnement d'un polymère comportant des groupements ionisables entraîne une modification du degré d'ionisation à une valeur spécifique appelée pKa. Ainsi, la variation de pH affecte les interactions ioniques, les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes et modifie donc la balance hydrophile/hydrophobe ce qui affecte la solubilité du polymère en milieu aqueux (les chaînes de polymère sont contractées ou étendues). De ce fait, un polyacide (ex. le PAA de pKa ~ 5) va s'étendre lorsqu'il se trouve à pH basique du fait de sa déprotonation. A l'inverse, une polybase (ex. le PDMAEMA de pKa ~ 7,5) mise en milieu acide va accepter des protons, la chaîne de polymère va donc s'étendre. [19]

1.1. Polyacide

Les polyacides faibles présentant une transition ionisation/déionisation dans des gammes de pH allant de 4 à 8 sont les plus couramment utilisés en tant que polymères pH-sensibles. Les polyacides comportant un groupement acide carboxylique avec un pKa

d'environ 5-6 tel que les poly(acide (méth)acrylique) (P(M)AA) sont les plus représentatifs. [24] Ce groupement ionisable libère les protons à pH élevé, le polymère est donc transformé en polyélectrolyte avec des forces de répulsion électrostatique entre les chaînes macromoléculaires. Ainsi ces forces de répulsions (qui peuvent être plus ou moins écrantées en présence de sel) couplées aux interactions hydrophobes permettent de gouverner la précipitation/solubilisation des chaînes. [25]

A titre d'exemple, le copolymère dibloc poly(styrène)-*b*-poly(acide acrylique), PS-*b*-PAA est l'un des premier copolymère utilisé pour créer un système pH-sensible à partir de PAA. [26] En milieu acide, le copolymère est insoluble dans l'eau, une augmentation du pH provoque la déprotonation des chaînes de PAA permettant ainsi l'auto-association du copolymère en solution. Différentes morphologies peuvent être obtenues selon la longueur de chaîne de PAA, le pH et la concentration en sel (Figure 8).

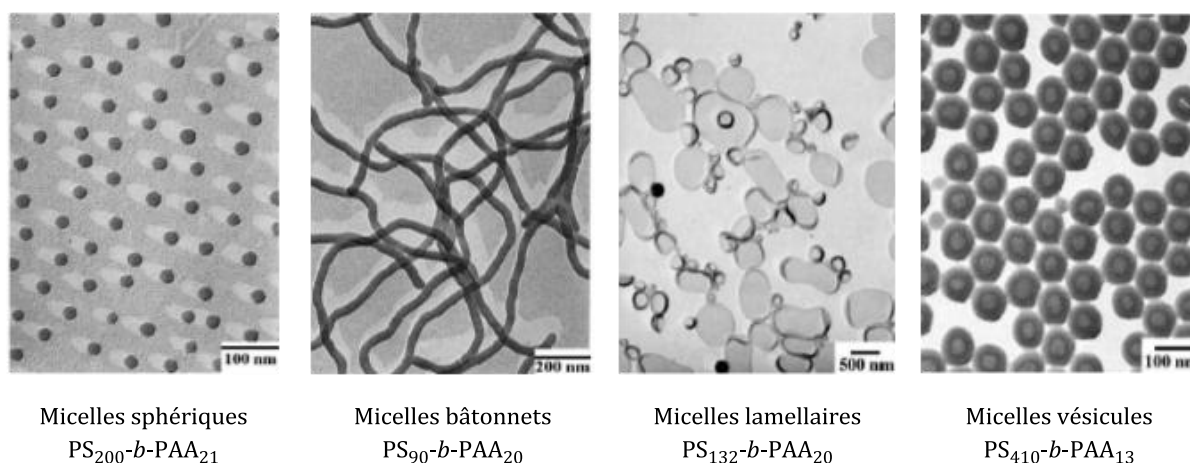


Figure 8 : Illustration des différentes morphologies adoptées en fonction de la longueur du bloc hydrophobe pour le copolymère PS-*b*-PAA. [26]

On retrouve également dans la littérature des polyélectrolytes avec des groupements de type sulfonamide (Figure 9) possédant une valeur de pH allant de 3 à 11 selon la nature électrophile du substituant de l'azote.[24] [27]

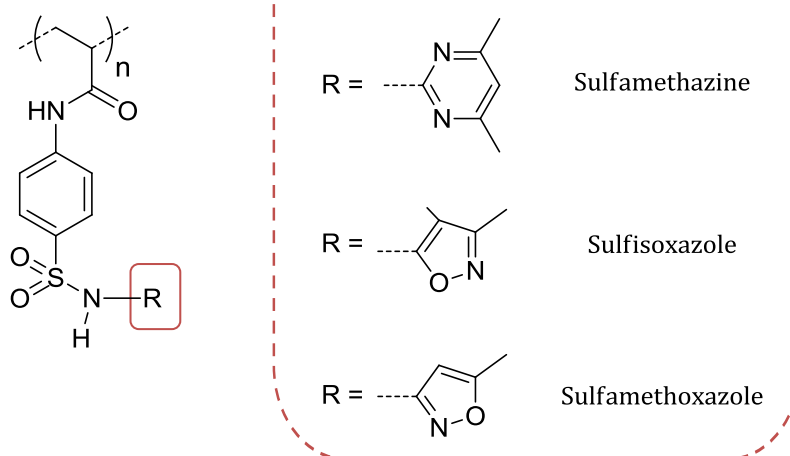


Figure 9 : Exemples de polymères de type sulfonamide

1.2. Polybase

A l'inverse d'un polyacide, une polybase est déprotonée à pH élevé et protonée à pH neutre et faible. Les groupements caractéristiques responsables de la transition ionisation/déionisation sont de type amine, pyridine ou encore imidazole. En tant que polybase, on peut citer de façon non exhaustive le poly(méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (PDMAEMA) et le poly(méthacrylate de diéthyle aminoéthyle) (PDEAEMA) possédant une fonction amine ionisable à pH inférieur à 7,5 et 7,3 respectivement et les poly(2- ou 4-vinylpyridine) (PVP) présentant une transition à $\text{pH} < 5$ avec déprotonation des groupements pyridines. [25] Un autre exemple, le poly(méthacrylate de *N*-éthyle pyrrolidine) (PEPyM) est illustré Figure 10.

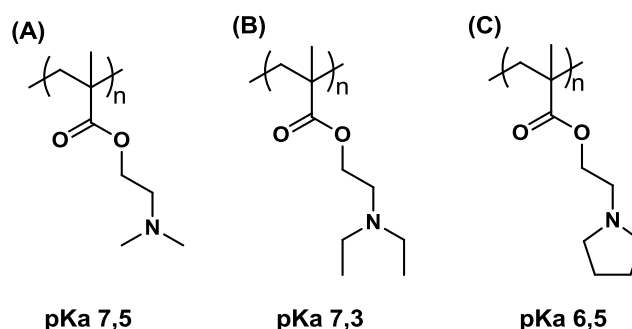


Figure 10 : Structure chimique de polybases : (A) PDMAEMA, (B) PDEAEMA, (C) PEPyM et leur pKa respectifs. [25], [28]

Le choix du polyélectrolyte se fera en fonction de l'application visée. Selon le système formulé (micellaire, hydrogel, film...), on retrouve des applications telles que la délivrance contrôlée de principe actif, [21] [29] l'ingénierie tissulaire, [23] la stabilisation de solutions colloïdales. [30]

La littérature étant de plus en plus conséquente sur les systèmes pH-sensibles, la suite de cette partie sera consacrée aux systèmes micellaires exclusivement.

1.3. Exemples de systèmes micellaires pH-sensibles

Comme préalablement mentionné, le comportement d'un système auto-assemblé peut être affecté par les propriétés pH-sensible du copolymère le constituant via la modulation de la balance hydrophile/hydrophobe. Selon les études, la variation de pH peut être utilisée pour générer la désorganisation de nanostructures en unimères [26] [31] ou encore pour modifier leur morphologie. [32]

La transition unimères/micelles a par exemple été observée pour le copolymère comportant un bloc PHEMA (poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle)) neutre et un bloc PDEAEMA ionisable. A faible pH les groupements amines sont protonés, le copolymère est totalement hydrophile, il y a seulement présence d'unimère en solution. Une élévation de pH permet de rendre le bloc PDEAEMA plus hydrophobe provoquant la formation de micelles avec un cœur PDEAEMA. [26]

Les systèmes pH-sensibles suscitent un intérêt, notamment dans le domaine biomédical du fait des différents pH rencontrés dans le sang, les organes, les cellules par exemple. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées aux systèmes micellaires formés par un cœur hydrophobe et une couronne hydrophile pH-sensible et à leur transition morphologique. Par exemple, Car et *al.* ont étudié le relargage de la doxorubicine (DOX) sur le copolymère PDMS-*b*-PDMAEMA (Figure 11). La diminution de pH permet une modification de la morphologie du copolymère associé avec présence d'un système monomodal de 192 nm à pH 7,4 et bimodal (165 et 62 nm) à pH 5. La désorganisation en unimères n'est donc pas observée mais le relargage de la DOX est beaucoup plus rapide à pH 5 (> 80% au bout de 2 h contre 10% à pH 7,4). [33]

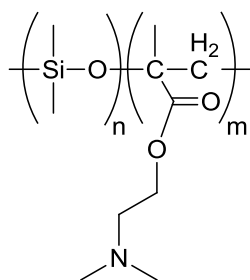


Figure 11 : Structure du copolymère PDMS-*b*-PDMAEMA étudié par Car *et al.* [33]

Dans notre équipe, de récentes études ont été réalisées sur le copolymère lipide-*b*-PAA et la transition unimères/micelles a été observée. Ainsi, à pH 4,6, les chaînes de PAA sont totalement protonées, le copolymère se trouve sous forme de micelles de l'ordre de 10 nm. Une élévation de pH à 10 provoque l'ionisation des groupements carboxylique, le système se dissocie et se retrouve sous forme d'unimère. [34]

Tan *et al.* [35] ont étudié le comportement pH-sensible du système amphiphile PMAA-*b*-[60]fullerène (PMAA-*b*-C60). Différentes microstructures ont été observées, à pH acide, le PMAA totalement protoné rend le système insoluble et on observe des agrégats compacts de l'ordre de 80-120 nm. Lorsque le pH augmente, les auteurs observent l'ionisation des chaînes de PMAA, ainsi la solubilité du copolymère dans l'eau augmente et les fortes répulsions électrostatiques entre les charges négatives favorisent l'étirement de la couronne hydrophile. L'auto-association sous forme micellaire (125-165 nm) a donc lieu. De plus, cette étude montre que l'ajout de NaCl à différents degrés d'ionisation permet d'obtenir des morphologies variables par association de plusieurs structures micellaires (Figure 12).

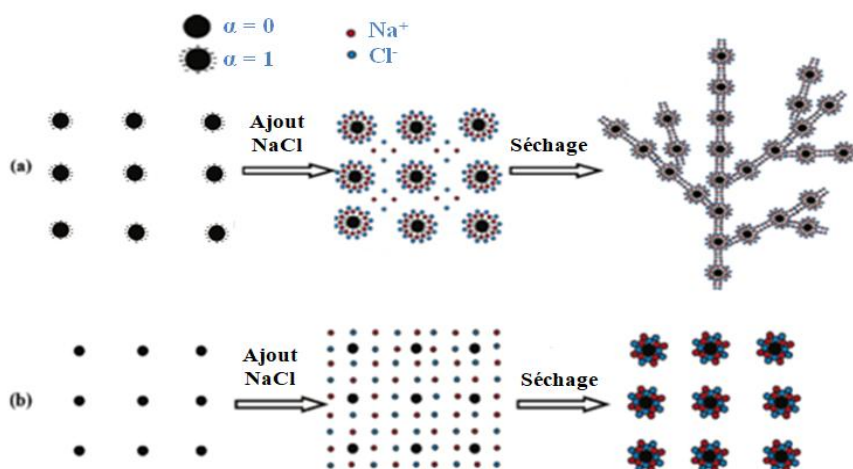


Figure 12 : Mécanisme proposé pour les morphologies adoptées en fonction de l'ajout de NaCl à des degrés d'ionisation (a) $\alpha = 1$ (charge négative) et (b) $\alpha = 0$ (neutre). [35]

1.4. Modulation des propriétés pH-sensible

La modulation des propriétés pH-sensibles d'un copolymère permet d'obtenir des systèmes correspondants au mieux à l'application visée. Plusieurs études par exemple se sont penchées sur la modification de polymère cationique diminuant ainsi le pKa pour correspondre au pH physiologique. Le pKa peut être modulé de deux manières :

- 1) Par introduction d'unité hydrophobe au sein du polymère. En effet, la transition de phase due au changement de pH est gouvernée par la balance entre les répulsions électrostatiques et les interactions hydrophobes. Chen *et al.* [36] ont montré que, sur un système poly(vinylamine) (PVAm) hydrophobiquement modifié à différents degrés de substitution, le pH nécessaire à la protonation du polymère diminue lorsque l'hydrophobie augmente (Figure 13).

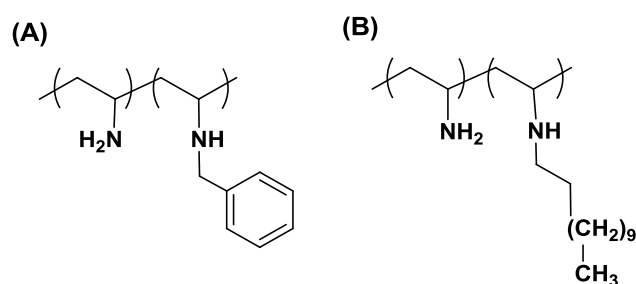


Figure 13 : PVAm modifié par un groupement (A) benzyle (PVBA) et (B) alkyle (PVAA) dans les travaux de Chen *et al.* [36]

- 2) Par ajout d'unités ionisables dans le polymère pH-sensible formant ainsi un polyampholyte de type AB possédant une double réponse au pH. Ces derniers composés d'un polyacide et d'une polybase ont la particularité de former à la fois des micelles conventionnelles (le bloc A formant le cœur) et des micelles inverses (avec B au cœur) par simple modification du pH. Du fait de ce changement de comportement, ces copolymères sont décrits comme ayant un caractère « schizophrène ». [37] En effet, l'auto-association du copolymère peut donner lieu à deux différentes structures micellaires sans l'utilisation de solvant sélectif à chacun des blocs, mais seulement par variation du pH.

Liu et Armes ont été parmi les premiers à montrer la capacité d'un polyampholyte à former des micelles et des micelles inverses en milieu aqueux uniquement. [38] Le copolymère dibloc (PVBA-*b*-PDEAEMA) a été étudié sachant que les deux blocs sont hydrophobes autour d'une valeur appelée point isoélectrique PIE (pH 7,4) ; grandeur caractéristique des polyampholytes. Le PIE correspond au pH pour lequel le copolymère est électriquement neutre du fait de la compensation des charges. À pH 2, la protonation du PDEA entraîne sa solubilité dans l'eau, il constitue alors la couronne des micelles alors que le PVBA est au cœur. À l'inverse, à pH 10 le bloc de PDEAEMA hydrophobe forme le cœur tandis que le PVBA devient hydrophile du fait de l'ionisation du bloc (Figure 14).

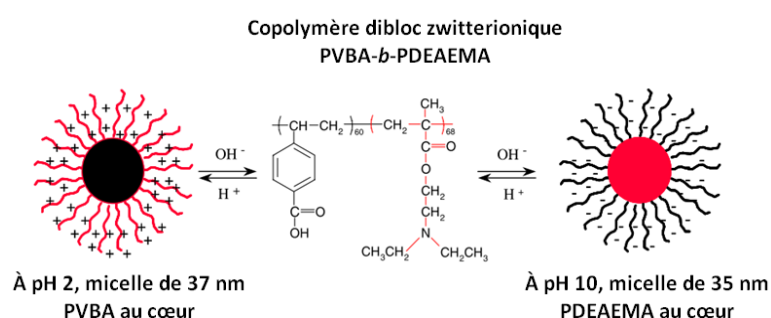


Figure 14 : Formation de micelles et micelles inverses du PVBA-*b*-PDEAEMA en fonction du pH appliqué [37]

De façon intéressante, sur ce système, la substitution du bloc PDEAEMA par le poly(méthacrylate de 2-(*N*-morpholino)éthyle) (PMEMA) (pKa 4,9) ne permet pas l'obtention de micelle inverse contenant le PMEMA au cœur lors de l'augmentation de pH au-dessus de 6, le copolymère reste sous forme d'unimère en solution. De plus, aucune précipitation n'est observée à l'approche du PIE ($\approx 6,2$) du fait de la faible densité de charge présente sur les blocs PVBA et PMEMA. En revanche, par ajout de sel en quantité suffisante (Na_2SO_4 , 0,8M), la précipitation survient et la formation de micelles en milieu basique a lieu. [39]

Dans certains cas, l'influence du pH sur les copolymères ampholytes peut induire une forte variation de tailles des micelles. Le copolymère dibloc $\text{PMAA}_{95}\text{-}b\text{-PDEAEMA}_{65}$ par exemple [40] forme des micelles au cœur PMAA en milieu acide ($\text{pH} < 5,5$) de rayon hydrodynamique (R_h) 70 nm et la présence concomitante d'unimères de 2,7 nm (8 w%) est observée. En milieu basique ($\text{pH} > 9,5$), on observe uniquement des micelles au cœur PDEAEMA avec un R_h de

17,5 nm. Ce comportement est expliqué par une différence de compacité entre le PDEAEMA à pH basique et le PMAA à pH acide (moins compact) (Figure 15).

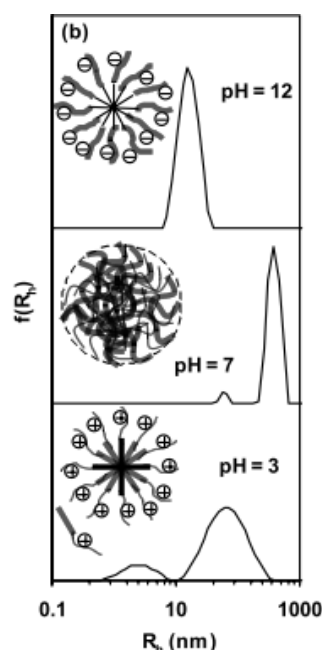


Figure 15 : Graphiques DLS et illustration des différentes structures possibles pour le copolymère PMAA₉₅-*b*-PDEAEMA₆₅ en fonction du pH. [40]

Le même phénomène a été observé par Zou *et al.* sur le copolymère à bloc poly(acide 3-acrylamidophényle boronique)-*b*-poly(acrylamido éthylamine) PAPBA-*b*-PAEA (Figure 16). Les structures formées passent de nanoparticules de 70nm à pH acide à un mélange métastable micelles/agrégats pour un pH entre 6 et 8. Lorsqu'on se rapproche du PIE (9,5), les deux blocs sont chargés, la précipitation survient du fait des interactions électrostatiques attractives. À pH plus élevé, on retrouve des micelles de l'ordre de 80-100 nm. [41]

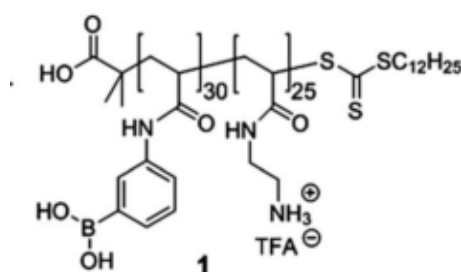


Figure 16 : Structure chimique du PAPBA-*b*-PAEA. [41]

1.5. Conclusion

Il est possibles d'obtenir une variété de systèmes micellaires pH-sensibles et d'en moduler le comportement grâce à une modification de son environnement. De part le choix du polyélectrolyte (polybase ou polyacide), le domaine d'application de ces systèmes reste très varié. Mis à part les stimuli chimiques (internes), les stimuli physiques externes peuvent également permettre la construction et la modulation de systèmes micellaires. L'un des plus étudiés dans la littérature et que nous allons détailler par la suite est la température.

2. Thermo sensible

2.1. Introduction au comportement thermo-sensible

La température est un des stimuli externes le plus couramment utilisé car relativement facile à contrôler. Le comportement thermosensible des polymères repose sur la nature intrinsèque des interactions solvant/chaînes de polymère et chaînes de polymère entre elles (liaisons hydrogènes et liaisons hydrophobes). Un polymère thermo-sensible est caractérisé par une température critique basse de solubilité (ou LCST pour Low Critical Solubility Temperature) en dessous de laquelle le polymère est hydrosoluble du fait des interactions hydrogènes qui prédominent alors qu'au-dessus de la LCST, il y a séparation de phase due aux interactions hydrophobes. [42] Cette transition hydrophile-hydrophobe illustrée Figure 17, peut dépendre de la concentration en polymère. Ainsi en travaillant à concentration fixe, on parlera plutôt de température de point trouble (T_{PT}).

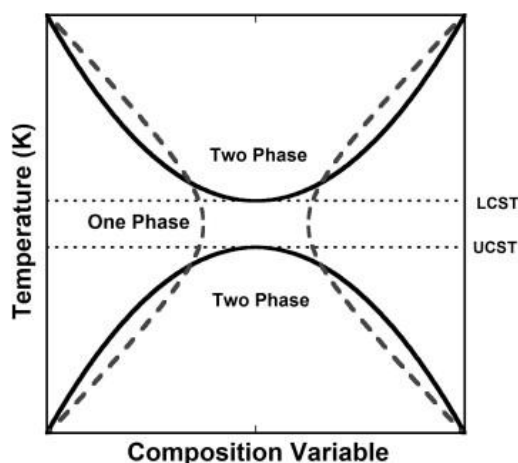


Figure 17 : Diagramme de phase illustrant la LCST et l'UCST d'un polymère [43]

Par analogie à la LCST, il existe une température critique haute de solubilité (ou UCST pour Upper Critical Solubility Temperature) au-dessus de laquelle le polymère est totalement hydrosoluble (Figure 17).

Tableau 1 : Principales familles de polymères thermo-sensibles retrouvées dans la littérature [44]

Famille	Polymère	Abréviation	LCST (°C)	Réf.
Poly(oxyde d'alkyle)	Poly(oxyde d'éthylène)	PEO	100-175	[45]
	Poly(oxyde de propylène)	PPO	-5	[46]
	Poly(méthyle éther de vinyle)	PVME	34	[47], [48]
Poly(N-acrylamide)s	Poly(acrylamide)	PAAM	Soluble	[49]
	Poly(N-éthyle acrylamide)	PEAM	82	[49]
	Poly(N-isopropylacrylamide)	PNIPAM	30-35	[50], [51]
	Poly(N,N-diéthyle acrylamide)	PDEAM	32	[49], [52]
	Poly(N-tert-butylacrylamide)	PtBAM	Insoluble	[49], [52]
	Poly(2-éthyle-2-oxazoline)	PEtOx	62-65 (soluble pour $X_n < 100$)	[53], [54]
Poly(oxazoline)s	Poly(2-isopropyle-2-oxazoline)	PiPrOx	36-39	[54]
	Poly(n-propyle-2-oxazoline)	PnPrOx	24-43	[53]
	Poly(cyclopropyle-2-oxazoline)	PcPrOx	30-54	[55]
	Poly(méthacrylate de diéthyle aminoéthyle)	PDMAEMA	30-70	[56]–[59]
Poly(méthacrylate d'aminoalkyle)				
Poly(caprolactam de N-vinyle)		PVCL	32	[60]–[62]
Poly(N-vinyl pyrrolidone)		PVP	170	[61]
Poly(peptide)s	Poly(peptide)s type Elastine	ELPs	20-90	[63], [64]

Tout comme les systèmes pH sensibles, de nombreuses applications utilisent les propriétés thermo-sensibles des polymères. Ils ont été étudiés pour la délivrance de principe actif, la séparation de soluté, l'extraction de solvant, la purification de protéines ou encore les systèmes catalytiques. [65] Le Tableau 1 ci-dessus rassemble les principales familles de polymères thermo-sensibles rencontrées dans la littérature.

2.2. Copolymères diblocs thermo-sensibles

2.2.1 Copolymère dibloc présentant une seule thermo-sensibilité

Les copolymères diblocs thermo-sensibles peuvent se présenter sous deux formes, un bloc thermo-sensible associé à un bloc non thermo-sensible de nature hydrophile ou un bloc thermo-sensible associé à un bloc non thermo-sensible hydrophobe (Figure 18). Selon le cas de figure, l'association en milieu aqueux des copolymères diffère. En effet, l'association d'un thermosensible avec un bloc hydrophile amène à un copolymère totalement hydrophile en dessous de la LCST et donc présent sous forme d'unimères dans l'eau, et qui au-dessus de la LCST va s'organiser sous forme micellaire (ex. PEO-*b*-PNIPAM [66]) du fait de l'apparition d'un bloc hydrophobe. En revanche, l'association à bloc hydrophobe conduit à un copolymère amphiphile qui s'auto-assemble sous forme de micelles en dessous de la LCST et donnera lieu à une transition micelle-agrégats lorsque l'on dépasse la LCST (Figure 18).

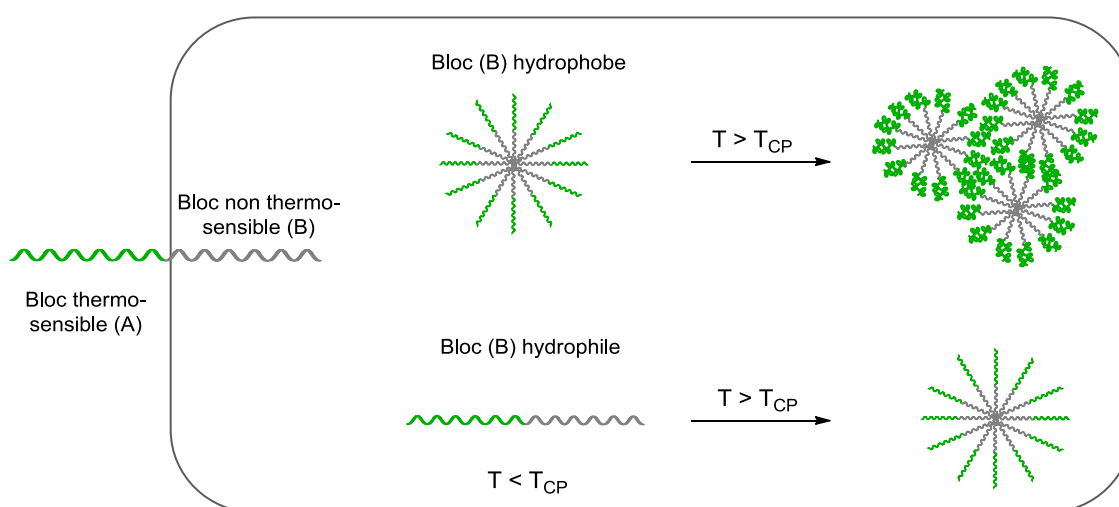


Figure 18 : Illustration du comportement thermo-sensible d'un copolymère dibloc selon la nature du second bloc

Historiquement, le plus utilisé des polymères thermo-sensibles est le PNIPAM, du fait de sa LCST de 30-34°C, [67], [68] proche de la température du corps humain et donc ayant un potentiel dans le domaine biomédical. Cependant, le PNIPAM reste non biodégradable et le monomère utilisé pour sa polymérisation est connu comme étant toxique. [69] Pour pallier ce problème, d'autres copolymères diblocs thermo-sensibles à partir de PEG ou encore de poly(oxazoline) (POx) sont de plus en plus développés.

Les études sur le PNIPAM vers la formation de systèmes micellaires sont très nombreuses et variées, il constitue généralement la couronne micellaire thermo-sensible tandis que le bloc hydrophobe non thermo-sensible constitue le cœur des micelles. Dans ce type de système, la contribution du bloc hydrophobe va avoir pour effet d'altérer la LCST du PNIPAM comme démontré par Hoffman *et al.* [70]. Une diminution linéaire de la LCST en fonction de la composition en *n*-butylacrylamide (*n*BAM) est observée sur le système PNIPAM-*b*-P*n*BAM et la LCST du copolymère chute à 5°C en présence de 5% de monomère hydrophobe *n*BAM. Le même phénomène a été observé par Obeid *et al.* [71] puis récemment dans notre groupe par Hespel *et al.* [72] sur un autre type de polymère thermo-sensible, la poly(2-isopropyle-2-oxazoline) modifié par une chaîne alkyle C18.

La contribution de l'addition d'un bloc hydrophile sur un copolymère thermo-sensible a également été beaucoup étudiée, dans ce cas le phénomène inverse se produit puisque l'augmentation de la nature hydrophile du polymère entraîne l'augmentation de la formation de liaisons hydrogène entre les chaînes de polymères et le solvant, celle-ci sont stabilisées ce qui retarde la LCST. [70], [73]

Ainsi, il est possible de moduler la LCST des systèmes en faisant varier le caractère hydrophile/hydrophobe du copolymère, cependant une autre voie de plus en plus étudiée ces dernières années, celle de la polymérisation avec un second monomère (co-monomère) thermo-sensible, ouvre de nouvelles perspectives pour ces systèmes « intelligents ».

2.2.2 *Copolymères dibloc comportant deux blocs thermo-sensible*

Deux blocs polymères présentant deux LCST différentes peuvent être combinés afin de moduler la LCST. Deux cas de figure sont alors possibles :

- soit le copolymère résultant présente une seule LCST et dans ce cas, elle se trouvera entre celle des deux homopolymères via la relation suivante :

$$T = \frac{\mu_1 T_1 + K \mu_2 T_2}{\mu_1 + K \mu_2}$$

Avec μ_1 et μ_2 les fractions molaires des monomères 1 et 2 respectivement, T_1 et T_2 , les LCST des homopolymères correspondants et K un paramètre déduit par extrapolation de la courbe expérimentale ($T = f(\mu)$), une valeur de $K = 1$ équivaut à une relation linéaire entre la composition et la LCST. [74]

- soit le copolymère résultant présente différentes LCST correspondant plus ou moins à celles des homopolymères. Cependant, il peut être difficile de détecter les différentes LCST car (i) les transitions sont trop proches pour être détectées individuellement, (ii) l'enthalpie associée à la précipitation de chacun des blocs est trop faible, (iii) la précipitation a lieu trop rapidement. Dans ces cas là, il est intéressant de coupler plusieurs techniques d'analyse (spectroscopie UV-visible, RMN, UH-DSC...). [74]

Pour rappel, la température de transition d'un copolymère peut être de type LCST ou UCST. Les blocs constituant les copolymères à double thermo-sensibilité peuvent être caractérisés par l'une ou l'autre de ces températures. Il existe donc deux types de copolymères, ceux avec différentes LCST et ceux présentant une LCST et une UCST.

2.2.2.a. Copolymères avec différentes LCST

Depuis une dizaine d'années, les études se développent sur les copolymères diblocs ou triblocs de types AB, ABA ou ABC possédant des blocs de LCST indépendantes. Selon la température, le copolymère est soluble, insoluble ou forme des systèmes colloïdaux. Mertoglu *et al.* ont étudié sur le système poly(NIPAM-*b*-N-acryloylpyrrolidine) les transitions hydrophiles-amphiphile-hydrophobes. Au-dessus de la première LCST de 30°C, le PNIPAM est déshydraté et forme le cœur des micelles. La couronne composée d'unité acryloylpyrrolidine est stable jusque 41°C. Au-dessus de cette deuxième transition, la structure devenue totalement hydrophobe s'agregé. La première LCST correspond à celle de l'homopolymère PNIPAM, en revanche, la seconde est 10°C inférieure à celle de

l'homopolymère poly(acryloylpyrrolidine) du fait de l'hydrophobie apportée par le premier bloc thermo-sensible. [75] Ce comportement a également été observé par Kotsuchibashi *et al.* sur le copolymère PNIPAM-*b*-poly(NIPAM-*co*-*N*-(hydroxyméthyle)acrylamide) (HMAAM). Ce dernier présente une première LCST à 35°C et une seconde variable en fonction de sa proportion. L'étude du comportement thermo-sensible du copolymère leur a permis de constater que plus la proportion d'HMAAM augmente, plus la seconde LCST augmente du fait de l'accroissement de l'hydrophilie. Ainsi, à partir d'une certaine composition en HMAAM (52%mol), l'hydrophilie du système est telle qu'une seule transition de phase, correspondant à celle du PNIPAM, est visible en spectrophotométrie UV-vis (Figure 19) et en RMN. [76] [77] Le phénomène inverse a également été démontré sur d'autres natures de copolymère tel que le PNIPAM-*b*-P(NIPAM-*co*-*N*-(isobutoxyméthyle)acrylamide) (BMAAM) pour lequel l'augmentation de l'hydrophobie du copolymère (par ajout d'unité BMAAM) mène vers un système à deux transitions de phase. [78]

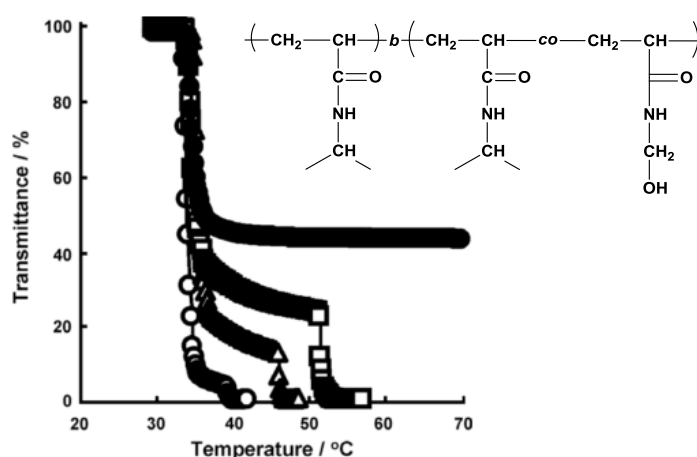


Figure 19 : Influence de la proportion en HMAAM sur la LCST du copolymère PNIPAM-*b*-poly(NIPAM-*co*-HMAAM). (●) 52%, (□) 34%, (Δ) 22%, (⊙) 10%.

Les copolymères statistiques et à gradients composés d'unités sensibles aux changements de température permettent d'étendre le champ d'application des polymères thermo-sensibles. Ces derniers étant plus homogènes en composition, une seule température de transition est observée. [73] Soga *et al.* ont par exemple étudié une récente classe de polymères thermo-sensible et biodégradable, le poly(*N*-(méthacrylamide de 2-hydroxypropyle)) (HPMAM). Le p(HPMAM-monolactate) et le p(HPMAM-dilactate) ont été synthétisés (Figure 20), ils présentent en milieu aqueux des T_{PT} de 65 et 13 °C respectivement, la faible température de

transition de ce dernier étant due à la forte hydrophobie du groupement dilactate. Leur copolymérisation statistique permet la variation de la T_{PT} avec une augmentation linéaire de 10 à 65 °C en fonction de la proportion en HPMAM-monolactate. [79]

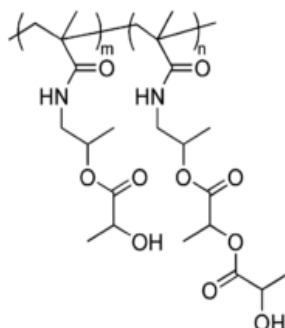


Figure 20 : Structure du p(HPMAM-monolactate) pour $n = 0$, p(HPMAM-dilactate) pour $m = 0$ et p(HPMAM-monolactate-co-HPMAM-dilactate) pour $m, n \neq 0$. [79]

Park et Kataoka [80] ont synthétisé une gamme de copolymères à gradient poly(isopropyle oxazoline-grad-éthyle oxazoline) (poly(*i*PrOx-grad-EtOx)) de différentes compositions en EtOx afin de contrôler précisément la T_{PT} . Ainsi, une augmentation linéaire de 38 à 67°C est observée pour une composition en EtOx allant de 0 à 75% mol due à l'hydrophilie mais aussi à la T_{PT} plus élevées de l'EtOx comparé à l'*i*PrOx.

2.2.2.b Copolymères avec une LCST et une UCST (copolymères thermosensibles schizophrènes)

Une particularité des copolymères présentant à la fois une LCST et une UCST est leur capacité à former des structures « schizophrènes ». Le premier exemple de micelles « schizophrènes » entièrement thermo-sensible a été introduit par Arotçaréna *et al.* avec le système PNIPAM-*b*-PSBAm (poly(hydroxide de 3-(methacryloylamino)propyle diméthyle (3-sulfopropyle) ammonium) (Figure 21). Les deux blocs du copolymère sont hydrosolubles entre les deux températures de transitions caractéristiques à savoir l'UCST du PSBAM à 20°C et la LCST du PNIPAM à 34°C. Les analyses RMN ^1H et la fluorescence par sonde 2-anilidonaphtalène confirment la formation de structures micellaires avec un cœur PSBAM en dessous de 20°C et un cœur PNIPAM au-dessus de 34°C. [81] La taille des particules et le mécanisme d'agrégation de ce même système ont été étudiés peu après par Virtanen *et al.* Ils

ont démontré par DLS notamment que la concentration en copolymère et celle en NaCl ajouté influaient fortement sur le processus d'aggrégation et la distribution des particules. L'ajout de sel augmente la solubilité du bloc ionique PSBAM mais diminue celle du PNIPAM. Ainsi, le poly(sulfobétaine) étant un polymère zwitterionique, sa UCST est provoquée par des interactions charge-charge ou dipôle-dipôle au niveau du groupement bétaine. Sa solubilité sera donc naturellement favorisée par addition de sel qui aura également pour effet la disparition de son caractère thermosensible (observée pour une $C_{\text{NaCl}} > 0,05 \text{ M}$). [82]

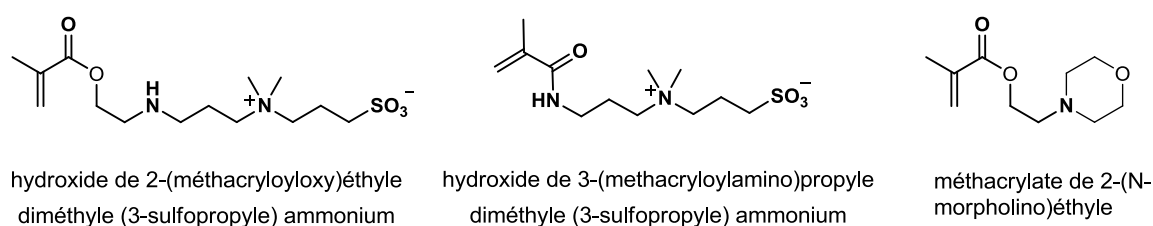


Figure 21 : Structure des monomères de méthacrylate de sulfobétaine (SBMA), méthacrylamide de sulfobétaine (SBAm) et méthacrylate de 2-(N-morpholino)éthyle

Dans le même temps, Weaver et *al.* ont synthétisé le second copolymère « schizophrène » purement thermo-sensible poly(hydroxide de 2-(méthacryloyloxy)éthyle diméthyle (3-sulfopropyle) ammonium)-*b*-poly(méthacrylate de 2-(N-morpholino)éthyle) (PSBMA-*b*-PMEMA) (Figure 21). Ils ont démontré sur ce système une structure monodisperse en dessous et au-dessus des températures de transition (UCST 20°C et LCST 50°C). De façon intéressante, les analyses par DLS et par SANS (Small Angle Neutron Scattering) montrent que les micelles composées d'un cœur PSBMA sont anisotropes, non sphériques de l'ordre de 50 nm alors que celles possédant un cœur PMEMA et stabilisées par une couronne PSBMA sont sphériques (39-45 nm). Les auteurs expliquent ce comportement par le fait que le cœur neutre formé par le PMEMA est plus hydrophobe que celui formé par le bloc ionique PSBMA (Figure 22). [83] [37]

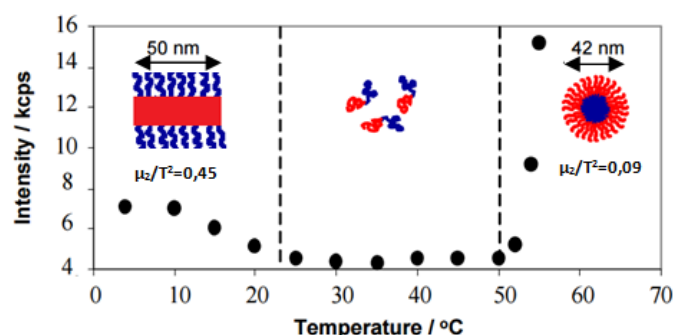


Figure 22 : Différentes morphologies obtenues pour le copolymère di bloc PSBMA-*b*-PMEMA en fonction de la température d’après les analyses DLS. [83]

Du fait de la présence de sites anionique et cationique dans la structure des copolymères à base de sulfobetaine, le comportement de ceux-ci est fortement affecté par l’ajout de sel. Pour pallier cette limitation, des études sur les copolymères non ioniques mettant en jeu des interactions via des liaisons hydrogènes se sont développées. Pour ce type de copolymère, le mécanisme qui engendre l’UCST vient de la balance entre le groupement donneur d’hydrogène (par ex., N-H) et celui accepteur d’hydrogène (par ex., O).

Dans les travaux de Zhang *et al.* le copolymère poly((acrylamide-*co*-acrylonitrile)-*b*-(methacrylate de diméthylaminoéthyle)), p(AAm-*co*-AN)-*b*-PDMAEMA, présente un comportement de type UCST-LCST, il est hydrosoluble sous forme d’unimères entre 22 et 41°C correspondant à la UCST du p(AAm-*co*-AN) et à la LCST du PDMAEMA respectivement (Figure 23). Les auteurs se sont appuyés sur différentes techniques afin de confirmer la formation de micelles et de micelles inverses en dehors de ces températures (turbidimétrie, DLS, RMN ^1H). [84]

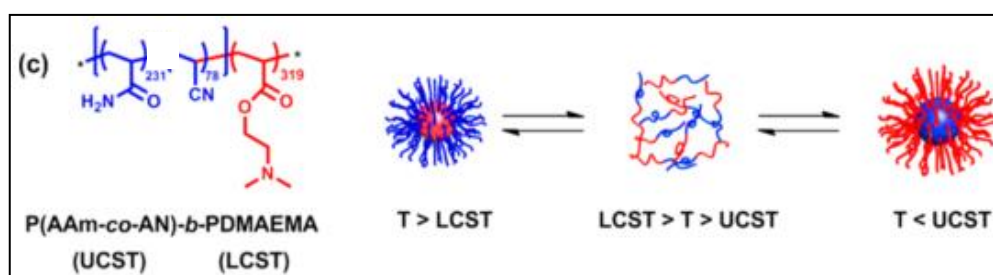
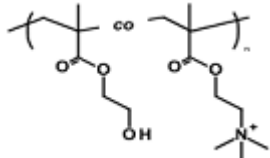
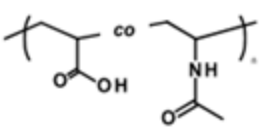
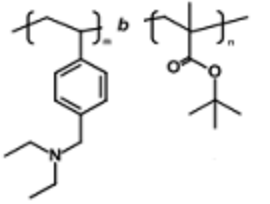
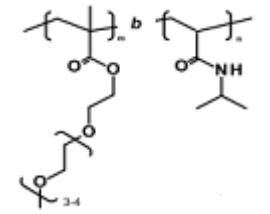
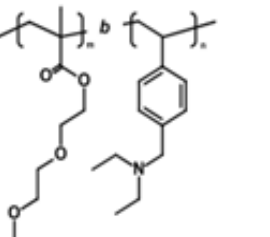
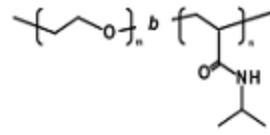
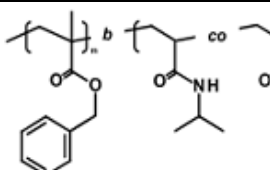


Figure 23 : Représentation schématique de la formation des micelles en fonction de la LCST et l’UCST. [84]

Les copolymères à blocs de type UCST-LCST peuvent aussi avoir des propriétés thermo-sensibles dans des milieux organiques ou encore dans des liquides ioniques. Ils sont utilisés en catalyses, dans les batteries et les matériaux durables par exemple (Tableau 2). [85] [86] [87]

Tableau 2 : Milieu d'étude des copolymères de type UCST-LCST

Milieu d'étude	Dénomination	Structure
Type UCST-LCST en solution aqueuse	P(HEMA-co-MOETAC)	
	P(AA-co-NVA)	
Type UCST-LCST en solution alcoolique	P(VEA-b-PtBA)	
Type UCST-LCST en mélange eau/alcool	P(OEGMA-b-NIPAM)	
	P(MEO ₂ MA-b-VEA)	
Type UCST-LCST en milieu liquide ionique	P(EO-b-NIPAM)	
	P(BnMA)-b-P(NIPAM-co-AAm)	

A l'image des copolymères à double thermo-sensibilité, il est possible de combiner plusieurs stimuli différents dans un même copolymère. La combinaison de stimuli physique et chimique pour des polymères « intelligents » est l'une des plus étudiées et attire beaucoup l'attention récemment du fait de la possibilité de faire varier le contrôle des propriétés. Le pH et la température étant les deux stimuli fréquemment rencontrés, leur combinaison au sein d'un même copolymère permet d'améliorer la versatilité de ces systèmes. De part les variations de pH et de température rencontrées dans le corps humain, ces systèmes ont de plus un intérêt particulier pour le domaine de la vectorisation.

3. Double stimuli pH et thermo-sensibles

3.1. Introduction

Théoriquement, toutes les combinaisons de deux stimuli sont possibles pour obtenir un polymère présentant une double sensibilité. L'avantage est la présence de plusieurs groupements répondant à une modification de l'environnement extérieur au sein d'un seul et même polymère. Cette combinaison de plusieurs stimuli peut engendrer une réponse selon trois mécanismes : [19]

- **En parallèle** : la réponse d'un groupe n'affecte pas l'autre, les réponses se font de façon indépendante. (ex. : PNIPAM modifié par le fulgimide, groupement sensible à la lumière). [88]
- **En série** : la réponse au premier stimulus impacte sur le second, c'est le plus communément utilisé. (ex. : au sein d'un copolymère statistique, le (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxyl (TEMPO) qui possède une activité redox permet une élévation de la LCST du PNIPAM par l'oxydation et la réduction du groupement). [89]
- **De manière causale** : la réponse du groupement A à un stimulus externe génère un second et nouveau stimulus, soit par un changement dans la structure soit par un changement dans l'environnement du polymère, ceci engendre une réponse du second groupement B. Ce mécanisme est moins commun et l'on retrouve peu d'exemples dans la littérature. (ex. : le copolymère contenant des unités *N*-alkyle acrylamide et un fluorophore, le benzofurane. La transition hydrophile-hydrophobe

du polymère induit par le caractère thermo-sensible du butyle acrylamide implique un changement dans la fluorescence du benzo furane) (Figure 24). [90]

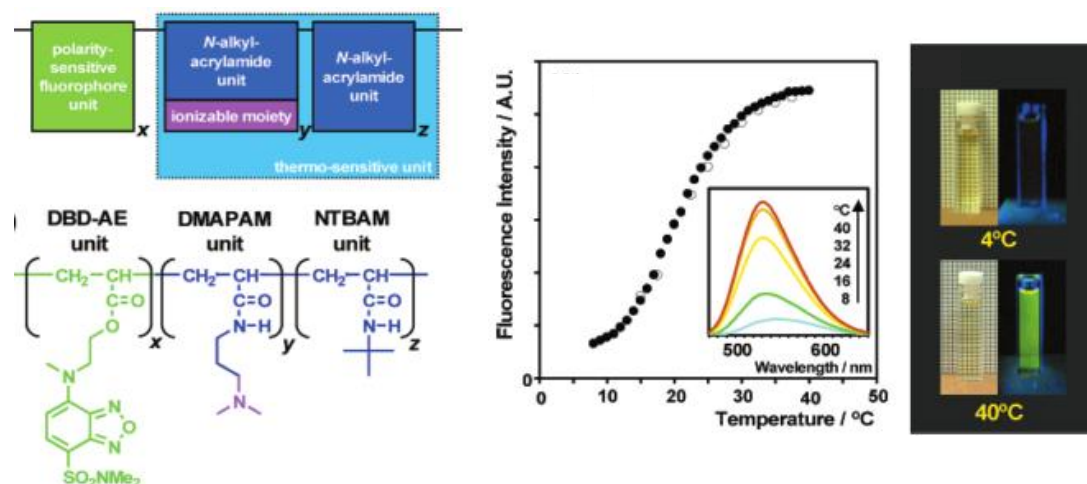


Figure 24 : À gauche, structure schématique et chimique du système p(DBD-co-DMAPAM-co-NtBAM). À droite, influence de la température sur la fluorescence du copolymère à pH 7. [90]

Il est donc possible d'imaginer des polymères multi-fonctionnels via la combinaison de différents groupements répondant à des stimuli divers (thermo-photo, thermo-redox, thermo-pH...). Cette partie sera consacrée aux études effectuées sur les polymères à double stimuli pH- et thermo. Dans la littérature, on retrouve principalement des copolymères à blocs, statistiques ou greffés constitués d'une unité pH-sensible et d'une seconde thermo-sensible. Cependant, il existe également des homopolymères contenant les deux stimuli au sein d'un même groupement.

3.2. Homopolymères pH et thermo-sensibles

Les homopolymères dont un seul et même groupe fonctionnel est susceptible de répondre à deux stimuli individuellement sont des modèles très intéressants en tant que polymères fonctionnels car il n'est pas nécessaire de les introduire selon une distribution statistique pour avoir une réponse précise et sensible. Il n'existe que quelques exemples d'homopolymères répondant à deux stimuli (Figure 25).

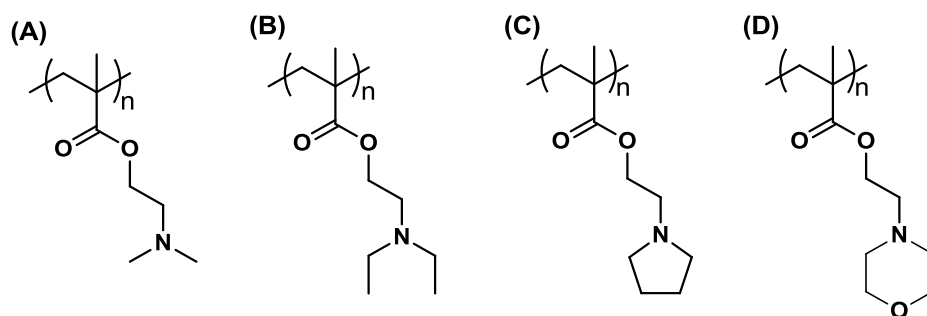


Figure 25 : Structure chimique de quelques homopolymères pH et thermo-sensible : (A) PDMAEMA, (B) PDEAEMA, (C) PEPyM, (D) PMEMA

Bütun *et al.* ont démontré sur des homopolymères méthacrylate d'amine tertiaire tel que le PDMAEMA, PDEAEMA, et PMEMA l'influence du pH sur la solubilité des systèmes à différentes températures. Ainsi le PDMAEMA et le PMEMA de pKa respectif 7,5 et 4,6, sont hydrosolubles à température ambiante en milieu acide et neutre (c'est-à-dire lorsqu'ils sont protonés), mais présentent une T_{PT} à pH 8 allant de 32 à 53 °C selon les masses molaires. De plus, lorsque le pH augmente de 8 à 10, une légère diminution de la T_{PT} est observée. En ce qui concerne le PDEAEMA (pKa 7,3), plus hydrophobe du fait de la chaîne alkyle plus longue, il est insoluble en milieu neutre et basique à température ambiante. À pH acide, les groupements amines protonés rendent le polymère soluble. [57] La comparaison entre le groupement méthyle et éthyle a aussi été étudiée par Schmaltz *et al.* sur des homopolymères linéaires et en étoiles. Ils ont démontré que la T_{PT} du PDEAEMA augmente fortement de 40 à 70°C pour une faible diminution de pH allant de 7 à 6 (Figure 26) démontrant ainsi le fort impact de la variation du taux de protonation du polymère sur sa solubilité. [91]

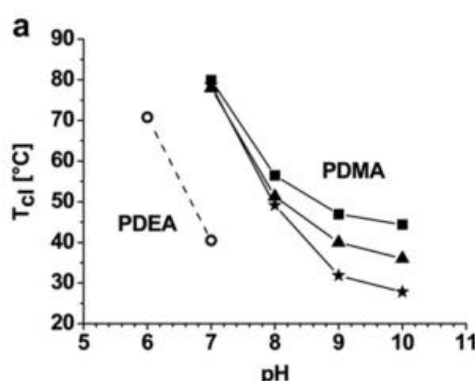


Figure 26 : Comparaison des T_{PT} en fonction du pH pour le PDEAEMA (○) et le PDMAEMA (□) linéaire, (Δ) étoile (PDMAEMA₁₀₀)_{3,1} et (★) étoile (PDMAEMA₁₇₀)₁₈

3.3. Copolymères à blocs

La modification de pH est employée pour moduler la température de transition de phase du fait de la possible présence de charge sur le polyélectrolyte. Les liaisons hydrogène vont jouer un rôle important dans ce type de polymère à double stimuli. Dans le cas du polymère thermo-sensible PNIPAM par exemple, la variation de la T_{PT} peut être atteinte via l'utilisation d'un comonomère hydrophile ou hydrophobe comme précédemment expliqué. Cependant, la copolymérisation du PNIPAM avec un comonomère chargé reste la manière la plus efficace de moduler cette température. Les premiers copolymères pH et thermo-sensible étudiés ont été les PNIPAM-*b*-PAA. [92] [93] [94] Le comportement du copolymère en milieu acide est particulièrement intéressant du fait de la présence des interactions intramoléculaires entre les groupements de chaque bloc. Des études ont montré que lorsque le PAA est non ionisé, la température de point de trouble est plus faible que pour l'homopolymère PNIPAM [94] probablement du à la formation de liaisons hydrogène entre le groupe acide carboxylique (donneur d'H) et le groupe amide (accepteur d'H) diminuant de ce fait les liaisons hydrogène avec l'eau. [95] [96]

La contribution des liaisons hydrogène sur le comportement de la LCST a également été soulignée par le groupe de Lee [97] avec le copolymère p(DMAEMA-co-éthyle acrylamide) (EAAM). D'une part, la diminution de la LCST en fonction de la proportion croissante en monomère hydrophile EAAM a été observée. Généralement, la LCST augmente lorsque l'hydrophilie augmente. Les analyses par IR-TF ont montré que ce phénomène était dû à la formation préférentielle de liaisons hydrogène entre les chaînes DMAEMA/EAAM plutôt que DMAEMA/H₂O. D'autre part, à pH acide, le DMAEMA est totalement ionisé provoquant des répulsions électrostatiques entre les charges. Il y a donc rupture de ces liaisons hydrogène et désorganisation de la matrice de copolymère.

4. Conclusion

Dans le domaine biomédical, les systèmes de vectorisation capables de répondre à un changement de pH et de température attirent beaucoup l'attention à cause des différences de pH et de température observée selon l'environnement étudié (lieu de stockage, corps humain, cellules, tumeurs...) (Tableau 3). [98], [99]

Tableau 3 : pH des différents tissus du corps humain. [98] [100]

Tissus/cellules	pH
Sang	7,4-7,5
Estomac	1,0-3,0
Colon	7,0-7,5
Lysosome	4,5-5,0
Endosome	5,0-6,5
Tumeur – milieu extracellulaire	6,2-7,2

Nous avons vu jusqu'ici qu'il était possible d'obtenir des structures possédant une double réponse via l'utilisation de copolymère à double stimuli. Afin d'obtenir un contrôle optimal, l'idée serait d'avoir des structures micellaires cœur/couronne présentant cette double sensibilité dans la couronne. Ceci permettrait l'encapsulation et la protection de la molécule encapsulée au cœur jusqu'à la cible voulue et sa libération uniquement lorsque les conditions défavorables à la stabilité de la couronne double sont réunies. De tels systèmes ont pu être créés à travers la synthèse de copolymère tribloc ABC constitué d'un bloc hydrophobe (« neutre ») A et de deux blocs hydrophiles B et C (stimuli-sensibles) formant ainsi une structure en oignon de type cœur-« shell »-couronne. [101] Cette approche certes intéressante nécessite la synthèse de copolymères triblocs dont la composition et/ou l'architecture parfois complexe doit être adaptée(s) à chaque application visée. Ainsi, afin de contourner les limitations de l'approche traditionnelle de modulation de la structure d'un copolymère unique, une voie alternative a récemment vu le jour.

III. Etat de l'art sur le mélange physique de copolymères diblocs

Face aux difficultés de synthèse d'un copolymère d'architecture et de composition parfaitement contrôlées afin de moduler les propriétés ou de combiner deux sensibilité, et à la nécessité de synthétiser un nouveau copolymère pour chaque application visée, une nouvelle approche basée sur le mélange physique de deux copolymères a très récemment été étudiée. Ainsi, nous verrons au travers des études théoriques et expérimentales sur le concept de

mixité, s'il est possible de concevoir des systèmes mixtes mimant ceux obtenus à partir des copolymères triblocs et permettant donc de moduler de façon simple les structures et propriétés des micelles résultantes.

En fonction des structures étudiées et des auteurs, la terminologie des systèmes obtenus par le mélange physique varie (par exemple hybrides, complexes). Pour des questions de clarté, l'ensemble de ces systèmes sera par la suite regroupé sous le terme de micelles mixtes.

1. Travaux préliminaires sur le mélange physique de copolymères diblocs

D'après les études théoriques, plusieurs paramètres influencent le processus de co-micellisation des copolymères diblocs tels que la longueur des blocs ou encore la concentration des polymères en solutions. [103] Idéalement, la cmc des micelles mixtes peut être calculée à partir des cmc initiales de chaque copolymère et de leur fraction molaire (M) au sein du système mixte. [3]

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

En ce qui concerne la nature et la longueur des blocs, on retrouve dans la littérature quelques études théoriques sur le sujet afin de prédire le comportement lors de la co-micellisation. Ainsi, Shim *et al.* [103] ont étudié sur deux copolymères diblocs AB/BD, avec A et D deux blocs insolubles (par rapport au solvant d'étude) de nature chimique différentes et B un bloc soluble, la dépendance de la concentration en AB et BD sur la co-micellisation. Ainsi, pour une concentration élevée en copolymères, la co-micellisation se produit. En revanche, seule des micelles pures AB et BD seraient présentes si la concentration en l'un ou l'autre des copolymères est faible. De plus, des paramètres tels que la longueur des chaînes et les interactions entre les chaînes dans le cœur, permettent de modifier la cmc des systèmes mixtes obtenus. Sens *et al.* [104] ont étendu cette étude à deux copolymères identiques AB (A étant le bloc soluble et B insoluble) de longueur différente (A_1B/A_2B). Ils ont prédit que la co-micellisation pouvait donner lieu à l'existence de micelles mixtes uniquement dans le cas où la différence de longueur des blocs A_1 et A_2 est faible, sinon il y a co-existence de micelles

mixtes et « pures » et ce même au-dessus des cmc. Ce même phénomène est également prédit par Potemkin *et al.* [105] sur le mélange AB/AC, pour lequel un système mixte est possible lorsque l'incompatibilité chimique des deux différents blocs solubles (B et C) est faible.

Une étude plus complète a été réalisée par Zhuang *et al.* via l'utilisation d'un outil de calcul plus poussé. [106] En modélisant l'interaction des copolymères AB/AC (A bloc insoluble et B et C blocs solubles) ils ont pu prédire les différentes morphologies pouvant être adoptées en fonction de la compatibilité entre les blocs solubles, la longueur des blocs solubles et insolubles ainsi que le ratio entre AB et AC. Ainsi, non seulement des micelles (sphériques et cylindriques), mais aussi des vésicules et quasi-vésicules devraient se former. La Figure 27 illustre la transition de morphologie lorsque la répulsion entre les blocs B et C augmente ou lorsque les blocs B et C ont des longueurs différentes).

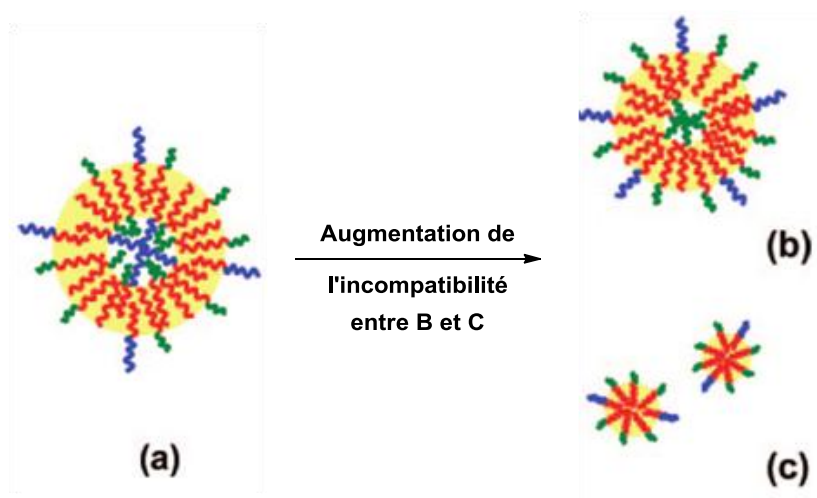


Figure 27 : Représentation schématique de (a) vésicules, (b) quasi-vésicules, et (c) micelles sphériques pour le mélange AB/AC étudié par Zhuang et al.. (Le rouge représente le bloc insoluble A, le bleu et vert, les blocs solubles B et C) [106]

Expérimentalement, on retrouve plusieurs études sur le processus de co-micellisation, [107] ainsi que sur l'influence du bloc hydrophile [108] et hydrophobe [109] [110] et dont les résultats sont cohérents avec ces études théoriques. Eisenberg *et al.* [108] ont par exemple pu observer un phénomène de ségrégation de chaînes lors du mélange de copolymères diblocs PS-*b*-PAA présentant différentes longueurs du bloc PAA. Les courtes chaînes de PAA se retrouvant principalement à l'intérieur des vésicules formées alors que les plus longues se positionnent à l'extérieur. Renou *et al.* [109] ont étudié le mélange de copolymères à base de PEO hydrophobiquement modifié par différentes longueurs de chaînes alkyles (PEO-C12 et

PEO-C22 par exemple). Les mesures de fluorescence dans un premier temps puis par DLS ont montré que seules des micelles de polymères possédant la plus faible cmc (PEO-C22) étaient formées à faible concentration et que le second polymère PEO-C12, sous forme d'unimère, était incorporé à plus haute concentration afin de former des micelles mixtes.

2. Modulation du comportement par l'approche de mixité

Le mélange physique de copolymères diblocs AB et BC a été développé afin d'obtenir des structures micellaires de type oignon (cœur-« shell »-couronne) à l'image des copolymères triblocs ABC. Plusieurs études ont été réalisées par l'équipe de Webber. [111] [112] Il ont démontré par exemple que des micelles à base de poly(acrylate de *tert*-butyle)-*b*-PVP ou de PS-*b*-PVP peuvent être stabilisées en formant des micelles mixtes avec le copolymère PVP-*b*-PEO. En effet, ces micelles ayant une structure en oignon, le PEO qui se trouve dans la couche externe de la couronne va pouvoir stabiliser le PVP présent dans la couronne interne.

Par la suite des systèmes micellaires à couronne mixte ont été préparées à partir du mélange de copolymères diblocs AB et AC c'est-à-dire comportant un bloc hydrophobe A identique et deux blocs hydrophiles B et C de nature différente. Ainsi, en jouant sur la longueur des blocs hydrophiles, [113] ou encore sur la composition du mélange [114] il est possible de moduler la structure des systèmes. Cette mixité dans la couronne permet d'ouvrir certains verrous et de faciliter la synthèse de systèmes pour différentes applications, dans le domaine de la vectorisation et du relargage par exemple. L'équipe de Shi a développé différents systèmes mixtes formant une couronne à canaux modulables et permettant ainsi de contrôler le relargage de molécule encapsulée. [115][116][117] A titre d'exemple, ils se sont intéressés à l'incorporation de copolymères thermo-sensibles au sein des micelles mixtes. Ainsi, la comicellisation de PLA-*b*-PEG et de PLA-*b*-PNIPAM permet de former des micelles au cœur PLA (poly(acide lactique)) et une couronne mixte PNIPAM/PEG via des interactions hydrophobes. Lorsque le PNIPAM collapse, des canaux de PEG se forment et vont avoir une influence directe sur la cinétique de relargage (Figure 28). Ainsi, plus la quantité de PLA-*b*-PEG introduit dans les micelles mixtes augmente, plus le relargage est rapide au-dessus de la LCST du PNIPAM. [115]

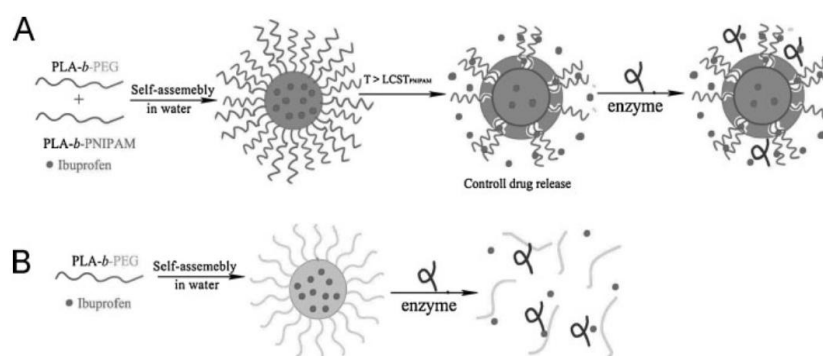


Figure 28 : (A) Illustration schématique des micelles et de la formation des canaux au-dessus de la LCST du PNIPAM et protection du PLA. (B) Dégradation enzymatique du PLA. [115]

Dans leur étude, Lo *et al.* [118] ont tenté de résoudre le problème de stockage d'une solution micellaire constituée de méthoxy poly(éthylène glycol)-*b*-poly(*N*-*n*-propylacrylamide-co-vinylimidazole) (mPEG-*b*-P(NnPAAm-co-VIm)), copolymère thermo-sensible, de LCST 31°C. Il est donc présent sous forme d'unimère à température ambiante car totalement hydrophile en dessous de la LCST et forme des micelles avec un cœur (NnPAAm-co-VIm) au dessus de 31°C uniquement. Le mélange physique avec le copolymère (mPEG-*b*-PLA) peut être une solution au stockage. En effet, du fait des interactions avec le bloc PLA, la mobilité du bloc thermo-sensible est limitée et donc sa LCST diminuée. Ceci permet d'avoir des micelles stables à température ambiante et après injection dans le corps humain à 37°C. De plus, le mPEG-*b*-PLA possède une cmc faible ($5,37 \times 10^{-3}$ mg/mL) ce qui permet d'avoir une stabilité en milieu dilué et donc d'éviter la libération non contrôlée d'une molécule encapsulée.

En modulant le ratio des deux copolymères utilisés, Omede Pujol *et al.* [119] démontrent qu'il est possible de réguler de façon simple les propriétés du système formé d'une couronne mixte PDMAEMA/PEG et d'un cœur poly(ϵ -caprolactone) (PCL). Du fait de sa capacité à se protoner en milieu acide, le PDMAEMA peut grâce aux interactions électrostatiques se lier aux pARNi (petit ARN interférent) et de ce fait être utilisé comme plateforme pour la délivrance d'ARN. A pH 7,4, le PCL se trouve au cœur tandis que la couronne mixte à base de PDMAEMA/PEG comporte des groupements amine partiellement protonés. La densité de charge cationique est ici un élément primordial puisqu'une quantité suffisante est nécessaire pour la complexation avec les pARNi. En revanche, un taux trop important de charge signifie également un haut degré de toxicité. La méthode de mixité est donc un réel avantage

permettant d'obtenir les micelles présentant la densité de charge optimale par simple variation de la proportion en copolymère PCL-*b*-PDMAEMA.

Une approche similaire a été utilisée par Khoe et *al.* [120] pour faire varier la densité de motifs acide folique (FA, ligand de reconnaissance) en surface de micelles mixtes formées par co-micellisation du PEG-*b*-PCL et du FA-PEG-*b*-PCL. La densité de ligand étant un paramètre important pour l'internalisation des micelles dans les cellules, le mélange physique apporte ici un réel avantage puisqu'il suffit de jouer sur le ratio entre les deux copolymères pour obtenir le nombre de fonction FA désiré.

3. Vers des systèmes mixtes pH et thermo-sensibles

L'intérêt grandissant des micelles mixtes repose aussi sur la possibilité d'incorporer au sein d'une même structure différents stimuli. Il sera d'autant plus aisé à travers cette approche de construire des micelles propres à chaque application visée plutôt que d'effectuer la synthèse de nouveau bloc de polymère comportant des structures spécifiques. Ainsi cette partie sera consacrée aux mélanges de deux copolymères présentant chacun un stimulus et formant des micelles à couronne mixte sensible au pH et à la température.

Bien que l'on puisse trouver différentes combinaisons de copolymères pH et thermo-sensible pour former des systèmes mixtes, leurs propriétés ne sont pas systématiquement étudiées. [121][122]

On retrouve ainsi une nouvelle étude de l'équipe de Shi dans laquelle la couronne mixte composée de PNIPAM/P4VP présente cette fois-ci un double stimulus pH et thermo. Il est de ce fait possible grâce à ces deux leviers de contrôler de façon plus précise le système mixte. [123] Lors d'une augmentation de la température ou du pH, les micelles forment une structure cœur-« shell »-couronne : tandis que le PNIPAM ou le P4VP collapse, l'autre copolymère soluble s'étire afin de créer les canaux de la couronne. Ces systèmes ont montrés une efficacité dans le contrôle du relargage d'une molécule hydrophobe en fonction du pH et de la composition en copolymère, avec notamment une limitation du « burst release » à pH élevé. [124]

Il existe peu d'études sur la formation de micelles mixtes pH et thermo-sensibles résultant de la co-micellisation de copolymères ioniques. Voet et al. [125] ont étudié un système dont le cœur mixte composé de poly(iodure de *N*-méthyle-2-vinyl pyridinium) (P2MVP) et de PAA est formé via des liaisons électrostatiques. La couronne également mixte étant composée de PEO/PNIPAM, cette étude est l'un des rares exemples de la co-micellisation de deux copolymères totalement différents et dont les propriétés pH et thermo-sensibles ont été étudiés. De façon intéressante, entre pH 3 et 5, malgré la protonation du PAA qui devrait engendrer une dissociation des micelles, le système s'agrège. Ce phénomène s'explique, d'après les auteurs, par la formation de liaisons hydrogène entre le PAA protoné et la couronne PEO/PNIPAM. A température élevée, lorsque le PNIPAM collapse, les analyses par Cryo-TEM et titration par diffusion de la lumière en présence de sel (salt Light Scattering Titration, salt LS-T) démontrent une structure en oignon avec le PNIPAM au cœur, le P2MVP/PAA à l'interface et le PEO formant la couronne.

Plus récemment notre équipe, a démontré la formation de micelles mixtes constituées d'un cœur lipidique C_{18} issu de l'huile de lin et d'une couronne mixte PAA/PiPrOx. Le comportement des micelles mixtes à différentes combinaisons de pH et température a été étudié. Ainsi, à pH 4,6, et à une température supérieure au point de trouble ($T_{PT} = 32^{\circ}C$), le PiPrOx devenu hydrophobe collapse tandis que les chaînes de PAA stabilisent la structure. A pH 10 et à température ambiante, les groupements carboxyliques du PAA sont totalement ionisés, celui-ci s'étire dans la couronne mais la présence du PiPrOx stabilise la structure via des interactions PAA/PiPrOx. Afin de déstabiliser le système, il faut se trouver dans les conditions défavorables à la stabilité de chaque copolymère, c'est-à-dire à pH 10 et à $T > T_{PT}$. Le système mixte PAA/PiPrOx montre donc un comportement en milieu aqueux très intéressant car en fonction des conditions, chaque copolymère peut stabiliser l'autre et il faut appliquer simultanément deux stimuli pour déstabiliser les micelles et observer l'aggrégation du système. [72]

4. Conclusion

A travers ces quelques études récentes, il est intéressant de voir qu'il est possible via l'approche de mixité de construire des systèmes micellaires aux multiples propriétés. Ce concept est un réel avantage par rapport aux systèmes issus de copolymères triblocs

puisque'elle permet d'éviter de revenir sur des étapes de synthèse pour chaque application visée. Ainsi, l'incorporation des deux stimuli pH et thermo au sein d'un même système devient moins contraignante et permet de moduler de façon plus précise le comportement des structures mixtes.

Conclusion

Ce chapitre bibliographique nous a permis d'avoir une vue générale sur l'auto-association des copolymères « intelligents » sous forme de systèmes micellaires. Parmi les différents stimuli existants et leurs intérêts pour les diverses domaines d'applications, notre choix s'est porté sur les copolymères pH- et thermo-sensibles. Ainsi, grâce à une modification chimique (pour le pH) ou physique (pour la température), le comportement des systèmes auto-assemblés peut changer. De plus, il est possible de combiner les deux stimuli sur un même copolymère afin d'obtenir des structures à double sensibilité (pH-pH, thermo-thermo ou encore pH-thermo) et ainsi agrandir leur champ d'application. Cependant, si l'on souhaite construire des systèmes « intelligents » avec une double sensibilité dans la couronne par exemple, la voie classique utilisée consiste en la synthèse de copolymères triblocs afin de former des systèmes de type oignon (cœur-« shell »-couronne). Cette voie certes intéressante possède des inconvénients notamment celui de nécessiter la synthèse de nouvelles structures pour chaque gamme de stabilité visée.

Ainsi, afin de contourner ces limitations, notre intérêt s'est porté sur une approche récente consistant au mélange physique de copolymères et différentes structures existantes ont été décrites. A l'image des copolymères triblocs, des structures en oignon peuvent être formulées mais également des structures cœur-couronne à couronne mixte. Les propriétés des polymères ainsi que leurs sensibilités peuvent donc être combinées au travers de cette approche intéressante.

Récemment, Wright *et al.* [126][107] ont étudié la co-micellisation de deux copolymères P(DMAEMA-*co*-DEAEMA)-*b*-PDMAEMA possédant des ratio en monomère hydrophobe DEAEMA différents. Par cette approche, les micelles mixtes obtenues sont de structures identiques aux micelles « pures » formées d'un unique copolymère dibloc de même composition globale. Cette étude démontre donc que les propriétés du système micellaire peuvent être modulées via une variation de la composition globale du cœur hydrophobe par un mélange physique de deux copolymères. De ce fait, il serait intéressant de savoir si ce comportement est transposable à la couronne hydrophile des micelles, c'est-à-dire s'il est possible de moduler la réponse à un stimulus des micelles via un mélange physique de copolymères.

Références

- [1] V. P. Torchilin, "Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives," *Pharm. Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–16, 2007.
- [2] K. Letchford and H. Burt, "A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 65, no. 3, pp. 259–269, 2007.
- [3] V. P. Torchilin, "Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems," *J. Control. Release*, vol. 73, no. 2–3, pp. 137–172, 2001.
- [4] M. Malmsten and B. Lindman, "Self-assembly in aqueous block copolymer solutions," *Macromolecules*, vol. 25, no. 20, pp. 5440–5445, Sep. 1992.
- [5] V. S. Trubetskoy, "Polymeric micelles as carriers of diagnostic agents," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 37, no. 1–3, pp. 81–88, 1999.
- [6] L. Zhang and A. Eisenberg, "Multiple Morphologies and Characteristics of 'Crew-Cut' Aggregates of Polystyrene- b -poly(acrylic acid) block Copolymers," *Science (80-.)*, vol. 268, no. 13, pp. 1728–1731, 1995.
- [7] A. Blanz, S. P. Armes, and A. J. Ryan, "Self-Assembled Block Copolymer Aggregates : From Micelles to Vesicles and their Biological Applications," pp. 267–277, 2009.
- [8] M. C. Jones and J. C. Leroux, "Polymeric micelles - A new generation of colloidal drug carriers," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 48, no. 2, pp. 101–111, 1999.
- [9] O. Théodoly, M. Jacquin, P. Muller, and S. Chhun, "Adsorption kinetics of amphiphilic diblock copolymers: From kinetically frozen colloids to macrosurfactants," *Langmuir*, vol. 25, no. 2, pp. 781–793, 2009.
- [10] M. Jacquin, P. Muller, R. Talingting-Pabalan, H. Cottet, J. F. Berret, T. Futterer, and O. Théodoly, "Chemical analysis and aqueous solution properties of charged amphiphilic block copolymers PBA-b-PAA synthesized by MADIX®," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 316, no. 2, pp. 897–911, 2007.
- [11] R. Lund, L. Willner, D. Richter, and E. E. Dormidontova, "Equilibrium chain exchange

- kinetics of diblock copolymer micelles: Tuning and logarithmic relaxation,” *Macromolecules*, vol. 39, no. 13, pp. 4566–4575, 2006.
- [12] A. Halperin and S. Alexander, “Polymeric Micelles: Their relaxation kinetics,” *Macromolecules*, vol. 22, no. 2, pp. 2403–2412, 1989.
- [13] D. D. Bendejacq, V. Ponsinet, and M. Joanicot, “Chemically tuned amphiphilic diblock copolymers dispersed in water: From colloids to soluble macromolecules,” *Langmuir*, vol. 21, no. 5, pp. 1712–1718, 2005.
- [14] D. D. Bendejacq and V. Ponsinet, “Double-polyelectrolyte, like-charged amphiphilic diblock copolymers: Swollen structures and pH- And salt-dependent lyotropic behavior,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 27, pp. 7996–8009, 2008.
- [15] F. Dutertre, O. Boyron, B. Charleux, C. Chassenieux, and O. Colombani, “Transforming frozen self-assemblies of amphiphilic block copolymers into dynamic pH-sensitive micelles,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 33, no. 9, pp. 753–759, 2012.
- [16] E. Lejeune, M. Drechsler, J. Jestin, A. H. E. Müller, C. Chassenieux, and O. Colombani, “Amphiphilic diblock copolymers with a moderately hydrophobic block: Toward dynamic micelles,” *Macromolecules*, vol. 43, no. 6, pp. 2667–2671, 2010.
- [17] U. P. Strauss and E. G. Jackson, “Polysoaps. I. Viscosity and solubilization studies on an n-dodecyl bromide addition compound of poly-2-vinylpyridine,” *J. Polym. Sci.*, vol. 6, no. 5, pp. 649–659, 1951.
- [18] U. P. Strauss and N. L. Gershfel, “The Transition from Typical Polyelectrolyte to Polysoap. I. Viscosity and Solubilization Studies on Copolymers of 4-Vinyl-N-ethylpyridinium Bromide and 4-Vinyl-N-n-Dodecylpyridinium Bromide,” *J. Phys. Chem.*, vol. 58, no. 7, pp. 747–753, 1954.
- [19] P. Schattling, F. D. Jochum, and P. Theato, “Multi-stimuli responsive polymers – the all-in-one talents,” *Polym. Chem.*, vol. 5, no. 1, pp. 25–36, 2014.
- [20] V. K. Mourya, N. Inamdar, R. B. Nawale, and S. S. Kulthe, “Polymeric micelles: General considerations and their applications,” *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 128–138, 2011.
- [21] B. Jeong and A. Gutowska, “Lessons from nature : stimuli- responsive polymers and

- their biomedical applications,” *TRENDS Biotechnol.*, vol. 20, no. 7, pp. 305–311, 2002.
- [22] A. S. Hoffman, P. S. Stayton, V. Bulmus, G. Chen, J. Chen, C. Cheung, A. Chilkoti, Z. Ding, L. Dong, R. Fong, C. A. Lackey, C. J. Long, M. Miura, J. E. Morris, N. Murthy, Y. Nabeshima, T. G. Park, O. W. Press, T. Shimoboji, S. Shoemaker, H. J. Yang, N. Monji, R. C. Nowinski, C. A. Cole, J. H. Priest, J. M. Harris, K. Nakamae, T. Nishino, and T. Miyata, “Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 577–586, 2000.
- [23] A. Kumar, A. Srivastava, I. Y. Galaev, and B. Mattiasson, “Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 10, pp. 1205–1237, 2007.
- [24] V. A. Sethuraman, M. C. Lee, and Y. H. Bae, “A biodegradable pH-sensitive micelle system for targeting acidic solid tumors,” *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 3, pp. 657–666, 2008.
- [25] E. S. Gil and S. M. Hudson, “Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 29, no. 12, pp. 1173–1222, 2004.
- [26] S. Dai, P. Ravi, and K. C. Tam, “pH-Responsive polymers: synthesis, properties and applications,” *Soft Matter*, vol. 4, no. 3, p. 435, 2008.
- [27] S. Y. Park and Y. H. Bae, “Novel pH-sensitive polymers containing sulfonamide groups,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 20, no. 5, pp. 269–273, 1999.
- [28] N. Gonzalez, C. Elvira, J. S. Romn, and J. S. Roma, “Novel Dual-Stimuli-Responsive Polymers Derived from Ethylpyrrolidine,” *Macromolecules*, vol. 38, no. 22, pp. 9298–9303, 2005.
- [29] G. H. Gao, Y. Li, and D. S. Lee, “Environmental pH-sensitive polymeric micelles for cancer diagnosis and targeted therapy,” *J. Control. Release*, vol. 169, no. 3, pp. 180–184, 2013.
- [30] G. Kocak, C. Tuncer, and V. Bütün, “pH-Responsive polymers,” *Polym. Chem.*, vol. 8, no. 1, pp. 144–176, 2017.
- [31] M. J. Manganiello, C. Cheng, A. J. Convertine, J. D. Bryers, and P. S. Stayton, “Diblock copolymers with tunable pH transitions for gene delivery,” *Biomaterials*, vol.

- 33, no. 7, pp. 2301–2309, Mar. 2012.
- [32] K. E. B. Doncom, C. F. Hansell, P. Theato, and R. K. O'Reilly, "pH-switchable polymer nanostructures for controlled release," *Polym. Chem.*, vol. 3, no. 10, p. 3007, 2012.
- [33] A. Car, P. Baumann, J. T. Duskey, M. Chami, N. Bruns, and W. Meier, "pH-Responsive PDMS- b -PDMAEMA Micelles for Intracellular Anticancer Drug Delivery," *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 9, pp. 3235–3245, 2014.
- [34] L. Hespel, E. Kaifas, L. Lecamp, L. Picton, G. Morandi, and F. Burel, "Synthesis of pH-sensitive micelles from linseed oil using atom transfer radical polymerisation (ATRP)," *Polymer*, vol. 53, no. 20, pp. 4344–4352, 2012.
- [35] C. H. Tan, P. Ravi, S. Dai, and K. C. Tam, "Polymer-induced fractal patterns of [60]fullerene containing poly(methacrylic acid) in salt solutions," *Langmuir*, vol. 20, no. 23, pp. 9901–9904, 2004.
- [36] X. Chen, Y. Wang, and R. Pelton, "pH-dependence of the properties of hydrophobically modified polyvinylamine," *Langmuir*, vol. 21, no. 25, pp. 11673–11677, 2005.
- [37] V. Bütün, S. Liu, J. V. M. Weaver, X. Bories-Azeau, Y. Cai, and S. P. Armes, "A brief review of 'schizophrenic' block copolymers," *React. Funct. Polym.*, vol. 66, no. 1, pp. 157–165, 2006.
- [38] S. Liu and S. P. Armes, "Polymeric surfactants for the new millennium: A pH-responsive, zwitterionic, schizophrenic diblock copolymer," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 41, no. 8, pp. 1413–1416, 2002.
- [39] S. Liu and S. P. Armes, "Synthesis and aqueous solution behavior of a pH-responsive schizophrenic diblock copolymer," *Langmuir*, vol. 19, no. 10, pp. 4432–4438, 2003.
- [40] S. Dai, P. Ravi, K. C. Tam, B. W. Mao, and L. H. Gan, "Novel pH-responsive amphiphilic diblock copolymers with reversible micellization properties," *Langmuir*, vol. 19, no. 12, pp. 5175–5177, 2003.
- [41] J. Zou, S. Zhang, R. Shrestha, K. Seetho, C. L. Donley, and K. L. Wooley, "pH-Triggered reversible morphological inversion of orthogonally-addressable poly(3-

- acrylamidophenylboronic acid)-block-poly(acrylamidoethylamine) micelles and their shell crosslinked nanoparticles,” *Polym. Chem.*, vol. 3, no. 11, pp. 3146–3156, 2012.
- [42] D. S. Bag and K. U. B. Rao, “Smart polymers and their applications,” *J. Polym. Mater.*, vol. 23, no. 3, pp. 225–248, 2006.
- [43] E. A. Clark and J. E. G. Lipson, “LCST and UCST behavior in polymer solutions and blends,” *Polymer*, vol. 53, no. 2, pp. 536–545, 2012.
- [44] S. Hocine and M.-H. Li, “Thermoresponsive self-assembled polymer colloids in water,” *Soft Matter*, vol. 9, no. 25, p. 5839, 2013.
- [45] M. Saeki, S., Kuwahara, N., Nakata, M., & Kaneko, “Upper and lower critical solution temperatures in poly (ethylene glycol) solutions,” *Polymer*, vol. 17, no. 8, pp. 685–689, 1976.
- [46] P. Alexandridis, “Poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide) block copolymer surfactants,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 2, no. 5, pp. 478–489, Oct. 1997.
- [47] R. . Horne, J. . Almeida, A. . Day, and N.-T. Yu, “Macromolecule hydration and the effect of solutes on the cloud point of aqueous solutions of polyvinyl methyl ether: A possible model for protein denaturation and temperature control in homeothermic animals,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 35, no. 1, pp. 77–84, Jan. 1971.
- [48] D. Crespy and R. M. Rossi, “Temperature-responsive polymers with LCST in the physiological range and their applications in textiles,” *Polym. Int.*, vol. 56, no. 12, pp. 1461–1468, Dec. 2007.
- [49] H. Y. Liu and X. X. Zhu, “Lower critical solution temperatures of N -substituted acrylamide copolymers in aqueous solutions,” *Polymer*, vol. 40, no. 25, pp. 6985–6990, Dec. 1999.
- [50] H. G. Schild, “Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 17, no. 2, pp. 163–249, Jan. 1992.
- [51] H. G. Schild and D. A. Tirrell, “Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions,” *J. Phys. Chem.*, vol. 94, no. 10, pp. 4352–4356, May 1990.

- [52] Y. Cao, X. X. Zhu, J. Luo, and H. Liu, "Effects of Substitution Groups on the RAFT Polymerization of N -Alkylacrylamides in the Preparation of Thermosensitive Block Copolymers," *Macromolecules*, vol. 40, no. 18, pp. 6481–6488, Sep. 2007.
- [53] R. Hoogenboom, H. M. L. Thijs, M. J. H. C. Jochems, B. M. van Lankvelt, M. W. M. Fijten, and U. S. Schubert, "Tuning the LCST of poly(2-oxazoline)s by varying composition and molecular weight: alternatives to poly(N-isopropylacrylamide)?," *Chem. Commun. (Camb)*, no. 44, pp. 5758–5760, 2008.
- [54] C. Diab, Y. Akiyama, K. Kataoka, and F. M. Winnik, "Microcalorimetric Study of the Temperature-Induced Phase Separation in Aqueous Solutions of Poly(2-isopropyl-2-oxazolines)," *Macromolecules*, vol. 37, no. 7, pp. 2556–2562, Apr. 2004.
- [55] M. M. Bloksma, C. Weber, I. Y. Perevyazko, A. Kuse, A. Baumgärtel, A. Vollrath, R. Hoogenboom, and U. S. Schubert, "Poly(2-cyclopropyl-2-oxazoline): From Rate Acceleration by Cyclopropyl to Thermoresponsive Properties," *Macromolecules*, vol. 44, no. 11, pp. 4057–4064, Jun. 2011.
- [56] S. H. Cho, M. S. Jhon, S. H. Yuk, and H. B. Lee, "Temperature-induced phase transition of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate-co-acrylamide)," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 35, no. 4, pp. 595–598, 1997.
- [57] V. Bütün, S. . Armes, and N. . Billingham, "Synthesis and aqueous solution properties of near-monodisperse tertiary amine methacrylate homopolymers and diblock copolymers," *Polymer*, vol. 42, no. 14, pp. 5993–6008, Jun. 2001.
- [58] D. Fournier, R. Hoogenboom, H. M. L. Thijs, R. M. Paulus, and U. S. Schubert, "Tunable pH- and Temperature-Sensitive Copolymer Libraries by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Copolymerizations of Methacrylates," *Macromolecules*, vol. 40, no. 4, pp. 915–920, Feb. 2007.
- [59] F. A. Plamper, M. Ruppel, A. Schmalz, O. Borisov, M. Ballauff, and A. H. E. Müller, "Tuning the Thermoresponsive Properties of Weak Polyelectrolytes: Aqueous Solutions of Star-Shaped and Linear Poly(N,N -dimethylaminoethyl Methacrylate)," *Macromolecules*, vol. 40, no. 23, pp. 8361–8366, Nov. 2007.
- [60] A. Laukkanen, S. Hietala, S. L. Maunu, and H. Tenhu, "Poly(N -vinylcaprolactam) Microgel Particles Grafted with Amphiphilic Chains," *Macromolecules*, vol. 33, no.

- 23, pp. 8703–8708, Nov. 2000.
- [61] A. Laukkanen, L. Valtola, F. M. Winnik, and H. Tenhu, “Formation of Colloidally Stable Phase Separated Poly(N -vinylcaprolactam) in Water: A Study by Dynamic Light Scattering, Microcalorimetry, and Pressure Perturbation Calorimetry,” *Macromolecules*, vol. 37, no. 6, pp. 2268–2274, Mar. 2004.
- [62] A. S. Dubovik, E. E. Makhaeva, V. Y. Grinberg, and A. R. Khokhlov, “Energetics of Cooperative Transitions of N-Vinylcaprolactam Polymers in Aqueous Solutions,” *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 206, no. 9, pp. 915–928, May 2005.
- [63] J. C. Rodríguez-Cabello, J. Reguera, A. Girotti, F. J. Arias, and M. Alonso, “Genetic Engineering of Protein-Based Polymers: The Example of Elastinlike Polymers,” in *Advances in Polymer Science*, 2005, pp. 119–167.
- [64] D. E. Meyer and A. Chilkoti, “Quantification of the Effects of Chain Length and Concentration on the Thermal Behavior of Elastin-like Polypeptides,” *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 3, pp. 846–851, May 2004.
- [65] F. Bignotti, M. Penco, L. Sartore, and I. Peroni, “Synthesis, characterisation and solution behaviour of thermo- and pH-responsive polymers bearing l-leucine residues in the side chains,” *Polymer*, vol. 41, pp. 8247–8256, 2000.
- [66] S. Qin, Y. Geng, D. E. Discher, and S. Yang, “Temperature-controlled assembly and release from polymer vesicles of poly(ethylene oxide)-block-poly(N-isopropylacrylamide),” *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 21, pp. 2905–2909, 2006.
- [67] A. Gandhi, A. Paul, S. O. Sen, and K. K. Sen, “Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications,” *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 10, no. 2, pp. 99–107, 2015.
- [68] S. Fujishige, K. Kubota, and I. Ando, “Phase transition of aqueous solutions of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylmethacrylamide),” *J. Phys. Chem.*, vol. 93, no. 8, pp. 3311–3313, 1989.
- [69] M. A. Cooperstein and H. E. Canavan, “Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and poly(N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces,” *Biointerphases*, vol. 8, no. 1, p. 19, 2013.

- [70] A. S. Hoffman, P. S. Stayton, V. Bulmus, G. Chen, J. Chen, C. Cheung, A. Chilkoti, Z. Ding, L. Dong, R. Fong, C. A. Lackey, C. J. Long, M. Miura, J. E. Morris, N. Murthy, Y. Nabeshima, T. G. Park, O. W. Press, T. Shimoboji, S. Shoemaker, H. J. Yang, N. Monji, R. C. Nowinski, C. A. Cole, J. H. Priest, J. M. Harris, K. Nakamae, T. Nishino, and T. Miyata, "Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 577–586, 2000.
- [71] R. Obeid, E. Maltseva, A. F. Thünemann, F. Tanaka, and F. M. Winnik, "Temperature response of self-assembled micelles of telechelic hydrophobically modified poly (2-alkyl-2-oxazoline)s in water," *Macromolecules*, vol. 42, pp. 2204–2214, 2009.
- [72] L. Hespel, G. Morandi, M. Grossel, L. Lecamp, L. Picton, and F. Burel, "Synthesis of lipid-b-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) and successive study of pH- and thermo-sensitive mixed micelles by combination with lipid-b-poly(acrylic acid)," *Polym. Chem.*, vol. 5, no. 13, p. 4009, 2014.
- [73] I. Dimitrov, B. Trzebicka, A. H. E. Müller, A. Dworak, and C. B. Tsvetanov, "Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive reversibly interacting entities," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 11, pp. 1275–1343, 2007.
- [74] S. Strandman and X. X. Zhu, "Thermo-responsive block copolymers with multiple phase transition temperatures in aqueous solutions," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 42, pp. 154–176, 2015.
- [75] M. Mertoglu, S. Garnier, A. Laschewsky, K. Skrabania, and J. Storsberg, "Stimuli responsive amphiphilic block copolymers for aqueous media synthesised via reversible addition fragmentation chain transfer polymerisation (RAFT)," *Polymer*, vol. 46, no. 18, pp. 7726–7740, 2005.
- [76] Y. Kotsuchibashi, Y. Kuboshima, K. Yamamoto, and T. Aoyagi, "Synthesis and characterization of double thermo-responsive block copolymer consisting N - isopropylacrylamide by atom transfer radical polymerization," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 46, no. 18, pp. 6142–6150, Sep. 2008.
- [77] Y. Kotsuchibashi, K. Yamamoto, and T. Aoyagi, "Assembly behavior of double thermo-responsive block copolymers with controlled response temperature in aqueous solution," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 336, no. 1, pp. 67–72, 2009.

- [78] Y. Kotsuchibashi, M. Ebara, K. Yamamoto, and T. Aoyagi, ““On-off” switching of dynamically controllable self-assembly formation of double-responsive block copolymers with tunable LCSTs,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 48, no. 20, pp. 4393–4399, Oct. 2010.
- [79] O. Soga, C. F. van Nostrum, and W. E. Hennink, “Poly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide mono/di lactate): A new class of biodegradable polymers with tuneable thermosensitivity,” *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 3, pp. 818–821, 2004.
- [80] J. Park and K. Kataoka, “Precise Control of Lower Critical Solution Temperature of Gradient Copolymerization with 2-Ethyl-2-oxazoline as a Hydrophilic Comonomer,” *Macromolecules*, vol. 39, pp. 6622–6630, 2006.
- [81] M. Arotçaréna, B. Heise, S. Ishaya, and A. Laschewsky, “Switching the inside and the outside of aggregates of water-soluble block copolymers with double thermoresponsivity,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 14, pp. 3787–3793, 2002.
- [82] J. Virtanen, M. Arotçaréna, B. Heise, S. Ishaya, A. Laschewsky, and H. Tenhu, “Dissolution and aggregation of a poly(NIPA-block-sulfobetaine) copolymer in water and saline aqueous solutions,” *Langmuir*, vol. 18, no. 14, pp. 5360–5365, 2002.
- [83] J. V. M. Weaver, S. P. Armes, and V. Butun, “Synthesis and aqueous solution properties of a well-defined thermo-responsive schizophrenic diblock copolymer,” *Chem. Commun.*, no. 18, pp. 2122–2123, 2002.
- [84] H. Zhang, X. Tong, and Y. Zhao, “Diverse thermoresponsive behaviors of uncharged ucst block copolymer micelles in physiological medium,” *Langmuir*, vol. 30, no. 38, pp. 11433–11441, 2014.
- [85] P. J. Roth, T. P. Davis, and A. B. Lowe, “Comparison between the LCST and UCST transitions of double thermoresponsive diblock copolymers: Insights into the behavior of POEGMA in alcohols,” *Macromolecules*, vol. 45, no. 7, pp. 3221–3230, 2012.
- [86] Y. Su, M. Dan, X. Xiao, X. Wang, and W. Zhang, “A new thermo-responsive block copolymer with tunable upper critical solution temperature and lower critical solution temperature in the alcohol/water mixture,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 51, no. 20, pp. 4399–4412, 2013.

- [87] T. Ueki, M. Watanabe, and T. P. Lodge, "Doubly Thermosensitive Self-Assembly of Diblock Copolymers in Ionic Liquids," *Macromolecules*, vol. 42, no. 4, pp. 1315–1320, Feb. 2009.
- [88] F. D. Jochum, F. R. Forst, and P. Theato, "PNIPAM Copolymers Containing Light-Responsive Chromophores: A Method Toward Molecular Logic Gates.," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 31, no. 16, pp. 1456–61, Aug. 2010.
- [89] H. Fu, D. M. Policarpio, J. D. Batteas, and D. E. Bergbreiter, "Redox-controlled 'smart' polyacrylamide solubility," *Polym. Chem.*, vol. 1, p. 631, 2010.
- [90] S. Uchiyama, N. Kawai, A. P. De Silva, and K. Iwai, "Fluorescent Polymeric AND Logic Gate with Temperature and pH as Inputs," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 10, pp. 3032–3033, 2004.
- [91] A. Schmalz, M. Hanisch, H. Schmalz, and A. H. E. Müller, "Double stimuli-responsive behavior of linear and star-shaped poly(N,N-diethylaminoethyl methacrylate) in aqueous solution," *Polymer*, vol. 51, no. 6, pp. 1213–1217, 2010.
- [92] M. Shibayama and T. Tanaka, "Small-angle neutron scattering study on weakly charged poly(N-isopropyl acrylamide-co-acrylic acid) copolymer solutions," *J. Chem. Phys.*, vol. 102, no. 23, p. 9392, 1995.
- [93] G. Chen and A. S. Hoffman, "Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH.," *Nature*, vol. 373, no. 6509, pp. 49–52, 1995.
- [94] Mi Kyong Yoo, Yong Kiel Sung, S. C. Chong, and M. L. Young, "Effect of polymer complex formation on the cloud-point of poly(N-isopropyl acrylamide) (PNIPAAm) in the poly(NIPAAm-co-acrylic acid): polyelectrolyte complex between poly(acrylic acid) and poly(allylamine)," *Polymer*, vol. 38, no. 11, pp. 2759–2765, 1997.
- [95] G. Bokias, G. Staikos, and I. Iliopoulos, "Solution properties and phase behaviour of copolymers of acrylic acid with N-isopropylacrylamide: The importance of the intrachain hydrogen bonding," *Polymer*, vol. 41, no. 20, pp. 7399–7405, 2000.
- [96] C. M. Schilli, M. Zhang, E. Rizzardo, S. H. Thang, Y. K. Chong, K. Edwards, G. Karlsson, and A. H. E. Müller, "A New Double-Responsive Block Copolymer Synthesized via RAFT Polymerization: Poly(N -isopropylacrylamide)- b lock -

- poly(acrylic acid),” *Macromolecules*, vol. 37, no. 21, pp. 7861–7866, 2004.
- [97] S. H. Yuk, S. H. Cho, and S. H. Lee, “pH/Temperature-Responsive Polymer Composed of Poly((N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate-co-ethylacrylamide),” *Macromolecules*, vol. 9297, no. 97, pp. 6856–6859, 1997.
- [98] H. Almeida, M. H. Amaral, and P. Lobão, “Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery,” *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 2, no. 6, pp. 01–10, 2012.
- [99] K.-Y. Peng, S.-W. Wang, and R.-S. Lee, “Amphiphilic diblock copolymers based on poly(2-ethyl-2-oxazoline) and poly(4-substituted- ϵ -caprolactone): Synthesis, characterization, and cellular uptake,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 51, no. 13, pp. 2769–2781, Jul. 2013.
- [100] B. Priya and Et Al., “Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery,” vol. 4, p. 22001, 2009.
- [101] V. Sfika, C. Tsitsilianis, A. Kiriya, G. Gorodyska, and M. Stamm, “pH responsive heteroarm starlike micelles from double hydrophilic ABC terpolymer with amphoteric A and C blocks,” *Macromolecules*, vol. 37, no. 25, pp. 9551–9560, 2004.
- [102] S. Kubowicz, J. F. Baussard, J. F. Lutz, A. F. Thünemann, H. Von Berlepsch, and A. Laschewsky, “Multicompartment micelles formed by self-assembly of linear ABC triblock copolymers in aqueous medium,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 33, pp. 5262–5265, 2005.
- [103] D. F. K. Shim, C. Marques, and M. E. Cates, “Diblock Copolymers: Comicellization and Coadsorption,” *Macromolecules*, vol. 24, pp. 5309–5314, 1991.
- [104] P. Sens and C. M. Marques, “Mixed Micelles in a Bidisperse Solution of Diblock Copolymers,” *Macromolecules*, vol. 9297, no. 95, pp. 4880–4890, 1996.
- [105] V. V. Palyulin and I. I. Potemkin, “Mixed versus ordinary micelles in the dilute solution of AB and BC diblock copolymers,” *Macromolecules*, vol. 41, no. 12, pp. 4459–4463, 2008.
- [106] Y. Zhuang, J. Lin, L. Wang, and L. Zhang, “Self-Assembly Behavior of AB/AC Diblock Copolymer Mixtures in Dilute Solution,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 7, pp.

- 1906–1913, Feb. 2009.
- [107] D. B. Wright, J. P. Patterson, N. C. Gianneschi, C. Chassenieux, O. Colombani, and R. K. O'Reilly, "Blending block copolymer micelles in solution; Obstacles of blending," *Polym. Chem.*, vol. 7, no. 8, 2016.
- [108] L. Luo and A. Eisenberg, "Thermodynamic stabilization mechanism of block copolymer vesicles" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 5, pp. 1012–1013, 2001.
- [109] F. Renou, T. Nicolai, E. Nicol, and L. Benyahia, "Poly (ethylene oxide) End Capped with Alkyl Groups of Different Length," *Langmuir*, no. 14, pp. 515–521, 2009.
- [110] K. Iizuka, N. Numasawa, K. Hiraoka, R. Yamazaki, and T. Nose, "Composition dependence of ordered structures in mixed micellar aqueous solutions of hydrophobically modified poly(ethylene glycol)s," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 43, no. 18, pp. 2474–2483, 2005.
- [111] K. Prochazka, T. J. Martin, S. E. Webber, and P. Munk, "Onion-type micelles in aqueous media," *Macromolecules*, vol. 29, no. 20, pp. 6526–6530, 1996.
- [112] M. R. Talingting, P. Munk, S. E. Webber, and Z. Tuzar, "Onion-Type Micelles from Polystyrene-block-poly (2-vinylpyridine) and Poly (2-vinylpyridine) -block-poly (ethylene oxide)," *Macromolecules*, vol. 32, no. model 510, pp. 1593–1601, 1999.
- [113] L. Luo and A. Eisenberg, "One-step preparation of block copolymer vesicles with preferentially segregated acidic and basic corona chains," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 41, no. 6, pp. 1001–1004, 2002.
- [114] K. Podhájecká, M. Štěpánek, K. Procházka, and W. Brown, "Hybrid Polymeric Micelles with Hydrophobic Cores and Mixed Polyelectrolyte/Nonelectrolyte Shells in Aqueous Media. Studies of the Shell Behavior" *Langmuir*, vol. 17, no. 14, pp. 4245–4250, Jul. 2001.
- [115] C. Wu, R. Ma, H. He, L. Zhao, H. Gao, Y. An, and L. Shi, "Fabrication of complex micelles with tunable shell for application in controlled drug release," *Macromol. Biosci.*, vol. 9, no. 12, pp. 1185–1193, 2009.
- [116] R. Ma and L. Shi, "Polymeric Micelles with Tunable Channels," *Macromol. Biosci.*, vol. 10, no. 12, pp. 1397–1405, 2010.

- [117] R. Ma, B. Wang, Y. Xu, Y. An, W. Zhang, G. Li, and L. Shi, "Surface phase separation and morphology of stimuli responsive complex micelles," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 28, no. 9, pp. 1062–1069, 2007.
- [118] C. L. Lo, S. J. Lin, H. C. Tsai, W. H. Chan, C. H. Tsai, C. H. D. Cheng, and G. H. Hsiue, "Mixed micelle systems formed from critical micelle concentration and temperature-sensitive diblock copolymers for doxorubicin delivery," *Biomaterials*, vol. 30, no. 23–24, pp. 3961–3970, 2009.
- [119] M. Omedes Pujol, D. J. L. Coleman, C. D. Allen, O. Heidenreich, and D. A. Fulton, "Determination of key structure-activity relationships in siRNA delivery with a mixed micelle system," *J. Control. Release*, vol. 172, no. 3, pp. 939–945, 2013.
- [120] S. Khoei and A. Kavand, "Preparation, co-assembling and interfacial crosslinking of photocurable and folate-conjugated amphiphilic block copolymers for controlled and targeted drug delivery: Smart armored nanocarriers," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 73, pp. 18–29, 2014.
- [121] D. Xiong, Z. He, Y. An, Z. Li, H. Wang, X. Chen, and L. Shi, "Temperature-responsive multilayered micelles formed from the complexation of PNIPAM-b-P4VP block-copolymer and PS-b-PAA core-shell micelles," *Polymer*, vol. 49, no. 10, pp. 2548–2552, 2008.
- [122] D. Xiong, L. Shi, X. Jiang, Y. An, X. Chen, and J. Lu, "Composite worm-like aggregates formed from a pair of block-copolymers containing hydrogen-bonding donor and acceptor," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 28, no. 2, pp. 194–199, 2007.
- [123] G. Li, L. Shi, R. Ma, Y. An, and N. Huang, "Formation of complex micelles with double-responsive channels from self-assembly of two diblock copolymers," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 45, no. 30, pp. 4959–4962, 2006.
- [124] G. Li, L. Guo, S. Ma, and J. Liu, "Complex micelles formed from two diblock copolymers for applications in controlled drug release," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 47, no. 7, pp. 1804–1810, Apr. 2009.
- [125] I. K. Voets, P. M. Moll, A. Aqil, C. Jérôme, C. Detrembleur, P. De Waard, A. De Keizer, and M. A. Cohen Stuart, "Temperature responsive complex coacervate core micelles with a PEO and PNIPAAm corona," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 35, pp.

10833–10840, 2008.

- [126] D. B. Wright, J. P. Patterson, A. Pitto-Barry, A. Lu, N. Kirby, N. C. Gianneschi, C. Chassenieux, O. Colombani, and R. K. O'Reilly, “The Copolymer Blending Method: A New Approach for Targeted Assembly of Micellar Nanoparticles,” *Macromolecules*, vol. 48, no. 18, pp. 6516–6522, 2015.

Chapitre II

Synthèses et caractérisations de Lipide-*b*- poly(oxazoline)s

Introduction

Cette partie est consacrée à l'étude de la synthèse de copolymères amphiphiles possédant un bloc hydrophobe issu de l'huile de lin et comportant un bloc hydrophile de type poly(oxazoline) ainsi qu'à la caractérisation physico-chimique de leur comportement en milieu aqueux.

La partie hydrophobe des copolymères étant introduite lors de l'étape d'amorçage de la polymérisation, la synthèse de lipoamorceur est donc nécessaire. La partie hydrophile est constituée quant à elle de polymère appartenant à la famille des poly(oxazolines). Leur synthèse est largement décrite dans la littérature par polymérisation cationique par ouverture de cycle (Cationique Ring-Opening Polymerization, CROP), une polymérisation vivante mais aussi contrôlée permettant d'obtenir des structures bien définies. Afin d'obtenir des systèmes finaux « intelligents », deux monomères vont être étudiés : la 2-éthyle-2-oxazoline et la 2-isopropyle-2-oxazoline, du fait des propriétés thermo-sensibles du polymère final. Ainsi trois types de copolymères seront synthétisés, le lipide-poly(2-éthyle-2-oxazoline), le lipide-poly(2-isopropyle-2-oxazoline) et une série de copolymère lipide-poly((2-éthyle-2-oxazoline)-*co*-(2-isopropyle-2-oxazoline)).

Après une partie bibliographique présentant les poly(oxazoline)s ainsi que leur polymérisation, la synthèse de lipoamorceurs sera décrite. Différents polymères de type lipide-*b*-poly(oxazoline)s seront ensuite synthétisés et leur comportement auto-associatif sera étudié notamment en fonction de la température.

I. Présentation de la famille des poly(oxazoline)s

Les oxazolines sont des composés hétérocycliques à cinq atomes comportant un azote, un oxygène et une double liaison. Il existe trois structures isomères selon la position de la double liaison (Figure 1) mais la plus communément utilisée est la 2-oxazoline.

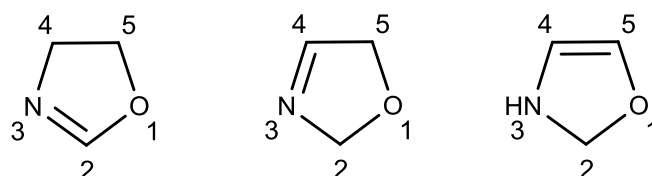


Figure 1 : Structures des isomères oxazolines : 2-oxazoline, 3-oxazoline et 4-oxazoline

Il est possible d'obtenir des oxazolines substituées de type X-R-2-oxazoline avec X correspondant à la position 2, 4 ou 5. La polymérisation des oxazolines substituées en position 4 et 5 étant plus complexe du fait de la gêne stérique, on retrouve le plus souvent dans la littérature des études sur les 2-R-2-oxazoline. [1] La nature du substituant est d'une importance primordiale puisqu'elle va conditionner les propriétés de solubilité du poly(2-R-2-oxazoline). Ainsi, pour un substituant R ayant une courte chaîne alkyle C1 (MeOx), C2 (EtOx) ou C3 (iPrOx, nPrOx), le polymère est hydrosoluble et présente une LCST pour C2 et C3. En revanche, les poly(oxazoline)s (POx) avec un R > C3 (ex : BuOx) sont hydrophobes (Figure 2) quelle que soit la température.

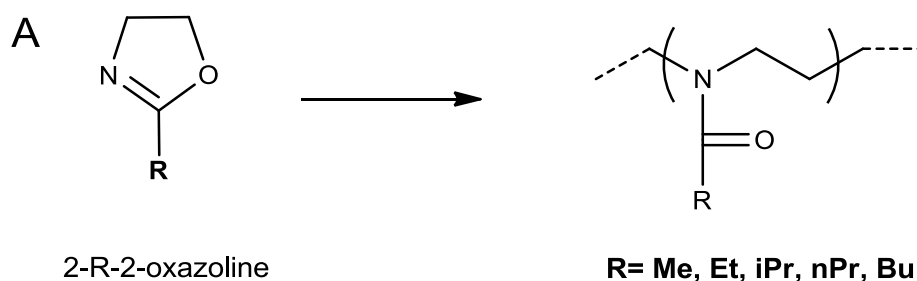


Figure 2 : Structure du monomère 2-R-2-oxazoline et de sa forme polymérisée.

La poly(2-méthyle-2-oxazoline) (PMeOx) et la poly(2-éthyle-2-oxazoline) (PEtOx) ont d'ailleurs été étudiées en tant qu'alternative au PEG. En effet, elles démontrent à la fois des solubilités et biocompatibilités très similaires à celui-ci ainsi que les mêmes propriétés de furtivité sans présenter d'effets secondaires sur les animaux. [2], [3] De plus la PEtOx a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) et classée non toxique.[4] Quant à la poly(2-isopropyle-2-oxazoline) (PiPrOx), de structure isomère au PNIPAM, elle possède une

LCST entre 36-39 °C, proche du corps humain, ce qui en fait une candidate idéale en tant que polymère intelligent pour le domaine biomédical. [5]

L'intérêt pour les POx date de plus de trente ans, développées dans un premier temps en tant qu'additif alimentaire au début des années 1980, des études ont par la suite montré qu'elles pouvaient être utilisées pour de multiples applications pharmaceutiques et médicales. Elles sont décrites sous différentes formes, conjuguées à une protéine ou petite molécule active, [6], [7] greffées sur des liposomes, [8] ou des surfaces ou encore sous forme de micelles [9].

Les POx représentent donc une classe de matériaux polymères prometteurs pour des applications diverses et variées, elles sont synthétisées par polymérisation cationique par ouverture de cycle (CROP) décrite dans plusieurs revues par Aoi et Okada,[10] et Kobayashi [11], [12].

II. Synthèse par CROP de polyoxazoline

La CROP est une technique de polymérisation vivante et contrôlée. Le mécanisme de polymérisation des oxazolines se déroule en plusieurs étapes (Figure 3). Dans un premier temps, l'amorceur électrophile est attaqué par l'azote du monomère 2-oxazoline afin de former une espèce cationique, l'oxazolinium. La croissance des chaînes lors de la propagation a lieu via l'attaque nucléophile du monomère sur la liaison C-O de l'oxazolinium engendrant l'ouverture et l'isomérisation du cycle en un composé plus stable. L'addition de monomère continue jusqu'à consommation totale de celui-ci ou bien si un agent de terminaison fortement nucléophile est ajouté (étape de terminaison). [13]

La polymérisation par CROP peut également se produire selon un mécanisme covalent, c'est-à-dire via la formation d'une espèce propageante covalente (Figure 3). La nature nucléophile du monomère, de l'amorceur et la polarité du solvant vont déterminer le mécanisme de la polymérisation. Si le contre-ion, X^- de l'amorceur est plus nucléophile que le monomère, la voie covalente sera favorisée. En revanche, une plus faible nucléophilie de X^- comparé au monomère mènera à un mécanisme de propagation de type ionique (Figure 4). [1], [2], [3]

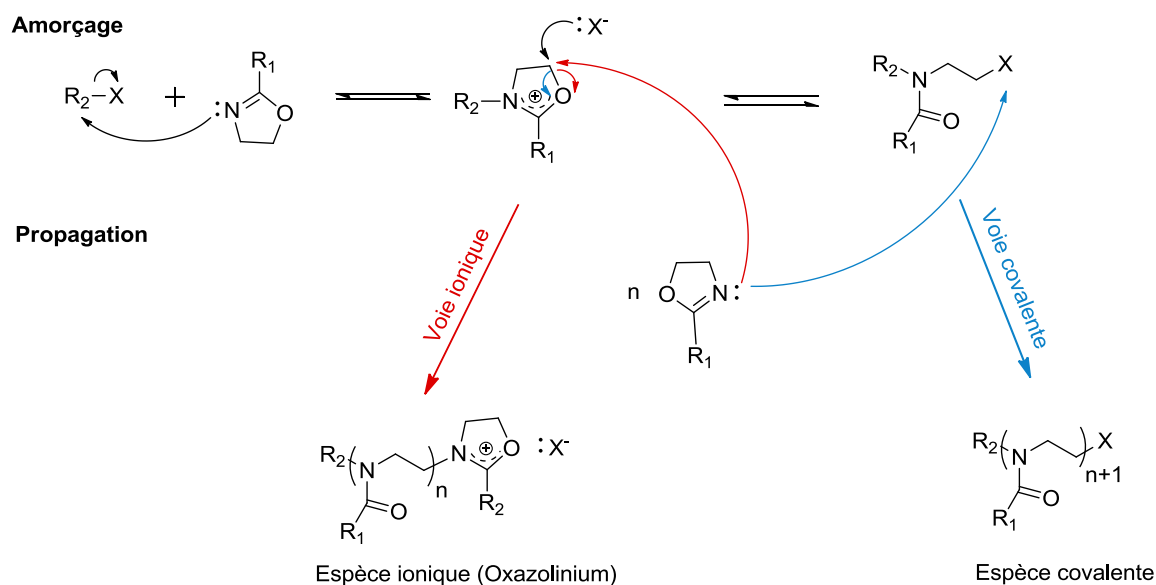


Figure 3 : Schéma réactionnel représentant les deux mécanismes possibles (ionique et covalent) lors de la polymérisation par CROP de la 2-oxazoline.

+ nucléophile

- nucléophile

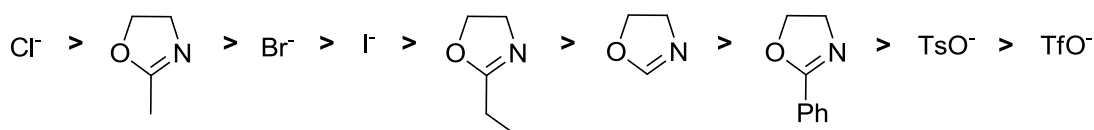


Figure 4 : Classement selon la nucléophilie de monomères oxazolines et de contre-ions des amorceurs [10]

Les amorceurs généralement utilisés pour la CROP sont les composés de type triflate, tosylate ou halogénure (Figure 4).

1. Synthèse des lipoamorceurs

Deux méthodes peuvent être envisagées pour introduire le bloc lipidique dans les copolymères amphiphiles lipide-*b*-poly(oxazoline)s : 1) lors de l'étape d'amorçage, le bloc lipidique est introduit dès le début de la polymérisation ou 2) lors de l'étape de terminaison en désactivant l'espèce propageante par ajout de l'alcool gras. La première méthode permettant

une incorporation quantitative de chaîne lipidique dans le copolymère final a été sélectionnée. [9]

Deux familles d'amorceur ont été étudiées, le mésylate, qui est très peu étudié dans la littérature, [9] et un second plus conventionnel, le tosylate. Ces deux lipoamorceurs ont été synthétisés en deux étapes. La première est la réduction de l'huile de lin en alcool gras, la seconde consiste en l'introduction du groupement nucléophile en extrémité de la chaîne lipidique.

Etape 1 : Réduction de l'huile de lin

La réduction des fonctions esters de l'huile de lin a lieu en présence de LiAlH_4 en milieu anhydre (Figure 5). La composition initiale de l'huile de lin étant un mélange de chaînes d'acides gras insaturés (linoléique, linoléique, oléique) et saturés (stéarique), un mélange statistique d'alcool gras est donc obtenu après réaction. D'après l'analyse RMN ^1H , nous retrouvons 55,5 % d'alcool linoléique, 16,9 % linoléique, 18 % oléique et 9,6 % de chaînes saturées. Le rendement de la réaction est de 80 %.

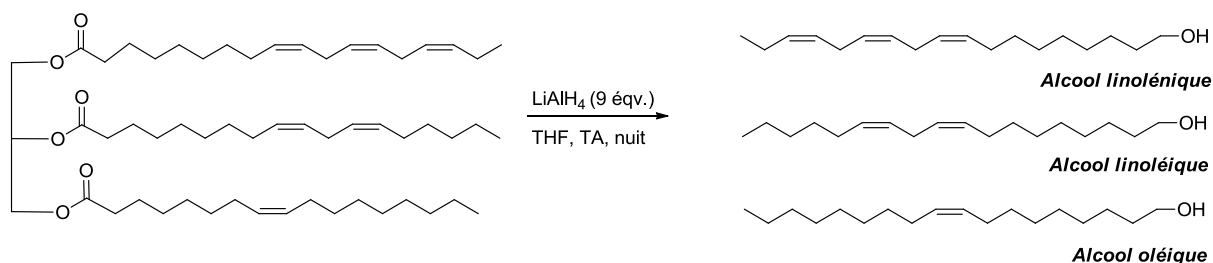


Figure 5 : Réduction de l'huile de lin

L'analyse RMN ^1H permet également de définir une moyenne de deux insaturations par chaîne lipidique dans le mélange, ainsi, afin de simplifier par la suite la représentation des structures comportant les chaînes lipidiques, seule la chaîne linoléique sera représentée, mais il s'agira toujours du même mélange statistique de chaînes grasses.

Etape 2: Introduction du groupement mésylate ou tosylate

La première étape de la polymérisation consistant en une réaction nucléophile entre le monomère et l'amorceur, celui-ci doit contenir un excellent groupe partant. Dans notre étude nous avons comparée deux groupements, le tosylate et le mésylate. Ainsi, deux lipoamorceurs ont été préparés : le lipoamorceur mésylé (LMs) dont la synthèse avait déjà été mise au point lors d'une étude précédente [9] et un nouveau lipoamorceur tosylé (LTs). L'étape qui suit la réduction de l'huile de lin est donc l'introduction d'un groupe partant mésylé [9] ou tosylé en extrémité des chaînes d'alcool gras.

La réaction de mésylation (Figure 6) est réalisée par réaction du chlorure de méthanesulfonyle sur l'hydroxyle de l'alcool gras. Une conversion totale est obtenue au bout de 4 heures de réaction et l'étape de purification consistant en de simples lavages aqueux permet l'obtention du produit final avec un rendement de 77 %.

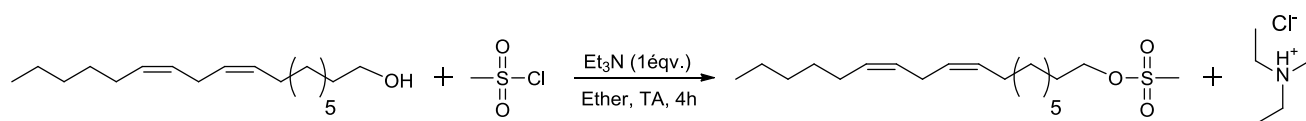


Figure 6 : Réaction de mésylation sur l'alcool gras

L'analyse RMN ^1H permet de vérifier que la réaction a eu lieu grâce au déplacement du signal caractéristique des protons en α (de 3,63 à 4,22 ppm) et β (de 1,56 à 1,74 ppm) de la fonction mésylate introduite ainsi qu'à l'apparition du pic à 3 ppm correspondant aux protons de $-\text{S}-\text{CH}_3$ (Figure 7). De plus le spectre infrarouge montre clairement la disparition de la bande de vibration de la fonction hydroxyle ($\nu = 3335 \text{ cm}^{-1}$) et l'apparition à $\nu = 1353 \text{ cm}^{-1}$ et $\nu = 1175 \text{ cm}^{-1}$ des bandes caractéristiques du groupement $\text{S}=\text{O}$.

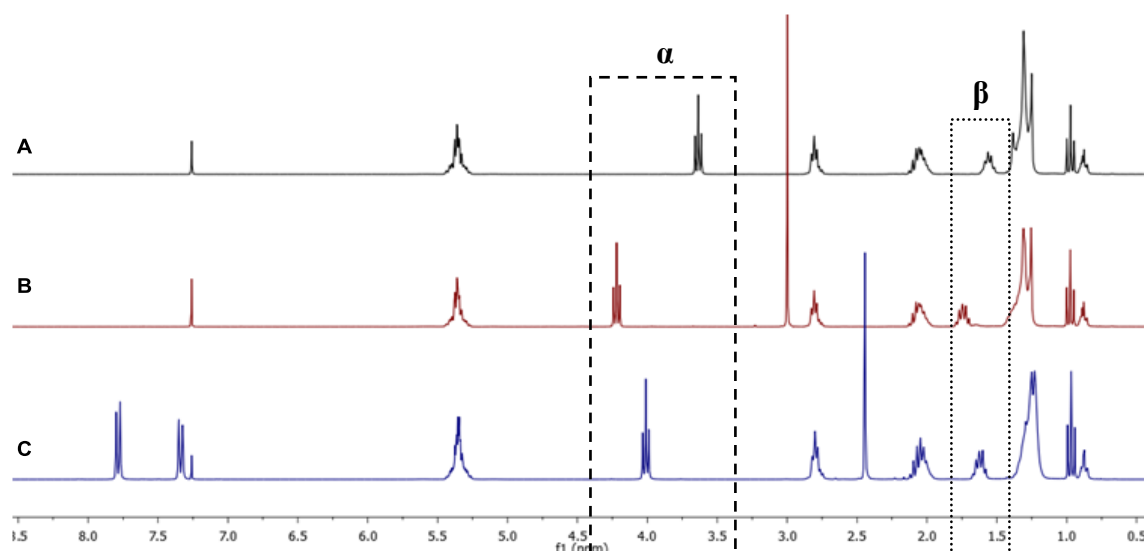


Figure 7 : Spectres RMN ^1H dans le CDCl_3 de (A) l'alcool gras, (B) LMs et (C) LTs

La réaction de tosylation (Figure 8) est réalisée par réaction d'une solution de chlorure de *p*-toluenesulfonyl dans le chloroforme sur l'hydroxyle de l'alcool gras. Des essais avaient précédemment été réalisés au sein du laboratoire pour cette réaction en présence de pyridine en tant que base nucléophile cependant de faibles rendements et des difficultés de purification avaient été rencontrés.

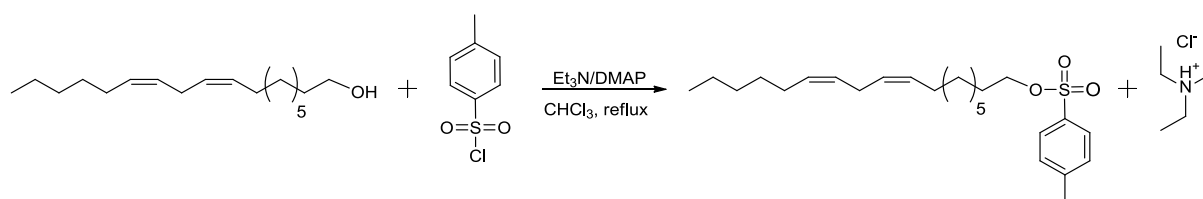


Figure 8 : Réaction de tosylation sur l'alcool gras

Des modifications ont donc été apportées au protocole de cette réaction notamment sur le choix de la base nucléophile et sur les étapes de purification. Ainsi, le couple $\text{Et}_3\text{N}/\text{DMAP}$ a été utilisé au lieu de la pyridine et des lavages par une solution de NaHCO_3 ont été effectués afin d'éliminer les sous-produits de la réaction (Et_3NH^+ , TsCl , DMAP) avant la purification sur colonne de gel de silice. [14] L' Et_3N a également été testée seule mais une conversion

plus faible a été obtenue (Tableau 1, essai 1), l'ajout de DMAP ici sert de catalyseur à la réaction.

Ainsi, afin d'optimiser la réaction de tosylation, le nombre d'équivalents en DMAP, Et₃N et TsCl a été varié afin d'influer sur le taux de conversion (Tableau 1). Le temps de réaction, dans un premier temps fixé à 3,5 heures, sera par la suite étudié.

Tableau 1 : Optimisation de la réaction de tosylation

Essais	n _{éqv.} DMAP ^a	n _{éqv.} TsCl ^a	n _{éqv.} Et ₃ N ^a	tps (heures)	Conv. (%)
1	0	2	3	24	62
2	0,1	2	3	3,5	97
3	0,1	1,5	2,5	3,5	83
4	0,3	2	3	3,5	84
5	0,3	1,5	2,5	3,5	76
6	0,5	2	3	3,5	92
7	0,5	1,5	2,5	3,5	81

^a par rapport à l'alcool gras

Les conversions obtenues au bout de 3,5 heures varient de 76 à 97 %. Dans chacun des cas, un rapport de 2/3 en nombre d'équivalents pour TsCl/Et₃N semble donner une meilleure conversion. Augmenter la quantité de DMAP ne semble pas améliorer le taux de conversion de façon significative, ainsi 0,1 équivalent a été retenu par la suite.

Dans un deuxième temps, la durée de réaction a été augmentée, mais elle n'a apparemment pas d'influence sur la conversion au-delà de 3,5 heures (Tableau 2).

Tableau 2 : Variation du temps de réaction de tosylation en présence de 0,1 éqv. de DMAP

Essais	n _{éqv.} DMAP	n _{éqv.} TsCl	n _{éqv.} Et3N	tps	Conv
2	0,1	2	3	3,5	97
8	0,1	2	3	20	97

Les conditions sélectionnées sont donc celles de l'essai 2. L'obtention du produit est confirmée par RMN ^1H (Figure 7) montrant l'apparition des pics correspondants aux protons du cycle aromatique ($\delta = 7,80$ et $7,35$ ppm) et le déplacement du signal caractéristique des protons en α (de $\delta = 3,63$ à $\delta = 4,01$ ppm) et en β (de $\delta = 1,5$ à $\delta = 1,63$ ppm) de la fonction tosylate. Le spectre IRTF montre la disparition de la bande de vibration de la fonction hydroxyle ($\nu = 3335 \text{ cm}^{-1}$) ainsi que l'apparition de la bande de vibration correspondant au groupement sulfate ($\nu = 1360$ et $\nu = 1180 \text{ cm}^{-1}$). Un rendement correct de 57 % est obtenu après purification, plus faible que pour le LMs du fait de la purification sur colonne de gel de silice.

2. Synthèse des copolymères lipide-*b*-poly(oxazoline)

2.1. Comparaison de l'efficacité des deux amorceurs lipidiques

La synthèse de copolymères amphiphiles lipide-*b*-poly(2-méthyle-2-oxazoline)s a été effectuée par CROP par voie thermique en présence des lipoamorceurs issus de l'huile de lin (Figure 9). Des études cinétiques ont été effectuées afin de déterminer lequel permet un meilleur amorçage, notamment en termes de contrôle de polymérisation et d'efficacité.

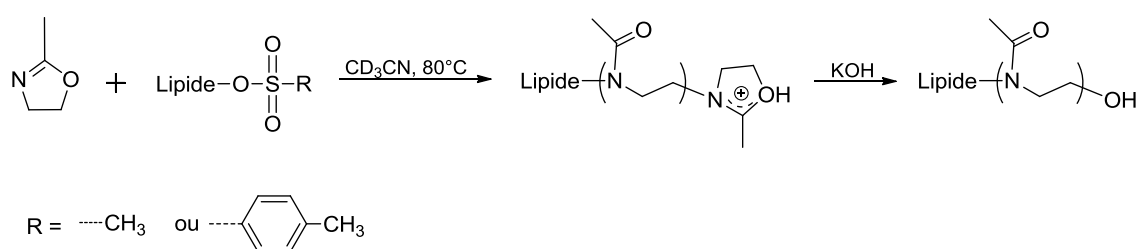


Figure 9 : Schéma de polymérisation par CROP de la MeOx en présence des LTs ou LMs

Les conditions de polymérisation ont été choisies d'après les nombreuses publications décrivant la CROP du MeOx. [15][16][17] La polymérisation est effectuée dans l'acétonitrile deutéré afin d'analyser directement les prélèvements de la cinétique par RMN ^1H . Les échantillons prélevés sont également analysés par SEC dans le DMAc sans purification préalable.

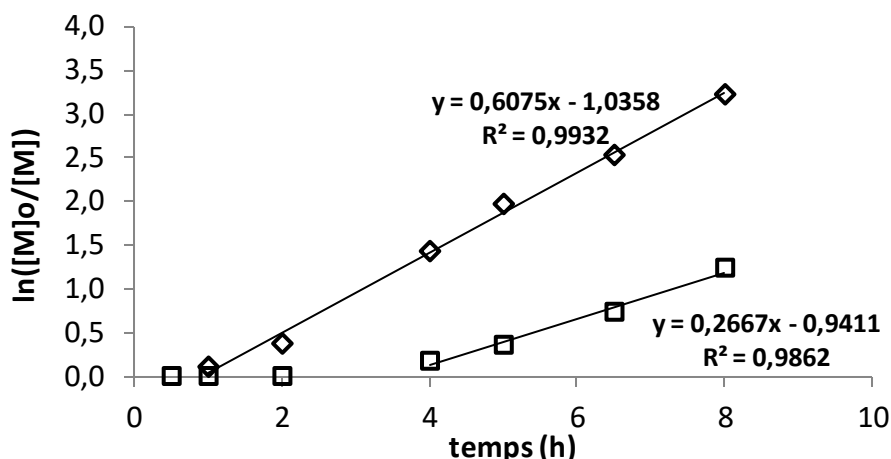


Figure 10 : Tracé de la cinétique de la CROP du MeOx amorcée par LMs (□) et LTs (◇)

L'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps (Figure 10) montre une différence en début de polymérisation avec un temps de latence plus long pour le LMs (4 heures) que pour le LTs (1 heure). Bien qu'il soit rare d'avoir un temps de latence lors d'une polymérisation CROP, ce phénomène a déjà été observé pour d'autres amorceurs. [18] Il pourrait ici s'expliquer par la faible réactivité des amorceurs due à une faible probabilité de rencontre entre l'extrémité de chaîne aliphatique hydrophobe et le premier monomère MeOx hydrophile. Au-delà de ces temps de latence, la cinétique est du premier ordre démontrant une concentration constante en espèce propageante.

L'étude cinétique permet également d'obtenir la constante de vitesse de polymérisation k_p via la pente du tracé de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps (Figure 10). Ainsi la polymérisation amorcée par le LTs (k_p (LTs) = $1,06 \times 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) s'effectue deux fois plus vite que celle amorcée par le LMs (k_p (LMs) = $4,87 \times 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ces valeurs sont cohérentes avec celles de la littérature pour un amorçage par le propargyl toluene-4-sulfonate [19] ou encore le MeOTs [20]. On retrouve très peu l'utilisation d'amorceur mésylé pour la CROP de 2-

oxazoline dans la littérature, [9] cependant il est décrit que la nucléophilie des amorceurs joue un rôle important dans la vitesse de polymérisation. Plus le groupe partant de l'amorceur est nucléophile, plus la vitesse de polymérisation augmente : $\text{MeOTf} > \text{MeOTs} > \text{MeI}$. [10] [21].

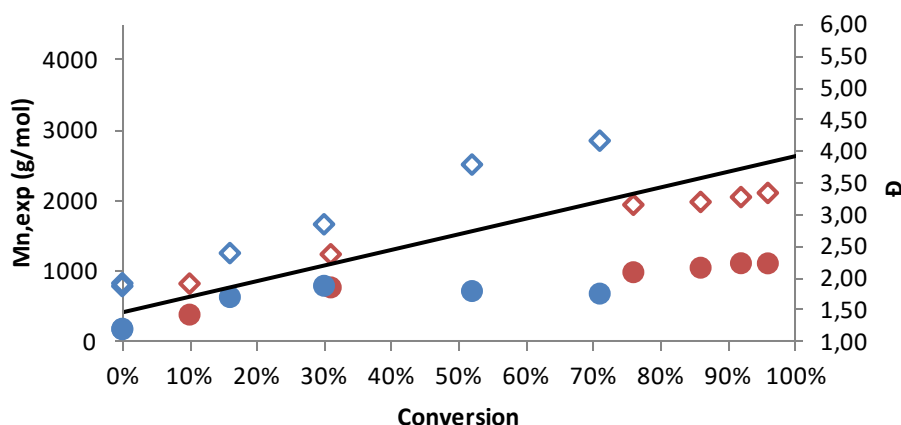


Figure 11 : Evolution des M_n expérimentales ($M_{n,exp}$) ($\diamond$) et des dispersités (Đ) ($\bullet$) en fonction de la conversion pour la CROP amorcée par les LTs (rouge) et par les LMs (bleu).

Les M_n expérimentales ainsi que les dispersités obtenues par analyses SEC des échantillons prélevés pendant la cinétique ont été tracées en fonction de la conversion (Figure 11). Pour la polymérisation par CROP amorcée par les LMs, les masses molaires apparentes obtenues sont plus importantes que les masses molaires théoriques. Ce comportement peut s'expliquer par une faible efficacité d'amorçage, néanmoins les masses molaires restent proportionnelles à la conversion démontrant une polymérisation contrôlée. À l'inverse, lors de l'amorçage par les LTs, les M_n obtenues au cours de la cinétique concordent assez bien avec la droite théorique. Une légère déviation vers les faibles masses peut tout de même être observée à haute conversion. Cependant, les analyses SEC ayant été effectuées sur un échantillon prélevé pendant la cinétique et sans purification préalable, la présence de lipoamorceur est donc inévitable (Figure 12). Notons que l'intégration comprend la totalité du pic conduisant nécessairement à une sous-estimation des masses molaires et à des dispersités élevées.

Après purification par dialyse la masse moyenne en nombre et la dispersité des L-PMEOx ont été déterminées par SEC (Tableau 3). L'amorçage de la polymérisation par les lipoamorceurs a permis d'obtenir des copolymères bien définis de dispersité 1,33 et 1,49 et de $\overline{M}_n = 3700$ g/mol et 4500 g/mol pour les LTs et LMs respectivement.

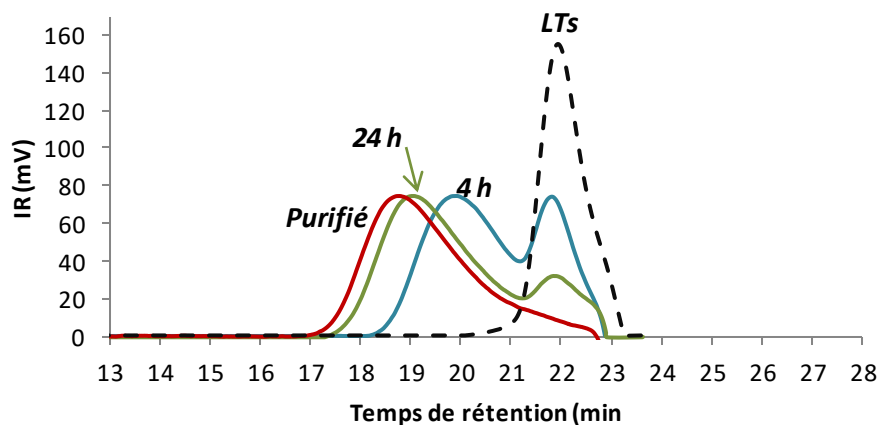


Figure 12 : Etude cinétique de la CROP amorcée par le LTs

L'analyse par RMN (Figure 13) des copolymères finaux permet de calculer l'efficacité de chaque amorceur grâce aux signaux caractéristiques avant et après réaction. Pour le LTs, les signaux caractéristiques des protons aromatiques, situés à 7,35 et 7,80 ppm, se déplacent après réaction (TsO^-) à 7,20 et 7,60 ppm (Figure 13). Ainsi, le rapport des intégrations ($I_{7,6 \text{ ppm}} / (I_{7,6 \text{ ppm}} + I_{7,8 \text{ ppm}})$) donne l'efficacité d'amorçage du LTs. Le même calcul peut être fait pour le LMs en considérant les pics à 2,50 et 3 ppm. Les résultats montrent une meilleure efficacité pour le LTs, 71 % contre 47 % pour le LMs.

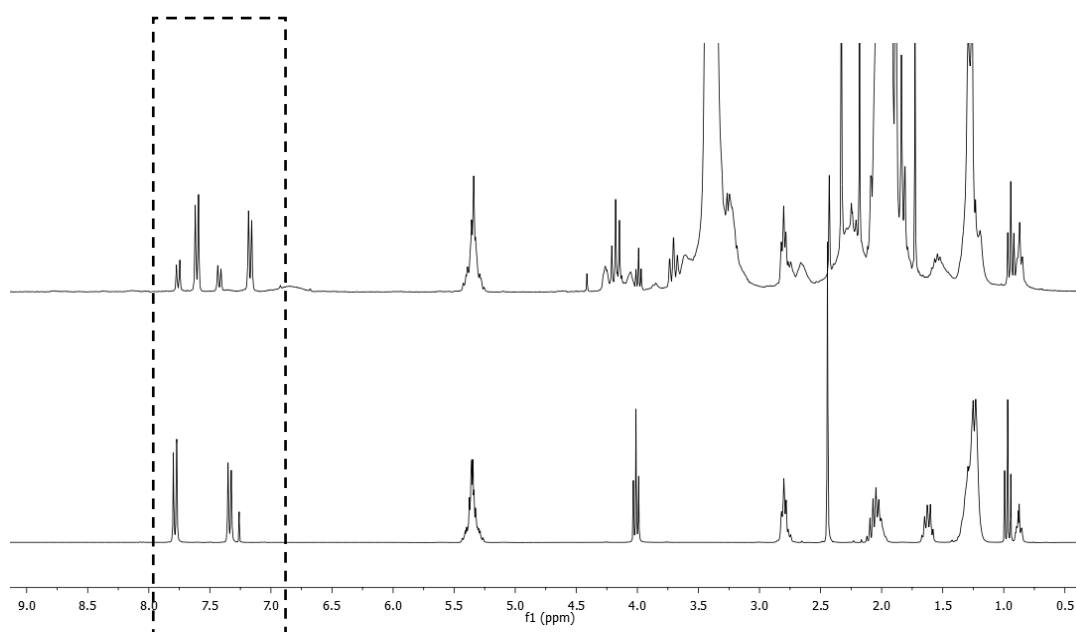


Figure 13 : Spectres RMN ^1H du L-P(MeOx au bout de 8 heures de polymérisation dans CD_3CN (en haut) et du LTs dans CDCl_3 (en bas)

Il est possible de déterminer le degré de polymérisation d'après le spectre RMN ^1H (Figure 14) par un calcul prenant en compte les intégrations relatives des CH_2 de la chaîne lipidique ($\delta = 1,30 \text{ ppm}$) et des CH_2 des motifs oxazoline ($\delta = 3,5 \text{ ppm}$) selon la formule suivante :

$$\overline{X}_n = \frac{I_{3,5 \text{ ppm}}}{4} / \frac{I_{1,30 \text{ ppm}}}{15}$$

(pour rappel, le lipoamorceur est représenté avec la chaîne aliphatique majoritaire, di-insaturée, mais le mélange statistique contient en moyenne 15 CH_2 aliphatique).

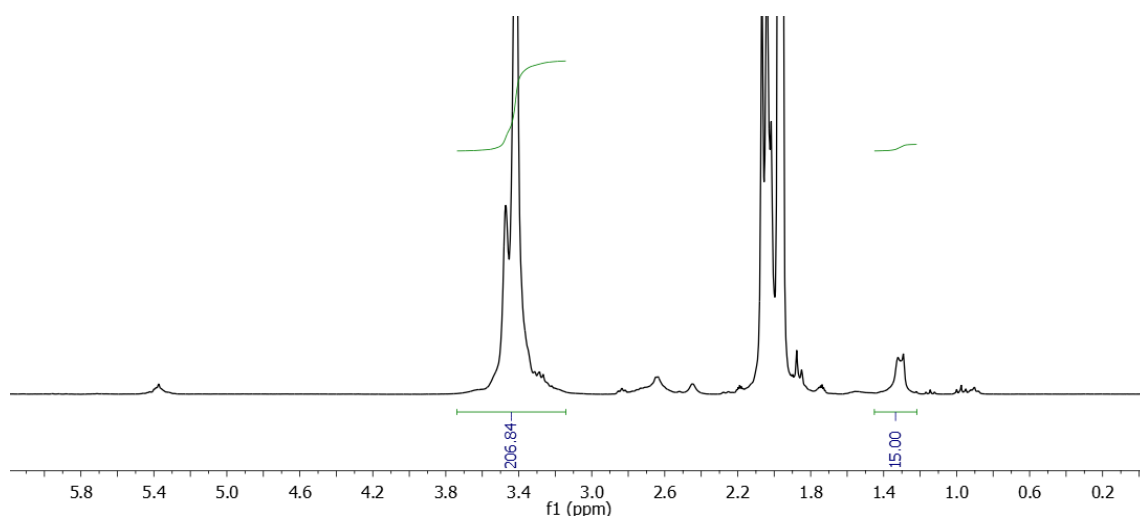


Figure 14 : Spectre RMN ^1H du L-PMeOx dans CD_3CN

Ainsi des $\overline{X}_n$ de 51 et 48 ont été obtenus pour le L-PMeOx amorcé par le LTs et LMs respectivement.

Tableau 3 : Caractéristiques des polymérisations du MeOx par les lipoamorceurs

Run	Amorceur	Conversion ^c (%)	$\overline{Mn}_{\text{théo.}}$ (g/mol)	$\overline{Mn}_{\text{SEC}}$ (g/mol) ^a	$\overline{Mn}_{\text{RMN}}$ (g/mol) ^b	$\overline{X}_n$ ^c	$\overline{D}^a$	eff. ^c (%)
1	LMs	98%	2600	4500	4400	48	1,49	47
2	LTs	99%	2600	3700	4800	51	1,33	71

^a M_n et $\overline{D}$ déterminées par SEC dans le DMAc après dialyse, étalonnage PMMA

^b $\overline{Mn}_{\text{RMN}} = \overline{X}_n \times M_{\text{monomère}} + M_{\text{lipoamorceur}}$

^c Déterminé par ^1H RMN

Au vu des résultats obtenus à travers l'étude cinétique de nos lipoamorceurs, nous avons sélectionné le LTs pour la suite de notre projet, notamment pour sa meilleure efficacité, son temps de latence plus faible et sa vitesse de propagation plus élevée. Néanmoins, le lipoamorceur mésylé reste un candidat intéressant puisqu'il présente également de bons résultats et a l'avantage d'une synthèse plus aisée.

2.2. Polymérisation d'une gamme de 2-alkyl-2-oxazoline

Le contrôle de la polymérisation à partir de nos amorceurs originaux par voie thermique classique ayant été démontrée, nous nous sommes intéressés à la CROP assistée par micro-onde dans le but de réduire la durée de polymérisation et d'améliorer le contrôle. En effet, Wiesbrock *et al.* ont récemment étudié la polymérisation CROP assistée par micro-onde, [20] démontrant un caractère vivant lors de la synthèse de poly(2-éthyle-2-oxazoline), un temps de réaction considérablement réduit (de plusieurs heures à quelques minutes) et une faible dispersité des polymères, donc un bon contrôle. [22]

Dans un premier temps la polymérisation du MeOx amorcée par le LTs a été réalisée par CROP assistée par micro-ondes (μ -CROP) afin de comparer les résultats avec la voie thermique. Ainsi, la μ -CROP de la MeOx dans l'acétonitrile à 140 °C (Tableau 4, run 3) permet d'obtenir le copolymère L-PMeOx avec un degré de polymérisation de 43, résultat cohérent avec la voie thermique. De nouveau, l'efficacité d'amorçage a été calculée (63 %) et elle est légèrement inférieure à celle obtenue par voie thermique (71 %).

Tableau 4 : Résultats de polymérisation par micro-onde de la MeOx, l'EtOx et l'iPrOx amorcé par le LTs.

Run	Monomère	Temps	$\overline{Mn}_{théo.}(g/mol)$	$\overline{Mn}_{SEC}(g/mol)^a$	$\overline{Mn}_{RMN}(g/mol)^b$	$\overline{D}^a$	eff. ^c (%)
3	MeOx	20 min	2700	2900	4100	1,41	63
4	EtOx	30 min	3000	3500	3000	1,50	62
5	iPrOx	30 min	3500	5400	4800	1,33	52

^a M_n et $\overline{D}$ déterminées par SEC dans le DMAc après dialyse, étalonnage PMMA

^b $\overline{Mn}_{RMN} = \overline{X}_n \times M_{monomère} + M_{lipoamorceur}$

^c Déterminé par ^1H RMN

Le contrôle de la polymérisation par CROP assistée par micro-onde du MeOx ayant été démontré, les mêmes conditions ont été appliquées à différents monomères oxazolines (l'EtOx et l'*i*PrOx) afin d'accéder à des polymères thermo-sensibles (Tableau 4, run 4 et 5).

Ainsi la polymérisation par μ -CROP de l'EtOx et de l'*i*PrOx a été effectuée avec un ratio initial Monomère/LTs de 26/1. Le temps de polymérisation passe de 20 min (pour le MeOx) à 30 min du fait de la plus faible nucléophilie de l'EtOx et de l'*i*PrOx comparé au MeOx. Les analyses RMN ^1H et SEC dans le DMAc ont permis d'évaluer le degré de polymérisation et l'efficacité d'amorçage ainsi que la masse molaire moyenne en nombre et la dispersité des copolymères 4 et 5 après purification. Les dispersités obtenues sont de 1,50 pour le copolymère 4 et 1,33 pour le copolymère 5.

Comme pour le copolymère 3, le rapport des intégrations des CH_2 de la chaîne lipidique à $\delta = 1,30$ ppm (i) et des CH_2 des motifs oxazoline à $\delta = 3,5$ ppm (b) permet le calcul du degré de polymérisation (Figure 15). Il est de 26 et 39 pour le copolymère 4 et 5 respectivement, la différence venant probablement d'une plus faible efficacité d'amorçage pour l'*i*PrOx (Tableau 4). Par ailleurs, nous pouvons remarquer un problème de cohérence entre les $\overline{Mn}_{\text{SEC}}$ et les $\overline{Mn}_{\text{RMN}}$. Le lipoamorceur et la POx étant soluble dans le CDCl_3 , nous nous fixerons à la détermination des masses molaires par RMN.

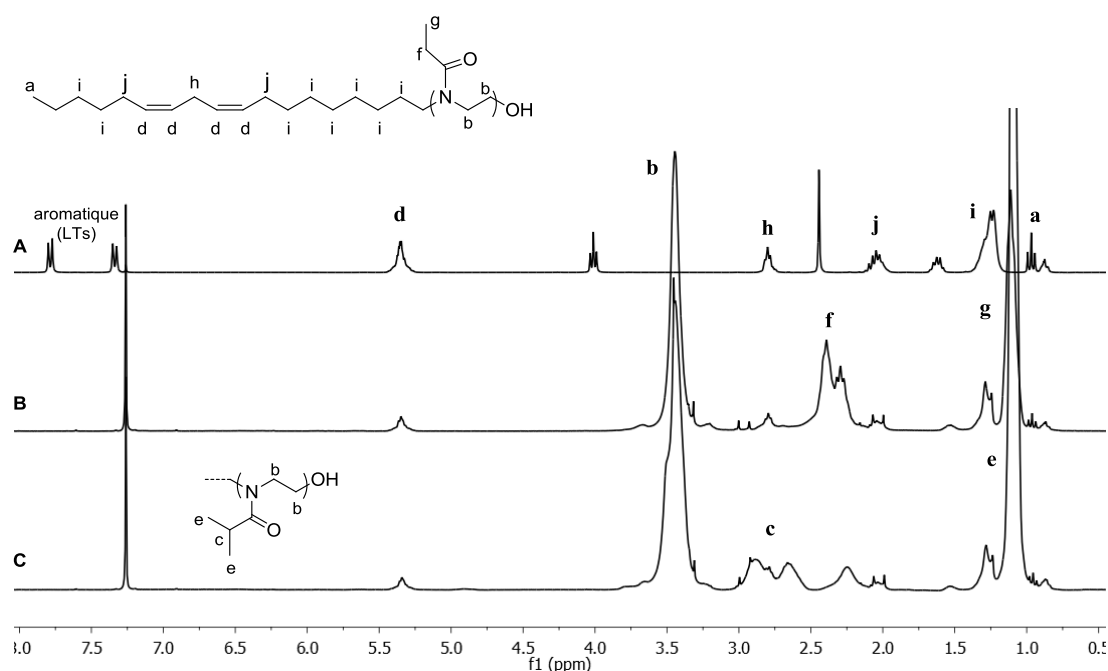


Figure 15 : Spectres RMN ^1H dans le CDCl_3 du (A) LTs, (B) copolymère 4 et (C) copolymère 5.

La Figure 15 montre également l'attribution des pics constitutifs des unités monomères. Pour l'EtOx nous retrouvons les signaux à $\delta = 3,3$ ppm (f) et à $\delta = 1,15$ ppm (g) correspondants au groupement éthyle. Pour l'iPrOx, les signaux à $\delta = 3,75$ ppm (c) et à $\delta = 1,15$ ppm (e) correspondent au groupement isopropyle. Ces signaux vont permettre dans la suite de notre étude de déterminer la composition de chacun des monomères dans les copolymères L-P(EtOx-co-iPrOx).

2.3. Copolymérisation de l'EtOx et de l'iPrOx

L'intérêt de la copolymérisation de l'iPrOx avec l'EtOx réside dans la volonté de moduler la température de point trouble (T_{PT}) des poly(oxazoline)s. Park et Kataoka ont étudié des copolymères totalement hydrophiles poly(EtOx-co-iPrOx). [23] Ils ont démontré qu'il existe une relation linéaire entre la composition en EtOx et la T_{PT} . Notre étude visant à moduler la T_{PT} du copolymère L-PiPrOx, une série de copolymères L-P((EtOx)_x-co-(iPrOx)_y) présentant différents ratio EtOx/iPrOx a été synthétisée par copolymérisation de l'iPrOx et de l'EtOx : le L-P(EtOx_{21%} iPrOx_{79%}), L-P(EtOx_{42%} iPrOx_{58%}) et L-P(EtOx_{75%} iPrOx_{25%}) (run 7 à 9, Tableau 5). L'analyse par RMN ¹H permet le calcul de la composition finale en EtOx et en iPrOx au sein du copolymère (Figure 16). Le calcul (Équation 1) est effectué via l'intégration des signaux correspondants aux groupements CH₃ de l'isopropyle et de l'éthyle à $\delta = 1,1$ ppm (e + g) et des protons -CH₂-CH₂ du squelette polyoxazoline à $\delta = 3,45$ ppm (b).

$$\text{Équation 1} \quad \left\{ \begin{array}{l} I_b = 4n_e + 4n_i \\ I_{e+g} = 3n_e + 6n_i \end{array} \right. \Rightarrow n_i = \frac{I_b}{4} + \frac{I_{e+g}}{3}$$

Avec n_e : nombre de motifs EtOx et n_i : nombre de motifs iPrOx. I_{e+g} et I_b , les intégrations des pics (e+g) et b.

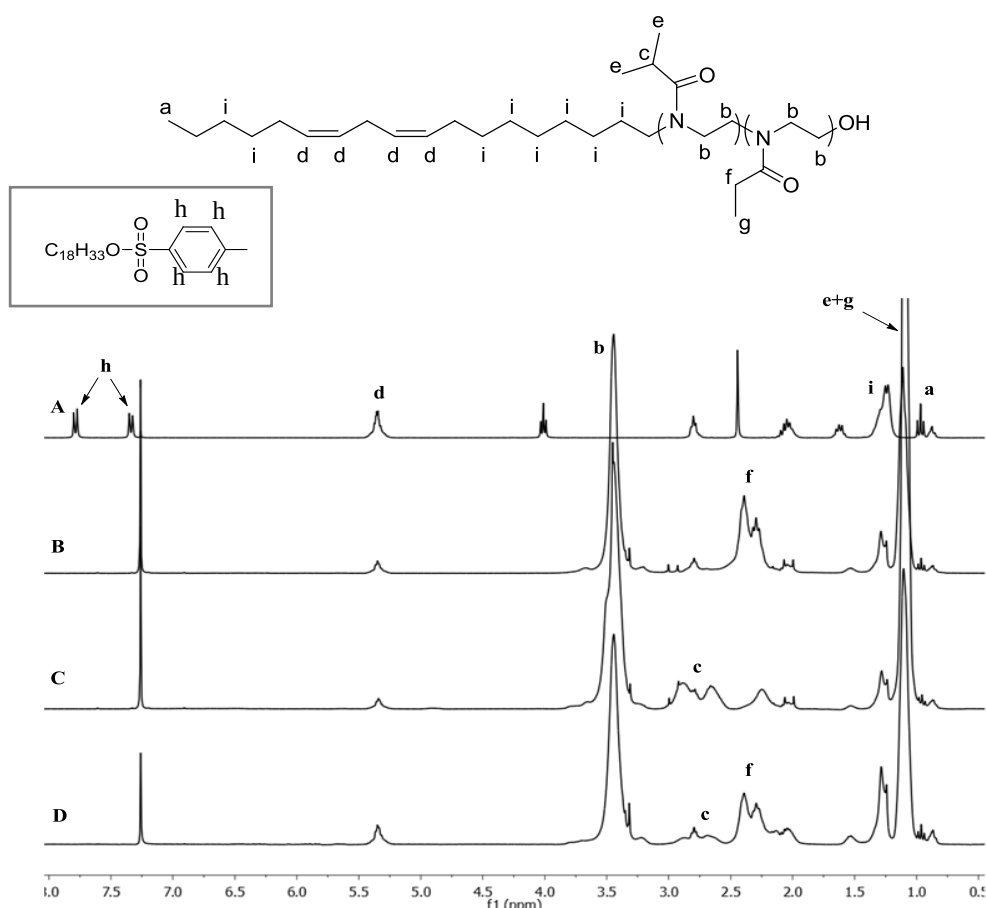


Figure 16 : Spectre RMN (CDCl_3) de A) LTs, B) L-PEtOx 4, C) L-PiPrOx 5, and D) L-P((EtOx)-co-(iPrOx)) 8

Ainsi, les ratios expérimentaux calculés montrent une déviation par rapport à la composition du mélange initial lorsque l'amorçage est effectué par le LTs (comparé à un amorceur classique, MeOTs) (Tableau 5, run 6). Ceci peut s'expliquer par l'introduction favorisée de l'EtOx par rapport à l'iPrOx lors de l'utilisation du lipoamorceur due à une légère différence de nucléophilie et réactivité des deux monomères ($\text{EtOx} > \text{iPrOx}$). Ce phénomène a déjà été observé par Lambermont-Thijs *et al.*[24] lors d'une copolymérisation statistique avec une incorporation plus rapide de la MeOx par rapport à la 4-éthyle-2-butyle-2-oxazoline, révélant une diminution de la constante de vitesse de polymérisation de ce second monomère due à une augmentation de la gêne stérique.

Les masses molaires moyennes en nombre et les dispersités en masse des copolymères finaux ont été déterminées après purification par analyse SEC (Tableau 5). Pour chaque polymérisation, un bon contrôle est observé ($\bar{M}_w/\bar{M}_n = 1,30$ environ). Les efficacités d'amorçage

calculées à partir des spectres RMN ^1H sont plus faibles que lors des polymérisations précédentes. De façon intéressante, nous pouvons remarquer que dans nos conditions, plus le copolymère contient de l'*i*PrOx, plus l'efficacité est faible, en lien avec l'appauvrissement de la nucléophilie du système étudié.

Tableau 5 : Caractéristiques des copolymérisations de l'EtOx et de l'*i*PrOx

Run	Monomère	Amorceur	EtOx/ <i>i</i> PrOx introduit (%mol) (x/y)	EtOx/ <i>i</i> PrOx (%mol) (x/y) ^a	$\overline{Mn}_{\text{théo.}}$ (g/mol)	$\overline{Mn}_{\text{RMN}}$ (g/mol) ^b	$\overline{D}^c$	eff. ^a (%)
4	EtOx	LTs	100/0	100/0	3000	2800	1,50	62
5	<i>i</i> PrOx	LTs	0/100	0/100	3500	4800	1,33	52
6	EtOx/ <i>i</i> PrOx	MeOTs	20/80	20/80	3000	3000	1,18	/ ^d
7	EtOx/ <i>i</i> PrOx	LTs	20/80	21/79	2500	2900	1,29	37
8	EtOx/ <i>i</i> PrOx	LTs	40/60	42/58	2400	2800	1,35	40
9	EtOx/ <i>i</i> PrOx	LTs	70/30	75/25	2300	2000	1,32	51

^a Déterminés par ^1H RMN dans le CDCl_3 .

^b $\overline{Mn}_{\text{RMN}} = \overline{X_n} \times [(\% \text{ mol}_{\text{EtOx}} \times M_{\text{EtOx}}) + (\% \text{ mol}_{\text{iPrOx}} \times M_{\text{iPrOx}})] + M_{(\text{lipo})\text{amorceur}}$

^c Déterminées par SEC dans DMAc, PMMA standards.

^d Intégration du signal en bout de chaîne non possible.

Une caractérisation plus poussée de la structure du copolymère L-P(EtOx_{21%} *i*PrOx_{79%}) a été réalisée par spectrométrie MALDI-TOF en mode positif via l'utilisation du cation NH_4^+ , d'un réflectron et en présence d'acétonitrile.

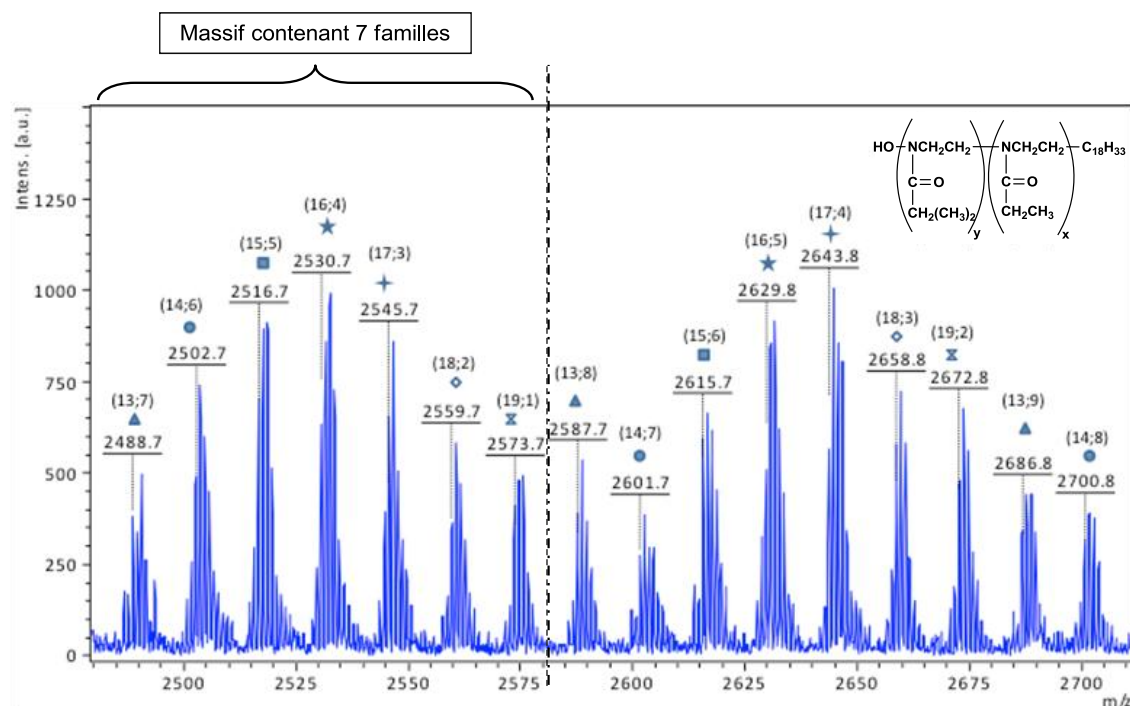


Figure 17 : Spectre MALDI-TOF du copolymère L-P(EtOx_{21%}-co-iPrOx_{79%}) (zoom dans la région 2400-2700 g/mol).

Comme illustré sur le spectre Figure 17, seulement une population de polymère est détectée pour le copolymère L-P(EtOx_x-co-iPrOx_y). Les pics ont été attribués à la famille $(M + \text{NH}_4 + \text{ACN})^+$ avec M la chaîne de polymère constituée des unités de répétition EtOx (x) et iPrOx (y) totalement terminée par le groupement hydroxyle. Une bonne concordance est observée entre les valeurs expérimentales et théoriques ($\Delta m = 0,2$). Par exemple, 2530,7 contre 2530,9 g/mol a été déterminée pour y = 16 et x = 4. Le massif obtenu à l'issue de l'analyse (Figure 17) est divisé en vagues successives, chacune composée de 7 pics (marqués par un symbole spécifique) avec une augmentation du nombre d'unités iPrOx et une diminution du nombre d'unités EtOx dans la chaîne de polymère [y:7, (y + 1):6, (y + 2):5, (y + 3):4, (y + 4):3, (y + 5):2 et (y + 6):1]. Deux pics consécutifs des sept familles sont séparés par un m/z de 113 correspondant à l'unité iPrOx (Figure 18). De façon intéressante, le maximum de chaque famille correspond à un ratio iPrOx/EtOx proche de 80 % en y (y:x = 16:4, 17:4, ...) cohérent avec les résultats RMN.

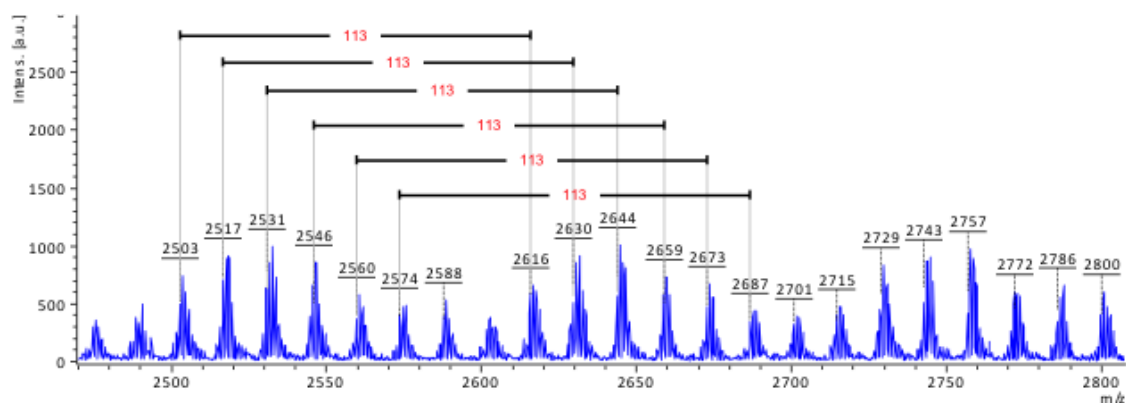


Figure 18 : Zoom du spectre MALDI-TOF du copolymère L-P(EtOx₂₁%-co-iPrOx₇₉%)

La synthèse d'une gamme copolymères amphiphiles L-POx ainsi effectuée, l'étude de leur comportement en milieu aqueux a été entreprise par la suite.

III. Caractérisation physico-chimique des copolymères amphiphiles thermo-sensibles en milieu aqueux

Le comportement physico-chimique des copolymères synthétisés précédemment ainsi que l'influence de la température sur celui-ci ont été étudiés dans l'eau. Le caractère amphiphile de ces copolymères apporté par la coexistence de la chaîne lipidique et du bloc poly(oxazoline) permet leur auto-association dans l'eau sous forme d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile. Les propriétés thermo-sensibles de cette couronne vont être étudiées dans cette partie ainsi que la nature des agrégats obtenus.

1. Caractérisation des copolymères *L-PEtOx* (4) et *L-PiPrOx* (5)

La caractérisation des copolymères amphiphiles L-PiPrOx 5 et L-PEtOx 4 a dans un premier temps été effectuée par fluorescence par sonde pyrène. Cette technique couramment utilisée pour déterminer la concentration d'agrégation critique (cac) de systèmes macromoléculaires utilise une molécule hydrophobe fluorescente, ici le pyrène. Le pyrène possède une solubilité dans l'eau très faible (10^{-7} mol/L) et est sensible à son environnement.

[25], [26] En fonction de la polarité du milieu dans lequel il se trouve, son spectre de fluorescence change. Ainsi, grâce au spectre d'excitation ($\lambda_{\text{excitation}} = 330\text{-}360\text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 374\text{ nm}$), il est possible de suivre le transfert de la molécule de pyrène d'un milieu polaire à apolaire via le déplacement du maximum du pic de 333 à 338 nm. Dans un milieu polaire tel que l'eau, le rapport d'intensité du pyrène à ces longueurs d'ondes (I_{338}/I_{333}) est d'environ 1,8 (1,1 dans l'éthanol), ce rapport diminue à une valeur inférieure à 1 dans le cas d'un solvant apolaire. Pour une solution de copolymère amphiphile, le rapport I_{338}/I_{333} en fonction de la concentration permet de déterminer si le pyrène est dans un milieu hydrophile (l'eau) ou hydrophobe (cœur des micelles, des agrégats...). En étudiant le spectre d'excitation du pyrène sur toute une gamme de concentration en copolymère, il est donc possible de déterminer la cac. L'un des objectifs de ce travail étant l'étude de la formation de micelles mixtes avec d'autres natures de polymères hydrophiles (dont les polyelectrolytes), l'ensemble des caractérisations physico-chimiques a été effectuées en présence de sel (0,1 M NaCl), introduit pour écranter d'éventuelles charges. Pour chacun des copolymères, les cac, déterminées à l'intersection des deux droites (Figure 19) sont faibles : 29 mg/L ($8,3 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$) pour le L-PiPrOx et 17 mg/L ($3,10 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$) pour le L-PEtOx. Ces valeurs sont cohérentes avec la littérature qui indique des cac de 10^{-4} et 10^{-6} mol/L pour les copolymères amphiphiles triglycérol-*b*-poly(MeOx) [27] et lipide-*b*-poly(*i*PrOx) [9] respectivement

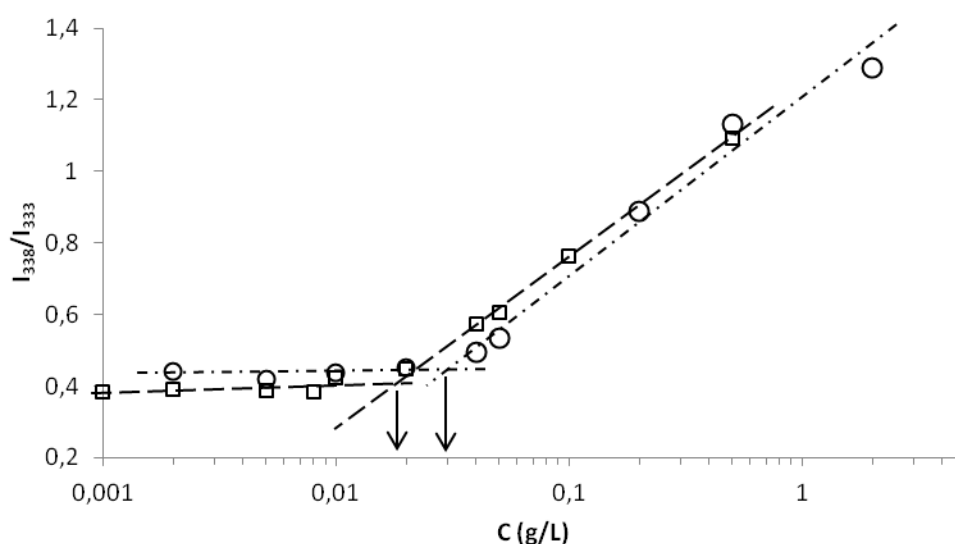


Figure 19 : Détermination de la cac par fluorescence du pyrène (0,1 M NaCl) à t_{amb} : Evolution du rapport des intensités I_{338}/I_{333} en fonction de la concentration en copolymère. □ L-PiPrOx, ○ L-PEtOx

Les copolymères **4** et **5** ont par la suite été étudiés par spectrophotométrie UV-visible à une concentration de 2 g/L dans l'eau distillée (NaCl, 0,1 M). A cette concentration, les mesures de fluorescence par sonde pyrène confirment l'auto-association des copolymères amphiphiles.

Les températures de point de trouble observées pour les copolymères **4** et **5** sont de 76 °C et 35 °C respectivement. Dans un premier temps nous pouvons remarquer la forte diminution de la température de transition comparée aux homopolymères PEtOx et PiPrOx. En effet, aucune transition n'avait été observée jusqu'à 85 °C pour l'homopolymère PEtOx. [23] Dans le cas du L-PiPrOx une diminution de 23 °C est obtenue comparée à l'homopolymère correspondant (58 °C) (Figure 20). Ce comportement est dû à l'incorporation d'un bloc hydrophobe de 18 carbones dans la structure du copolymère qui tend à diminuer sa température de point trouble comme observé dans les travaux de Winnik *et al.* [28]

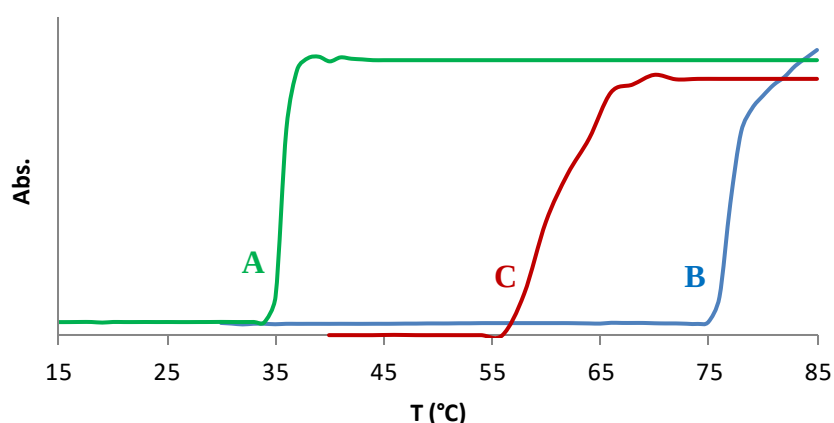


Figure 20 : Spectre d'absorbance UV-Visible ($\lambda = 600$ nm) en fonction de la température pour le copolymère A) L-PiPrOx 5, B) L-PEtOx 4 et C) PiPrOx à 2 g/L dans l'eau distillée (0,1 M NaCl). La T_{PT} est déterminée à 10 % de l'augmentation de l'absorbance.

L'étude de la réversibilité d'un polymère thermo-sensible peut également être réalisée par spectrophotométrie UV-visible. L'étude d'un LPEtOx de $\overline{Mn}_{RMN} = 2700$ g/mol (Figure 21) montre qu'il existe une différence de température de transition de phase lors du refroidissement. Ce phénomène appelé hystérèse est très connu dans le cas du PNIPAM et met en évidence une difficulté de réhydratation des chaînes de polymères collapsées. Ainsi, la

redissolution du polymère s'effectue de façon plus lente et l'expansion des chaînes à lieu à une température inférieure à la T_{PT} obtenue lors de la chauffe.

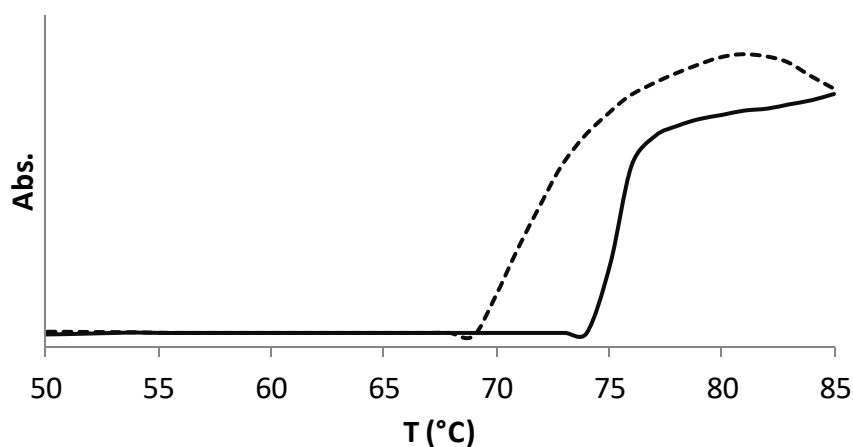


Figure 21 : Etude de l'évolution de la transition de phase pour le copolymère L-PEtOx à 2 g/L dans l'eau distillée (0,1 M NaCl) lors d'une montée (trait plein) et descente (pointillé) en température ($\lambda = 600$ nm).

Pour aller plus loin et déterminer la nature des objets formés en solution, des mesures par diffusion de la lumière ont été effectuées. Le diamètre hydrodynamique (D_h) des copolymères a été étudié par diffusion dynamique de la lumière (DLS) dans les mêmes conditions de concentration et dans le même milieu que précédemment. Les résultats représentent les populations en nombre.

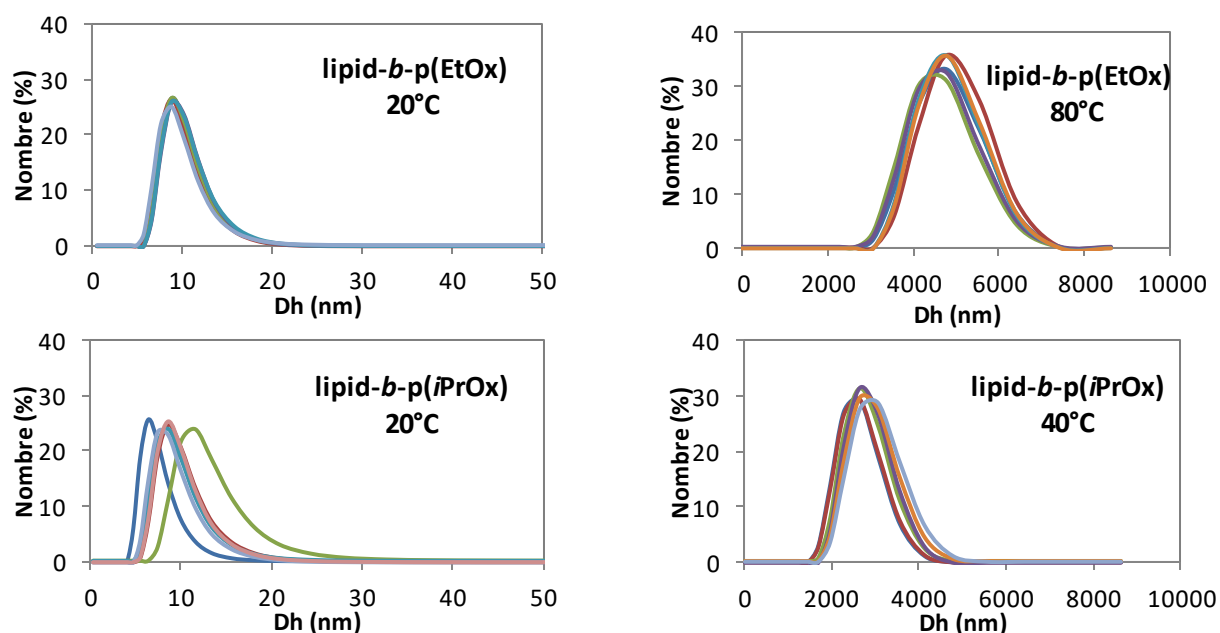


Figure 22 : Mesures DLS des copolymères 4 et 5 à 2 g/L dans l'eau distillé (0,1M NaCl) à 20 °C et au-dessus de leur T_{PT} respective.

A 20 °C, les copolymères **4** et **5** présentent des tailles de l'ordre de 10 nm correspondants à des micelles comportant un cœur lipidique et une couronne thermo-sensible. Ces résultats concordent avec ceux de Winnik *et al.* [28] qui ont observé des rayons hydrodynamiques (R_h) de 7,2 nm et 10,6 nm pour les lipopolyoxazolines C18-PiPrOx-OH (6700 g/mol) et C18-PEtOx-OH de (9700 g/mol) à 1g/L. Lorsque leur T_{PT} respective est atteinte, des agrégats se forment (Figure 23), ce qui confirme le comportement thermo-sensible observé en spectrophotométrie UV-visible (Figure 22).

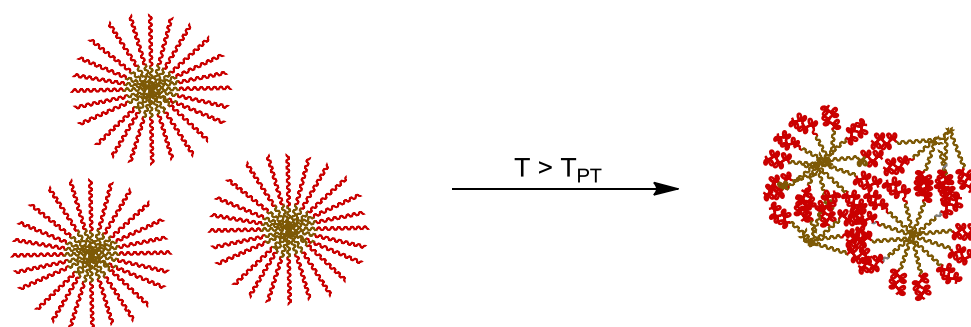


Figure 23 : Représentation schématique des micelles avant et après agrégation.

Afin de déterminer le nombre d'agréations (N_{agg}) de nos systèmes, des manipulations préliminaires ont été réalisées au sein du laboratoire IMMM par le Pr. Christophe Chassenieux. L'étude de la diffusion de la lumière en mode dynamique sur le L-PEtOx a permis d'obtenir un N_{agg} de 9 en prenant un dn/dC de 0,2 mL/g. Ce résultat, faible du fait de la courte longueur du bloc hydrophobe, reste tout de même à confirmer en déterminant le dn/dC propre au copolymère analysé.

2. Caractérisation des copolymères L-P(EtOx_x-co-iPrOx_y)

Le but de la synthèse des copolymères L-P(EtOx-co-iPrOx) **7** à **9** étant de moduler de façon précise la thermo-sensibilité via l'introduction du comonomère EtOx, la T_{PT} de chaque copolymère a été étudiée ainsi que la nature des systèmes (micelles, agrégats). L'étude est réalisée à une concentration de 2 g/L en milieu aqueux (0,1 M NaCl), largement au-dessus de la cac déterminée par fluorescence du pyrène pour le copolymère L-P(EtOx₄₂-co-iPrOx₅₈) **8** : 14 mg/L ($3,10 \times 10^{-6}$ mol/L) comparable à celle du L-PiPOx (Figure 24). De plus, nous confirmons la nature micellaire par mesure DLS à 20 °C, le diamètre hydrodynamique (D_h) de nos systèmes étant similaires à ceux des copolymères **4** et **5**, environ 10 nm (Figure 27).

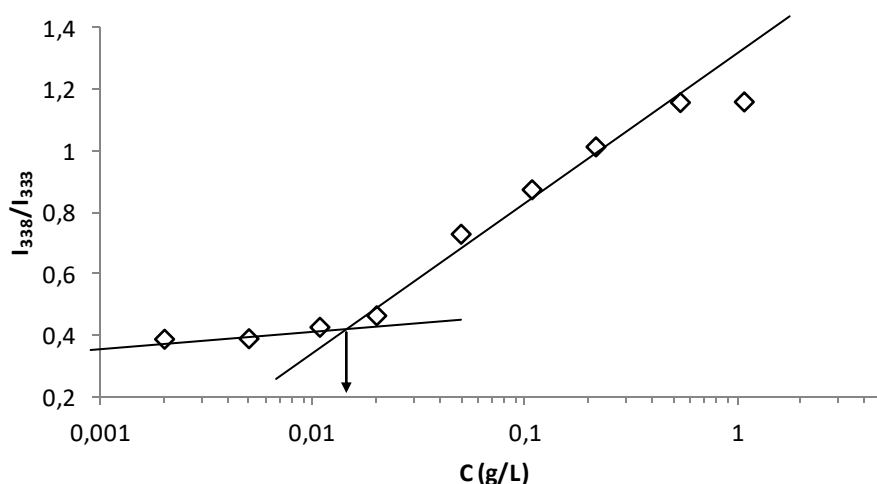


Figure 24 : Détermination de la cac par fluorescence du pyrène (0,1 M NaCl) à t_{amb} : Evolution du rapport des intensités I_{338}/I_{333} en fonction de la concentration en copolymère L-PEtOx_{42%}-co-iPrOx_{58%} **8.**

Park et Kataoka [23] ont étudié la copolymérisation de différents monomères de type oxazoline afin de contrôler précisément la température de point trouble (T_{PT}). Ainsi, l'introduction du 2-éthyle-2-oxazoline (EtOx) dans le copolymère poly(*i*PrOx-*grad*-EtOx) permet d'augmenter la T_{PT} de façon linéaire en fonction de la composition en EtOx. En effet, l'EtOx ayant une hydrophilie et une LCST plus élevée que l'*i*PrOx, la T_{PT} des copolymères varie de 38 °C à 67 °C pour une composition en EtOx allant de 0 % mol à 75 % mol. D'autres monomères tels que le 2-*n*-butyl-2-oxazoline ou encore le 2-*n*-nonyl-2-oxazoline ont également été étudiés pour la copolymérisation de l'*i*PrOx par Huber et Jordan pour faire varier la LCST du copolymère final. [29]

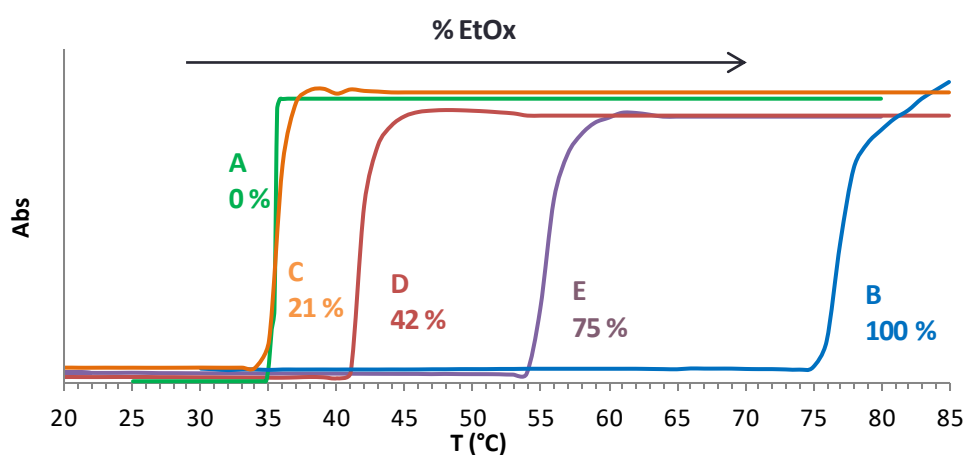


Figure 25 : Spectre d'absorbance UV-Visible ($\lambda = 600$ nm) en fonction de la température pour le copolymère A) L-*Pi*PrOx, C) L-P(EtOx₂₁-co-*i*POx₇₉), D) L-P(EtOx₄₂-co-*i*POx₅₈), E) L-P(EtOx₇₅-co-*i*POx₂₅) et B) L-PEtOx à 2 g/L dans l'eau désionisée (0,1 M NaCl). La T_{PT} est déterminée à 10% de l'augmentation de l'absorbance.

D'après la Figure 25, les températures de point trouble évoluent de 35 °C à 76 °C lorsque le pourcentage en EtOx augmente. Contrairement aux travaux de Park et Kataoka, cette évolution n'est pas proportionnelle à la composition en EtOx. En effet, la température augmente progressivement de 40 à 54 °C pour une composition allant de 42 à 75 % en EtOx, cependant en dessous de 21 % en EtOx aucune influence sur la température n'est observée (Figure 26). Ce comportement peut être dû au caractère amphiphile de nos copolymères, engendrant leur pré-organisation sous forme de micelle et donc favorisant les interactions polymère-polymère. En dessous d'une certaine composition en EtOx, les chaînes d'*i*PrOx qui

collapsent pourraient entraîner toute la chaîne hydrophile hors de la phase aqueuse. Néanmoins ces résultats démontrent bien l'influence de la proportion en comonomère EtOx sur la T_{PT} des copolymères amphiphiles.

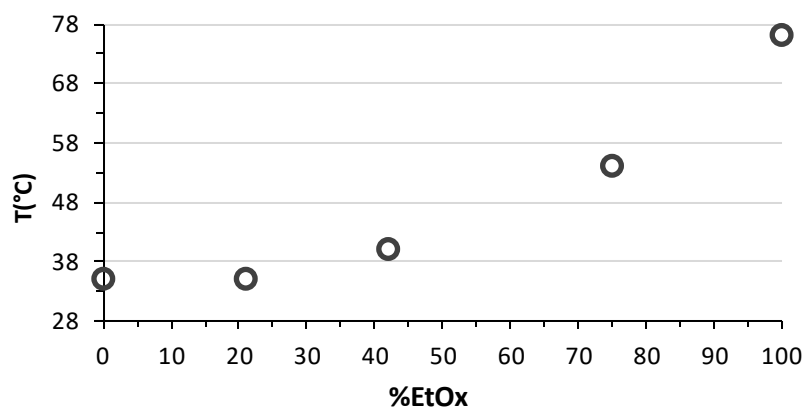


Figure 26 : Evolution de la T_{PT} des L-P(EtOx_x-co-iPrOx_y) à 2 g/L en fonction de la composition en EtOx

Le comportement thermo-sensible a également été confirmé par des mesures DLS en dessous et au-dessus de la température de point trouble pour le copolymère **8**. Les résultats sont en accord avec les mesures par spectroscopie UV-visible puisqu'à 45 °C (T_{PT} = 42 °C), des agrégats sont observés, démontrant ainsi une réponse rapide de nos systèmes (Figure 27).

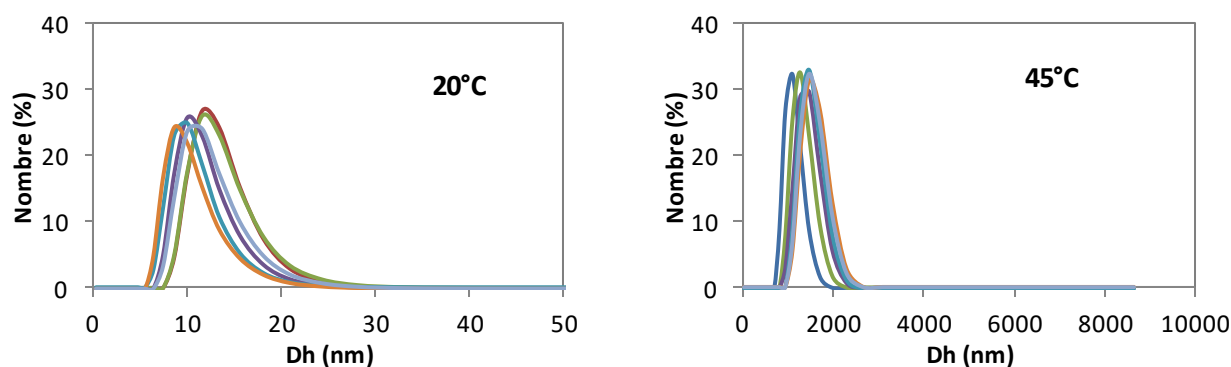


Figure 27 : Mesures DLS du copolymère L-P(EtOx_{42%}-co-iPrOx_{58%}) à 2 g/L à 20 °C et 45 °C

Conclusion

La synthèse de copolymères amphiphiles thermo-sensibles à base d'huile de lin modifiée a été réalisée par polymérisation cationique par ouverture de cycle (CROP). L'étude par voie thermique portant sur l'influence du groupement nucléophile utilisé lors de l'amorçage de la 2-méthyl-2-oxazoline, a permis de sonder l'efficacité des lipoamorceurs synthétisés à partir d'huile de lin. Le lipoamorceur tosylé (LTs) s'est révélé être le plus efficace et a donc été engagé dans la synthèse d'une gamme de copolymères, lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) (L-PiPrOx), lipide-*b*-poly(2-éthyle-2-oxazoline) (L-PEtOx) ainsi que lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline-*co*-2-éthyl-2-oxazoline) (L-P(iPrOx)-*co*-p(EtOx)) sous irradiation micro-onde. Les analyses par SEC, RMN ^1H et MALDI TOF permettent de déterminer les structures ainsi que la composition des copolymères finaux (21 %, 42 % et 75 % en EtOx).

La caractérisation physico-chimique a été effectuée en milieu aqueux par fluorescence, DLS et spectroscopie UV-visible. L'ensemble des résultats nous permettent de confirmer la formation de systèmes micellaires comportant un cœur hydrophobe et une couronne hydrophile. De plus, le comportement de cette couronne thermo-sensible a été étudié en fonction de la température. Si les copolymères L-PiPrOx et L-PEtOx présentent une température de point trouble très différente (35 et 74 °C pour le L-PiPrOx et le L-PEtOx respectivement), il est possible de faire varier cette température entre ces deux limites via l'introduction de comonomère EtOx en proportion variable.

Références

- [1] B. Verbraeken, B. D. Monnery, K. Lava, and R. Hoogenboom, "The chemistry of poly(2-oxazoline)s," *Eur. Polym. J.*, vol. 88, pp. 451–469, 2016.
- [2] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, and U. S. Schubert, "Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, no. 36, pp. 6288–6308, 2010.
- [3] C. Weber, R. Hoogenboom, and U. S. Schubert, "Temperature responsive bio-compatible polymers based on poly(ethylene oxide) and poly(2-oxazoline)s," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 5, pp. 686–714, 2012.
- [4] R. Luxenhofer, Y. Han, A. Schulz, J. Tong, Z. He, A. V Kabanov, and R. Jordan, "Poly (2-oxazoline)s as Polymer Therapeutics," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 33, pp. 1613–1631, 2012.
- [5] R. Hoogenboom, "Poly(2-oxazoline)s: A polymer class with numerous potential applications," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 43, pp. 7978–7994, 2009.
- [6] T. X. Viegas, M. D. Bentley, J. M. Harris, Z. Fang, K. Yoon, B. Dizman, R. Weimer, A. Mero, G. Pasut, and F. M. Veronese, "Polyoxazoline: Chemistry, properties, and applications in drug delivery," *Bioconjug. Chem.*, vol. 22, no. 5, pp. 976–986, 2011.
- [7] R. W. Moreadith, T. X. Viegas, M. D. Bentley, J. M. Harris, Z. Fang, K. Yoon, B. Dizman, R. Weimer, B. P. Rae, X. Li, C. Rader, D. Standaert, and W. Olanow, "Clinical development of a poly(2-oxazoline) (POZ) polymer therapeutic for the treatment of Parkinson's disease - Proof of concept of POZ as a versatile polymer platform for drug development in multiple therapeutic indications," *Eur. Polym. J.*, 2016.
- [8] S. Zalipsky, C. B. Hansen, J. M. Oaks, and T. M. Allen, "Evaluation of Blood Clearance Rates and Biodistribution of Poly(2-oxazoline)-Grafted Liposomes," *J. Pharm. Sci.*, vol. 85, no. 2, pp. 133–137, 1996.
- [9] L. Hespel, G. Morandi, M. Grossel, L. Lecamp, L. Picton, and F. Burel, "Synthesis of lipid-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) and successive study of pH- and thermo-

- sensitive mixed micelles by combination with lipid-*b*-poly(acrylic acid),” *Polym. Chem.*, vol. 5, no. 13, p. 4009, 2014.
- [10] Aoi Keigo and Okada Masahiko, “Polymerization of Oxazolines,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 21, pp. 151–208, 1996.
- [11] S. Kobayashi and H. Uyama, “Polymerization of Cyclic Imino Ethers : From Its Discovery to the Present State of the Art,” vol. 40, pp. 192–209, 2002.
- [12] S. Kobayashi and T. Saegusa, “Block and graft copolymers of 2-oxazolines,” *Makromol. Chem., Suppl.*, vol. 12, pp. 11–24, 1985.
- [13] M. A. R. Meier and D. C. Webster, *Polymer Libraries*. Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- [14] J. Su, Y. Qiu, K. Ma, Y. Yao, Z. Wang, X. Li, D. Zhang, Z. Tu, and S. Jiang, “Design, synthesis, and biological evaluation of largazole derivatives: Alteration of the zinc-binding domain,” *Tetrahedron*, vol. 70, no. 42, pp. 7763–7769, 2014.
- [15] G. Volet, L. Auvray, and C. Amiel, “Monoalkyl Poly(2-methyl-2-oxazoline) Micelles. A Small-Angle Neutron Scattering Study,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 41, pp. 13536–13544, Oct. 2009.
- [16] M. Stemmelen, C. Travelet, V. Lapinte, R. Borsali, and J.-J. Robin, “Synthesis and self-assembly of amphiphilic polymers based on polyoxazoline and vegetable oil derivatives,” *Polym. Chem.*, vol. 4, no. 5, p. 1445, 2013.
- [17] C. Giardi, V. Lapinte, C. Charnay, and J. J. Robin, “Nonionic polyoxazoline surfactants based on renewable source : Synthesis , surface and bulk properties,” *React. Funct. Polym.*, vol. 69, pp. 643–649, 2009.
- [18] R. J.-J. J. Giardi C., Lapinte V., Nielloud F., Devoisselle J.-M., “Synthesis of Polyoxazolines Using Glycerol Carbonate Derivative and End Chains Functionalization Via Carbonate and Isocyanate Routes,” *Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 48, pp. 4027–4035, 2010.
- [19] M. W. M. Fijten, C. Haensch, B. M. van Lankvelt, R. Hoogenboom, and U. S. Schubert, “Clickable Poly(2-Oxazoline)s as Versatile Building Blocks,” *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 209, no. 18, pp. 1887–1895, Sep. 2008.

- [20] F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, C. H. Abeln, and U. S. Schubert, "Single-Mode Microwave Ovens as New Reaction Devices: Accelerating the Living Polymerization of 2-Ethyl-2-Oxazoline," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 25, no. 22, pp. 1895–1899, Nov. 2004.
- [21] R. Hoogenboom, M. W. M. Fijten, and U. S. Schubert, "Parallel kinetic investigation of 2-oxazoline polymerizations with different initiators as basis for designed copolymer synthesis," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 42, no. 8, pp. 1830–1840, Apr. 2004.
- [22] F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, M. A. M. Leenen, M. A. R. Meier, and U. S. Schubert, "Investigation of the living cationic ring-opening polymerization of 2-methyl-, 2-ethyl-, 2-nonyl-, and 2-phenyl-2-oxazoline in a single-mode microwave reactor," *Macromolecules*, vol. 38, no. 12, pp. 5025–5034, 2005.
- [23] J. Park and K. Kataoka, "Precise Control of Lower Critical Solution Temperature of Gradient Copolymerization with 2-Ethyl-2-oxazoline as a Hydrophilic Comonomer," *Macromolecules*, vol. 39, pp. 6622–6630, 2006.
- [24] H. M. L. Lambermont-Thijs, M. W. M. Fijten, a. J. Van Der Linden, B. M. Van Lankvelt, M. M. Bloksma, U. S. Schubert, and R. Hoogenboom, "Efficient cationic ring-opening polymerization of diverse cyclic imino ethers: Unexpected copolymerization behavior," *Macromolecules*, vol. 44, pp. 4320–4325, 2011.
- [25] K. P. Ananthapadmanabhan, E. D. Goddard, N. J. Turro, and P. L. Kuo, "Fluorescence probes for critical micelle concentration," *Langmuir*, vol. 1, no. 3, pp. 352–355, 1985.
- [26] I. Astafieva, X. F. Zhong, and A. Eisenberg, "Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions," *Macromolecules*, vol. 26, no. 26, pp. 7339–7352, 1993.
- [27] C. Giardi, V. Lapinte, C. Charnay, and J. J. Robin, "Nonionic polyoxazoline surfactants based on renewable source: Synthesis, surface and bulk properties," *React. Funct. Polym.*, vol. 69, no. 9, pp. 643–649, Sep. 2009.
- [28] R. Obeid, E. Maltseva, A. F. Thünemann, F. Tanaka, and F. M. Winnik, "Temperature response of self-assembled micelles of telechelic hydrophobically modified poly (2-alkyl-2-oxazoline)s in water," *Macromolecules*, vol. 42, pp. 2204–2214, 2009.

- [29] J. Kronek, N. Petrenčíková, M. Mikulec, K. Borská, and D. Christova, “Structure analysis and thermosensitive properties of copolymers prepared from 2-ethyl-2-oxazoline and 2-(4-aminophenyl)-2-oxazoline,” *Polym. Bull.*, vol. 72, no. 5, pp. 1081–1094, 2015.

Chapitre III

Synthèses et caractérisations de Lipide-*b*- poly(méthacrylate de diméthyl(aminoéthyle))

Introduction

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la synthèse de copolymères amphiphiles lipide-*b*-poly(méthacrylate de diméthyle(aminoéthyle)) (L-PDMAEMA) comportant un bloc lipidique et un bloc hydrophile stimuli-sensible, le PDMAEMA. Ce dernier est un polymère hydrophile possédant une très bonne dégradabilité et une sensibilité au pH et à la température. [1] Il est très prometteur dans le domaine médical puisqu'il possède un pKa proche de 7, [2] et présente ainsi un changement de comportement en milieu aqueux en fonction du pH. Il a d'ailleurs fait l'objet de nombreuses études en tant que système de vectorisation, notamment sous forme micellaire. De part son pKa, ces derniers seraient stables en milieu physiologique ($\text{pH} > \text{pKa}$) et se dissocieraient en milieu acide permettant ainsi le transport et la protection d'un principe actif jusqu'aux zones tumorales où il pourrait être relargué. [3][4][5] De plus, une étude précédemment menée au laboratoire sur un lipide-*b*-poly(acide acrylique) a démontrée une dissociation totale des micelles lors de l'ionisation des chaînes, donc en milieu basique. Nous souhaitons ici étudier si le comportement miroir, c'est-à-dire une dissociation des micelles à pH acide, est atteignable à partir d'un copolymère lipide-polybase.

Cette synthèse requiert comme précédemment la préparation de lipoamorceur ou agent de transfert adéquats à partir de l'huile de lin. Puis, deux techniques de polymérisation radicalaire vivante et contrôlée sont étudiées et comparées en termes de contrôle de la polymérisation. L'une d'entre elles, donnant de meilleurs résultats, est par la suite utilisée afin de synthétiser des copolymères de structure et de taille définies.

Dans un second temps, les propriétés d'auto-association du L-PDMAEMA ont été étudiées à travers différentes techniques de caractérisation. Ces études ont permis d'évaluer à la fois le caractère pH-sensible mais également thermo-sensible de notre copolymère.

I. Synthèse de copolymère lipide-*b*-poly(méthacrylate de diméthyle(aminoéthyle))

Les différentes techniques de polymérisation radicalaire contrôlée permettent la synthèse de polymères d'architectures bien définies, de masses molaires prédictibles et de dispersités très faibles. Le caractère vivant de ce type de polymérisation permet le réamorçage du polymère synthétisé dû à la quasi-absence de réactions de terminaison irréversibles. De plus, à la différence de la polymérisation vivante ionique qui limite le choix des réactifs et impose notamment une grande pureté des monomères et des solvants utilisés, la polymérisation radicalaire vivante contrôlée (PRVC) rend possible la synthèse de polymères d'architectures contrôlées dans des conditions plus simples. [6] Parmi les techniques de PRVC, l'ATRP (pour Atom-Transfert Radical Polymerization) permet le contrôle de la masse molaire et l'obtention de faibles dispersités (environ 1,1-1,3). [6]

1. Polymérisation par ATRP

Le mécanisme de la polymérisation par ATRP repose sur l'équilibre dynamique entre une espèce désactivée et activée gouvernée par la réduction/oxydation d'un complexe métallique $Mt^n X/Lig$ (Lig pour ligand) (Figure 1). L'équilibre assure une faible population d'espèces propageantes et donc diminue les réactions de terminaison indésirables.

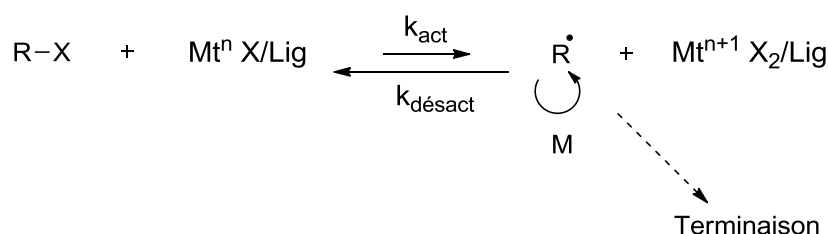


Figure 1 : Principe de la polymérisation par ATRP [6]

L'utilisation de l'ATRP permet la polymérisation d'une variété de monomère ((méth)acrylate (méth)acrylamide et styrène par exemple) et dans un large choix de solvant. De plus de nombreux amorceurs utilisés dans cette technique sont disponible commercialement. [6]

1.1.Synthèse du lipoamorceur pour la polymérisation par ATRP

Le lipoamorceur nécessaire à la polymérisation par ATRP du DMAEMA est synthétisé en deux étapes. La première étant la réduction de l'huile de lin (décrite dans le chapitre II) ne sera détaillée ici que l'étape 2 qui consiste en l'insertion d'un site d'amorçage en extrémité de la chaîne lipidique.

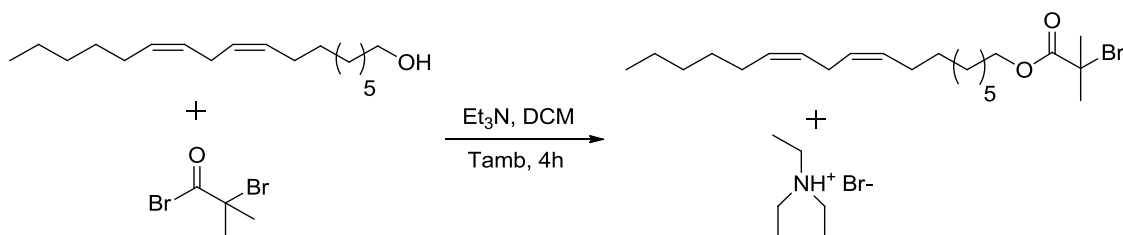


Figure 2 : Synthèse du lipoamorceur LBr à partir de l'alcool gras

La réaction d'estérification (Figure 2) est réalisée par réaction du bromure de 2-bromo-2-méthyle propionyle sur l'hydroxyle de l'alcool gras en présence de triéthylamine. Une conversion totale est obtenue au bout de 4 heures de réaction. La purification du produit brut sur colonne chromatographique de gel de silice permet d'obtenir un produit pur incolore avec un rendement de 65 %.

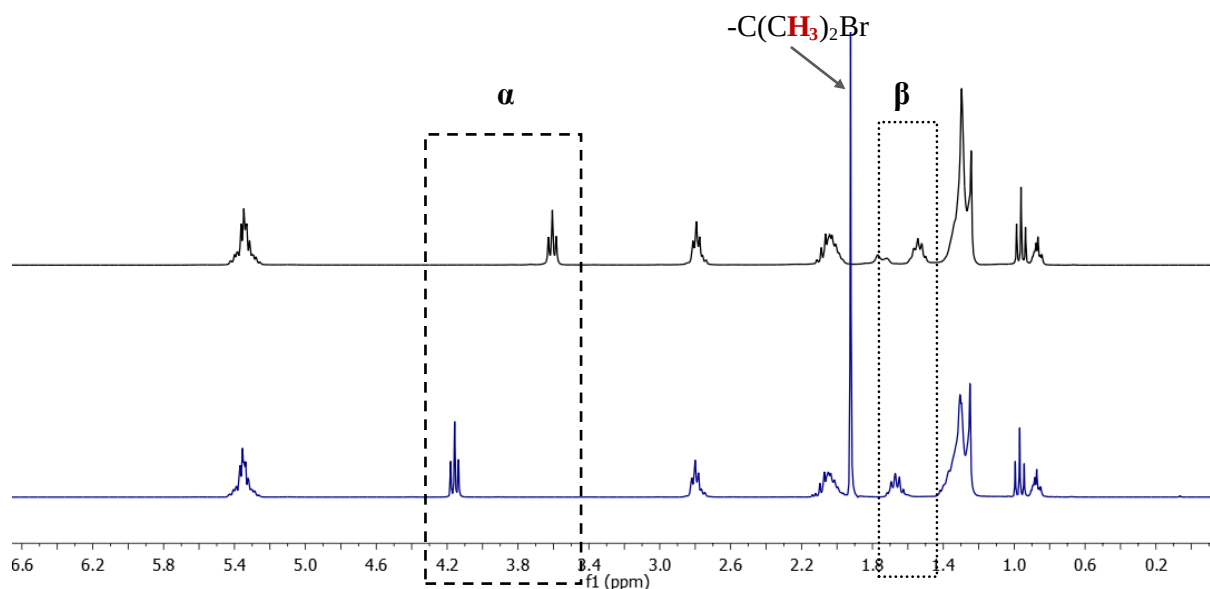


Figure 3 : RMN ^1H dans CDCl_3 de l'alcool gras (en haut) et du LBr (en bas)

L'analyse RMN ^1H (Figure 3) révèle les déplacements des pics caractéristiques des protons en α (de 3,60 à 4,15 ppm) et en β (de 1,55 à 1,67 ppm) de la fonction bromure. L'apparition du singulet à 1,92 ppm correspondant aux deux groupements méthyle confirme l'introduction du bromure d'acide sur l'alcool gras. De plus le spectre IRTF montre clairement la disparition de la bande de vibration de la fonction OH ($\nu = 3335 \text{ cm}^{-1}$) et l'apparition de la bande à $\nu = 1735 \text{ cm}^{-1}$ caractéristique de la fonction ester C=O ainsi que de celle à $\nu = 646 \text{ cm}^{-1}$ correspondant à la liaison C-Br.

Le lipoamorceur LBr synthétisé présente un mélange de chaînes grasses (linoléique, linoléique, oléique et stéarique) du fait de la composition initiale de l'huile de lin (cf. chapitre 2, p. 9). Dans un souci de clarté, ne sera cependant représentée que la chaîne alkyle linoléique dans les schémas suivants.

1.2.Synthèse par ATRP du lipide-*b*- poly(méthacrylate de diméthyle(aminoéthyle))

Le lipoamorceur bromé LBr précédemment synthétisé a été engagé dans la polymérisation du DMAEMA afin d'obtenir un copolymère amphiphile (Figure 4).

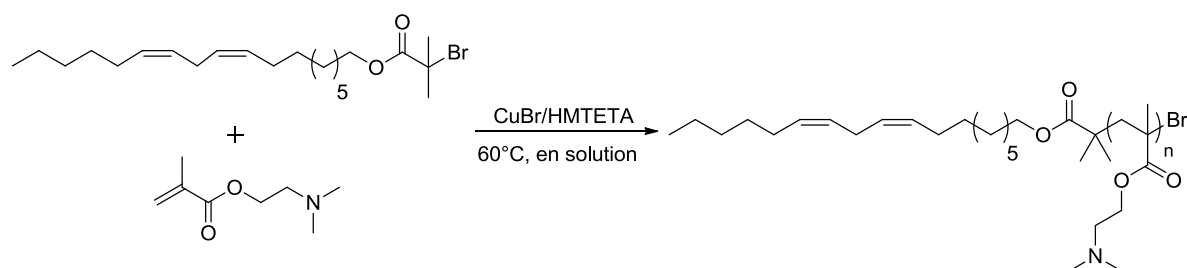


Figure 4 : Réaction de polymérisation par ATRP du DMAEMA à partir du lipoamorceur

La polymérisation par ATRP a été réalisée dans les conditions suivantes $[\text{Monomère}]:[\text{LBr}]:[\text{Cu(I)Br}]:[\text{HMTETA}] = 100/1/1/1$, et dans un premier temps, le DMF a été sélectionné en tant que solvant. Ces conditions ont été choisies à partir de celles décrites dans la littérature pour la polymérisation du DMAEMA amorcée par un macro-amorceur bromé à base de cellulose (Cellulose-Br) dans le DMF. [7] Une cinétique de polymérisation a été réalisée par prélèvement d'un échantillon à un temps t . L'analyse par RMN ^1H (CDCl_3) a été utilisée pour le calcul de la conversion. Pour la détermination des masses molaires et des dispersités, l'échantillon prélevé est simplement passé à travers une colonne d'alumine pour éliminer les traces de cuivre avant analyse par SEC dans le THF (standards PMMA).

Tableau 1 : Résultats des cinétiques de polymérisation ATRP selon le solvant utilisé

	Solvant (% v/v)	Constante diélectrique ϵ_r	Temps (h)	Conversion (%)
L-PDMAEMA 1a	DMF (70)	36,7	3 (5)	37 (37)
L-PDMAEMA 2a	DMF (50)	36,7	3	63
L-PDMAEMA 3a	THF (50)	7,58	3 (5)	70 (85)

Le suivi cinétique par RMN ^1H de la première polymérisation dans le DMF (70 % v/v) (L-PDMAEMA **1a**) a permis de tracer l'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps (Figure 5). Celle-ci est linéaire en début de polymérisation, mais la concentration en espèce active diminue après 1 heure de polymérisation. De plus un plateau de conversion est rapidement

atteint puisque elle n'évolue plus après 1 heure seulement (37 % de conversion). Ces résultats nous ont mené à réaliser un essai dans des conditions plus concentrées afin de tenter de d'augmenter la conversion finale. En diminuant la proportion de solvant à 50 % v/v (L-PDMAEMA **2a**), la non-linéarité de l'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps est de nouveau observée. Le taux de conversion est certes doublé et atteint 63 % au bout de 2 heures mais n'évolue plus par la suite (Figure 5).

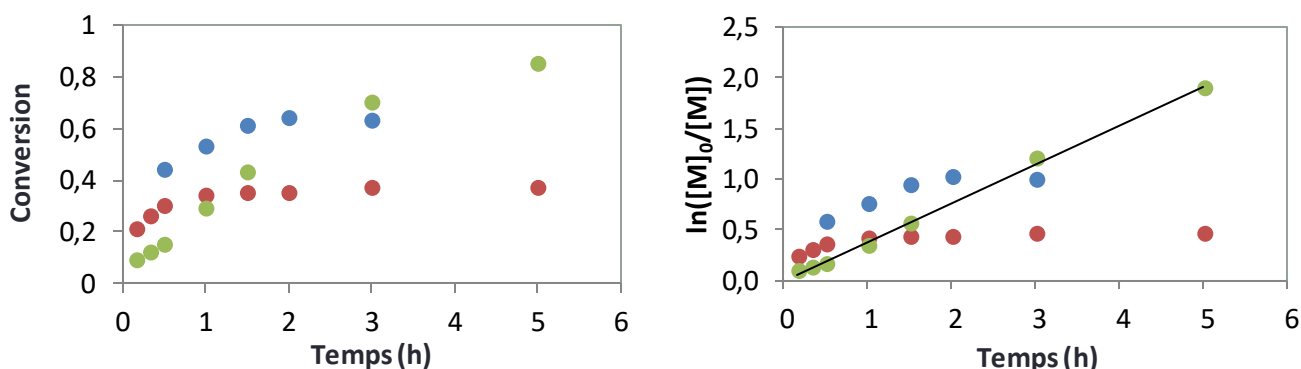


Figure 5 : Evolution de la conversion (à gauche) et $\ln([M]_0/[M])$ (à droite) en fonction du temps pour L-PDMAEMA 1a (●), L-PDMAEMA 2a (●) et L-PDMAEMA 3a (●)

Le solvant de réaction a donc été modifié et le THF (L-PDMAEMA **3a**) a été sélectionné. Dans la littérature, ce solvant est décrit pour la polymérisation du DMAEMA par des macro-amorceurs tels que le PCL-Br [8] ou le PEG-Br [9]. Dans les mêmes conditions expérimentales que pour le DMF, la polymérisation dans le THF à 50 % v/v montre que l'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps est linéaire traduisant une concentration constante en espèce active tout au long de la polymérisation et une cinétique du premier ordre (Figure 5). De plus, ces conditions permettent d'atteindre 85 % de conversion après 5 heures de réaction (Tableau 1). Le meilleur contrôle de la polymérisation dans le THF pourrait être lié au fait que sa constante diélectrique $\epsilon_{r(THF)}$ soit inférieure à celle du DMF (Tableau 1) favorisant ainsi la formation de l'espèce désactivée comme observé par Matyjaszewski. [10]

Les échantillons de la cinétique de polymérisation L-PDMAEMA **3a** ont été analysés en SEC dans le THF.

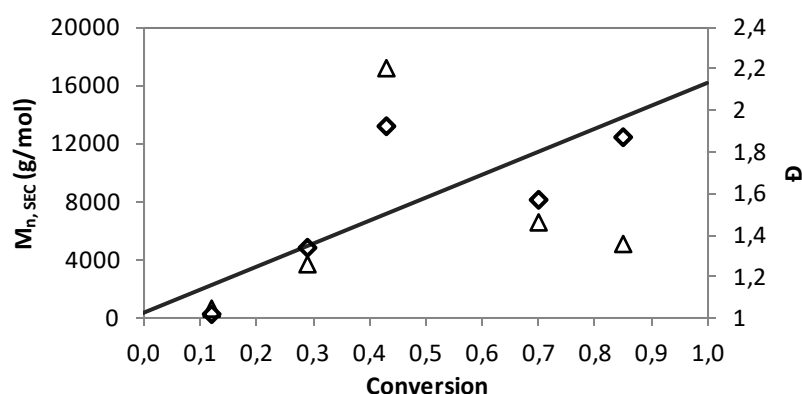


Figure 6 : Evolution de la masse molaire (◇) et de la dispersité (Đ) (Δ) en fonction de la conversion pour L-PDMAEMA 3 a. (—) correspond à l'évolution de la masse molaire théorique. NB : Echantillons stockés deux mois à 4 °C avant analyses

La Figure 6 présente l'évolution de la masse molaire moyenne en nombre ($\bar{M}_{n,SEC}$) et de la dispersité (Đ) en fonction de la conversion. A première vue, les valeurs des $\bar{M}_n$ expérimentales obtenues lors de l'analyse sont inférieures aux valeurs théoriques. Nous pouvons également remarquer une incohérence pour le point à 43 % (1h30) présentant une très forte déviation de la masse molaire ainsi qu'une dispersité très élevée. Ceci peut révéler une évolution des échantillons en présence du système catalytique.

De plus, lorsque l'expérience dans le THF a été reproduite avec un ratio monomère/amorceur plus faible (40/1), afin d'obtenir un copolymère de plus faible masse molaire, une perte de contrôle est observée (Figure 7).

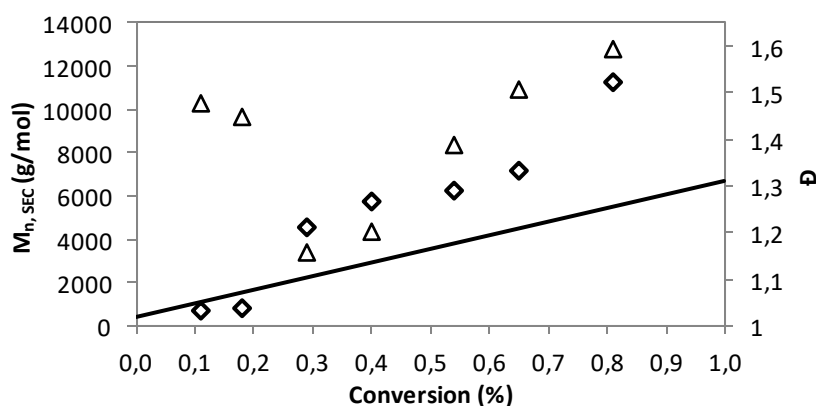


Figure 7 : Evolution de la masse molaire (◇) et de la dispersité (Đ) (Δ) en fonction de la conversion ([DMAEMA]/[LBr] = 40). (—) correspond à l'évolution de la masse molaire théorique. NB : Echantillons stockés deux mois à 4 °C avant analyses

Bien que de multiples études sur le bon contrôle de la polymérisation de ce monomère par ATRP soient décrites dans la littérature, d'autres ont observé le contraire. En effet, il a été démontré que le monomère azoté peut perturber le complexe cuivre/ligand durant la polymérisation entraînant une perte de contrôle et limitant le rendement final (Figure 8). [11] Ceci nous a amené à utiliser une autre voie de polymérisation vivante/contrôlée et très versatile, la RAFT (pour Reversible Addition-Fragmentation chain Transfert).

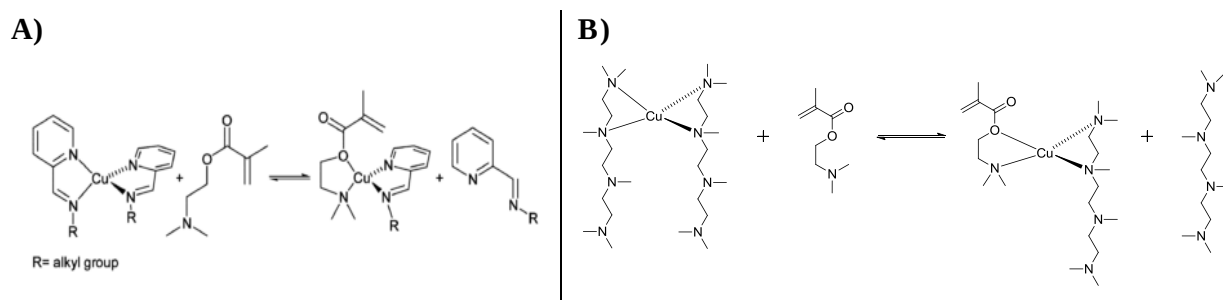


Figure 8 : A) Equilibre possible pouvant se produire lors de la complexation entre le monomère DMAEMA, le ligand (N-propyl-2-pyridylmethanimine et le catalyseur CuBr (I) décrit dans la référence [11] et B) structure simplifiée de l'équilibre avec le ligand utilisé ici lors de l'ATRP, le HMTETA.

2. Polymérisation par RAFT

2.1.Introduction de la technique de polymérisation par RAFT

Le principe de la RAFT repose sur l'établissement d'un équilibre entre des chaînes de polymère à l'état dormant (inactives) et à l'état actif (capables d'additionner du monomère) via un mécanisme de transfert réversible (Figure 9).

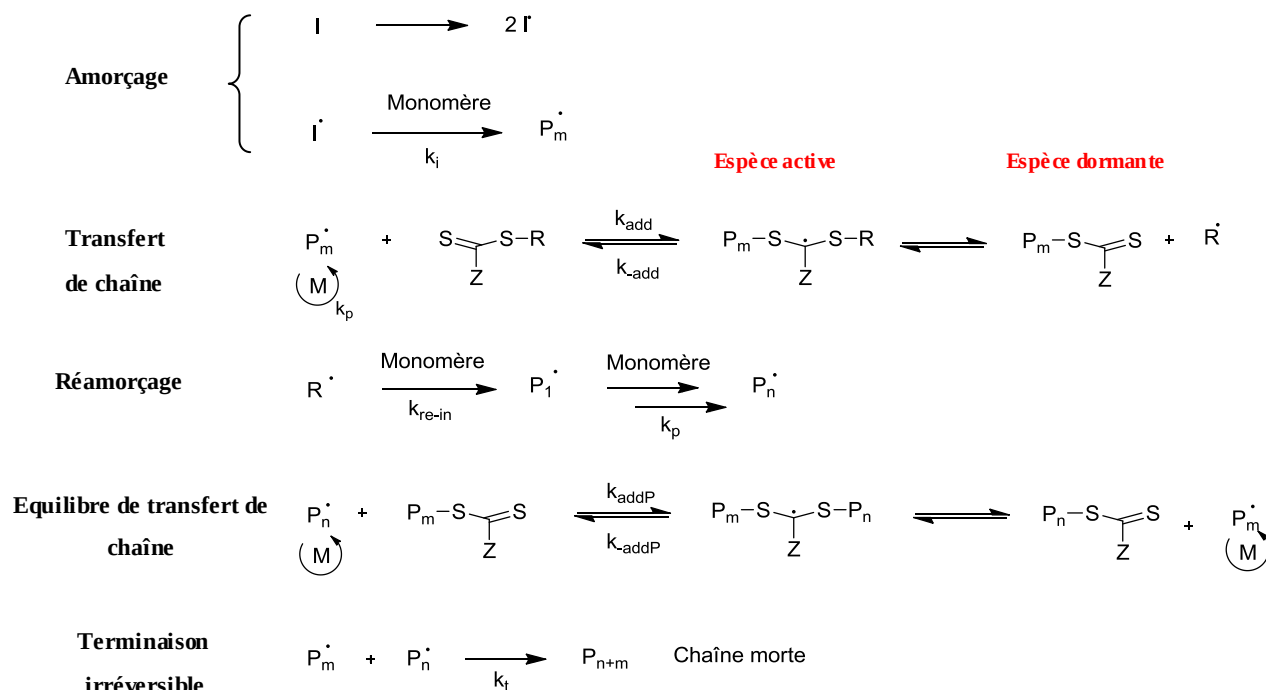


Figure 9 : Schéma de principe de la polymérisation RAFT. [12] [13]

Après une première étape d'amorçage « conventionnelle » (par l'AIBN par exemple), les radicaux obtenus ($P_m^\bullet$) réagissent avec l'agent de transfert de chaîne appelé CTA (pour *Chain Transfert Agent*) par addition sur la double liaison $C=S$ ce qui va générer un radical intermédiaire (**espèce active**). Ce dernier va subir deux types de fragmentation, une première régénérant les espèces présentes initialement (réaction réversible) et une deuxième créant à la fois un nouveau radical $R^\bullet$ (capable de réamorcer la polymérisation) ainsi qu'une chaîne dormante ou macro-CTA, (**espèce dormante**). Cette chaîne dormante peut de nouveau devenir active contrairement aux espèces mortes produites par réaction de terminaison irréversible. La réaction du radical $R^\bullet$ avec le monomère conduit donc à une nouvelle chaîne de polymère en croissance $P_n^\bullet$ qui va à son tour subir des réactions d'addition-fragmentation en présence du CTA. Une très faible proportion des chaînes de polymère $P_n^\bullet$ et $P_m^\bullet$ vont quant à elle donner lieu à des réactions de terminaison (par combinaison ou dismutation). Il existe alors un équilibre entre les chaînes actives et les chaînes dormantes, responsable du contrôle de la polymérisation, assurant la croissance des chaînes à vitesse égale et permettant la synthèse de polymères présentant une distribution des masses molaires étroite. [12] [13]

Jouant un rôle primordial, l'agent de transfert (nommé agent RAFT ou CTA) possède une structure permettant la stabilisation-déstabilisation de la double liaison thiocarbonyl par le groupe Z et un réamorçage du monomère grâce à un groupe partant R (Figure 10). [13]

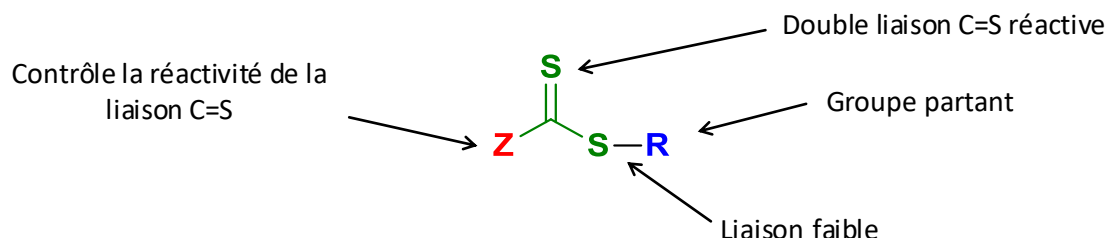


Figure 10 : Structure générale d'un CTA

Il existe différents types de CTA, les tri et dithiocarbonates, les dithiobenzoates et les dithiocarbamates par exemple (Figure 11). Le choix de l'agent RAFT est lié au monomère utilisé et aux propriétés du groupe R ainsi que du groupe Z.

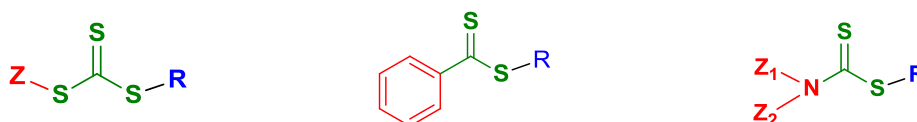


Figure 11 : Structure d'un CTA trithiocarbonate, dithiobenzoate, dithiocarbamate

En conclusion, le contrôle de la polymérisation est gouverné par une étape d'activation-désactivation (passage de chaînes dormantes à activées) au cours de laquelle des unités monomères s'ajoutent aux chaînes de polymère en croissance. [14]

Ainsi, tout comme pour la polymérisation par ATRP, il est nécessaire pour la RAFT de synthétiser un CTA à base lipidique afin d'obtenir un copolymère amphiphile L-PDMAEMA.

2.2.Synthèse du LCTA pour la polymérisation par RAFT

Le LCTA (lipide-Chain Transfert Agent) a été synthétisé en 2 étapes à partir d'un CTA commercial, l'acide 4-cyano-4-(thiobenzoylthio)pentanoïque (CTA COOH) connu pour un bon contrôle lors des polymérisations des acrylates et méthacrylates. [15] [32] La première étape, déjà décrite dans le chapitre précédent, consiste en la réduction de l'huile de lin afin d'obtenir les chaînes d'alcool gras. Quant à la seconde, elle permet une fonctionnalisation de ces chaînes via une réaction d'estérification avec le CTA en conditions douces (Figure 12).

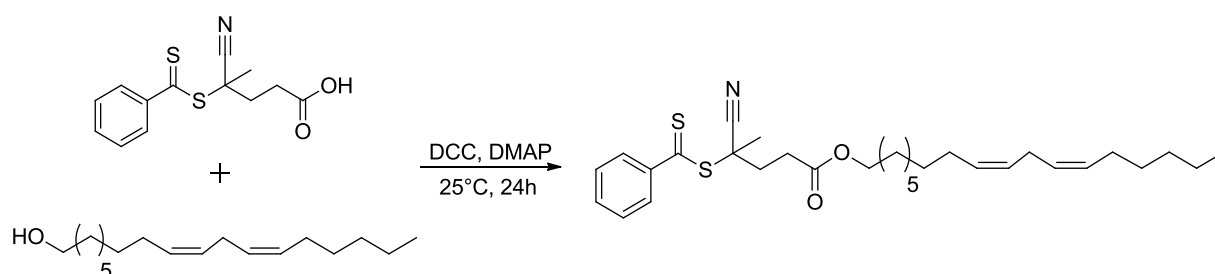


Figure 12 : Réaction d'estérification entre l'alcool gras et le CTA COOH permettant d'obtenir le lipo-CTA.

La conversion obtenue pour cette réaction est de 90 %. La purification du L-CTA brut se fait sur colonne chromatographique de gel de silice afin d'éliminer l'alcool gras résiduel ainsi que le CTA en excès.

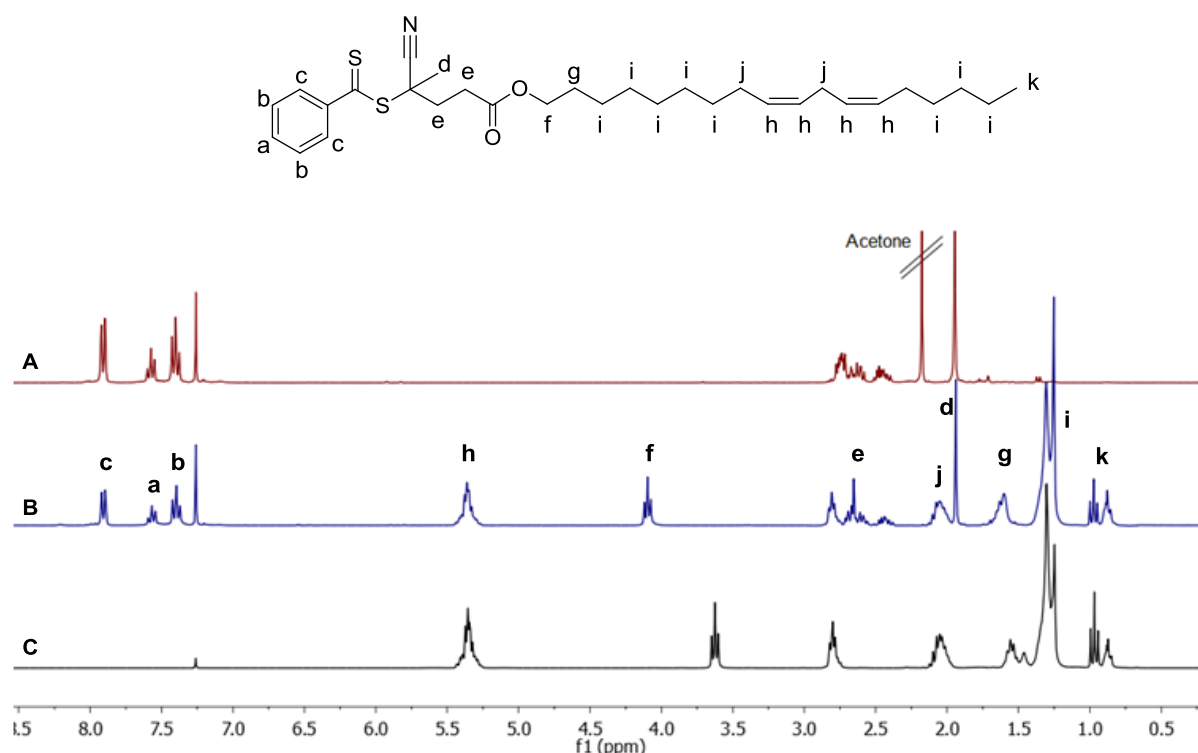


Figure 13 : Spectres RMN ^1H dans le CDCl_3 du CTACOOH (A), LCTA synthétisé (B) et alcool gras (C)

L'analyse RMN ^1H (Figure 13) permet de vérifier que la réaction a eu lieu grâce au déplacement du signal caractéristique des protons en α (de 3,63 à 4,22 ppm) et β (de 1,56 à 1,74 ppm) de la fonction ester introduite ainsi qu'à l'apparition d'un singulet à 1,9 ppm correspondant aux protons du méthyle du CTA et du massif à 7,5-8 ppm correspondants aux protons aromatiques. De plus, le spectre infrarouge révèle la disparition de la bande de vibration de la fonction hydroxyle ($\nu = 3335 \text{ cm}^{-1}$) et l'apparition à $\nu = 1736 \text{ cm}^{-1}$ de la bande caractéristique de la fonction carbonyle. Un rendement de 60 % est obtenu après purification sur colonne chromatographique de gel de silice.

2.3.Optimisation des conditions de polymérisation par RAFT du méthacrylate de diméthyle (aminoéthyle)

Afin de déterminer les conditions optimales de polymérisation par RAFT, le CTA COOH a été dans un premier temps utilisé pour la polymérisation du DMAEMA (Figure 14).

Toutes les polymérisations ont été réalisées à 70 °C avec un ratio DMAEMA/AIBN/CTA de 40/0,205/1 tel que généralement décrit dans la littérature. [16][15]

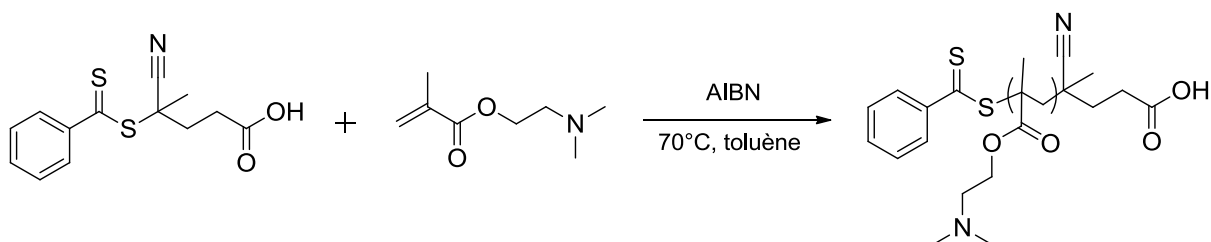


Figure 14 : Réaction de polymérisation RAFT du DMAEMA à partir du CTA COOH

D'après la littérature, différents solvants sont utilisés pour la polymérisation par RAFT du DMAEMA : l'eau, [17] le benzène, [18] le dioxane, [16] [19] ou encore le toluène [15] [20]. Afin de favoriser la polymérisation dans un milieu homogène, le choix d'un solvant organique est préféré. De part leur utilisation plus fréquente, le dioxane et le toluène ont été sélectionnés. L'influence du solvant (à 50 % v/v) a été étudiée pour la polymérisation du DMAEMA. De façon surprenante, au bout de 24 heures, la polymérisation dans le dioxane n'atteint que 7 % de conversion contre 88 % dans le toluène. Le dioxane est souvent utilisé en tant que solvant pour la synthèse du PDMAEMA par RAFT, cependant, Davis et *al.* ont observé une polymérisation par RAFT du DMAEMA plus lente dans le dioxane que dans le toluène probablement due au caractère donneur d'électron de ce solvant qui peut potentiellement interagir avec le groupement carbonyle (électrophile) du monomère. [15] Ainsi, le toluène a été sélectionné pour la suite de l'optimisation de notre polymérisation.

Une cinétique de polymérisation a été effectuée et suivie par RMN ^1H dans le CDCl_3 pour la détermination des conversions et par SEC dans la NMP pour les masses molaires et les dispersités.

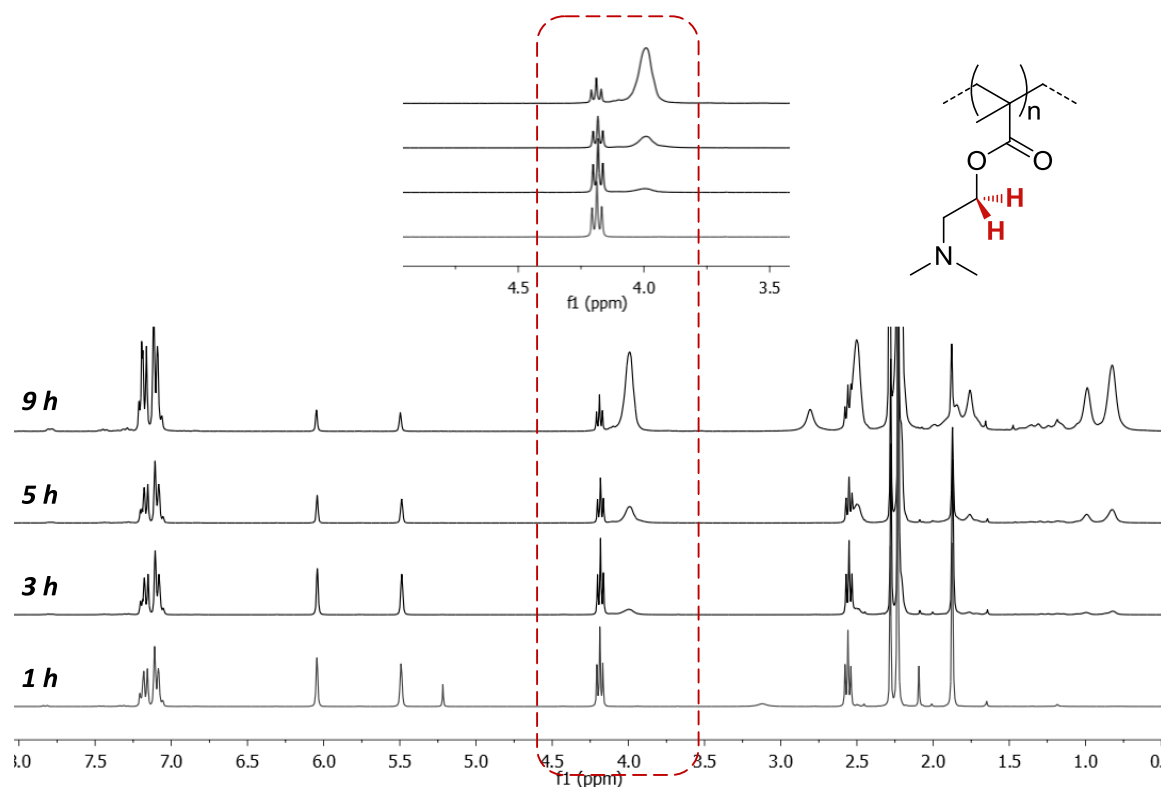


Figure 15 : Superposition des spectres RMN ^1H (CDCl_3) pendant la cinétique du copolymère PDMAEMA 3

Les RMN ^1H (Figure 15) analysées au cours de la polymérisation montrent d'une part la diminution des pics vinyliques du monomère (5,5 ppm et 6 ppm) lorsque le temps de polymérisation augmente, mais également le déplacement du pic correspondant aux protons du CH_2 du monomère. En effet, celui-ci une fois polymérisé, est déplacé de 4,2 à 4 ppm. Le rapport d'intégration entre ces deux signaux permet le calcul de la conversion.

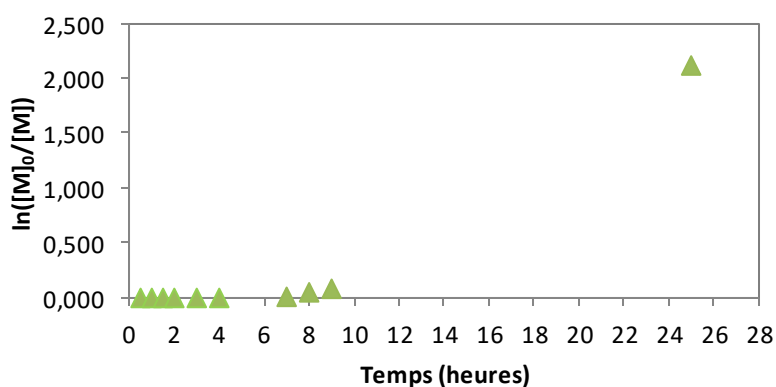


Figure 16 : Cinétique de polymérisation par RAFT du DMAEMA dans le toluène (50 % v/v) (Δ)

La Figure 16 illustrant la cinétique de polymérisation montre dans un premier temps une période d'induction de 6 heures. Ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature lors de la polymérisation de méthacrylate de méthyle (MMA) ou encore de *N,N*-diéthyl méthacrylamide (DEAM) en présence de différents CTA (Figure 17). [21] [22]

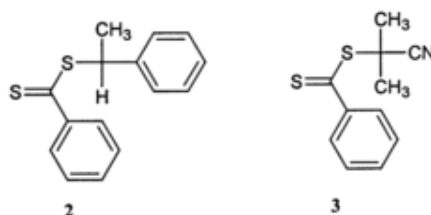


Figure 17 : CTA utilisés dans polymérisation du MMA : (1-phenylethyl dithiobenzoate) (2) et 2-(2-cyanopropyl) dithiobenzoate) (3) [21] et dans celle du DEAM : 2-(2-cyanopropyl) dithiobenzoate) (3) [22]

Dans chacun des cas, il est fait l'hypothèse que l'inhibition est causée par une fragmentation lente du radical intermédiaire ralentissant l'équilibre entre l'espèce active et le macro-radical, mais également par la faible capacité du groupe partant R° à réamorcer la polymérisation (le radical est donc plus stable et demeure pendant un certain temps avant d'effectuer le réamorçage).

Dans les travaux de Zhang et *al.* [22] les auteurs ont observé une augmentation de la vitesse de polymérisation lorsque le système était plus concentré. Ainsi, la proportion du toluène par rapport au monomère a été varié afin d'étudier l'influence de la concentration en CTA et en monomère (Tableau 2).

Tableau 2 : Concentrations en CTA COOH et en monomère étudiées lors de l'optimisation de la polymérisation par RAFT, DMAEMA/CTA = 40

	% v/v toluène	[CTA] ₀ (mol/mL)	[DMAEMA] ₀ (mol/mL)
PDMAEMA 1	50	$1,46 \times 10^{-4}$	$5,95 \times 10^{-3}$
PDMAEMA 2	66	$7,42 \times 10^{-5}$	$3,01 \times 10^{-3}$
PDMAEMA 3	33	$3,02 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-2}$

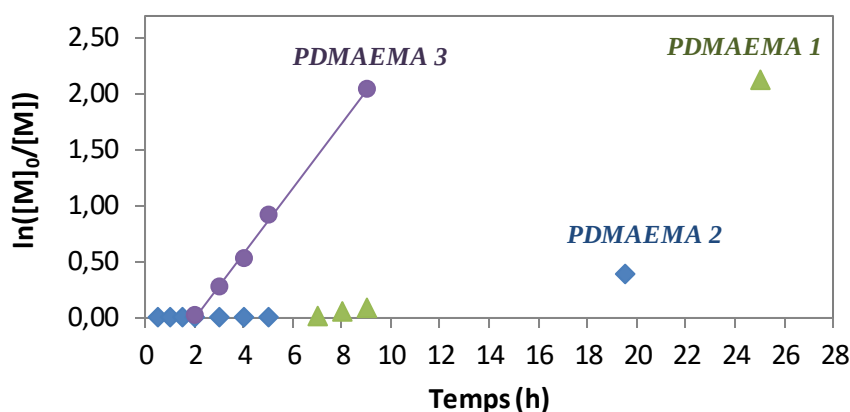


Figure 18 : Cinétique de polymérisation par RAFT du DMAEMA dans le toluène. $[CTA]_0 = 7,42 \times 10^{-5}$ mol/mL (◊), $1,46 \times 10^{-4}$ mol/mL (▲) et $3,02 \times 10^{-4}$ mol/mL (●)

La Figure 18 présente l'évolution de la cinétique de polymérisation du DMAEMA pour différentes concentrations en CTA. Plus la concentration en CTA est faible, plus la cinétique de polymérisation est lente et plus le temps d'inhibition augmente. Pour le milieu le plus concentré (PDMAEMA 3), le temps d'inhibition est relativement faible (2 heures). Au-delà, une relation linéaire de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps et une cinétique du premier ordre sont obtenues, démontrant une consommation en espèce propageante constante. Une conversion élevée (87 %) est atteinte au bout de 9 heures de polymérisation, contre 24 h pour le PDMAEMA 1.

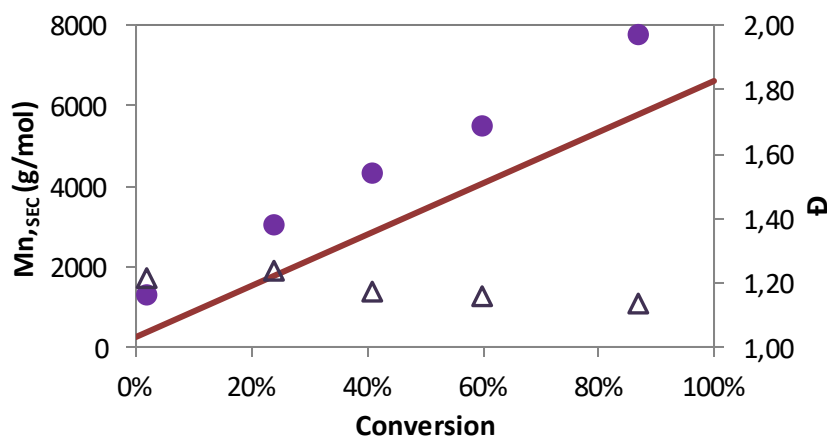


Figure 19 : Evolution de la masse molaire déterminée par SEC $\overline{Mn}_{SEC}$ (●) et de la dispersité $\overline{Mn}_{SEC} / \overline{Mn}_{theo}$ (Δ) en fonction de la conversion pour le PDMAEMA 3. (—) représente l'évolution de la masse molaire théorique $\overline{Mn}_{theo}$.

Les masses molaires et les dispersités déterminées par SEC au cours de la cinétique ont été tracées en fonction de la conversion (Figure 19). Une évolution linéaire des masses molaires est observée, mais un écart constant par rapport aux masses théoriques est toutefois notable. Ceci peut s'expliquer par un amorçage partiel lors de la polymérisation mais également par le fait que la droite d'étalonnage utilisée pour la détermination des masses molaires relatives par SEC est effectuée par un polymère standard (PMMA) de volume hydrodynamique différent du PDMAEMA. [23] Les dispersités au cours de la polymérisation sont faibles et diminuent avec la conversion ($< 1,20$) démontrant le bon contrôle de la polymérisation.

Au vu des résultats, le toluène (33 % v/v) se révèle être un solvant approprié pour la polymérisation par RAFT du DMAEMA. Ainsi, dans les mêmes conditions, le LCTA précédemment synthétisé a été engagé dans la polymérisation afin d'obtenir un copolymère amphiphile.

2.4. Synthèse de copolymères amphiphiles lipide-*b*-poly(méthacrylate de diméthyle(aminoéthyle))

2.4.1. Etude cinétique de la polymérisation à partir du LCTA

Afin d'évaluer l'efficacité de notre LCTA à contrôler la polymérisation par RAFT du DMAEMA, une cinétique de polymérisation dans les mêmes conditions qu'avec le CTA COOH a été effectuée (33 % v/v toluène et $[\text{DMAEMA}]/[\text{LCTA}] = 40/1$).

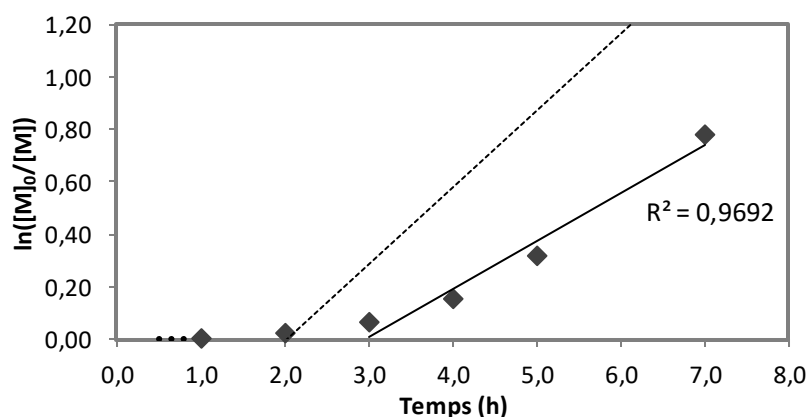


Figure 20 : Cinétique de polymérisation par RAFT du DMAEMA en présence du LCTA. A titre de comparaison, les résultats de cinétique du CTA sont représentés en pointillés.

L'évolution de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps (Figure 20) révèle un temps d'inhibition en début de polymérisation supérieur à celui observé lors de l'utilisation du CTA (3 heures contre 2 heures). Cette différence pourrait être expliquée par la présence d'une longue chaîne lipidique en extrémité du LCTA et donc une mobilité plus faible, ce qui rendrait l'accès à la liaison S-R plus difficile. Au-delà de la période d'inhibition, l'évolution est quasi linéaire mais reste toutefois plus lente qu'avec le CTA.

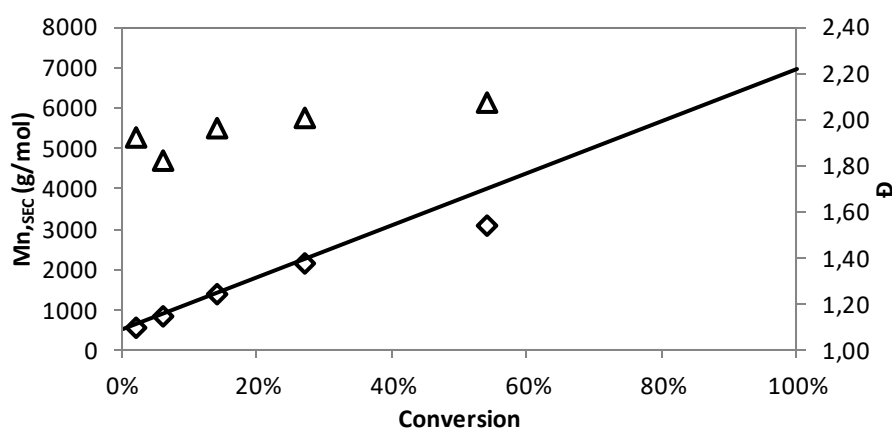


Figure 21 : Evolution de la masse molaire déterminée par SEC $\overline{Mn}_{SEC}$ (◇) et de la dispersité $\overline{Mn}_{SEC}$ (Δ) en fonction de la conversion. (—) représente l'évolution de la masse molaire théorique $\overline{Mn}_{théo}$

Le tracé des masses molaires moyennes en nombre mesurées par SEC dans la NMP est effectué en fonction de la conversion (Figure 21). L'évolution des masses molaires moyennes en nombre est cohérente avec les masses molaires théoriques. En revanche, les dispersités sont élevées tout au long du suivi cinétique. En effet, les échantillons prélevés au cours de la cinétique ayant été analysés en SEC sans purification préalable, le LCTA non réagit de masse molaire relativement élevée (531,38 g/mol) est toujours présent et impacte les mesures, les pics du polymère en croissance et du LCTA n'étant pas suffisamment éloignés pour les intégrer séparément. La détermination de la dispersité du polymère est donc faussée au cours de la polymérisation (Figure 22). En revanche après purification du copolymère par précipitation dans le cyclohexane, la dispersité peut être déterminée; elle est de 1,30 pour le polymère final de $\overline{Mn} = 4400$ g/mol.

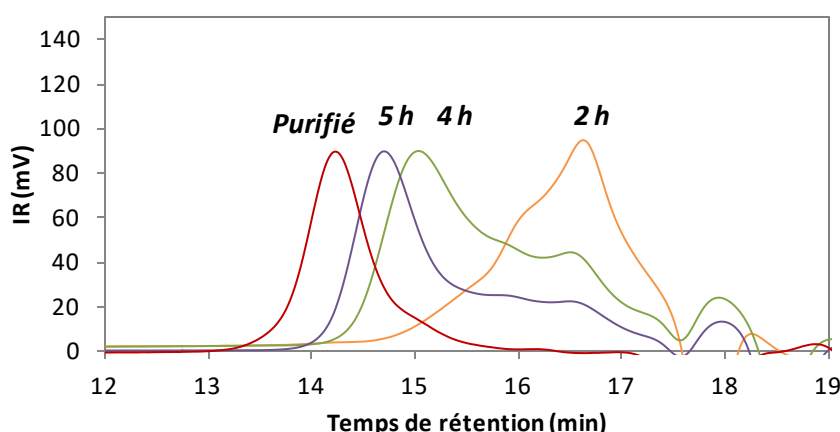


Figure 22 : Tracés SEC au cours de la cinétique de polymérisation

Ainsi, contrairement à ce qui avait été observé lors de la synthèse par ATRP, les résultats obtenus ici permettent de conclure que la polymérisation par RAFT du DMAEMA à partir d'un CTA en extrémité d'une chaîne lipidique se fait de façon contrôlée.

2.4.2. Synthèses de différents copolymères amphiphiles

Plusieurs copolymères amphiphiles de masses molaires différentes ont donc été synthétisés dans les conditions précédentes en variant le rapport monomère/LCTA. Après purification, les masses molaires des copolymères LPDMAEMA **4a**, **5a** et **6a** ont été déterminées par SEC dans le NMP ainsi que par RMN ^1H dans le CDCl_3 (Tableau 3).

Sur le spectre RMN du copolymère L-PDMAEMA (Figure 23), la présence sur la chaîne lipidique des insaturations ainsi que du cycle aromatique permet d'obtenir le degré de polymérisation ($\overline{X}_n$). Les signaux correspondants aux protons des insaturations ont été sélectionnés car pour un copolymère de masse molaire élevée (L-PDMAEMA **6a** par exemple) les protons du cycle aromatique sont moins visibles et se confondent dans le bruit. Ainsi, en prenant en compte l'intégration du signal à $\delta = 4,2$ ppm correspondant à un des CH_2 des motifs DMAEMA (I_a) et l'intégration du signal des insaturations de la chaîne lipidique comptant en moyenne pour quatre protons à $\delta = 5,34$ ppm (I_b), la relation suivante peut être établie :

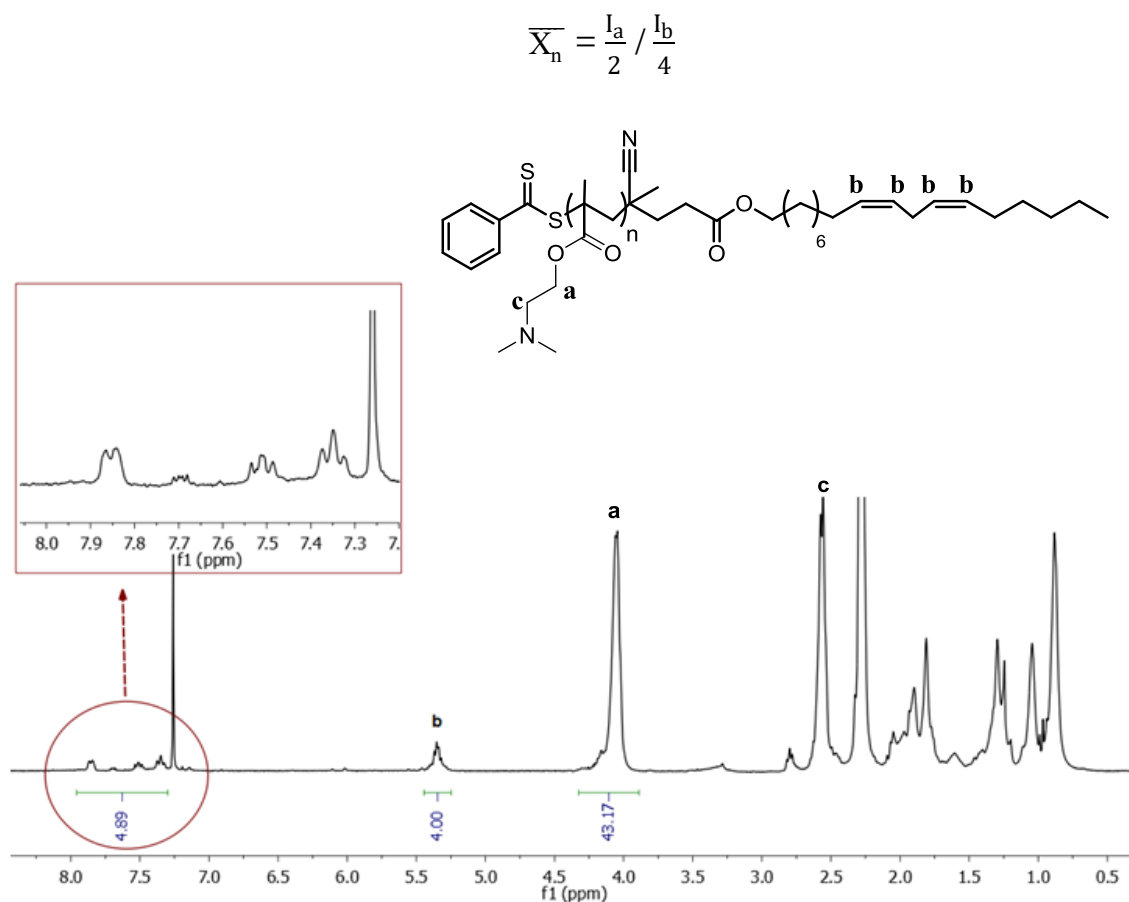


Figure 23 : Spectre RMN ^1H dans le CDCl_3 du copolymère L-PDMAEMA 5a

A partir du degré de polymérisation ($\overline{X}_n$), il est possible d'obtenir la masse molaire moyenne en nombre par le calcul suivant :

$$\overline{M}_n^{\text{RMN}} = M_{\text{LCTA}} + (\overline{X}_n \times M_{\text{monomère}})$$

Ainsi, pour les trois copolymères synthétisés, les masses molaires obtenues par SEC et RMN sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques des copolymères L-PDMAEMA synthétisés

	$\overline{M}_n^{\text{théo}} (\text{g.mol}^{-1})^a$	$\overline{M}_n^{\text{SEC}} (\text{g.mol}^{-1})$	$\overline{M}_n^{\text{RMN}} (\text{g.mol}^{-1})$	$\overline{X}_n^{\text{RMN}} (\text{g.mol}^{-1})$	Đ
L-PDMAEMA 4a	3200	5000	4100	23	1,31
L-PDMAEMA 5a	4000	4400	4000	22	1,54
L-PDMAEMA 6a	8400	9200	8600	52	1,26

$$^a \overline{M}_n^{\text{théo}} = M_{\text{LCTA}} + \left(\frac{[\text{DMAEMA}]}{[\text{LCTA}]} \times M_{\text{DMAEMA}} \times \text{conversion} \right)$$

Pour chacun des copolymères synthétisés, les masses molaires moyennes en nombre observées sont cohérentes avec les valeurs théoriques. L'analyse par SEC conduit cependant à des $\overline{M}_n$ supérieures à celles obtenues par RMN, probablement du à une différence de volume hydrodynamique entre notre copolymère et le PMMA standard utilisé pour la droite d'étalonnage de la SEC.

Les copolymères amphiphiles ainsi synthétisés, une étude approfondie de leur comportement en fonction du pH et de la température à par la suite été menée.

II. Caractérisation physico-chimique des copolymères amphiphiles en milieu aqueux

Avant toute étude physico-chimique sur les copolymères, le pKa a été déterminé. Cette étude a été effectuée par dosage conductimétrique et pH-métrie sur le copolymère **4a** (Tableau 3). Pour cela, la solution est acidifiée par ajout d'une solution d'HCl puis dosée par une solution de NaOH (0,1 M). Le dosage des fonction NH^+ correspond au second segment de droite (Figure 24). La valeur mesurée de 7,55 est cohérente avec celles de la littérature dans laquelle les auteurs observent des pKa de 7,4 [7] ou encore 7,5. [24]

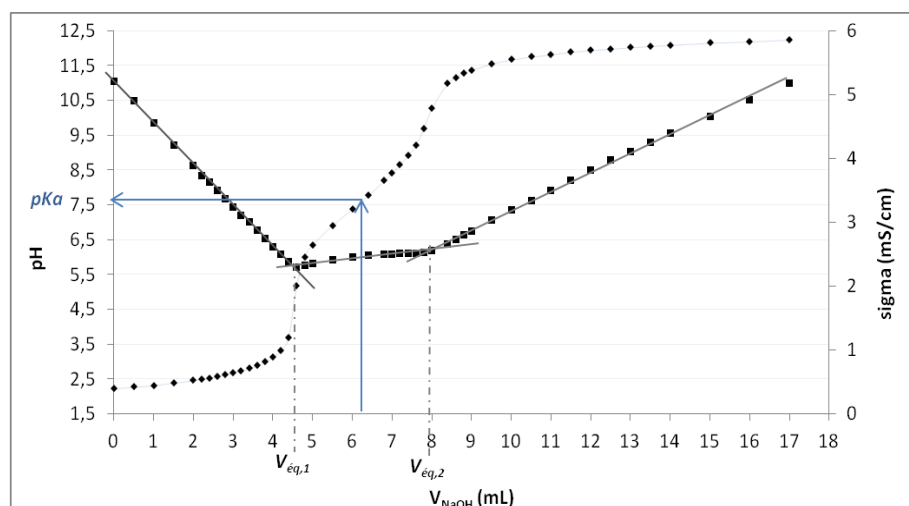


Figure 24 : Evolution du pH et de la conductimétrie en fonction du volume de soude ajoutée (0,1 M) pour le copolymère 4a à 1 g/L

1. Etude du comportement pH-sensible

1.1. Influence de la longueur de la chaîne hydrophile

Les propriétés d'auto-association des copolymères LPDMAEMA en milieu aqueux tamponné et en présence de 0,1 M de chlorure de sodium, à pH 4,6 et à pH 7,4 (PBS) ont été étudiées. Pour cela, la fluorescence par sonde pyrène a été utilisée en mode excitation ($\lambda_{\text{excitation}} = 330\text{-}360\text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 374\text{ nm}$) afin de déterminer la présence de clusters hydrophobes composés d'un cœur lipidique et d'une couronne pH-sensible. La détermination de la concentration d'agrégation critique (cac) a été réalisée sur les trois copolymères précédemment synthétisés, LPDMAEMA **4a**, **5a** et **6a** et l'influence de la masse molaire et donc de la longueur de la chaîne hydrophile a été étudiée (Tableau 4).

Tableau 4 : cac mesurées par fluorescence pour les copolymères L-PDMAEMA à pH 4,6 et 7,4

	$\overline{Mn}_{\text{RMN}}$ (g.mol ⁻¹)	cac PBS (pH 7,4) (mol/L)	cac (pH 4,6) (mol/L)
L-PDMAEMA 4a	4100	$3,00 \times 10^{-5}$	$7,60 \times 10^{-5}$
L-PDMAEMA 5a	4000	$4,77 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-4}$
L-PDMAEMA 6a	8600	$2,28 \times 10^{-5}$	$4,67 \times 10^{-5}$

Le tracé de l'évolution de la cac à pH 4,6 et 7,4 en fonction de la masse molaire (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) permet d'observer le comportement d'auto-association des copolymères amphiphiles à différents pH.

A pH 4,6, les motifs DMAEMA sont totalement protonés rendant le copolymère plus soluble. Les blocs hydrophiles étant étirés, aucune association ne devrait être observée. Cependant, pour les trois copolymères, une cac apparaît (Tableau 4). Lorsque la masse molaire augmente, cette cac diminue. Théoriquement, lorsque la masse molaire du copolymère augmente, celui-ci étant plus soluble, la cac devrait augmenter si l'on se réfère au comportement d'un surfactant classique tel que le laurylsulfate de sodium par exemple. En revanche le phénomène inverse se produit ici et peut être expliqué par une plus forte contribution de l'effet stérique par rapport à l'hydrophilie du bloc PDMAEMA. [25] [26]

A pH 7,4, les groupements amine du L-PDMAEMA sont seulement partiellement protonés puisque le pH est légèrement inférieur au pKa (7,55). De façon cohérente avec la diminution de l'hydrophilie engendrées, les cac mesurées sont inférieures à celles à pH 4,6 et ce pour toutes les masses molaires. De nouveau, les cac diminuent lorsque les masses molaires augmentent. Ce phénomène conforte l'hypothèse que l'effet stérique joue un rôle important. De plus, il est intéressant de souligner que l'impact du pH sur la cac est beaucoup plus marqué pour des masses molaires plus faibles.

Les valeurs des cac mesurées pour les copolymères L-PDMAEMA sont de l'ordre de 10^{-5} mol/L. Dans la littérature les valeurs retrouvées sont assez variables, pour le poly(éthyle éthylène phosphate)-*b*-PDMAEMA [26] les cac mesurées à pH 9 sont du même ordre de grandeur que nos copolymères en revanche, pour le poly(acide acrylique)-*b*-PDMAEMA, des cac plus faibles ont été observées de l'ordre de 10^{-7} mol/L à pH 9. [27]

De part l'écart plus élevé entre les cac à différents pH et la disponibilité de produit en quantité suffisante, le copolymère L-PDMAEMA **4a** a été sélectionné pour la suite de notre étude.

Afin d'étendre notre étude, la cac du copolymère L-PDMAEMA **4a** a également été déterminée dans un milieu basique à pH 10. A ce pH, le copolymère n'est plus protoné et la cac mesurée ($1,4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) est logiquement plus faible qu'à pH 7,4 (Tableau 5).

1.2. Etude des propriétés tensio-actives

Les propriétés tensio-actives du copolymère ont été étudiées dans les trois milieux (pH 4,6, 7,4 et 10). Les tensions de surfaces ont été déterminées par la méthode du plateau de Wilhelmy à différentes concentrations. Cette technique, consiste à immerger une lame de platine dans la solution de copolymère et de la remonter verticalement hors du liquide. La force exercée sur la lame (F , en N) est alors mesurée à l'aide d'une balance, elle est proportionnelle à la longueur de la lame (l , en m) et à la tension de surface (γ , en N/m):

$$F = l \cdot \gamma \cdot \cos(\theta)$$

θ correspond à l'angle entre la lame et la tangente du ménisque formé par le liquide. Le nettoyage préalable et intensif de la lame par calcination doit être effectué pour assurer un mouillage parfait et donc un angle de 0° .

Dans le cas d'une solution de tensio-actif classique, les molécules amphiphiles s'organisent spontanément de telle sorte que la partie hydrophobe se place à l'interface eau-air. La stabilisation de la tension de surface se produit lorsque les molécules amphiphiles saturant la surface et que des micelles commencent à se former en solution. C'est ainsi qu'est déterminée la cac.

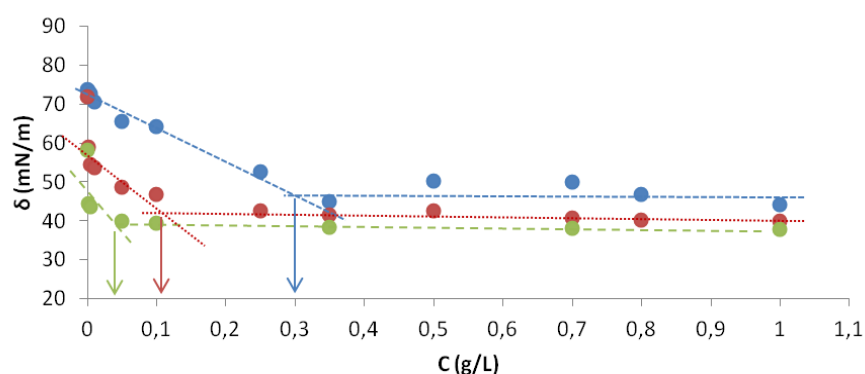


Figure 25 : Evolution de la tension de surface du copolymère L-PDMAEMA 4a en fonction de la concentration et à pH 4,6 (●), pH 7,4 (PBS) (●) et pH 10 (●) à t_{amb} .

L'évolution de la tension de surface est représentée en fonction de la concentration (Figure 25).

A pH 10 et à pH 7,4, une forte diminution de la tension à l'interface eau/air est visible et la stabilisation a lieu à 39 et 41 $mN.m^{-1}$ respectivement.

A pH 4,6, l'adsorption du copolymère à l'interface a lieu à plus haute concentration et la tension de surface se stabilise à 45 $mN.m^{-1}$ car le copolymère se trouve sous forme protoné et est donc plus hydrophile. Il est important de noter qu'à ce pH, le comportement souhaité était une dissociation totale du système en unimères provoquée par la protonation des chaines de PDMAEMA. Néanmoins, contrairement au système L-PAA qui ne s'associait plus lorsqu'il est totalement ionisé et qui perdait son caractère tensio-actif, [28] le L-PDMAEMA conserve de bonnes propriétés d'association et de stabilisation.

Les valeurs de cac sont cohérentes avec celles mesurées par fluorescence (Tableau 5).

Tableau 5 : Résumé des cac obtenues pour le copolymère 4a

Méthode	$\overline{Mn}_{RMN}$ ($g.mol^{-1}$)	pH 10 cac ($mol.L^{-1}/g.L^{-1}$)	pH 7,4 (PBS) cac ($mol.L^{-1}/g.L^{-1}$)	pH 4,6 cac ($mol.L^{-1}/g.L^{-1}$)
Fluorescence	4100	$1,40 \times 10^{-5} / 0,070$	$3,00 \times 10^{-5} / 0,150$	$7,60 \times 10^{-5} / 0,380$
Tension de surface		$1,00 \times 10^{-5} / 0,050$	$2,20 \times 10^{-5} / 0,110$	$6,00 \times 10^{-5} / 0,300$

Les valeurs de tension de surface mesurées sont similaires à celles de la littérature pour un copolymère PMMA-*b*-PDMAEMA ce qui confirme que le L-PDMAEMA possède de bonnes propriétés tensio-actives. [25]

1.3.Détermination de la nature des systèmes auto-associés en solution

Afin de connaître la taille et donc la nature de nos systèmes en solution aqueuse, des mesures par DLS ont été effectuées sur le copolymère **4a** dans les trois différents milieux tampons (à pH 10, 7,4 et 4,6). Les diamètres hydrodynamiques ainsi que les PDI donnés représentent une moyenne des 8 mesures effectuées.

Dans un premier temps, le copolymère en solution a été étudié à une concentration de 1 g/L (+ 0,1 M NaCl) (Figure 26). A cette concentration, les mesures de fluorescence par sonde pyrène confirment l'auto-association du copolymère amphiphile indépendamment du pH.

A pH 10, le diamètre hydrodynamique (D_h) moyen en nombre de 10 nm indique que le copolymère amphiphile **4a** est sous forme micellaire avec une polydispersité (PDI) élevée (0,430). Le terme de concentration d'agrégation critique peut donc être remplacé par concentration micellaire critique (cmc).

A pH 7,4, le copolymère amphiphile s'auto-assemble pour former des micelles de l'ordre de 15 nm avec une meilleure polydispersité (0,273) qu'à pH 10 ainsi qu'une légère augmentation de la taille. Cette différence de taille peut s'expliquer par le fait qu'à pH 7,4 ($pK_a = 7,55$), le copolymère étant partiellement protoné, les chaînes hydrophiles se trouvant dans la couronne s'étirent.

A pH 4,6, les mesures par DLS révèlent une organisation beaucoup plus polydisperse (PDI = 0,689) avec des tailles allant de 1 à 25 nm. A ce pH, les chaînes totalement protonées de la couronne sont étendues engendrant la présence d'un mélange de systèmes de tailles plus ou moins élevées. Il semble donc y avoir une désorganisation partielle du système L-PDMAEMA, bien que les mesures par fluorescence effectuées à ce pH révèlent la persistance de clusters hydrophobes capables de solubiliser le pyrène.

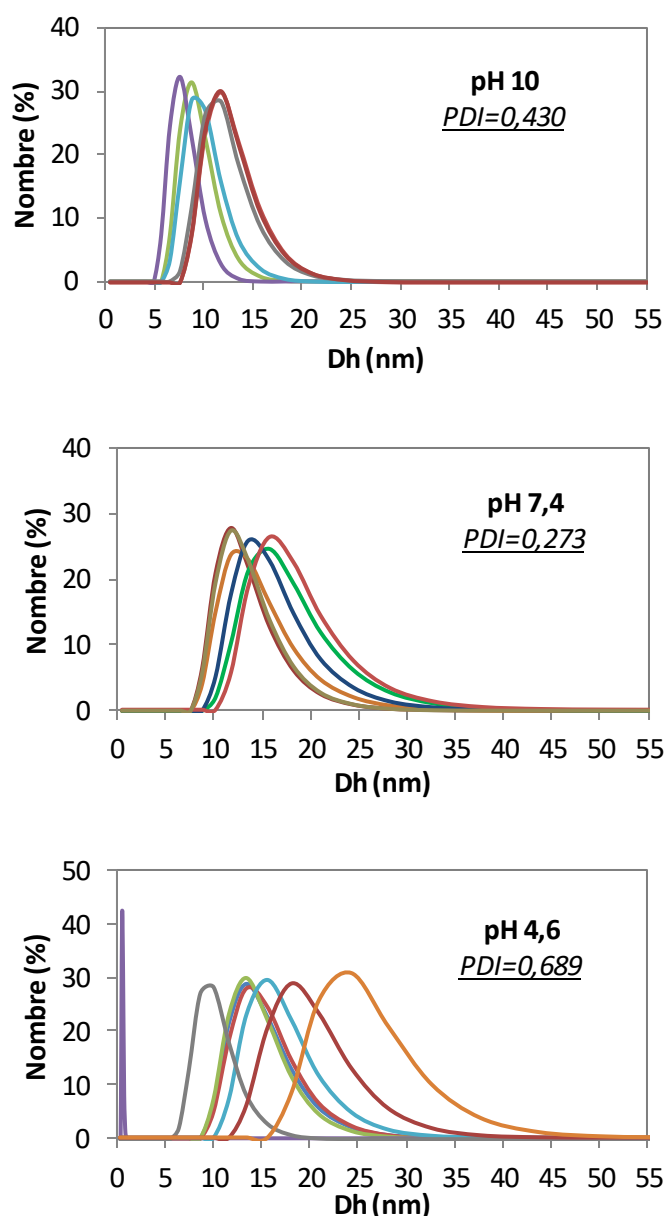


Figure 26 : Mesures DLS du copolymère 4a à 1 g/L (0,1 M NaCl) à 25 °C et différents pH.

Notre but quant à l'utilisation d'un système à base de PDMAEMA était d'étudier si la désorganisation du système par simple variation de pH (micelles à $\text{pH} \geq 7,4$ et unimères à $\text{pH} 4,6$) était possible. Les résultats précédemment obtenus montrent qu'à une concentration de 1g/L, des clusters hydrophobes existent indépendamment du pH étudié. Le comportement de ce système a donc été étudié à différentes concentrations. En se plaçant dans une gamme de concentration à laquelle le copolymère est auto-assemblé à $\text{pH} \geq 7,4$ mais dissocié à $\text{pH} 4,6$ d'après les mesures par fluorescence, la transition micelles/unimères devrait être observée.

Ainsi, des mesures DLS ont été réalisées à pH 4,6 à une concentration de 0,350 g/L et 0,250 g/L ($\text{cmc}_{\text{pH}4,6} = 0,380 \text{ g/L}$) et les résultats sont représentés en Figure 27.

Une solution de concentration inférieure à la cmc du copolymère en milieu acide ne nous a donc pas permis d'observer une désorganisation du système. En effet, des micelles de diamètre hydrodynamique de 5 à 20 nm environ sont obtenues et de polydispersité élevée à 0,350 g/L (0,961) alors qu'à 0,250 g/L les tailles sont moins étalées et beaucoup moins polydisperses (0,376) (Figure 27). Il semblerait donc qu'il y ait un problème de concordance entre le phénomène microscopique observé par fluorescence et celui macroscopique observé par DLS. Néanmoins les derniers résultats restent à considérer avec précaution puisque les concentrations étudiées sont dans les limites des mesures détectables par l'appareil utilisé. De plus, il a déjà été observé sur des systèmes comportant ce monomère des problèmes d'analyses dus à un phénomène de non réversibilité. [29] Une autre hypothèse serait la présence, à très faible concentration ($< 300 \text{ mg/L}$), de cluster de faible nombre d'agrégation rendant difficile la solubilisation du pyréne. [30]

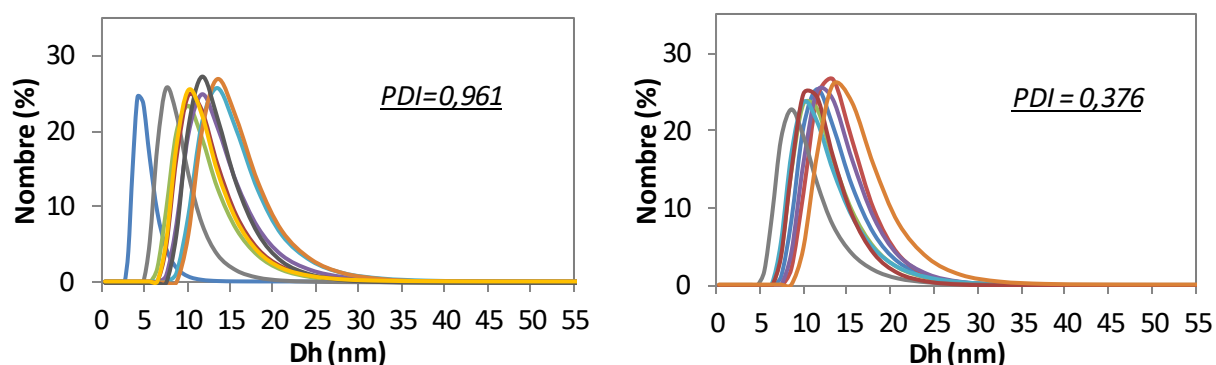


Figure 27 : Mesures DLS du copolymère 4a en milieu tampon pH 4,6, à 25 °C, à 0,350 g/L (gauche) et à 0,250 g/L (droite)

Dans la littérature il existe différents systèmes à base de PDMAEMA dont le comportement pH-sensible décrit présente le même phénomène, c'est-à-dire la non dissociation à pH acide. [31] L'étude du copolymère poly(ϵ -caprolactone)-*b*-PDMAEMA [8] par exemple montre que la protonation et la solvation de la couronne de PDMAEMA provoquent une augmentation de la taille des systèmes micellaires à pH acide (60 nm à pH 4,5). En revanche lorsque le pH

augmente à 10, la taille des micelles diminue à 40 nm, ce phénomène est expliqué par la suppression des forces de répulsions entre les chaînes de PDMAEMA à pH élevé puisque celles-ci ne sont plus chargées. Le même comportement a été décrit par Hadjichristidis et *al.* pour le copolymère poly(DL-lactide)-*b*-PDMAEMA. [32] A l'inverse, d'autres systèmes se dissocient à $\text{pH} < \text{pKa}$, tels que le PDEAEMA_m-*b*-PDMAEMA_n [33] ou encore le poly(méthacrylate de méthyle)_x-*b*-PDMAEMA_y [34]. Ce dernier est d'autant plus intéressant puisque en fonction de la composition en DMAEMA, le copolymère se comporte différemment. En effet, à pH acide le système composé de 10 % en DMAEMA reste stable alors qu'à 25 % il est totalement dissocié. De plus, les résultats de fluorescence par sonde pyrène confirment ces comportements différents.

Malgré la non dissociation du système L-PDMAEMA lors d'une variation de pH, les résultats précédemment obtenus démontrent tout de même un comportement pH-sensible. Suite à cela, nous avons souhaité étudier les propriétés thermo-sensibles du copolymère. En effet, le PDMAEMA est également connu pour présenter une température de point de trouble qui de plus est dépendante du pH. L'étude de la double sensibilité du L-PDMAEMA a donc été menée par la suite.

2. Etude du comportement thermo-sensible en fonction du pH

Selon la littérature, l'homopolymère PDMAEMA est connu pour être soluble en milieu aqueux en dessous de sa température de point trouble (T_{PT}). Cette dernière dépend de la masse molaire (de 46 à 32 °C pour des degrés de polymérisation allant de 9 à 337), [35] de la concentration en polymère et en sel dans le milieu. [36] Cependant, la T_{PT} du PDMAEMA peut également être influencée par le pH. [20]

C'est pourquoi une étude sur les propriétés thermo-sensibles des systèmes micellaires à base de L-PDMAEMA a été réalisée, et notamment l'influence du pH sur la solubilité des systèmes à différentes températures (Figure 28).

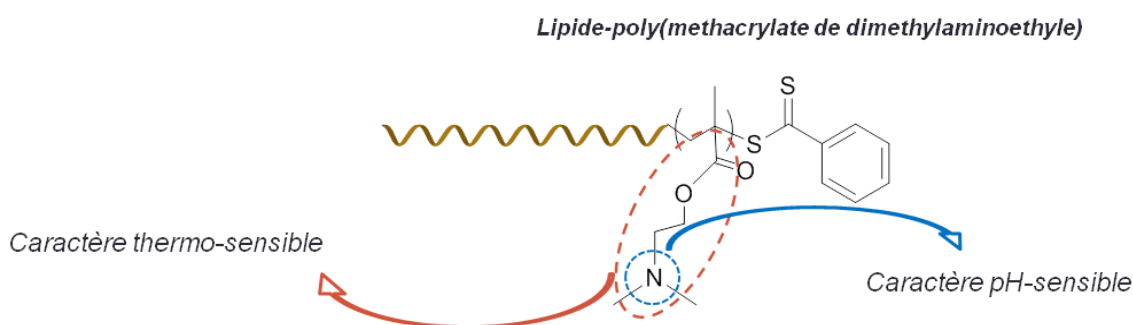


Figure 28 : Illustration des fonctions pH et thermo-sensible du copolymère L-PDMAEMA

Le comportement du copolymère **4a** en fonction de la température a été étudié par spectrophotométrie UV-visible à une concentration de 1 g/L dans différents milieux tampons (NaCl, 0,1 M) à pH 4,6, 7,4, 8 et 10 (Figure 29).

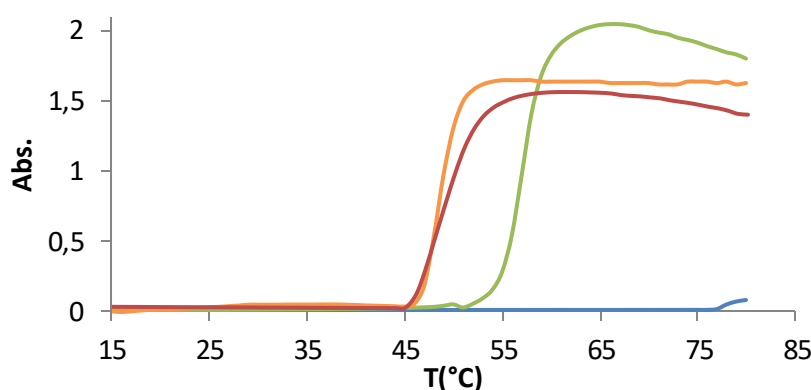


Figure 29 : Spectre d'absorbance UV-Visible ($\lambda = 600$ nm) en fonction de la température pour le copolymère 4 à 1 g/L et à pH 4,6 (bleu), 7,4 (vert), 8 (orange) et 10 (rouge). La T_{PT} est déterminée à 10 % de l'augmentation de l'absorbance.

A pH 4,6, la protonation des fonctions amine du copolymère engendre une augmentation de la solubilité du copolymère et de ce fait, aucune T_{PT} n'est observée jusqu'à 85 °C. En revanche en augmentant le pH, le taux de protonation des chaînes diminue et une température de transition apparaît. Ainsi, à pH 7,4, la T_{PT} est de 54 °C, cette température beaucoup plus faible que celle de l'homopolymère (76 °C pour un $\overline{X}_n$ de 108) [36] est due à la présence d'un bloc lipidique dans la structure du copolymère, comme expliqué dans le chapitre 1, II.2.2.1.

Une fois les chaînes totalement déprotonées, la T_{PT} n'évolue quasiment plus, elle est de 48 °C à pH 8 et 47 °C à pH 10. Dans la littérature, l'influence du pH étudiée sur l'homopolymère montre également une diminution de la T_{PT} lorsque le pH augmente et ce même au-dessus de pH 8 (53 °C à pH 8 et 38 °C à pH 10 pour un $\overline{X}_n$ de 108) [36].

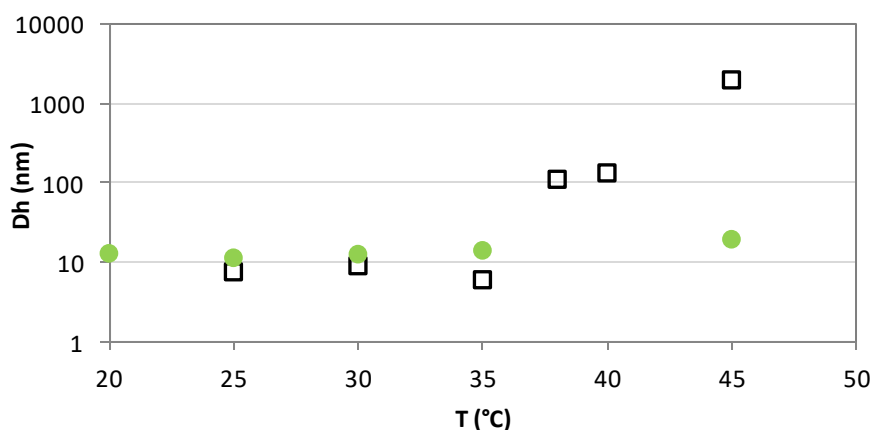


Figure 30 : Evolution du diamètre hydrodynamique des systèmes à 1 g/L en fonction de la température à pH 10 (□) et 7,4 (●). La montée en température ne correspond pas à une rampe de température.

Le caractère thermo-sensible du copolymère a également été étudié par DLS dans les mêmes conditions de concentration que précédemment et à pH 7,4 et 10. Les mesures ont été effectuées de 20 à 45 °C et l'évolution du diamètre hydrodynamique a pu être tracée en fonction de la concentration (Figure 30).

A pH 7,4, la taille des micelles (environ 10 nm) reste inchangée jusqu'à 45 °C, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par spectrophotométrie UV-visible (T_{PT} = 54 °C). A pH 10, la taille des micelles est stable et de l'ordre de 10 nm pour des températures inférieures à 35 °C. A partir de 38 °C, la taille augmente à 100 nm, probablement due à la réorganisation du système par un changement de morphologie ou encore à une augmentation drastique du nombre d'agrégation. Cependant, ce phénomène n'est pas visible en spectrophotométrie. A 45 °C, des agrégats se forment puisque la température est très proche de la T_{PT} (47 °C).

Conclusion

Dans cette partie, la synthèse de copolymères amphiphiles stimuli-sensibles lipide-*b*-poly(méthacrylate de diméthyle(aminoéthyle)) a été réalisée par des techniques de polymérisation radicalaire vivante et contrôlée. Bien que la synthèse du PDMAEMA par ATRP soit largement décrite dans la littérature, cette technique n'a pas permis d'obtenir un bon contrôle de la polymérisation et de ce fait, la polymérisation par RAFT a été sélectionnée. Cette polymérisation nécessitant un agent de transfert de chaîne (CTA pour Chain Transfer Agent), la synthèse d'un LCTA a été effectuée afin de synthétiser des copolymères amphiphiles. Une étude sur l'optimisation de la polymérisation par RAFT avec un CTA classique a permis de sonder les conditions permettant d'obtenir une polymérisation contrôlée. Les paramètres optimisés ont été appliqués avec le LCTA et la synthèse de copolymères amphiphiles de structures définies a pu être réalisée.

La caractérisation physico-chimique d'un copolymère de masse molaire 4100 g/mol a pu être réalisée de façon approfondie à la fois par fluorescence par sonde pyrène, par DLS et par spectroscopie UV-visible. Ces techniques permettent de confirmer les propriétés tensio-actives ainsi que l'auto-association des systèmes sous forme de micelles de l'ordre de 10 nm avec des cmc faibles de l'ordre de 10^{-5} mol/L. De plus le caractère pH-sensible mais aussi thermo-sensible de la couronne a été étudié et bien que le système ne se dissocie pas lorsque l'environnement devient acide, il a été démontré que la variation de pH influait sur les propriétés thermo-sensibles du système. Ainsi, plus le pH est élevé, plus la T_{PT} est faible : alors qu'à pH 4,6 aucune agrégation du système n'est observée, à pH 7,4 et 10 une transition a lieu dès 53 °C et 46 °C respectivement.

Références

- [1] X. Sui, J. Yuan, M. Zhou, J. Zhang, H. Yang, and W. Yuan, "Synthesis of Cellulose-graft-Poly (N , N -dimethylamino-2-ethyl methacrylate) Copolymers via Homogeneous ATRP and Their Aggregates in Aqueous Media," pp. 2615–2620, 2008.
- [2] P. Cotanda, D. B. Wright, M. Tyler, and R. K. O'Reilly, "A comparative study of the stimuli-responsive properties of DMAEA and DMAEMA containing polymers," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 51, no. 16, pp. 3333–3338, 2013.
- [3] V. San Miguel, A. J. Limer, D. M. Haddleton, F. Catalina, and C. Peinado, "Biodegradable and thermoresponsive micelles of triblock copolymers based on 2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate and ϵ -caprolactone for controlled drug delivery," *Eur. Polym. J.*, vol. 44, no. 11, pp. 3853–3863, 2008.
- [4] H. Almeida, M. H. Amaral, and P. Lobão, "Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery," vol. 2, no. 6, pp. 1–10, 2012.
- [5] S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, and M. Amiji, "A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery," *J. Control. Release*, vol. 126, no. 3, pp. 187–204, 2008.
- [6] M. Destarac, "Controlled radical polymerization: industrial stakes, obstacles and achievements," *Macromol. React. Eng.*, vol. 4, pp. 165–179, 2014.
- [7] X. Sui, J. Yuan, M. Zhou, J. Zhang, H. Yang, W. Yuan, Y. Wei, and C. Pan, "Synthesis of cellulose-graft-poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) copolymers via homogeneous ATRP and their aggregates in aqueous media," *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 10, pp. 2615–2620, 2008.
- [8] F. Bougard, M. Jeusette, L. Mespouille, P. Dubois, and R. Lazzaroni, "Synthesis and supramolecular organization of amphiphilic diblock copolymers combining poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) and poly(ϵ -caprolactone).," *Langmuir*, vol.

- 23, no. 5, pp. 2339–2345, 2007.
- [9] M. Ji, L. Jin, J. Guo, W. Yang, C. Wang, and S. Fu, "Formation of luminescent nanocomposite assemblies via electrostatic interaction," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 318, no. 2, pp. 487–495, 2008.
- [10] M. Horn and K. Matyjaszewski, "Solvent effects on the activation rate constant in atom transfer radical polymerization," *Macromolecules*, vol. 46, no. 9, pp. 3350–3357, 2013.
- [11] J. Lad, S. Harrisson, G. Mantovani, and D. M. Haddleton, "Copper mediated living radical polymerisation: interactions between monomer and catalyst," *Dalt. Trans.*, no. 21, pp. 4175–4180, 2003.
- [12] S. Perrier and P. Takolpuckdee, "Macromolecular Design via Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (RAFT)/Xanthates (MADIX) Polymerization," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 43, pp. 5347–5393, 2005.
- [13] G. Moad, A. E. Rizzardo, and S. H. T. A, "Living Radical Polymerization by the RAFT Process," *Aust. J. Chem.*, pp. 379–410, 2005.
- [14] A. Favier and M.-T. Charreyre, "Experimental Requirements for an Efficient Control of Free-Radical Polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Process," *Macromol. Rapid Commun.*, no. 27, pp. 653–692, 2006.
- [15] S. Sevimli, S. Sagnella, M. Kavallaris, V. Bulmus, and T. P. Davis, "Synthesis, self-assembly and stimuli responsive properties of cholesterol conjugated polymers," *Polym. Chem.*, vol. 3, no. 8, p. 2057, 2012.
- [16] D. B. Wright, J. P. Patterson, A. Pitto-barry, P. Cotanda, C. Chassenieux, and R. K. O. Reilly, "Tuning the aggregation behavior of pH-responsive micelles by copolymerization," pp. 2761–2768, 2015.
- [17] L. Carlsson, A. Fall, I. Chaduc, L. Wagberg, B. Charleux, E. Malmstrom, F. D'Agosto, M. Lansalot, and A. Carlmark, "Modification of cellulose model surfaces by cationic polymer latexes prepared by RAFT-mediated surfactant-free emulsion

- polymerization," *Polym. Chem.*, vol. 5, no. 20, pp. 6076–6086, 2014.
- [18] T. C. Krasia and C. S. Patrickios, "Amphiphilic polymethacrylate model co-networks: Synthesis by RAFT radical polymerization and characterization of the swelling behavior," *Macromolecules*, vol. 39, no. 7, pp. 2467–2473, 2006.
- [19] M. Sahnoun, M. T. Charreyre, L. Veron, T. Delair, and F. D'Agosto, "Synthetic and characterization aspects of dimethylaminoethyl methacrylate reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 43, no. 16, pp. 3561–3565, 2005.
- [20] D. Fournier, R. Hoogenboom, H. M. L. Thijs, R. M. Paulus, and U. S. Schubert, "Tunable pH- and Temperature-Sensitive Copolymer Libraries by Reversible Addition - Fragmentation Chain Transfer Copolymerizations of Methacrylates," pp. 915–920, 2007.
- [21] S. Perrier, C. Barner-Kowollik, J. F. Quinn, P. Vana, and T. P. Davis, "Origin of inhibition effects in the reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of methyl acrylate," *Macromolecules*, vol. 35, no. 22, pp. 8300–8306, 2002.
- [22] X. Zhang, O. Giani, S. Monge, and J. J. Robin, "RAFT polymerization of N,N-diethylacrylamide: Influence of chain transfer agent and solvent on kinetics and induction period," *Polymer*, vol. 51, no. 14, pp. 2947–2953, 2010.
- [23] F. D'Agosto, R. Hughes, M. T. Charreyre, C. Pichot, and R. G. Gilbert, "Molecular weight and functional end group control by RAFT polymerization of a bisubstituted acrylamide derivative," *Macromolecules*, vol. 36, no. 3, pp. 621–629, 2003.
- [24] Y. Hu, J. Wang, H. Zhang, G. Jiang, and C. Kan, "Synthesis and characterization of monodispersed P(St-co-DMAEMA) nanoparticles as pH-sensitive drug delivery system," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 45, pp. 1–7, 2014.
- [25] G. Xiao, Z. Hu, G. Zeng, Y. Wang, Y. Huang, X. Hong, B. Xia, and G. Zhang, "Effect of hydrophilic chain length on the aqueous solution behavior of block amphiphilic copolymers PMMA-*b*-PDMAEMA," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 124, no. 1, pp. 202–208,

Apr. 2012.

- [26] X. Liu, P. Ni, J. He, and M. Zhang, "Synthesis and micellization of pH/temperature-responsive double-hydrophilic diblock copolymers polyphosphoester- block -poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] prepared via ROP and ATRP," *Macromolecules*, vol. 43, no. 10, pp. 4771–4781, 2010.
- [27] X. Han, X. Zhang, H. Zhu, Q. Yin, H. Liu, and Y. Hu, "Effect of composition of PDMAEMA-*b*-PAA block copolymers on their pH- and temperature-responsive behaviors," *Langmuir*, vol. 29, no. 4, pp. 1024–1034, 2013.
- [28] L. Hespel, E. Kaifas, L. Lecamp, L. Picton, G. Morandi, and F. Burel, "Synthesis of pH-sensitive micelles from linseed oil using atom transfer radical polymerisation (ATRP)," *Polymer*, vol. 53, no. 20, pp. 4344–4352, 2012.
- [29] L. Lauber, J. Santarelli, O. Boyron, C. Chassenieux, O. Colombani, and T. Nicolai, "pH- and Thermoresponsive Self-Assembly of Cationic Triblock Copolymers with Controlled Dynamics," *Macromolecules*, vol. 50, no. 1, pp. 416–423, Jan. 2017.
- [30] J. Aguiar, P. Carpena, J. A. Molina-Bolívar, and C. Carnero Ruiz, "On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 258, no. 1, pp. 116–122, 2003.
- [31] A. Car, P. Baumann, J. T. Duskey, M. Chami, N. Bruns, and W. Meier, "pH-Responsive PDMS-*b*-PDMAEMA Micelles for Intracellular Anticancer Drug Delivery," *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 9, pp. 3235–3245, 2014.
- [32] N. Karanikolopoulos, M. Zamurovic, M. Pitsikalis, and N. Hadjichristidis, "Poly(DL-lactide)-*b*-poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate): Synthesis, characterization, micellization behavior in aqueous solutions, and encapsulation of the hydrophobic drug dipyrindamole," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 2, pp. 430–438, 2010.
- [33] U. Jeng, V. Bütün, Y. H. Lai, and C. H. Su, "Micellization behavior of tertiary amine-methacrylate-based block copolymers characterized by small-angle X-ray scattering and dynamic light scattering," vol. 138, 2013.

- [34] T. Yildirim, A. C. Rinkenauer, C. Weber, A. Traeger, S. Schubert, and U. S. Schubert, "RAFT Made Methacrylate Copolymers for Reversible pH-Responsive Nanoparticles," pp. 2711–2721, 2015.
- [35] V. Bütün, S. . Armes, and N. . Billingham, "Synthesis and aqueous solution properties of near-monodisperse tertiary amine methacrylate homopolymers and diblock copolymers," *Polymer (Guildf)*., vol. 42, no. 14, pp. 5993–6008, Jun. 2001.
- [36] F. A. Plamper, M. Ruppel, A. Schmalz, O. Borisov, M. Ballauff, and A. H. E. Müller, "Tuning the Thermoresponsive Properties of Weak Polyelectrolytes: Aqueous Solutions of Star-Shaped and Linear Poly(N,N -dimethylaminoethyl Methacrylate)," *Macromolecules*, vol. 40, no. 23, pp. 8361–8366, Nov. 2007.

Chapitre IV

Etude de mélanges physiques de copolymères diblocs amphiphiles

Introduction

Les synthèses de copolymères amphiphiles diblocs précédemment décrites permettent l'obtention de systèmes originaux capables de s'organiser sous forme micellaire. Afin de varier le champ d'application de ces systèmes, la couronne des micelles possède des propriétés pH et/ou thermo-sensibles. Dans le chapitre 2, la modulation de la température de point trouble de copolymères L-P(EtO_x-co-iPrO_y) a été mise en évidence par la copolymérisation de l'iPrOx avec l'EtOx. La température de point trouble augmentait avec la proportion en EtOx au sein du copolymère. Cependant, pour chaque application visée, la composition de nos copolymères doit être adaptée. Bien que les techniques de polymérisation utilisées pour synthétiser ces systèmes intelligents soient contrôlées, il peut être difficile d'obtenir des structures finales dont la composition et la distribution concordent parfaitement celles souhaitées.

Ainsi une récente méthode reposant sur un simple mélange physique de copolymères afin de former des micelles mixtes et de combiner à la fois les propriétés des polymères et leurs sensibilités a été étudiée. Il a été démontré lors de précédents travaux qu'il était possible d'additionner les propriétés pH-sensibles de L-PAA et thermo-sensible de L-PiPrOx en formant des micelles mixtes. Dans un premier temps, nous nous sommes ici intéressés à la possibilité de moduler la température de point de trouble d'un système micellaire via la composition globale de la couronne hydrophile plutôt qu'au travers de la composition individuelle de chaque unimère. Puis dans un second temps, nous avons étendu l'étude à un copolymère à la fois thermo- et pH-sensible afin d'étudier la combinaison de leur propriétés.

Ainsi, dans ce chapitre, la co-micellisation de deux copolymères amphiphiles de différentes L-PEtOx et L-PiPrOx en proportions variables sera étudiée et la modulation des propriétés physico-chimiques de micelles mixtes sera comparée aux copolymères diblocs L-P(EtO_x-co-iPrO_y). Par la suite, cette même approche sera appliquée à des copolymères L-PDMAEMA et L-PiPrOx de natures différentes afin d'étendre ce concept et les futures applications.

I. Etude de systèmes mixtes poly(oxazoline)s

1. Mélanges physiques de copolymères thermo-sensibles

Dans cette partie, le mélange physique des copolymères thermo-sensibles L-PEtOx **4** et L-PiPrOx **5** (Figure 1) a été réalisé afin d'obtenir des systèmes mixtes.

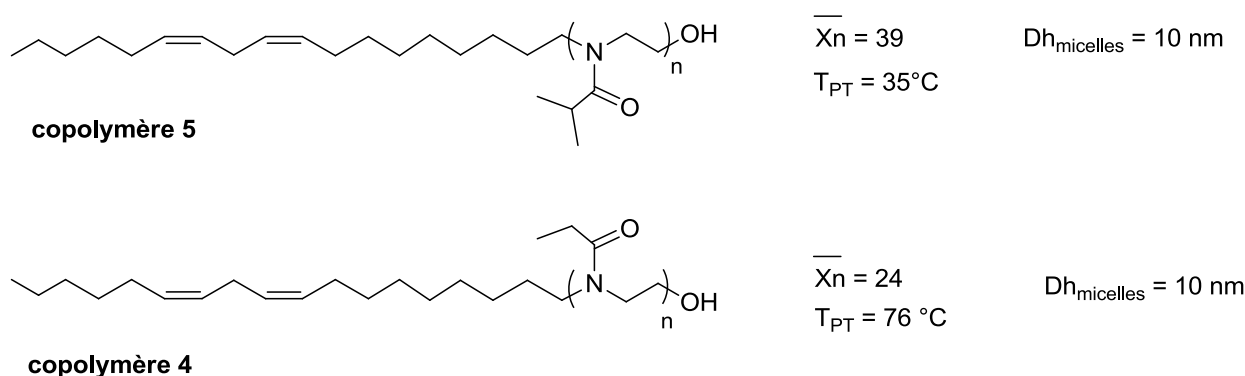


Figure 1 : Structures et caractéristiques des copolymères utilisés pour les mélanges physiques

A l'image des copolymères statistiques L-P(EtOx-co-iPrOx) étudiés dans le chapitre 2, l'intérêt ici est de sonder le comportement thermo-sensible en fonction de la proportion en EtOx. Différents systèmes ont donc été formulés puis analysés par spectrophotométrie UV-visible et DLS afin d'étudier leur température de point de trouble et leur taille. Les mélanges physiques sont nommés sous la forme X/Y, X et Y correspondants à la proportion molaire respective en EtOx et iPrOx.

Les mélanges physiques ont dans un premier temps été réalisés à partir de deux solutions de copolymères **4** et **5** préalablement préparées à une concentration de 2 g/L dans l'eau désionisée (+ 0,1 M NaCl). En fonction de la composition en EtOx voulue dans le système final, le ratio en copolymère **4** et **5** est modifié. Pour chaque mélange, la solution de copolymère **4** est introduite dans la solution de copolymère **5** puis agitée pendant 3 heures avant analyses. La concentration finale des systèmes mixtes est de 2 g/L.

Les mesures par DLS réalisées sur les mélanges physiques à 20 °C révèlent une population monodisperse de diamètre hydrodynamique 10 nm (Figure 2). A ce stade, nous ne pouvons néanmoins pas confirmer que les micelles sont mixtes puisque les copolymères **4** et **5** utilisés pour les mélanges physiques et caractérisés dans le chapitre 2 forment des systèmes micellaires de l'ordre de 10 nm. En revanche, notre équipe a récemment démontré que la présence d'un bloc hydrophobe lipidique commun conduit à la formation de micelles mixtes avec des blocs hydrophiles poly(acide acrylique) et poly(2-isopropyl-2-oxazoline). [1] De plus, d'après les études théoriques de Zhuang et *al.* sur la formation de micelles mixtes, une bonne compatibilité entre les blocs hydrophiles favorise la mixité du système. [2] Ces deux blocs étant ici formés de poly(oxazoline)s, la probabilité d'obtenir des systèmes mixtes est accrue.

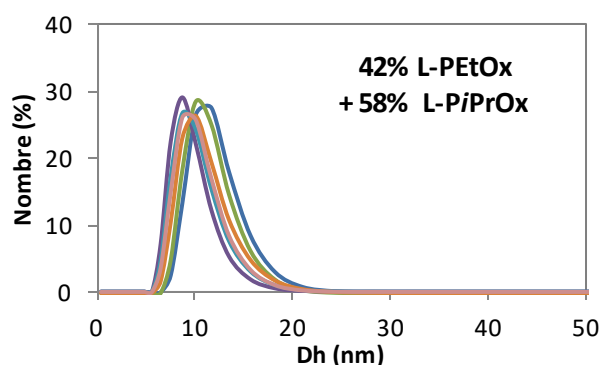


Figure 2 : Mesures DLS du mélange physique 42/58 à 20 °C et à 2 g/L

1.1. Etude de la température de point de trouble

Les analyses par spectrophotométrie ont été réalisées pour les mélanges physiques comportant 11 à 89 % en EtOx.

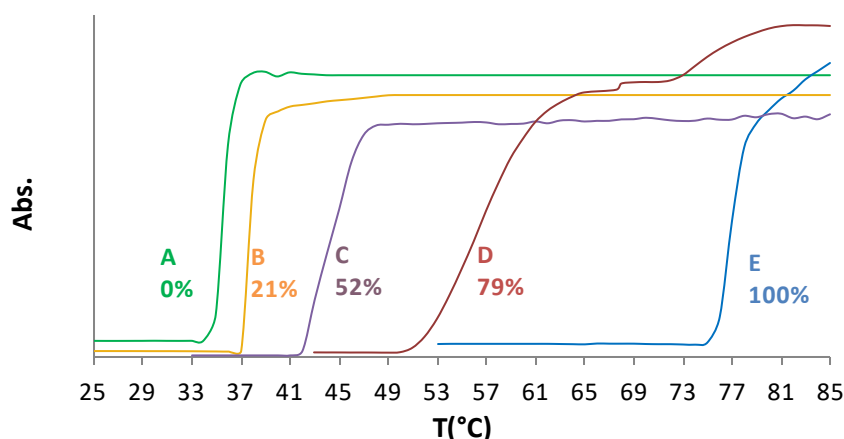


Figure 3 : Evolution de l'absorbance en fonction de la température ($\lambda = 600$ nm) pour le copolymère A) L-PiPrOx 5, les mélanges physiques des copolymères 4 et 5 à différents ratios en EtOx B) 21 %, C) 52 %, D) 79 % et le copolymère E) L-PEtOx 4 ($c_{\text{copo.}} = 2$ g/L).

L'évolution de l'absorbance en fonction de la température de différents mélanges physiques est illustrée Figure 3. Il est intéressant de noter que deux types de comportements différents apparaissent selon la proportion en L-PEtOx introduite.

Tout d'abord, pour les systèmes mixtes contenant jusqu'à 52 % en EtOx, une seule T_{PT} est observée, confirmant ainsi la mixité de nos systèmes et leur homogénéité. De plus sur cette gamme de composition (de 0 à 52 %), la température d'agrégation (de 35 °C à 42 °C) varie linéairement avec la proportion en EtOx (Figure 4).

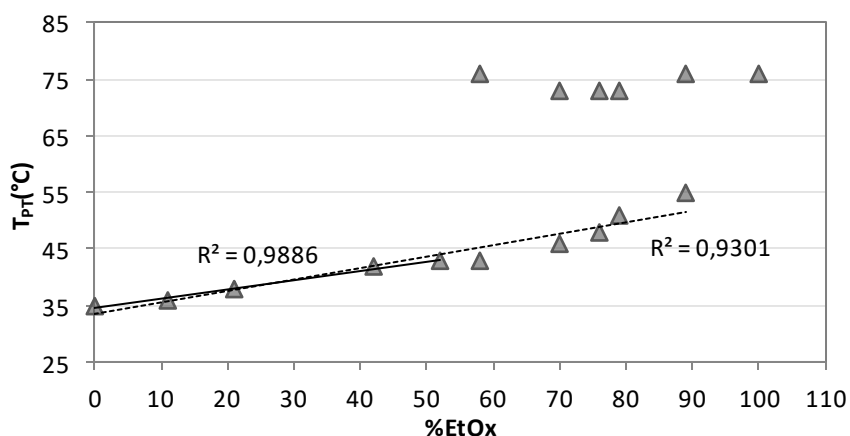


Figure 4 : Evolution de la T_{PT} en fonction de la composition en copolymère 4 à 2 g/L.

En revanche, au-dessus de 52 % en EtOx (Figure 3 – Courbe D), deux sauts d'absorbances successifs sont observés révélant deux phénomènes de précipitation distincts. La température du premier phénomène d'agréation continue à augmenter avec la proportion en EtOx révélant la formation de micelles mixtes sur toute la gamme étudiée. Cependant, la seconde transition (autour de 75 °C) correspond à la T_{PT} du L-PEtOx pur (76 °C). Il apparaît donc qu'une partie du L-PEtOx initialement introduit précipite ultérieurement au système mixte.

A priori, deux phénomènes peuvent être à l'origine de ce comportement. Soit, à partir d'une certaine proportion en L-PEtOx le mélange est initialement hétérogène et comporte à la fois des micelles mixtes et « pures ». Soit le mélange physique est parfaitement homogène initialement, mais une démixtion survient lors de la montée en température induisant une réorganisation du système.

Différents procédés de préparation ont donc été comparés sur un mélange présentant deux transitions (79 % en EtOx) afin de voir si ce phénomène persiste. En effet, la méthode de préparation pourrait influencer sur la cinétique de formation du système même si celui-ci est destiné à atteindre le même équilibre thermodynamique. Wright et *al.* ont par exemple montré que la vitesse de formation de micelles mixtes élaborées à partir des copolymères en poudre était plus rapide comparée à celles préparées via le mélange de deux solutions micellaires. Les systèmes finaux obtenus étaient en revanche identiques. [3] Ainsi, sur nos systèmes la préparation du mélange physique 79/21 a été effectuée de deux manières différentes :

- a) La méthode n°1 est celle utilisée précédemment, la solution micellaire de copolymère **4** est ajoutée à celle du copolymère **5**.
- b) Dans la méthode n°2, le mélange physique a été formulé à partir du mélange des copolymères en poudre puis ajout de la solution aqueuse.

Pour chaque méthode de préparation, l'analyse par spectrophotométrie UV-vis a été réalisée (Figure 5).

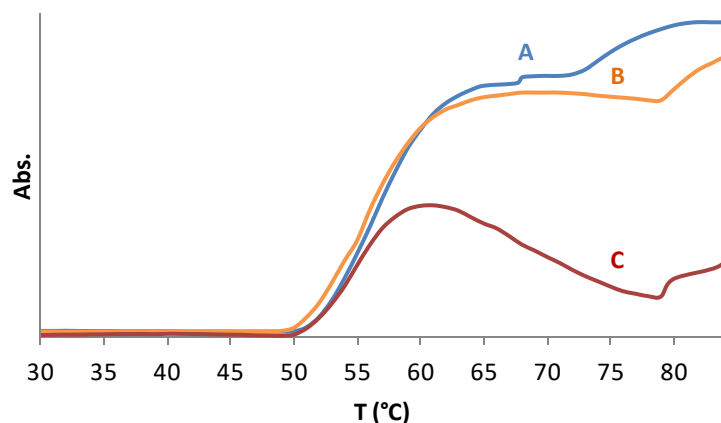


Figure 5 : Influence de la méthode de préparation sur l'évolution de l'absorbance en fonction de la température ($\lambda = 600$ nm). Méthode n°1, sans agitation pendant les mesures (A) et avec agitation (C), et méthode n°2 (B)

Les deux méthodes étudiées montrent des T_{PT} identiques et le phénomène à deux transitions est observé sur chacune d'elle.

Afin de permettre une meilleure homogénéité tout au long de la mesure, l'échantillon de la méthode n°1 a également été analysé en appliquant une agitation directement dans la cuve d'analyse (Figure 5 - courbe C). Dans ce cas, une diminution de l'absorbance est observée (comparée à la courbe A) probablement due à une sédimentation des agrégats de tailles plus élevées du fait de l'agitation. De plus, notons que le second saut est de plus faible amplitude et pourrait être la conséquence d'une quantité plus faible de L-PEtOx s'échappant des systèmes mixtes.

A travers cette étude, nous pouvons conclure que la méthode de préparation du mélange physique n'influe pas sur les températures de transition. Il semblerait que la structure finale du système ne soit pas influencée par la voie de préparation, indiquant le caractère dynamique de nos micelles mixtes. [4] Ainsi, pour la suite de notre étude, la méthode n°1 sera utilisée.

1.2. Etude du phénomène à deux transitions pour le mélange 79/21

Pour tenter de comprendre la double transition observée sur les systèmes de proportion en EtOx supérieure à 52 %, des études par DLS ont été menées sur le mélange physique 79/21 présentant deux transitions.

Chauffage de l'échantillon entre T_{PT1} et T_{PT2} , puis filtration à chaud

Lorsque la température augmente à 60 °C, au-dessus de la première T_{PT} (52 °C), l'apparition d'agrégats est observée. Puisque nous sommes en dessous de la seconde T_{PT} obtenue en spectroscopie visible (73 °C), la présence simultanée de micelles ou d'unimères aurait pu être observée. Cela n'est pas le cas sur les analyses effectuées, cependant la présence d'agrégats pourrait cacher la présence simultanée de plus petits objets (Figure 6).

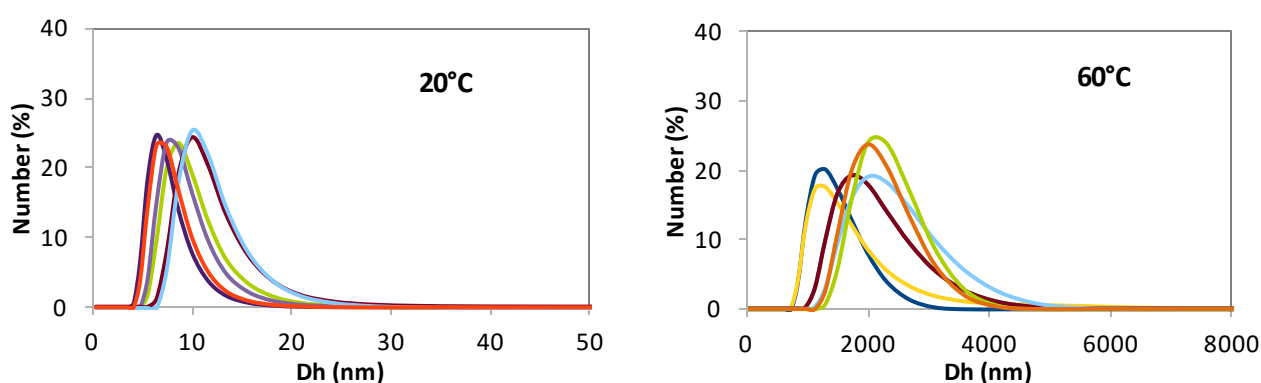


Figure 6 : Mesures DLS du mélange 79/21 à 2g/L, à 20 °C et à 60 °C au-dessus de la T_{PT1} .

Afin de voir s'il existe une double population, l'échantillon a été filtré directement après la chauffe à 60 °C (filtre en cellulose de 0,22 μ m) dans le but d'éliminer les agrégats formés. Pour éviter toute variation de température, le matériel utilisé (seringue et filtre) a été maintenu dans une étuve à 60 °C.

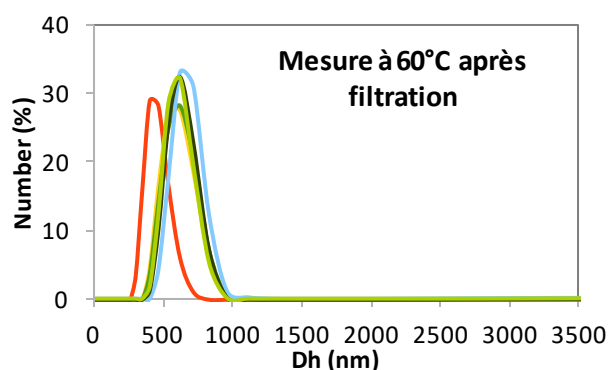


Figure 7 : Mesure DLS du mélange 79/21 à 2 g/L (après chauffe à 60 °C puis filtration) à 60 °C

Après filtration (Figure 7), les mesures DLS à 60 °C ($< T_{PT2}$) montrent de nouveau des agrégats. Ceci est probablement dû à la réversibilité rapide du système et à la difficulté à maintenir une température stable pendant la filtration avec les conditions matérielles disponibles. En effet, si l'échantillon a pu refroidir, la solubilisation d'une partie des agrégats a eu lieu.

La filtration ne paraît donc pas être une méthode efficace pour séparer le milieu des agrégats, une autre voie a donc été expérimentée.

Etude du comportement thermo-sensible après réticulation du cœur des micelles

Le cœur de nos systèmes micellaire est composé d'une chaîne lipidique issue de l'huile de lin et présente donc des insaturations (en moyenne 2). Celles-ci peuvent être réticulées pour obtenir des micelles figées, autrement dit, les échanges dynamiques unimères/micelles n'ont plus lieu. Notre équipe s'est récemment intéressée à la réticulation chimique de l'huile de lin via réaction thiol-ène. Le cœur lipidique des micelles mixtes comportant une couronne L-PAA/L-PiPrOx a été réticulé en utilisant l'éthylène glycol dithioacétate (Figure 8). [1] [5] Pour cela, le mélange a été irradié pendant 30 min à une température de 20 °C à l'aide d'une lampe Hg-Xe (Hamamatsu, LCL8) émettant un rayonnement polychromatique d'intensité 170 mW.cm^{-2} à 365 nm.

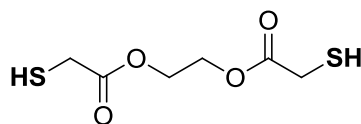


Figure 8 : Formule chimique de l'éthylène glycol dithioacétate utilisé pour la réticulation du cœur lipidique

La même réaction de réticulation a été appliquée sur nos systèmes mixtes afin de bloquer une potentielle démixtion de celui-ci lors de l'échauffement du milieu. Cependant, en raison du caractère thermo-sensible de nos copolymères, le protocole a dû être ajusté. En effet, la lampe utilisée étant à spectre large, l'émission de rayonnement infrarouge est inévitable provoquant un échauffement du milieu. La réticulation du cœur des micelles a donc été réalisée dans un bain d'eau à 15-20 °C. La température du milieu en fin de réaction est de 26 °C.

Ainsi, après réticulation lors d'une élévation de la température au-dessus de T_{PT1} , selon que le mélange initial soit homogène ou hétérogène, deux comportements différents devraient être observés :

- Dans le premier cas, puisque le système est figé, la démixtion entre micelles mixtes et L-PEtOx « pures » ne peut plus se produire et ainsi une seule température de transition devrait être observée.
- Dans le cas d'un milieu initialement hétérogène, la réticulation chimique figera les différents types de micelles présentes et les deux T_{PT} devraient continuer à apparaître.

L'analyse du système mixte réticulé a été effectuée par spectrophotométrie UV-vis et par DLS en vue d'étudier le comportement en fonction de la température.

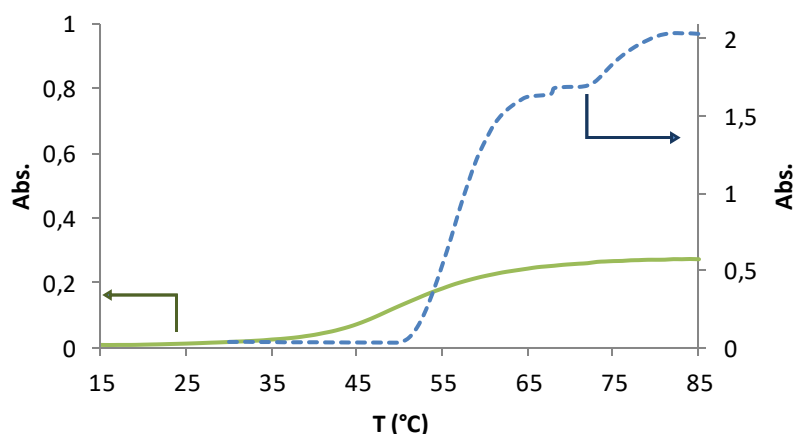


Figure 9 : Evolution de l'absorbance en fonction de la température ($\lambda = 600$ nm) pour le mélange 79/21 à 2 g/L avant (---) et après (—) réticulation

L'évolution de l'absorbance en fonction de la température est illustrée Figure 9. Comparée à la courbe obtenue pour le système non réticulé, trois différences majeures sont notables. Tout d'abord, un seul saut d'absorbance est visible, celui-ci étant plus étalé que pour le système non réticulé. De plus, la valeur de l'absorbance en fin de mesure est très faible et comparée aux micelles non réticulées pour lequel le saut d'absorbance était de 1,5-2, il n'est plus que de 0,3 après réticulation. Ce comportement signifie que la solution ne se trouble que très légèrement après réticulation lorsque la température augmente. Enfin, la température observée lors de cette transition est fortement diminuée, après réticulation cette valeur est de 39 °C (52 °C avant réticulation).

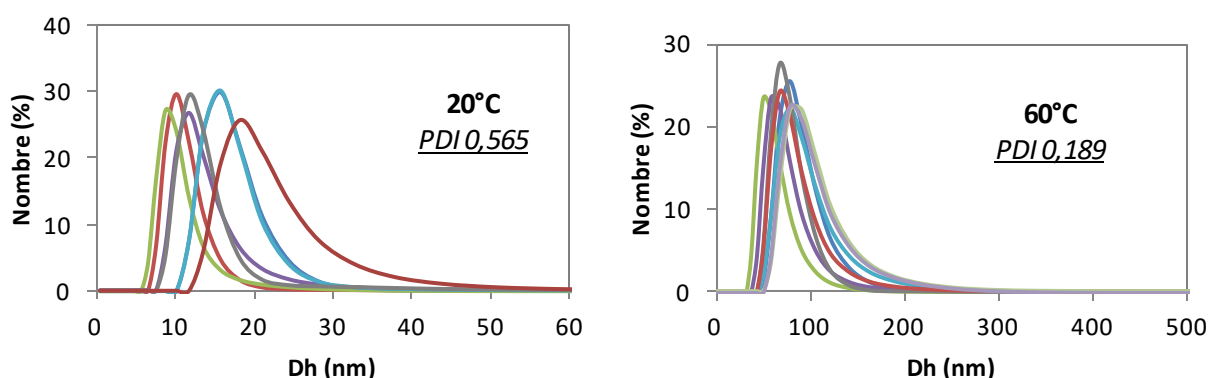


Figure 10 : Mesure DLS à 20 °C et 60 °C du mélange physique 79/21 réticulé.

En comparant dans un premier temps notre système mixte par DLS avant et après réticulation à 20 °C, nous avons pu confirmer que leur structure micellaire n'a pas été altérée par la réaction de réticulation (Figure 10 à 20 °C). Des objets de l'ordre de 10 nm ont été obtenus, mais de PDI plus élevé (0,565). D'autre part, lorsque le système mixte réticulé est analysé à 60 °C, des micelles plus larges ont été observées (60-80 nm). A première vue, ce résultat laisse à penser qu'une réorganisation via un regroupement de micelles a eu lieu, cependant, le PDI obtenu est très étroit (0,189). Ainsi, la question de l'efficacité de la réaction de réticulation est soulevée. Notamment si de l'éthylène glycol dithioacétate résiduel reste présent dans la couronne, une élévation de la température lors des analyses pourrait engendrer des réactions secondaires avec les chaînes de POx et donc une structure finale différente de celle visée. De plus, ce même système refroidi à 25 °C montre des tailles plus importantes qu'initialement (50 nm, PDI 0,379) appuyant notre hypothèse.

La réticulation semble être une méthode très prometteuse, mais le protocole reste à améliorer afin de vérifier son efficacité, éviter toute réaction secondaire et donc pouvoir en tirer des conclusions fiables.

1.3. Comparaison des micelles mixtes et des copolymères L-P(EtOx_x-co-iPrOx_y)

Comme vu précédemment (Figure 4), il est possible de faire varier la température de point de trouble des systèmes thermo-sensibles à travers le mélange physique de deux copolymères. De la même manière que pour les copolymères diblocs L-P(EtOx-co-iPrOx), la T_{PT} évolue en fonction de la composition en EtOx.

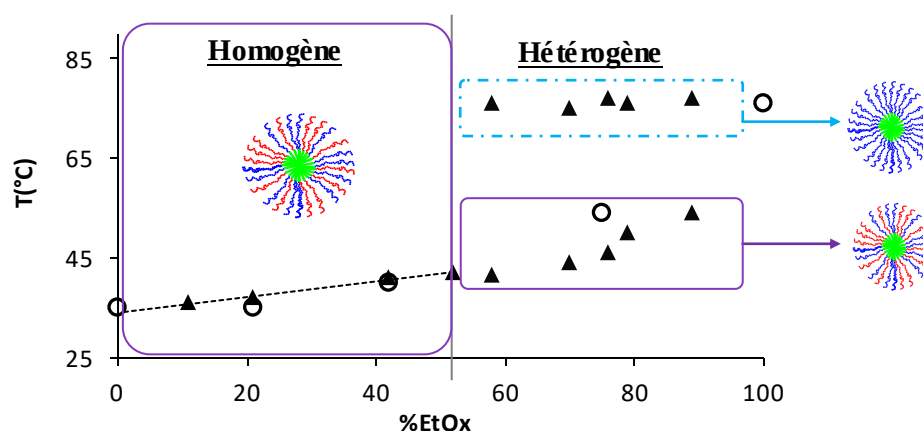
Dans l'optique de comparer l'efficacité de ces deux approches, les températures de point de trouble des mélanges physiques préparés précédemment ont été comparés aux copolymères L-P(EtOx-co-iPrOx) **7** à **9** de même composition étudiés dans le chapitre 2 (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des copolymères et des mélanges physiques de même composition

Copo.	EtOx/iPrOx (%mol)	$\overline{Xn}_{RMN}$	T_{PT} (°C)	Mélanges physiques	T_{PT} (°C)
7	21/79	22	35	21/79	38
8	42/58	22	42	42/58	42
9	75/25	15	55	76/24	48 (et 73)

Alors qu'aucune évolution de la T_{PT} n'avait lieu pour le copolymère 7 composé de 21 % en EtOx ($T_{PT} = 35$ °C, identique au L-PiPrOx), les micelles mixtes de même composition présentent une température de transition de 38 °C. En effet, dans le chapitre 2 le comportement du copolymère 7 a été expliqué par le fait qu'en présence d'une faible proportion en EtOx, lorsque les chaînes d'iPrOx collapsent, elles entraînent toute la chaîne hydrophile avec elles et que les quelques motifs EtOx ne suffisent pas à maintenir les chaînes en solution. En revanche, dans le cas du mélange physique des copolymères 4 et 5 (21/79), la présence de chaînes PEtOx permettrait de retarder le collapse des chaînes PiPrOx lors d'une élévation de la température, modulant ainsi la T_{PT} .

Le mélange physique de composition 42/58, conduit au même résultat que le copolymère 8 de même composition. En revanche, une différence est observée entre les T_{PT} du mélange physique 75/25 et du copolymère 9 (Figure 11). Ceci est probablement dû à la séparation d'une partie du copolymère 4 des micelles mixtes qui contiennent de ce fait une proportion plus faible en L-PEtOx que celle visée.


Figure 11 : Température de point trouble en fonction du % EtOx pour les copolymères (○) L-P(EtOx_xiPrOx_y) et les mélanges physiques (▲) de L-PiPrOx 5 et L-PEtOx 4 (2g/L)

Ainsi, pour des faibles taux en EtOx, l'approche des mélanges physiques semble plus efficace pour ajuster finement la température de déstabilisation que la copolymérisation. De plus, à composition identique, les températures obtenues pour les mélanges physiques sont comparables aux températures des copolymères L-P(EtOx-co-*i*PrOx) **7** et **8**. Ces résultats confirment que la composition finale des micelles mixtes est cohérente avec les proportions initialement introduites en copolymères **4** et **5**.

1.4. Conclusion

Deux méthodes sont alors envisageables dans le but de créer des systèmes thermo-sensibles dont la T_{PT} peut être modulée de façon précise. Le mélange physique semble être une approche plus efficace à faible taux en EtOx mais rencontre des limitations à partir de 52 % en EtOx. Au-delà de ce taux, la réticulation pourrait être une solution. Ainsi, l'approche très intéressante de mixité permettant l'accès à toute une gamme de température de point de trouble via la synthèse de deux copolymères thermo-sensibles uniquement, nous avons voulu étendre ce concept à la co-micellisation du copolymère thermo-sensible L-*Pi*PrOx avec des copolymères de propriétés différentes.

2. Mélanges physiques de poly(oxazoline)s thermo-sensible et hydrophile

Comme discuté dans le chapitre 2, dans la famille des poly(oxazoline)s, la nature du substituant latéral est responsable de la solubilité du polymère. Les groupements isopropyle et éthyle précédemment étudiés ont été choisis pour leur caractère thermo-sensible. En revanche un groupement moins hydrophobe tel que le méthyle mène à un polymère non thermo-sensible et donc soluble en milieu aqueux indépendamment de la température. Dans la littérature, le mélange physique de copolymères hydrophile (PEG) et thermo-sensible (PNIPAM) montre une stabilisation du système mixte par le PEG au-dessus de la T_{PT} du PNIPAM. [6][7] Qu'en est-il lorsque le copolymère hydrophile utilisé est de même nature que le copolymère thermo-sensible ?

Dans cette partie, le L-PMeOx (copolymère 3) (

Figure 12) synthétisé dans le chapitre 2 a été étudié en mélange physique avec le L-PiPrOx. Les mélanges ont été préparés dans une solution tampon phosphate (PBS, pH 7,4) et à une concentration finale de 2 g/L.

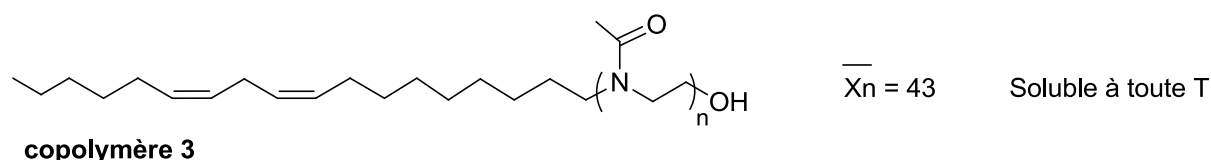


Figure 12 : Structure et caractéristique du L-PMeOx utilisée pour les mélanges physiques

L'évolution de l'absorbance en fonction de la proportion en copolymère 3 (Figure 13) montre deux comportements. Jusqu'à 50 % en MeOx, la courbe présente un saut marqué de l'absorbance au passage de la T_{PT} . En revanche au-dessus de cette proportion, la transition est plus étalée probablement du fait de l'hétérogénéité du système. En effet, la rencontre entre les chaînes de PiPrOx, et donc l'agrégation, est rendue plus difficile puisqu'elles sont « diluées » en présence d'une forte proportion en MeOx.

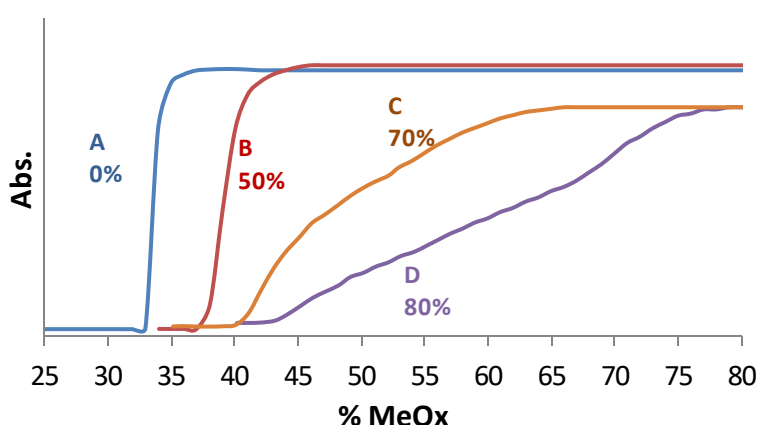


Figure 13 : Spectrophotométrie UV-visible ($\lambda = 600$ nm) des mélanges physiques L-PMeOx/L-PiPrOx à (A) 0 %, (B) 50 %, (C) 70 % et (D) 80 % en L-PMeOx et à C = 2g/L.

Notons que la T_{PT} des mélanges physiques L-PiPrOx/L-PMeOx évolue de façon quasi linéaire en fonction de la composition en copolymère 3 (Figure 14). Cependant, au-delà de 70 % en MeOx, il existe une incertitude sur les valeurs.

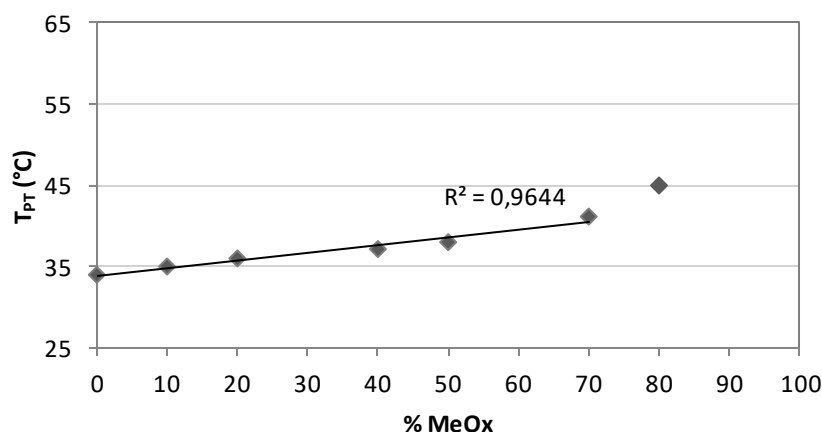


Figure 14 : Evolution de la T_{PT} des mélanges en fonction de la composition en L-PMeOx 3 et à 2 g/L

Ces résultats montrent l'importance du choix des copolymères intégrés à un système mixte. Contrairement au mélange PEG/PNIPAM, [6][7] le système purement poly(oxazoline) PMeOx/PiPrOx semble s'agréger et la T_{PT} peut être modulée. Nous attribuons ce comportement à une bonne compatibilité entre les chaînes de copolymère.

En comparaison avec les systèmes mixtes L-PEtOx/L-PiPrOx, l'utilisation d'un copolymère plus hydrophile et non thermo-sensible permet la variation de la T_{PT} sur une gamme de température plus restreinte de 34 à 44 °C. Cependant il est impossible de voir ici si le mélange est initialement homogène et si une démixtion du système est provoquée lors de la montée en température puisque le L-PMeOx, non thermo-sensible ne présente pas de température de transition. Ainsi, l'étude de ce type de mélange certes très intéressant d'un point de vue théorique n'offre pas de réelle perspective d'application puisqu'il est fort probable que le L-PMeOx « pur » subsiste sous forme de système micellaire dans le milieu au-dessus de la T_{PT} .

Les résultats obtenus lors du mélange de différentes poly(oxazoline)s sont très prometteurs tant en termes de structures que de propriétés. Afin d'aller plus loin dans ce concept de mixité, nous avons souhaité étudier le mélange de copolymères de structures chimiques

différentes dans le but de comprendre les conditions nécessaires à une modulation des propriétés. Ainsi la prochaine partie sera consacrée à la co-micellisation du L-PiPrOx et du L-PDMAEMA, dont la couronne présente deux stimuli différents, et à l'étude du comportement pH- et thermo-sensible en milieu aqueux.

II. Etude de systèmes mixtes composés de chaînes de natures différentes : L-PDMAEMA et L-PiPrOx

Les mélanges physiques L-PDMAEMA/L-PiPrOx ont été préparés dans les mêmes conditions d'étude que le copolymère L-PDMAEMA, *i.e.* trois milieux tampons (+ 0,1 M NaCl) à pH 4,6, pH 7,4 et pH 10 et de concentration totale finale 1 g/L. La concentration en copolymère et la présence de sel pouvant avoir une influence sur la T_{PT} du L-PiPrOx, [1][8] cette dernière a été étudiée à 1 g/L, à pH 7,4 (PBS) et 10. Une température légèrement plus faible a été observée, 33 °C au lieu de 35 °C à 2 g/L indépendamment du milieu d'étude (Tableau 2).

Tableau 2 : Caractéristiques des copolymères (1g/L) utilisés pour les mélanges physiques L-PDMAEMA/L-PiPrOx

Copo	Monomère	$\overline{X}_n$	Dh (nm)	T_{PT} (°C)		
				pH 4,6	pH 7,4	pH 10
4a	DMAEMA	22	10	/	54	48
5	iPrOx	39	10	32 ^a	33	33

^a Analyse effectué par Hespel et *al.* [1]

Dans un premier temps, les mélanges physiques à pH 7,4 ont été réalisés afin d'étudier le mélange de deux copolymères thermo-sensibles de nature différente. L'évolution de la température de point de trouble en fonction de la proportion en copolymère L-PDMAEMA est représentée Figure 15. Le même comportement que dans le cas des mélanges avec le L-PEtOx est obtenu, avec une élévation de la T_{PT} lorsque la proportion en L-PDMAEMA augmente. De plus, cette évolution est linéaire jusque 81 % en L-PDMAEMA, et une seule transition est observée (Figure 16).

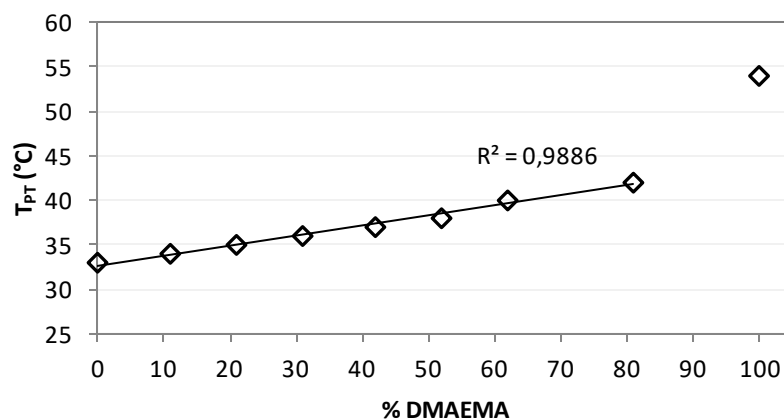


Figure 15 : Evolution de la T_{PT} des mélanges en fonction de la composition en L-PDMAEMA à 1 g/L et à pH 7,4 (◇)

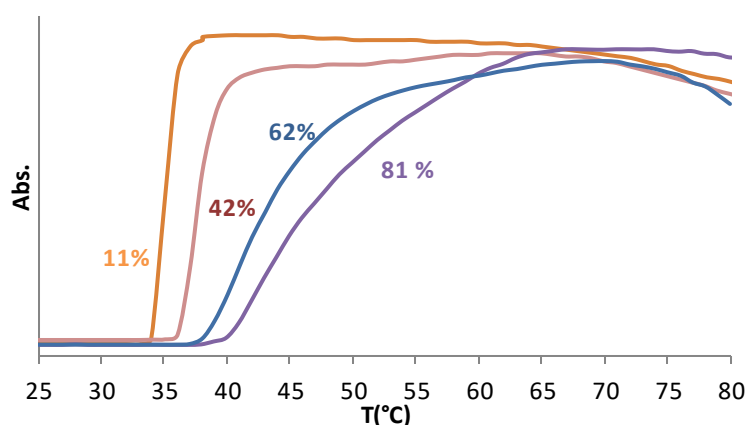


Figure 16 : Evolution de l'absorbance en fonction de la température ($\lambda = 600$ nm) pour des mélanges à 1 g/L et à différentes proportions en L-PDMAEMA à pH 7,4

Le copolymère L-PDMAEMA étant également pH-sensible, l'étude des mélanges physiques a été effectuée à pH 4,6 et à pH 10.

Pour rappel, à pH 4,6, les chaînes de PDMAEMA étant totalement protonées, le copolymère est hydrophile et ne présente aucune T_{PT} en solution. Ainsi, le comportement attendu sur les systèmes mixtes devrait être proche de celui obtenu pour le L-PMeOx.

D'après la Figure 17, les T_{PT} obtenue à pH 4,6 augmentent de façon linéaire jusqu'à 62 % en L-PDMAEMA. Pour le mélange à 81 % en revanche, l'absorbance n'évolue plus avec la température, le système mixte devient trop hydrophile et son comportement tend vers celui d'un système non thermo-sensible. La structure mixte semble donc être stabilisée par le L-

PDMAEMA. Ce phénomène intéressant qui n'était alors pas observé avec le L-PMeOx démontre une bonne coopérativité d'association sur toute la gamme de proportion.

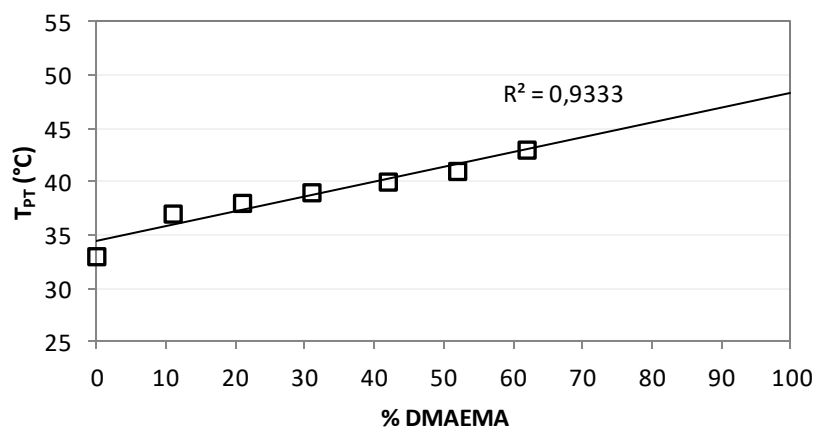


Figure 17 : Evolution de la T_{PT} des mélanges en fonction de la composition en L-PDMAEMA à 1g/L et à pH 4,6 (□)

A pH 10, le copolymère n'est plus protoné et présente seul une T_{PT} de 48 °C. Lors des mélanges physiques avec le L-PiPrOx, cette T_{PT} est modulé et augmente linéairement jusqu'à 81 % en L-PDMAEMA (Figure 18). Les températures de transition obtenues entre 0 et 81 % sont très similaires à celles des mélanges à pH 7,4.

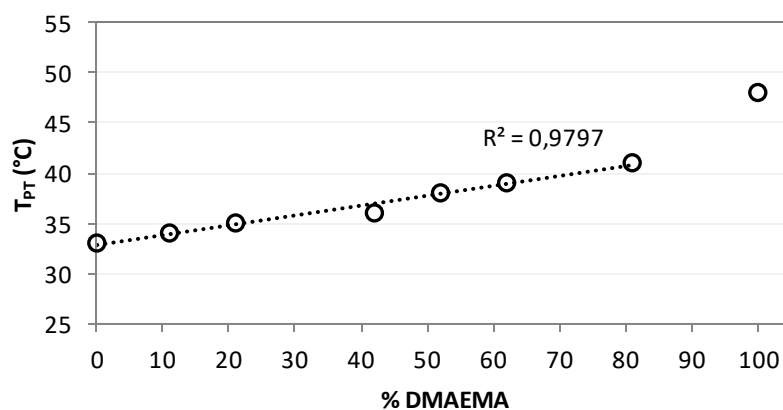


Figure 18 : Evolution de la T_{PT} des mélanges en fonction de la proportion en L-PDMAEMA à 1 g/L et à pH 10 (○)

Les résultats obtenus à pH 10 contrastent avec ceux de Hespel et *al.* [1], [5] pour le système mixte pH et thermo-sensible L-PAA/L-PiPrOx à l'état non ionisé. En effet, sur ces derniers, les chaînes de polyacide stabilisaient à pH 4,6 le L-PiPrOx au-dessus de la T_{PT} . Dans notre cas, à pH 10, le copolymère 5 thermo-sensible permet de moduler finement la T_{PT} du système mixte puisque celui-ci s'agrége à 40 °C comme le montrent les mesures DLS pour le mélange physique (52/48) (Figure 19).

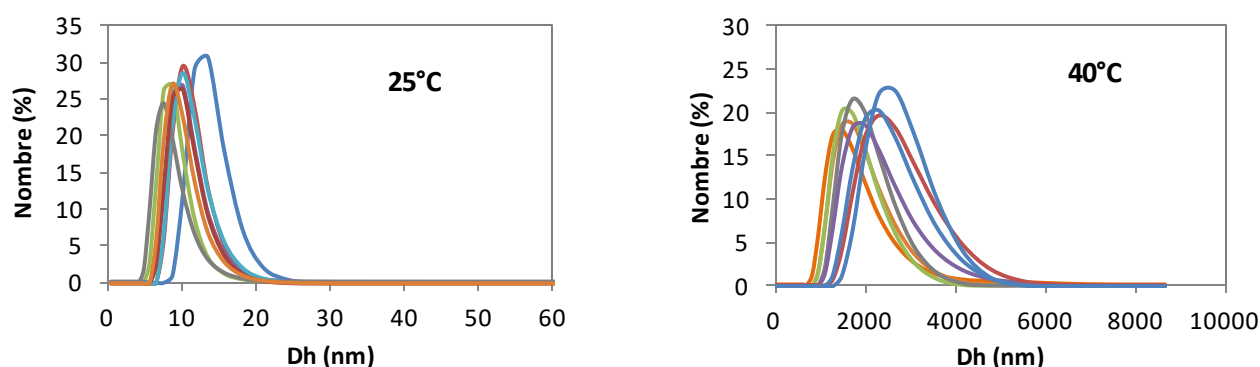


Figure 19 : Mesure DLS du mélange 52/48 à 1 g/L à pH 10 à 25°C et 40 °C

La comparaison des résultats aux différents pH, permet de noter la présence d'un faible saut d'absorbance vers 50 °C sur plusieurs courbes de spectrophotométrie UV-visible (Figure 20). Néanmoins, ce saut étant négligeable par rapport à celui observé avec le copolymère L-PEtOx, nous ne pouvons pas encore avancer les mêmes conclusions.

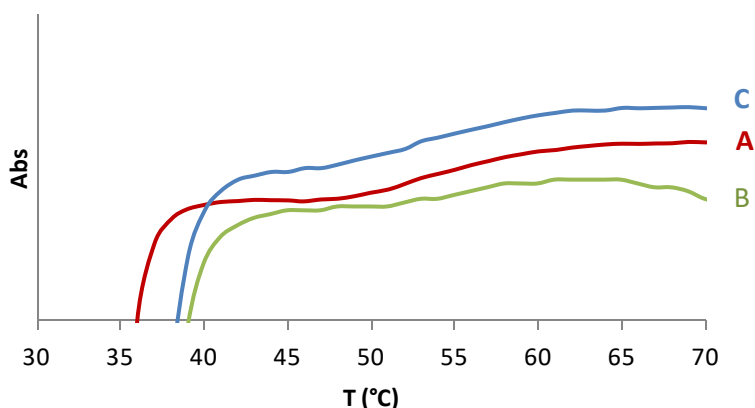


Figure 20 : Zoom de l'évolution de l'absorbance en fonction de la température ($\lambda = 600$ nm) pour le mélange (A) 11/89 à pH 10, (B) 42/58 à pH 7,4 et (C) 11/89 à pH 4,6

La particularité de ce système mixte à double stimuli est la variation de la T_{PT} en fonction du pH. Ce comportement pourrait démontrer un intérêt pour le domaine biomédical en tant que système de vectorisation. En effet, en prenant le système 62/38 par exemple, administré au patient par voie intraveineuse à pH 7,4, il resterait stable dans le sang puisque la température du corps humain est inférieure à sa T_{PT} (40 °C). En revanche, une fois internalisé dans les cellules cancéreuses, le système se trouve dans un environnement acide. Une hyperthermie locale (T_{PT} 43 °C) de la zone à traiter permettrait la déstabilisation du système et donc la libération du principe actif encapsulé. [9]

Le système 81/19 présente également un avantage pour une application par voie orale. En effet, stable en milieu acide quelle que soit la température, ce système passerait la barrière gastrique. Une fois dans les intestins, le milieu étant basique, une légère hyperthermie engendrerait l'aggrégation du système et permettrait le relargage du médicament.

Conclusion

Dans ce chapitre, le mélange physique de copolymères de natures et de propriétés différentes a été réalisé dans le but d'obtenir des systèmes micellaires mixtes stimuli-sensibles. Dans un premier temps, des systèmes mixtes ont été préparés à partir de copolymères thermo-sensibles L-PEtOx et L-PiPrOx. En variant le ratio de copolymère dans le mélange, il est possible de moduler de façon précise la T_{PT} des systèmes. Ces températures allant de 35 à 42 °C sont comparables à celles des copolymères diblocs L-P(EtOx_x-co-iPrOx_y) de même composition et l'approche de mixité offre même un meilleur ajustement à faible taux d'EtOx. Cependant au-dessus de 52 % en EtOx, deux transitions sont observées démontrant un milieu hétérogène.

Cette même approche a été étudiée sur un système composé d'un copolymère hydrophile non stimuli-sensible et d'un second thermo-sensible. Le mélange physique L-PMeOx/L-PiPrOx de composition variable a été comparé au précédent. De façon intéressante, le système peut également être modulé en présence de L-PMeOx, mais sur une gamme de température plus restreinte (de 34 à 44 °C). De plus, une introduction en proportion élevée en copolymère L-PMeOx (à partir de 70 %) augmente l'hétérogénéité du système. Ainsi, en plus de permettre la variation de la T_{PT} , les propriétés d'hydrophilie du système peuvent également être adaptées.

Dans le but d'obtenir des systèmes à double stimuli, le mélange physique du copolymère pH et thermo-sensible L-PDMAEMA avec le copolymère thermo-sensible L-PiPrOx a été réalisé. De nouveau, l'étude du comportement a été menée sur des mélanges de composition différente. Les micelles mixtes présentent un caractère thermo-sensible dont la température peut être modulée d'une part par la composition en L-PDMAEMA, mais aussi par un changement de pH. Ainsi, à pH 4,6, les T_{PT} observées (de 33 à 43 °C) sont légèrement supérieures à celles à pH 7,4 et 10 du fait de la protonation totale des chaînes de L-PDMAEMA. De plus, en présence de 62 % en DMAEMA, le système devient trop hydrophile et ne s'agrége plus, mais seulement à pH 4,6. Cette capacité de modulation offre à ces systèmes un fort potentiel d'utilisation pour un large panel d'application.

L'évolution de la T_{PT} des mélanges physiques précédemment étudiés à pH 7,4 est représentée Figure 21. Les trois méthodes ont permis de moduler la température de point de trouble de systèmes mixtes copolymère/L-PiPrOx. L'avantage de l'utilisation du L-PEtOx en tant que copolymère est la possibilité de faire varier plus fortement la T_{PT} . Cependant une séparation de phase a lieu au-dessus de 52 % en EtOx (non représentée sur la Figure 21). A ce pH, l'utilisation du L-PDMAEMA permet certes une variation plus faible de la température, mais il est possible de moduler finement ces T_{PT} par une simple modification de pH.

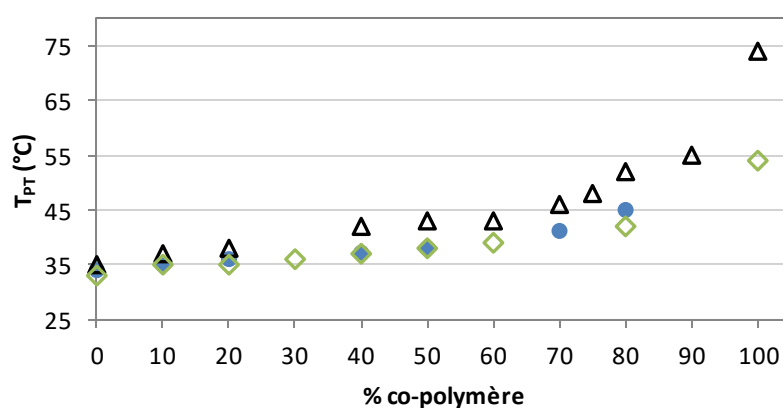


Figure 21 : Comparaison de l'évolution de la T_{PT} des mélanges physiques à pH 7,4 en fonction de la composition en copolymère L-PEtOx (Δ), L-PMeOx (●) et L-PDMAEMA (◇)

Références

- [1] L. Hespel, G. Morandi, M. Grossel, L. Lecamp, L. Picton, and F. Burel, "Synthesis of lipid-b-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) and successive study of pH- and thermo-sensitive mixed micelles by combination with lipid-b-poly(acrylic acid)," *Polym. Chem.*, vol. 5, no. 13, p. 4009, 2014.
- [2] Y. Zhuang, J. Lin, L. Wang, and L. Zhang, "Self-Assembly Behavior of AB/AC Diblock Copolymer Mixtures in Dilute Solution," *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 7, pp. 1906–1913, Feb. 2009.
- [3] D. B. Wright, J. P. Patterson, A. Pitto-Barry, A. Lu, N. Kirby, N. C. Gianneschi, C. Chassenieux, O. Colombani, and R. K. O'Reilly, "The Copolymer Blending Method: A New Approach for Targeted Assembly of Micellar Nanoparticles," *Macromolecules*, vol. 48, no. 18, pp. 6516–6522, 2015.
- [4] D. B. Wright, J. P. Patterson, N. C. Gianneschi, C. Chassenieux, O. Colombani, and R. K. O'Reilly, "Blending block copolymer micelles in solution; Obstacles of blending.," *Polym. Chem.*, vol. 7, no. 8, pp. 1577–1583, 2016.
- [5] L. Hespel, A. El Asmar, G. Morandi, L. Lecamp, L. Picton, and F. Burel, "Synthesis of Dual-Sensitive Core Cross-Linked Mixed Micelles through Thiol-Ene Addition and Subsequent Drug Release Behavior," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 218, no. 15, pp. 1–8, Aug. 2017.
- [6] X. Liu, H. Gao, F. Huang, X. Pei, Y. An, Z. Zhang, and L. Shi, "Structure change of mixed shell polymeric micelles and its interaction with bio-targets as probed by the 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) fluorescence," *Polym. (United Kingdom)*, vol. 54, no. 14, pp. 3633–3640, 2013.
- [7] X. Liu, Y. Liu, Z. Zhang, F. Huang, Q. Tao, R. Ma, Y. An, and L. Shi, "Temperature-responsive mixed-shell polymeric micelles for the refolding of thermally denatured proteins," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 19, no. 23, pp. 7437–7442, 2013.
- [8] M. Arotçaréna, B. Heise, S. Ishaya, and A. Laschewsky, "Switching the inside and the outside of aggregates of water-soluble block copolymers with double

thermoreponsivity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 14, pp. 3787–3793, 2002.

- [9] S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, and M. Amiji, "A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery," *J. Control. Release*, vol. 126, no. 3, pp. 187–204, 2008.

Chapitre V

Etude de l'encapsulation et de relargage de molécules hydrophobes

Introduction

La caractérisation des systèmes micellaires intelligents synthétisés a permis de connaître leur comportement lors d'une modification de leur environnement. L'un des intérêts grandissant pour ce type de systèmes stimuli-sensibles est la délivrance de principe actif. En effet, utilisés en tant que vecteur, ces systèmes peuvent permettre de diminuer les effets indésirables des molécules thérapeutiques et leur toxicité vis-à-vis des organes et tissus sains par exemple. L'apport de stimulus devant permettre de déclencher en temps voulu et à l'endroit souhaité la libération de la molécule active.

De précédentes études menées au sein de notre équipe ont permis d'évaluer le système pH-sensible lipide-*b*-poly(acide acrylique) (L-PAA) en termes de capacité d'encapsulation et de relargage de la benzophénone (Figure 1). Cependant, cette molécule hydrophobe possédant une solubilité dans l'eau de 136 mg/L à 25°C [1] est préférentiellement encapsulée dans la couronne des micelles plutôt que dans le cœur lipidique et son relargage est total au bout de 2 heures indépendamment des conditions appliquées.

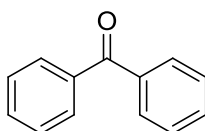


Figure 1 : Formule chimique de la benzophénone

Notre but sera donc d'étendre ces travaux sur nos systèmes en présence de molécules hydrophobes de solubilité dans l'eau plus faible.

Dans un premier temps, le système pH-sensible L-PAA sera repris comme système modèle afin de mettre en place le protocole de relargage. En effet, stable à pH 4,6, une dissociation totale des micelles a été démontrée lorsque le pH augmente à pH 10. [2] Par la suite, le système thermo-sensible L-PiPrOx ainsi que le système à double sensibilité L-PDMAEMA seront étudiés, dans le but de sonder l'impact de la nature de la couronne et les conditions externes sur les profils de relargage.

I. L'encapsulation de molécule dans les systèmes micellaires

L'encapsulation d'une substance au cœur des systèmes micellaires est une technique permettant, entre autres, la protection et la prolongation de sa circulation une fois administrée au patient. Il existe différentes méthodes d'encapsulation qui diffèrent selon les caractéristiques physico-chimiques de la molécule à encapsuler et du polymère. Dans la littérature, les quatre méthodes les plus couramment utilisées sont l'encapsulation par : [3]

- 1) **Dialyse** : La substance à encapsuler et le copolymère sont dissous dans un solvant organique (miscible à l'eau) qui sera par la suite dialysé dans l'eau. Dans ce processus, lorsque les micelles de polymères se forment, la substance est incorporée dans le cœur des micelles.
- 2) **Dissolution directe** : Le copolymère et la substance sont directement solubilisés en milieu aqueux (à une concentration supérieure à la cmc) et la solution est agitée. Lorsque les micelles se forment, la substance est simultanément encapsulée dans le cœur. Facile à mettre en œuvre, cette méthode serait dépendante de la durée d'agitation. [4]
- 3) **Réhydratation de film** : Le copolymère et la substance à encapsuler sont dissous dans un solvant organique (miscible ou non à l'eau) qui sera par la suite évaporé lentement afin de permettre la formation d'un film. Une quantité appropriée de solution aqueuse est alors ajoutée et la solution obtenue est agitée de manière à réhydrater le film et former un système auto-assemblé. Le processus de réhydratation peut cependant être long.
- 4) **Emulsion huile dans eau et évaporation**: La substance est dissoute dans un solvant organique volatil et non miscible à l'eau (généralement du dichlorométhane) puis ajoutée goutte à goutte sous agitation à une solution aqueuse micellaire. Le cœur des micelles peut alors piéger l'émulsion contenant la substance, celle-ci se retrouve encapsulée au cœur des micelles lors de l'évaporation du solvant.

L'analyse quantitative de la quantité de substance encapsulée peut être faite par spectrophotométrie, ou encore par des méthodes chromatographiques (en phase liquide ou gazeuse). La capacité d'encapsulation, correspondant à la concentration massique de la substance encapsulée par rapport à celle en copolymère, est calculée par la formule suivante :

$$\%E = \frac{\text{Concentration en substance encapsulée}}{\text{Concentration en copolymère}} \times 100$$

Différents paramètres peuvent influencer cette capacité d'encapsulation, tels que la méthode d'encapsulation, les conditions utilisées (solvant, température, agitation, concentration initiale en substance introduite ...), mais également les propriétés physico-chimiques de la molécule et du cœur. [5] En effet, l'affinité entre la molécule encapsulée et le cœur des micelles est importante de manière à assurer une bonne efficacité d'encapsulation et une meilleure stabilité du système. [6]

Pour notre étude, la Vitamine K1 (VK1) (Figure 2) a dans un premier temps été sélectionnée en tant que molécule modèle. Utilisée dans le domaine pharmaceutique pour son activité anti-hémorragique et pro-thrombogénique, [7] elle est hydrophobe et de solubilité très faible dans l'eau. Elle présente une longue chaîne alkyle semblable à la structure lipidique du cœur des micelles ce qui devrait favoriser son encapsulation.

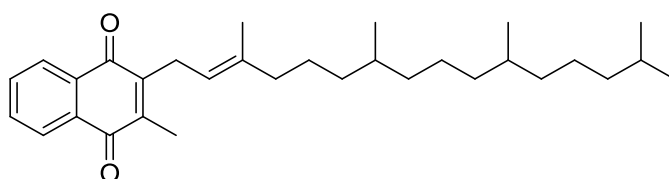


Figure 2 : Formule chimique de la Vitamine K1 (VK1)

II. Etude de l'encapsulation et du relargage de la VK1 par le système pH-sensible L-PAA

1. Capacité d'encapsulation du système

Le taux d'encapsulation de la VK1 est déterminé par HPLC. D'après le spectre UV de la molécule dans un mélange éthanol/eau (90/10 v/v), la solution absorbe à 246, 271 et 330 nm (Figure 3). Afin d'éviter toute interaction avec l'éthanol absorbant entre 200 et 275 nm, la longueur d'onde sélectionnée pour la détection de la VK1 est $\lambda = 330$ nm.

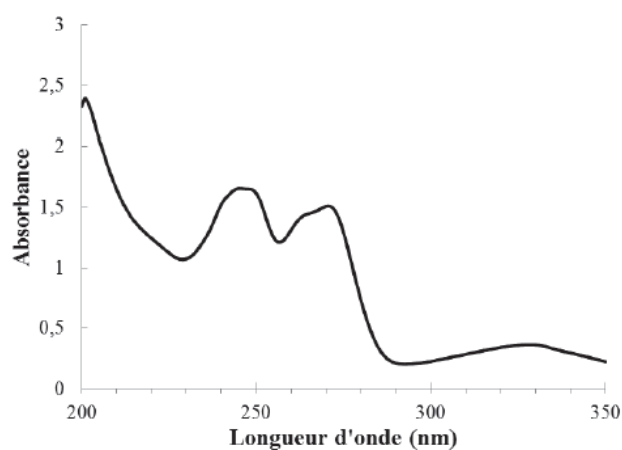


Figure 3 : Spectre UV de la VK1 dans un mélange éthanol/eau (90/10 v/v)

Afin d'effectuer l'étalonnage de l'appareil, une solution mère de VK1 est préparée dans un mélange éthanol/eau (90/10 v/v) et une gamme de concentration allant de 0,05 à 100 ppm est analysée permettant d'obtenir la droite de calibration (Figure 4).

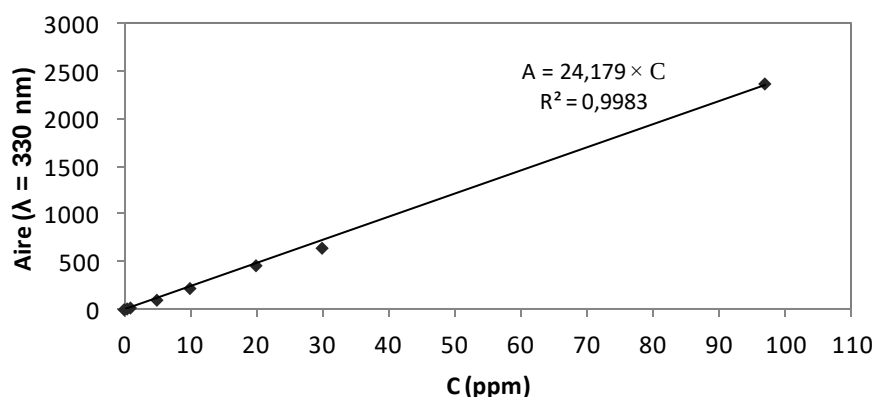


Figure 4 : Droite d'étalonnage de la VK1 à 330 nm

La préparation des micelles chargée en VK1 a été effectuée par la méthode émulsion/évaporation du fait de la simplicité de mise en œuvre du protocole (Figure 5). Une solution de VK1 dans le DCM (5,5 g/L) est introduite goutte à goutte (10% v/v) dans une solution micellaire de L-PAA (1 g/L) à pH 4,6. La solution est agitée pendant 15 h afin de permettre l'évaporation totale du solvant. Après filtration sur filtre en cellulose (0,45 µm) pour éliminer la VK1 non encapsulée, la solution est diluée dans l'éthanol (90/10 éthanol/solution analysée) puis analysée par HPLC, les micelles étant dissociées par l'éluant lors de l'analyse. Le taux d'encapsulation de VK1 calculée pour le système L-PAA est de (26 ± 7)% en masse. La littérature cite des résultats analogues d'encapsulation pour la VK3 (portant un méthyl à la place de la chaîne « terpénique ») dans des micelles PEG-PE (30% en masse). [8]

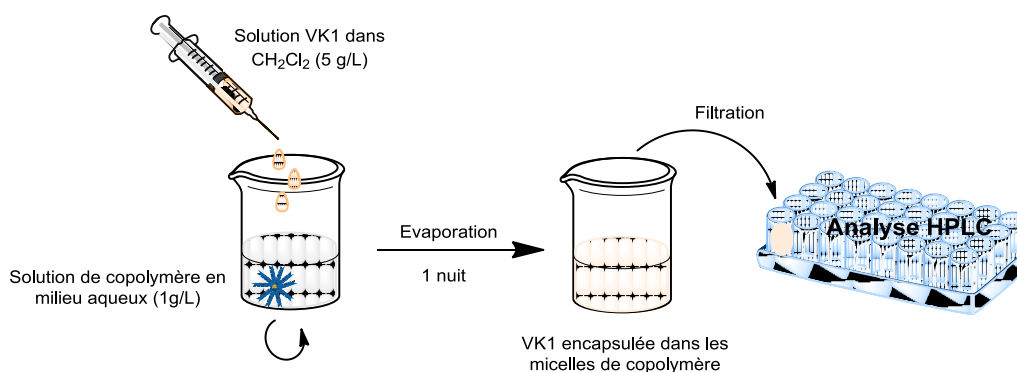


Figure 5 : Préparation des systèmes chargés en VK1 et analyse en HPLC

2. Etude du relargage

2.1. Protocole

Dans le but d'étudier le relargage de la VK1 par notre système pH-sensible, un protocole a été mis en place à travers la méthode de dialyse (Figure 6). La solution micellaire chargée en VK1 est introduite dans une membrane de dialyse (MWCO 1 kDa) fermée aux extrémités. Cette membrane est ensuite plongée dans une solution tampon (pH 4,6 ou 10) de température connue appelée milieu externe ou dialysat et sous agitation.

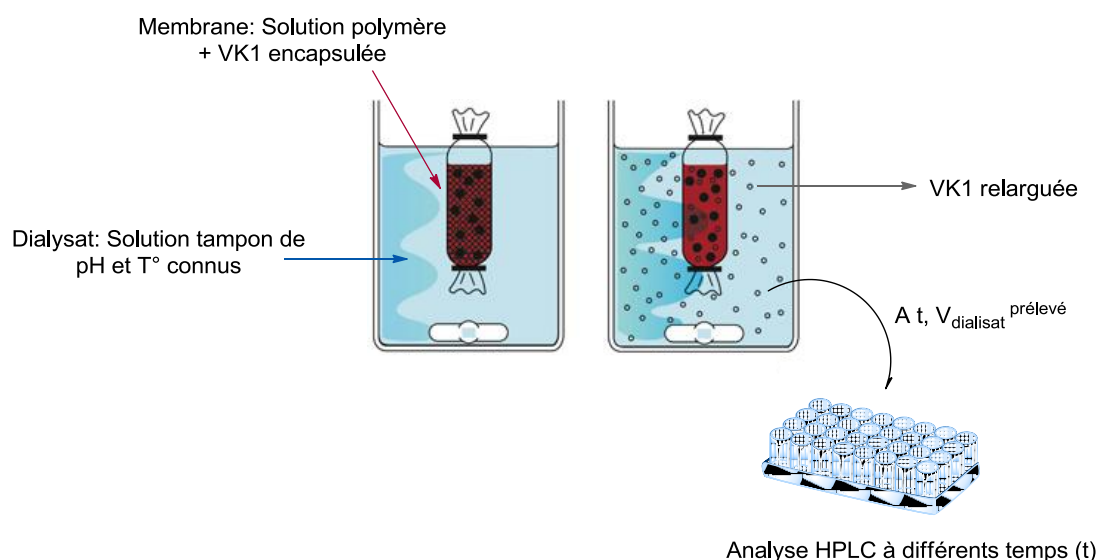


Figure 6 : Illustration du protocole utilisé pour le relargage

Généralement, les volumes de solution contenue dans la membrane et le dialysat sont choisis de manière à se trouver dans les conditions appelées « sink » permettant d'éviter la saturation du milieu externe. [9] Autrement dit, la concentration de substance dans le dialysat doit être au moins 10 fois plus faible que la solubilité de saturation de la VK1 dans le milieu. Cependant, la VK1 étant très hydrophobe, il est difficile de quantifier sa solubilité en milieu aqueux. Les conditions utilisées pour les essais de relargage ont donc été choisies comme suit : 4 mL de solution dans la membrane et 300 mL de solution tampon externe (dialysat).

Afin d'étudier la cinétique de relargage, 1 mL du dialysat est prélevé à un temps t , puis analysé en HPLC et 1 mL de solution tampon est ajouté au milieu externe afin d'éviter les variations de volume pendant l'expérience.

2.2. Cinétique de relargage en fonction du pH

Le relargage de la VK1 par les micelles de L-PAA a été réalisé dans les conditions favorables (pH 4,6, TA) et défavorables (pH 10, TA) à la stabilité du système. La Figure 7 présente les profils de relargage de la VK1 en fonction du temps.

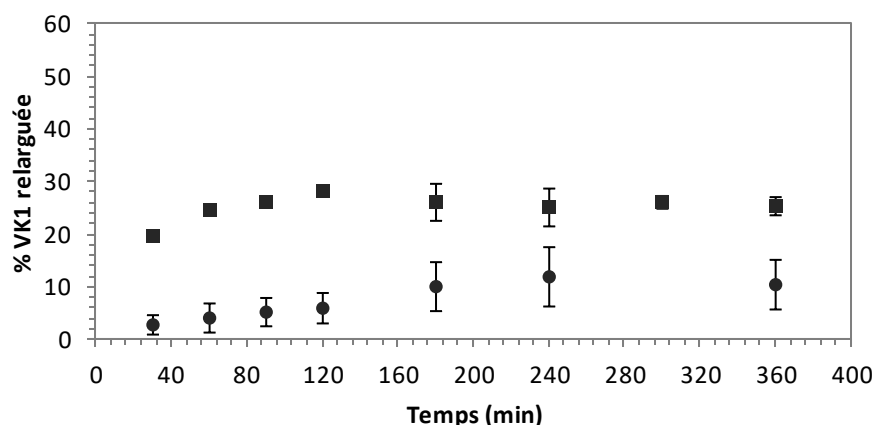


Figure 7 : Relargage de la VK1 à partir du système L-PAA à 22°C et à pH 4,6 (●) et pH 10 (■)

Le relargage de la VK1 en milieu acide est très limité et un plateau à 10% est atteint après 240 min. A ce pH le système présente une bonne stabilité et seulement une faible quantité de VK1 sort des micelles. En revanche, à pH 10, le profil obtenu représente un comportement type « burst release » puisque dès 30 min une libération instantanée a lieu, provoquée par la désorganisation des micelles. Un plateau à 30% environ est rapidement atteint et après 90 min, la VK1 ne semble plus être relarguée.

Puisque les conditions « sink » n'ont pas pu être déterminées, la limitation de ce relargage pourrait être la conséquence d'une saturation du milieu externe en VK1. Afin d'apporter une réponse à ce comportement, la membrane de dialyse a été déplacée dans une nouvelle solution

tampon pH 10 au bout de 240 min. Cependant, aucun relargage supplémentaire n'a été observé éliminant l'hypothèse d'une saturation de la phase aqueuse en VK1.

Un second paramètre qui limiterait le passage de la VK1 des micelles au dialysat pourrait être la membrane utilisée. En effet, la VK1 étant hydrophobe, elle pourrait préférentiellement rester sur les parois de la membrane au lieu d'aller dans l'eau. Cette hypothèse a été évoquée après avoir observé que lorsque les mêmes conditions de relargage sont appliquées pour un colorant hydrophobe, le Rouge de Soudan III, une coloration rouge de la membrane apparaît après 360 min (Figure 8).



Figure 8 : Photographie de la membrane après relargage du Rouge de Soudan III

L'étude réalisée sur le système L-PAA nous a permis de mettre en place une méthode d'analyse de l'encapsulation de la VK1 ainsi qu'un protocole de relargage. Ainsi, l'étude de systèmes de différentes natures a par la suite été réalisée.

III. Etude de l'encapsulation et du relargage de la VK1 par le système thermo-sensible L-PiPrOx

1. Capacité d'encapsulation du système

Le système thermo-sensible chargé en VK1 est préparé selon le même protocole que précédemment. Le taux d'encapsulation de la VK1 retrouvé dans les micelles L-PiPrOx est de $(9 \pm 3)\%$ en masse. Malgré la nature identique du cœur hydrophobe, ce résultat est très différent comparé au L-PAA ($(26 \pm 7)\%$ en masse). Néanmoins, il a été démontré que la couronne peut être un facteur déterminant dans le procédé d'encapsulation. [10] L'étude de la tension de surface du L-PiPrOx réalisée ultérieurement (cf partie expérimentale Figure A-12) ayant démontré une très bonne stabilisation de l'interface eau/air par ce copolymère, l'éventualité d'un problème de pouvoir tensio-actif lors de la stabilisation de l'émulsion initiale peut à priori être éliminée. La seule différence restante est donc bien l'aptitude du copolymère à solubiliser et retenir la VK1 dans le cœur. Les chaînes de PiPrOx étant de nature chimique différente du L-PAA, l'encombrement engendré par les groupements pendants ou encore l'existence de liaisons faibles entre les chaînes joue probablement un rôle important.

2. Cinétique de relargage en fonction de la température

Le protocole de dialyse précédemment décrit a été appliqué afin de suivre le relargage de la VK1 hors du système L-PiPrOx. Celui-ci étant thermo-sensible avec une T_{PT} 32°C à 1 g/L indépendamment du pH, le relargage a été effectué en milieu tampon pH 10, en dessous (23°C) et au-dessus (38°C) de la T_{PT} . Ce pH a été sélectionné afin de pouvoir ultérieurement étudier le relargage de système mixte L-PAA/L-PiPrOx non décrit dans ce manuscrit. [11]

Après 24h de relargage à 38°C , aucun signal correspondant à la VK1 n'apparaît en HPLC, indiquant que le système ne relargue pas. Ce comportement pourrait être dû à la formation d'agrégats hydrophobes lorsque le L-PiPrOx collapse, offrant un milieu plus favorable à la VK1 que l'eau. Ainsi, le système entrainerait la substance encapsulée lors de la précipitation

comme décrit ailleurs pour des micelles de poly(N,N-diéthyle acrylamide) emprisonnant le colorant Rouge du Nil dans les agrégats au-dessus de la LCST. [12]

De manière à améliorer la solubilité de la VK1 et donc sa diffusion des clusters hydrophobes vers le dialysat, les études de relargage ont été réalisées en présence de 10% v/v d'éthanol dans le milieu externe tel que décrit pour le relargage de l'indométacine à partir de poly(2-éthyle-2-oxazoline). [5]

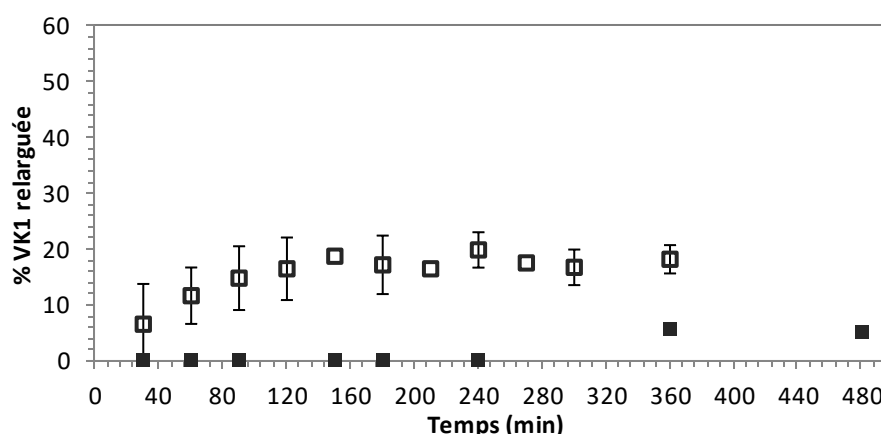


Figure 9 : Relargage de la VK1 à partir du système L-PiPrOx à pH 10 à 23°C (■) et 38°C (□) et en présence de 10% v/v d'éthanol

Dans ces conditions, en dessous de la T_{PT} , aucun relargage n'est observé jusqu'à 240 min (Figure 9). En effet, les chaînes de poly(oxazoline) sont susceptibles de former des liaisons hydrogène intermoléculaires avec l'eau, [13] augmentant la cohésion dans la couronne et donc limitant la diffusion de la VK1. Les interactions dipôle-dipôle sont également possibles et peuvent expliquer ce phénomène de cohésion. Cependant, sur des temps de relargage plus long, 5% de VK1 est libérée indiquant sa légère diffusion hors des micelles ou encore une influence du temps sur la stabilité du système encapsulé.

Au-dessus de la T_{PT} , un relargage progressif de la VK1 est observé (Figure 9). L'effet « burst » n'est pas observé ici probablement parce que contrairement au L-PAA, le système ne se dissocie pas mais collapse. La VK1 devrait ainsi traverser une épaisseur de chaînes de PiPrOx précipitées. Un plateau à 20% est rapidement atteint ce qui peut surprendre puisque dans la littérature un relargage de 100% d'indométacine a lieu pour des copolymères à base de poly(oxazolines), au-dessus de la T_{PT} et sur des temps d'analyse identiques. [5]

L'étude de la VK1 réalisée jusqu'ici a permis de démontrer l'importance de la nature de la couronne lors du processus d'encapsulation. De plus, les résultats montrent que le relargage peut être déclenché par différents stimuli selon les propriétés pH- ou thermo-sensible du système. Notons tout de même que l'ajout d'éthanol est nécessaire au relargage de la VK1 par le système thermo-sensible mais que cette méthode n'est pas très souhaitable car la structure du système peut s'en trouver modifiée. Par la suite le comportement du relargage d'un troisième système, à la fois pH- et thermo-sensible sera étudié.

IV. Etude de l'encapsulation et du relargage de la VK1 par le système double stimuli L-PDMAEMA

Le copolymère L-PDMAEMA possédant une double sensibilité au stimulus, la possibilité de contrôler le relargage de la VK1 à partir de la combinaison du pH et de la température a été étudiée. D'après le comportement précédemment décrit pour ce système (chapitre 3), l'encapsulation a été effectuée à pH 10 correspondant à un état totalement déprotoné du copolymère.

1. Capacité d'encapsulation

L'analyse HPLC des systèmes L-PDMAEMA préparés dans une solution tampon à pH 10 a permis de déterminer un taux d'encapsulation de $(69 \pm 2)\%$ en masse de VK1. Dans la littérature, des capacités de 30 % en masse de méthotrexate ont déjà été rapportées sur des systèmes cœur/couronne à base de PMMA/PNIPAM-co-PDMAEMA mais pour des copolymères de structure en étoiles. [14] Dans le cas de copolymère dibloc linéaire, cette valeur est très élevée comparée aux systèmes précédents. Il est donc possible que la VK1 soit également partiellement encapsulée dans la couronne de PDMAEMA.

2. Cinétique de relargage en fonction du pH et de la température

L'étude du système à double stimulus a été réalisée selon le même protocole que le L-PAA (sans ajout d'EtOH dans le dialysat) et quatre combinaisons de conditions ont été appliquées selon l'état du système:

- Déprotoné : pH 10 à $T = 20^{\circ}\text{C} < T_{PT}$ et $T = 52^{\circ}\text{C} > T_{PT}$
- Protoné : pH 4,6 (absence de T_{PT}) à 20°C et 52°

Rappelons que le copolymère n'est pas thermo-sensible à pH 4,6 mais possède une T_{PT} de 48°C à pH 10.

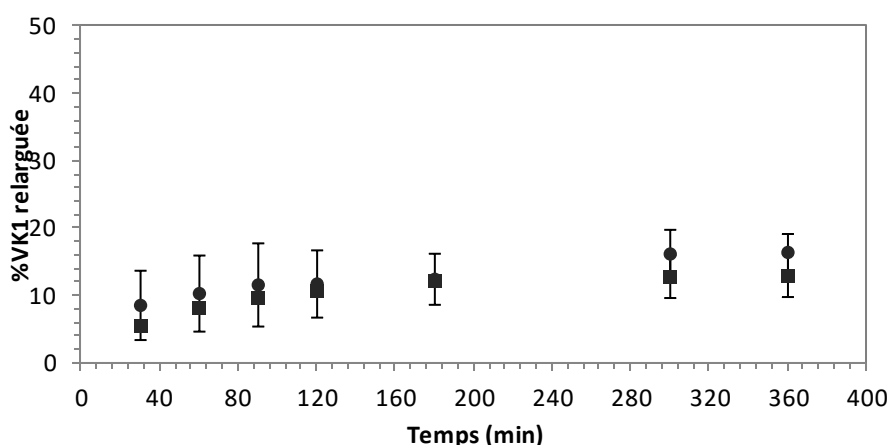


Figure 10 : Relargage de la VK1 à partir du système L-PDMAEMA à 20°C et à pH 4,6 (●) et 10 (■)

La variation de pH n'a aucun impact sur la cinétique de relargage tel qu'illustré Figure 10. Après 180 min, un plateau apparaît à 13% et 16% à pH basique et acide respectivement. Ce comportement n'est pas si surprenant puisque l'étude des propriétés physico-chimiques (Chapitre 3) a démontré la non-dissociation des micelles lors d'un changement de pH à 1 g/L. Cependant il est étonnant que la protonation de la couronne n'impacte pas plus sur la libération de la substance. Le relargage observé ici serait donc provoqué par une diffusion de la VK1 située à la fois dans le cœur mais aussi probablement dans la couronne. [10] Cette encapsulation non sélective dans le coeur pourrait de plus expliquer le taux très élevé d'encapsulation de ces systèmes.

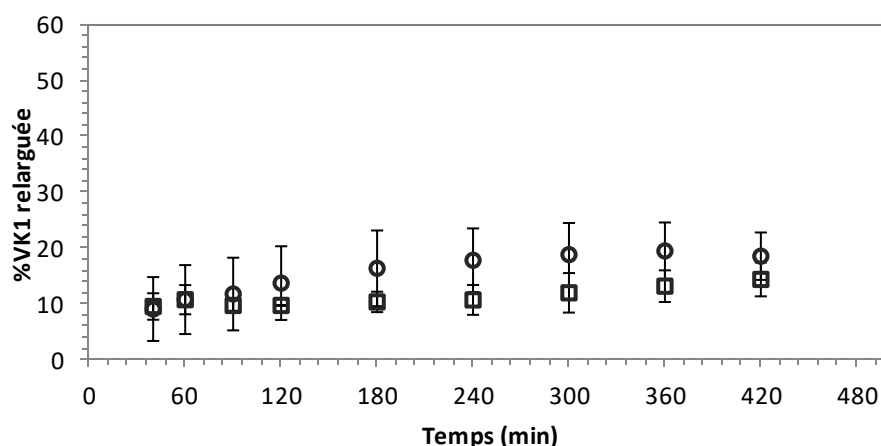


Figure 11 : Relargage de la VK1 à partir du système L-PDMAEMA à 52°C et à pH 4,6 (●) et 10 (□)

Au-dessus de la T_{PT} du L-PDMAEMA à pH 10 (Figure 11), le profil de relargage semble indépendant du pH et est semblable à celui précédemment obtenu à 20°C, avec une libération instantanée de 10 % de VK1 environ et évoluant très faiblement pour atteindre 15% au bout de 420 min. Le relargage est même sensiblement plus faible qu'en milieu acide (dans lequel le système micellaire est stable) alors que nous pouvions nous attendre à une libération plus élevée du fait de l'agrégation des micelles.. Ce comportement peut être la conséquence d'une rétention de la VK1 par la couronne devenue hydrophobe après agrégation, comme décrit pour le système L-PiPrOx. L'ajout d'éthanol dans le dialysat aurait probablement permis d'améliorer le relargage lors de l'agrégation, cependant la présence de celui-ci pouvant modifier la structure des micelles en solution nous lui avons préféré ici une seconde voie. Une autre option a donc été choisie pour étudier le phénomène se produisant à travers l'étude d'une seconde molécule (moins hydrophobe) pour le relargage du système L-PDMAEMA, la progestérone.

V. Etude de l'encapsulation et du relargage de la progestérone par le système L-PDMAEMA

La progestérone (PG) (Figure 12) est une hormone de la famille des stéroïdes utilisée dans le domaine thérapeutique chez les femmes présentant un risque de naissance prénatal [15] et également connu en tant que principe actif anti-tumoral. [16] Elle est moins hydrophobe que la VK1 et possède une solubilité dans l'eau de 8,8 ppm à 25°C. [1] Ainsi, son étude permettra de comparer l'influence de la nature de la molécule encapsulée dans le cœur lipidique de nos micelles sur la cinétique de relargage.

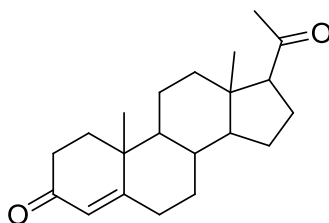


Figure 12 : Formule chimique de la Progestérone

1. Capacité d'encapsulation

Afin de calculer le taux d'encapsulation de la PG dans le système L-PDMAEMA, un étalonnage est nécessaire pour l'analyse en HPLC. La détection de la PG a été effectuée à une longueur d'onde $\lambda = 242$ nm, correspondant au maximum d'absorbance de la molécule d'après le spectre UV (Figure 13),

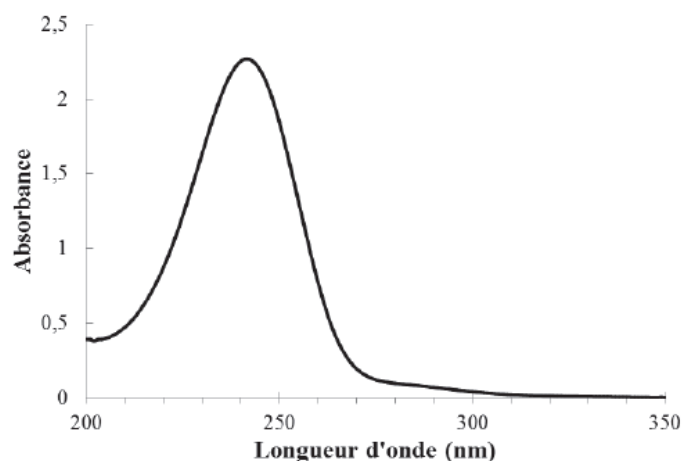


Figure 13 : Spectre UV de la progestérone dans un mélange acétonitrile/eau (65/35) à 20°C

Une solution mère de PG est préparée dans un mélange ACN/solution tampon (65/35 v/v), la solution est ensuite diluée successivement afin d'obtenir une gamme de concentration allant de 1 à 70 ppm. Le signal résultant de l'analyse à 242 nm permet de tracer la droite d'étalonnage représentée Figure 14.

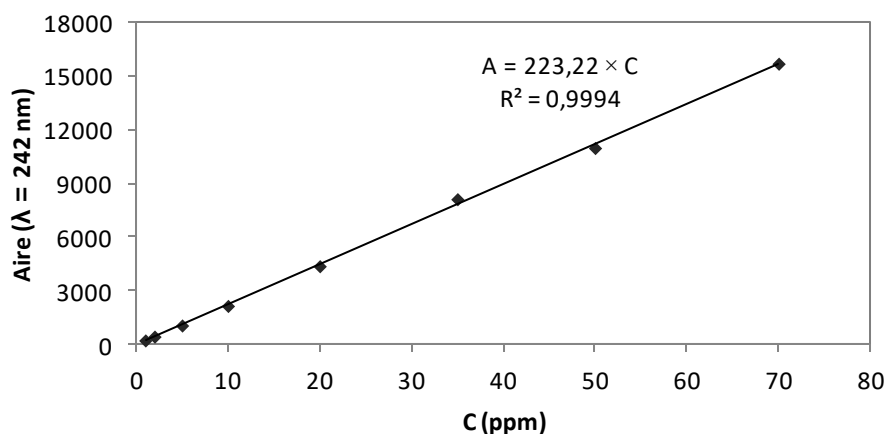


Figure 14 : Droite d'étalonnage de la PG à 242 nm

L'encapsulation réalisée par la méthode de l'émulsion/évaporation (PG solubilisée dans le DCM à 5,5 g/L et ajout à une solution micellaire à 1g/L en milieu tampon pH 10) permet d'obtenir un taux d'encapsulation de $(1,42 \pm 0,11)\%$ en masse. Un résultat similaire a été observé sur le système L-PAA lors de notre étude puis précédemment dans notre équipe. [17] Cette faible valeur serait due au manque d'affinité entre le cœur et la PG. Cependant, elle

reste cohérente avec la littérature qui indique une encapsulation du paclitaxel (Figure 15) de 1,2 % en masse dans des systèmes micellaires PE-PEG. [18], [19]

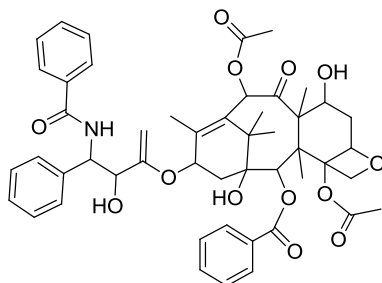


Figure 15 : Formule chimique du paclitaxel

Afin de comparer la méthode de préparation sur la capacité d'encapsulation, deux autres techniques ont été étudiées : la réhydratation de film et la dissolution directe, en gardant la masse de PG incorporée au système identique pour chaque méthode. Les résultats sont présentés dans le (Tableau 1).

Tableau 1: Résultats des taux d'encapsulation du système micellaire selon la méthode utilisée

Système	Emulsion/évaporation	Dissolution directe	Film
L-PDMAEMA	1,4 % m (14 ppm)	1,0 % m (10 ppm)	1,1 % m (11 ppm)

L'encapsulation dans le système L-PDMAEMA reste faible indépendamment de la méthode utilisée. Les résultats obtenus par dissolution directe et réhydratation de film sont très proches (1 et 1,1 % en masse) et légèrement inférieurs à celui obtenu par émulsion/évaporation. Cette dernière méthode sera donc conservée pour la suite de notre étude.

2. Cinétique de relargage

Contrairement à la VK1, les conditions « sink » ont pu être appliquées pour cette série d'expériences. Tout d'abord, la solubilité de la PG a été évaluée dans l'eau et en milieu tampon à pH 4,6 et pH 10 (+ 0,1 M NaCl) et à 22°C (Tableau 2). Expérimentalement nous observons une solubilité de 2,9 ppm dans l'eau désionisée, alors que la littérature indique une solubilité allant de 6,92 à 10,09 ppm à 20°C. [1] En solution tampon, les solubilités sont de 4,8 et 4,2 ppm pour les pH 10 et pH 4,6 respectivement. A titre de comparaison, la méthode par dissolution directe a été appliquée et une solubilité plus élevée est obtenue dans ce cas pour l'eau désionisée uniquement (4,6 ppm contre 2,9 ppm). Cette variation peut être due au fait que lors de l'ajout de la solution organique de PG dans l'eau, des gouttelettes de dichlorométhane restent sur les parois du bécher limitant l'homogénéité de l'émulsion.

Tableau 2 : Résultats des taux de solubilité en solution aqueuse selon la méthode utilisée

Système	Emulsion/évaporation	Dissolution directe
H ₂ O	2,9 ppm	4,6 ppm
Tampon pH 10	4,8 ppm	4,8 ppm
Tampon pH 4,6	4,2 ppm	3,8 ppm

Les conditions pour le relargage ont donc été choisies en prenant en compte la solubilité de la PG dans les solutions tampons. La membrane contenant un volume de 2,5 mL de solution de L-PDMAEMA chargé en PG ($C_{PG} = 14$ mg/L soit 0,035 mg environ dans les 2,5 mL) est plongée dans une solution tampon (pH 4,6 ou 10) de 200 mL. Ces conditions assurent que la concentration en PG dans le dialysat sera toujours au moins 10 fois inférieure à sa solubilité maximale permettant ainsi un relargage optimal.

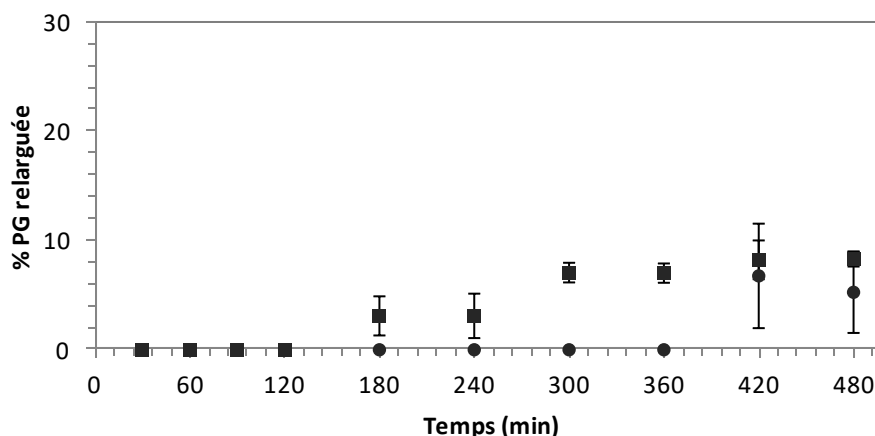


Figure 16 : Relargage de la progestérone à partir du système L-PDMAEMA à 22°C et à pH 4,6 (●) et 10 (■)

Le relargage de la PG a dans un premier temps été effectué à deux différents pH (4,6 et 10) correspondant à une protonation totale ou nulle de la couronne et en dessous de la T_{PT} (Figure 16). A pH 4,6, le relargage ne débute qu'après 360 min mais reste faible (7 %) sur la durée d'expérimentation. Rappelons que pour chacune de ces conditions, les analyses par fluorescence et DLS montrent que le système ne subit pas de désorganisation (cf. Chapitre 3, II). Ainsi à ce pH, la couronne protonée et donc plus hydrophile, semble causer un effet barrière à la diffusion de la PG..

A pH 10, la présence de progestérone dans le milieu est détectée dès 180 min, avec un plateau à 7% à partir de 300 min. En effet, une diffusion de la PG est ici possible lorsque les chaînes de PDMAEMA ne sont pas protonées tel qu'observé dans la littérature sur le système PMMA-*b*-poly(NIPAAm-co-DMAEMA) à pH 9 et 25°C. [14]

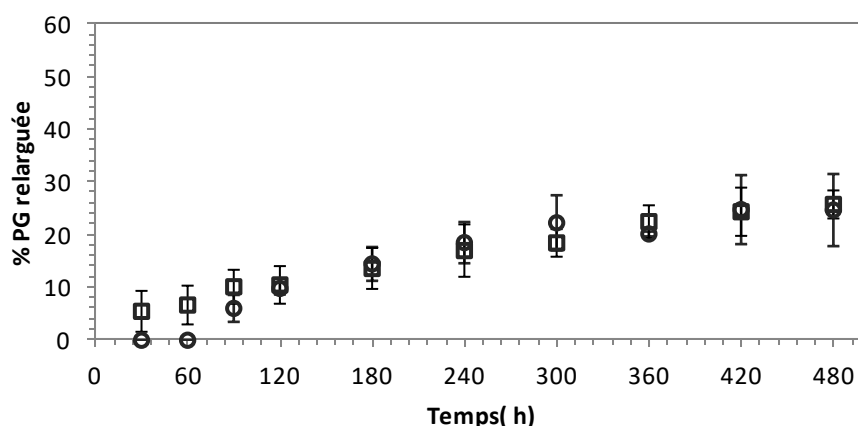


Figure 17 : Relargage de la Progestérone à partir du système L-PDMAEMA à 52°C et à pH 4,6 (○) et pH 10 (□)

A pH 10, au-dessus de la T_{PT} (48°C), la libération de la PG se produit dès l'agréation du système (Figure 14). L'évolution est progressive tout le long du relargage jusqu'à atteindre 25%. Contrairement au pH 4,6, le relargage débute dès 30 min. Ce comportement est ici attribué à la modification de la structure des micelles. Les chaînes de PDMAEMA étant collapsées, le relargage de la PG vers le milieu aqueux plus favorable à sa solubilisation est provoqué

A pH 4,6, le L-PDMAEMA ne présente pas de caractère thermo-sensible. Néanmoins, l'étude à 52°C montre, après un temps de latence de 60 min, une évolution progressive du profil de relargage (Figure 17). Au-delà de 120 min, le relargage est identique à celui à pH 10 avec une libération de 25% de PG au bout de 480 min. A cette température d'étude et en milieu acide, certes le système ne s'agrége pas, mais la solubilité de la PG dans l'eau est augmentée tel qu'indiquée dans la littérature (10,09 ppm à 20°C et 15,50 ppm à 50°C) [1] aidant ainsi la diffusion de la PG vers le milieu externe.

Dans le but d'expliquer le plateau final obtenu (inférieur à 30 % de relargage de la quantité encapsulée), la solution à pH 4,6 de L-PDMAEMA/PG contenue dans la membrane de dialyse a été analysée par HPLC en fin de relargage à 52°C afin de quantifier la progestérone non libérée. Celle-ci devrait théoriquement correspondre à :

$$(\% \text{ massique})PG_{\text{membrane}} = (\% \text{ massique})PG_{\text{initiale}} - (\% \text{ massique})PG_{\text{relarguée}}$$

Or expérimentalement, la proportion de PG retrouvée dans la membrane correspond à 1,5% de la masse initiale. Donc à priori, la quasi-totalité de la PG (98,5% environ) aurait été relarguée des micelles, cependant, seulement 25% sont retrouvées dans le dialysat. Ceci nous amène de nouveau à penser qu'une grande partie de la molécule reste adsorbée sur la membrane de dialyse lors du relargage, celle-ci agissant comme barrière.

En comparaison à la VK1, dont la libération était plus élevée et indépendante des conditions utilisées, le relargage de la PG varie en fonction de la température appliquée mais la modification du pH a très peu d'influence (Figure 18). Contrairement au comportement escompté, l'agrégation de la couronne ne conduit pas à un relargage plus marqué de la PG.

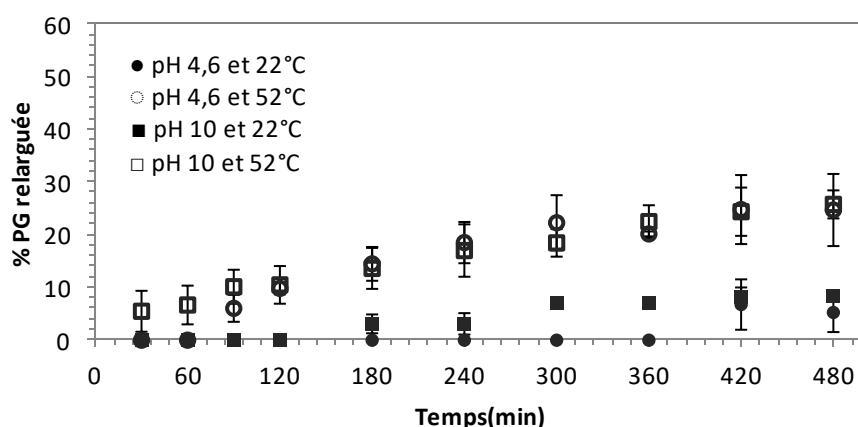


Figure 18 : Récapitulatif du relargage de la Progestérone par le système L-PDMAEMA

Conclusion

Dans ce chapitre, l'encapsulation de molécules hydrophobes a été effectuée sur les systèmes micellaires lipide-*b*-poly(acide acrylique) (L-PAA), lipide-*b*-poly(2-isopropyle-2-oxazoline) (L-PiPrOx) et lipide-*b*-poly(méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (L-PDMAEMA). Pour cela, la vitamine K1 (VK1) et la progestérone (PG) ont été sélectionnées et leur libération a été étudiée en fonction du stimulus appliqué.

Dans un premier temps, l'étude a permis de démontrer la capacité de solubilisation de la VK1, initialement peu soluble dans l'eau, à travers son encapsulation dans le cœur lipidique des micelles. Des taux d'encapsulation de l'ordre de $(26 \pm 7)\%$ et $(9 \pm 3)\%$ pour le système L-PAA et L-PiPrOx respectivement ont été obtenus. De plus, la possibilité de déclencher le relargage par simple variation du pH ou de la température a été observée sur ces deux systèmes. Ainsi 30% de VK1 peut être libérée en milieu aqueux à pH 10 pour le L-PAA. Quant au L-PiPrOx, une température supérieure à la T_{PT} permet le relargage de la VK1 jusqu'à 20% mais la présence d'éthanol dans le milieu de relargage est nécessaire dans ce cas.

En revanche pour le système L-PDMAEMA encapsulant $(69 \pm 2)\%$ de VK1, les profils de relargage sont identiques indépendamment des conditions de pH ou de température appliquées. Au vu de ces résultats, la question de la localisation de la molécule encapsulée dans les systèmes mais également de la stabilité de l'encapsulation est soulevée.

Par la suite, l'encapsulation et le relargage d'une seconde molécule active hydrophobe, la progestérone (PG) ont été étudiés sur ce système. Comparée à la VK1, une capacité d'encapsulation plus faible $(1,42 \pm 0,11)\%$ a été obtenue pour cette molécule. Du fait de la non-dissociation des micelles, la variation de pH n'influe que très peu sur le profil de relargage à 22°C. Cependant à 52°C, une libération progressive en fonction du temps est observée pour les deux pH. Et bien que le système ne présente pas de T_{PT} à pH 4,6, les profils de relargage sont très similaires. Notre étude soulève cependant des interrogations quant au piégeage d'une grande partie des substances libérées par les membranes et de ce fait de la représentativité de l'analyse du dialysat. Une amélioration des protocoles semble donc souhaitable afin de tirer des conclusions définitives sur ces systèmes.

Par ailleurs, l'utilisation de copolymères agrégatifs pour l'encapsulation et le relargage de substances hydrophobes semble soumise à un choix judicieux non seulement des affinités

cœur/substance mais également couronne agrégée/substance afin que la substance diffuse préférentiellement dans le milieu extérieur après agrégation plutôt que de rester piégée dans les agrégats formés.

Références

- [1] S. Yalkowsky, Y. He, and P. Jain, *Handbook of Aqueous Solubility Data, Second Edition*. CRC Press, 2010.
- [2] L. Hespel, E. Kaifas, L. Lecamp, L. Picton, G. Morandi, and F. Burel, "Synthesis of pH-sensitive micelles from linseed oil using atom transfer radical polymerisation (ATRP)," *Polymer (Guildf)*, vol. 53, no. 20, pp. 4344–4352, 2012.
- [3] R. Satchi-Fainaro and R. Duncan, Eds., *Polymer Therapeutics II*, vol. 193. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.
- [4] L. Yang, X. Wu, F. Liu, Y. Duan, and S. Li, "Novel biodegradable polylactide/poly(ethylene glycol) micelles prepared by direct dissolution method for controlled delivery of anticancer drugs," *Pharm. Res.*, vol. 26, no. 10, pp. 2332–2342, 2009.
- [5] L. Q. Chen, L. M. Zhang, J. J. Chen, J. Yang, and R. X. Li, "Self-assembly and drug delivery behaviors of a novel thermo-sensitive block glycopolymer," *Chinese Sci. Bull.*, vol. 55, no. 36, pp. 4187–4196, 2010.
- [6] J. E. Chung, M. Yokoyama, and T. Okano, "Inner core segment design for drug delivery control of thermo-responsive polymeric micelles," *J. Control. Release*, vol. 65, no. 1–2, pp. 93–103, 2000.
- [7] "National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database". Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4812>. [Accessed: 21-Aug-2017].
- [8] A. N. Lukyanov and V. P. Torchilin, "Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 9, pp. 1273–1289, 2004.
- [9] T. Musacchio, "Recent developments in lipid-based pharmaceutical nanocarriers," *Front. Biosci.*, vol. 16, no. 1, p. 1388, 2011.
- [10] V. P. Torchilin, "Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems," *J. Control. Release*, vol. 73, no. 2–3, pp. 137–172, 2001.
- [11] L. Hespel, A. El Asmar, G. Morandi, L. Lecamp, L. Picton, and F. Burel, "Synthesis of Dual-Sensitive Core Cross-Linked Mixed Micelles through Thiol-Ene Addition and Subsequent Drug Release Behavior," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 218, no. 15, pp. 1–8, Aug. 2017.

- [12] E. Blasco, B. V. K. J. Schmidt, C. Barner-Kowollik, M. Piñol, and L. Oriol, "Dual thermo- and photo-responsive micelles based on miktoarm star polymers," *Polym. Chem.*, vol. 4, no. 16, p. 4506, 2013.
- [13] G.-H. Hsiue, C.-H. Wang, C.-L. Lo, C.-H. Wang, J.-P. Li, and J.-L. Yang, "Environmental-sensitive micelles based on poly(2-ethyl-2-oxazoline)-b-poly(L-lactide) diblock copolymer for application in drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 317, no. 1, pp. 69–75, Jul. 2006.
- [14] Y. Liu, X. Cao, M. Luo, Z. Le, and W. Xu, "Self-assembled micellar nanoparticles of a novel star copolymer for thermo and pH dual-responsive drug release," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 329, no. 2, pp. 244–252, Jan. 2009.
- [15] E. B. da Fonseca, R. E. Bittar, M. H. B. Carvalho, and M. Zugaib, "Prophylactic administration of progesterone by vaginal suppository to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women at increased risk: A randomized placebo-controlled double-blind study," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 188, no. 2, pp. 419–424, Feb. 2003.
- [16] B. Luppi, F. Bigucci, T. Cerchiara, V. Andrisano, V. Pucci, R. Mandrioli, and V. Zecchi, "Micelles Based on Polyvinyl Alcohol Substituted with Oleic Acid for Targeting of Lipophilic Drugs," *Drug Deliv.*, vol. 12, no. 1, pp. 21–26, 2004.
- [17] L. Hespel, "Présentée par Spécialité : Chimie macromoléculaire," 2013.
- [18] G. Gaucher, P. Satturwar, M.-C. Jones, A. Furtos, and J.-C. Leroux, "Polymeric micelles for oral drug delivery," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 76, no. 2, pp. 147–158, Oct. 2010.
- [19] V. Torchilin, "Lipid-Core Micelles for Targeted Drug Delivery," *Curr. Drug Deliv.*, vol. 2, no. 4, pp. 319–327, Oct. 2005.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail de thèse était la synthèse de micelles de polymères stimuli-sensibles en vue d'une éventuelle utilisation en tant que système de vectorisation. Dans ce but, la synthèse de copolymères amphiphiles, composés d'un bloc hydrophobe et d'un second hydrophile pH- et/ou thermo-sensible, et d'architecture contrôlée a été réalisée. Le bloc hydrophobe est constitué d'une chaîne lipidique issue de l'huile de lin, valorisant ainsi la biomasse. Hétérogène en composition, sa modification chimique, donnant lieu à un mélange de chaînes d'alcool gras, a néanmoins permis la synthèse d'amorceur (lipoamorceur) et d'un agent de transfert de chaîne (LCTA) originaux (Schéma 1).

Afin d'effectuer la synthèse de copolymères thermo-sensibles à base d'oxazolines par polymérisation par CROP, deux lipoamorceurs ont été comparés lors d'une étude préliminaire. Les lipoamorceurs tosylé (LTs) et mésylé (LMs) ont été engagés dans la polymérisation par voie thermique d'un monomère non thermo-sensible, la 2-méthyle-2-oxazoline. Sa meilleure efficacité, son temps de latence plus faible et sa vitesse de propagation plus élevée ont permis de sélectionner le LTs pour la suite de notre étude. Ainsi, les copolymères amphiphiles thermo-sensibles, lipide-*b*-poly(2-isopropyle-2-oxazoline) (L-PiPrOx) et lipide-*b*-poly(2-éthyle-2-oxazoline) (L-PEtOx) de faibles dispersités ont été obtenus par polymérisation par CROP assistée par micro-onde. Cette dernière donne accès à des structures contrôlées sur des temps de réaction très courts comparés à la voie thermique (quelques minutes contre plusieurs heures). Afin de moduler les propriétés thermo-sensibles de poly(oxazoline)s, la copolymérisation de l'iPrOx avec l'EtOx a été réalisée. Celle-ci a permis l'accès à une gamme de copolymères lipide-*b*-poly((2-éthyle-2-oxazoline)-*co*-(2-isopropyle-2-oxazoline)) (L-P(EtOx-*co*-iPrOx)) de proportion variable en EtOx (21, 42 et 75% en EtOx).

L'étude du comportement en milieu aqueux des copolymères a ensuite été menée. L'association sous forme micellaire est confirmée par les mesures par fluorescence et DLS. Des objets de 10 nm formés d'un cœur lipidique et d'une couronne hydrophile et des cmc faibles de l'ordre de 10^{-6} mol/L ont été obtenus. Les analyses par spectrophotométries démontrent un comportement de type LCST pour chacun des copolymères. Comme attendu, la température de point de trouble (T_{PT}) obtenue pour le L-PiPrOx est inférieure à celle du L-PEtOx du fait de la présence du groupement isopropyle. De plus, l'introduction d'une chaîne lipidique en extrémité du polymère diminue les températures d'agrégation par rapport aux homopolymères correspondants. L'évaluation de l'influence du co-monomère EtOx sur les

propriétés thermo-sensibles des copolymères L-P(EtOx-co-*i*PrOx) démontre l'efficacité de la modulation de la T_{PT} permettant ainsi de faire varier le champ d'application de ces copolymères (Schéma 1).

L'étude de la synthèse d'un copolymère pH-sensible a été menée à travers l'utilisation de la polymérisation par RAFT. Dans ce but, un nouvel agent de transfert de chaînes à base lipidique a été synthétisé (LCTA) selon des conditions douces. Après une mise au point des conditions optimales de polymérisation à partir d'un CTA commercial, l'utilisation du LCTA a donné accès à des copolymères amphiphiles lipide-*b*-(méthacrylate de diméthylaminoéthyle)s (L-PDMAEMA) d'architecture et de masse contrôlées.

L'étude physico-chimique d'un L-PDMAEMA de $\overline{M}_n = 4100$ g/mol en milieu aqueux tamponné et à différents pH a notamment permis de sonder le comportement d'association en fonction de la protonation/déprotonation des motifs PDMAEMA. Si les mesures en fluorescence démontrent bien un impact du pH sur la cmc (qui passe de 0,070 g/L à 0,380 g/L pour une transition de pH entre 10 et 4,6), les mesures par DLS montrent la présence d'objets de taille compatibles avec des micelles même en dessous des cmc mesurées. Ainsi, malgré l'augmentation de l'hydrophilie du copolymère suite à sa protonation ($pH < pK_a$), le système ne se dissocie *a priori* pas et le L-PDMAEMA semble conserver de bonnes propriétés d'association et de stabilisation indépendamment de l'ionisation du système.

Ce système a suscité un double intérêt puisque le copolymère présente également des propriétés thermo-sensibles. L'étude de l'influence du pH sur ces propriétés a donc été menée. Lors d'une diminution de pH, la formation de liaisons hydrogène entre le copolymère et l'eau est favorisée du fait de la protonation des motifs PDMAEMA, conduisant à une augmentation de la température de point de trouble.

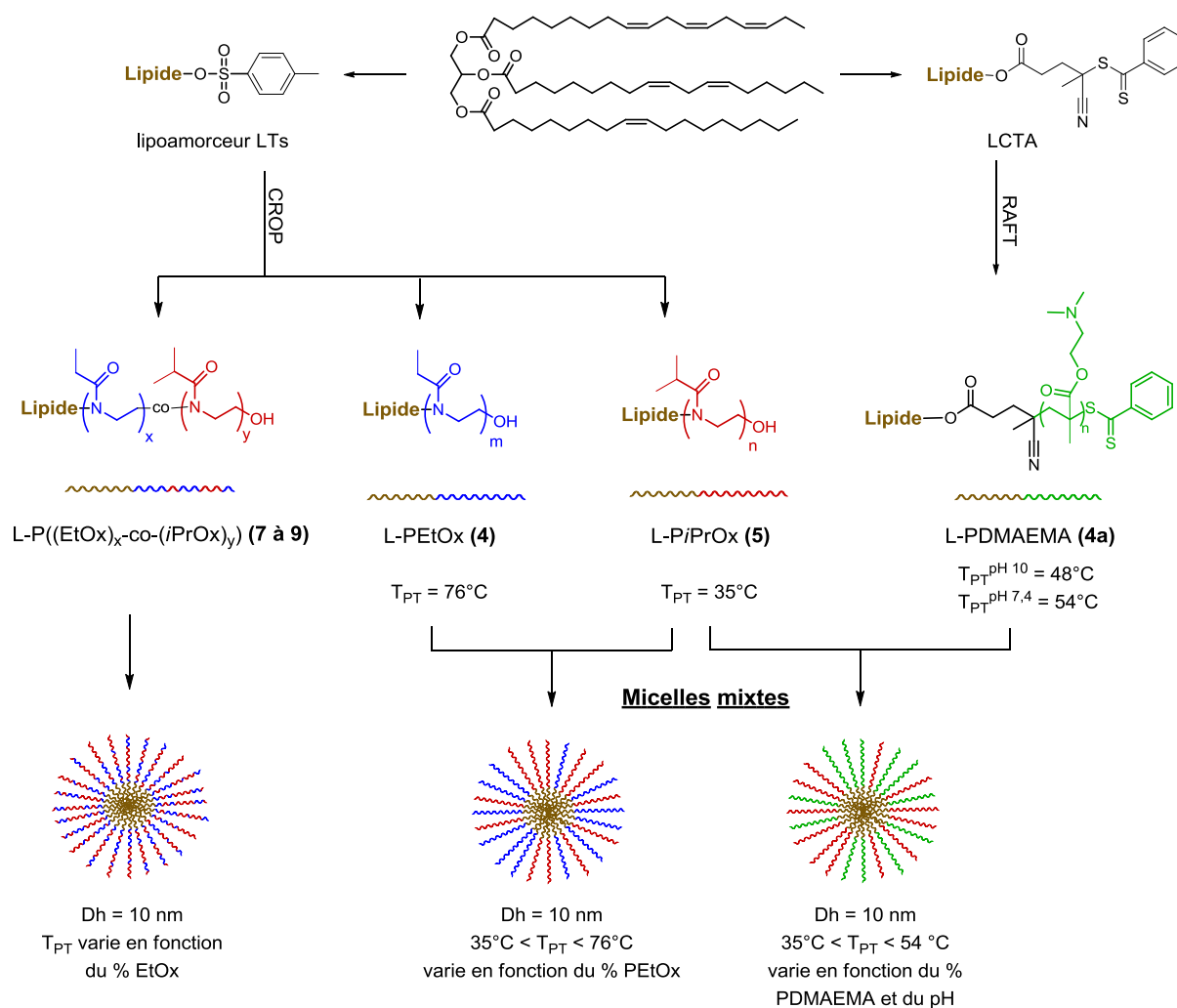


Schéma 1 : Bilan des copolymères amphiphiles et des principales structures micellaires étudiées.

L'étude de la modulation des propriétés des systèmes thermosensibles L-PEtOx et à double stimuli L-PDMAEMA a également été effectuée à travers une approche novatrice basée sur le mélange physique de copolymères (Schéma 1). La possibilité de faire varier la température de point de trouble des systèmes mixtes L-PEtOx/L-PiPrOx en fonction de la proportion en L-PEtOx a été démontrée. De façon très intéressante, en présence d'une faible à moyenne proportion en L-PEtOx (inférieure à 52 %), les T_{PT} sont comparables à celle des copolymères L-P(EtOx-co-iPrOx) de même composition. Ceci démontre toute la potentialité de cette approche pour moduler les propriétés des systèmes micellaires via la composition globale de la couronne plutôt que par l'ajustement de la composition de chaque chaîne hydrophile. Au-delà d'un seuil en L-PEtOx (supérieur à 52 %), un second phénomène

d'agrégation est détecté à la T_{PT} du L-PEtOx sans qu'il ait pu être déterminé jusqu'à présent s'il s'agit d'une démixtion initiale ou provoquée par l'élévation de la température.

Le mélange physique entre le L-PiPrOx et le L-PMeOx en proportion variable permet également de moduler la T_{PT} des micelles mixtes mais au-delà de 70 % en L-PMeOx, cette évolution n'est plus linéaire.

De la même manière, le mélange physique de copolymères de nature différente *i.e.* L-PDMAEMA/L-PiPrOx conduit à un système mixte. Dans ce cas, la température d'agrégation peut être modulée par la composition en L-PDMAEMA mais aussi par une variation de pH. A pH 4,6 cette modulation qui s'étend de 33 °C à 43 °C est plus marquée qu'à pH 7,4 et pH 10. De plus, le système mixte peut être stabilisé en présence d'une forte proportion en L-PDMAEMA puisqu'à 62% le système devient trop hydrophile et ne s'agrége plus. Cette approche formulatoire permet de faire varier de façon précise les propriétés stimuli-sensibles en évitant des synthèses plus complexes de terpolymères par exemple.

Enfin, dans le but d'étudier les systèmes stimuli-sensibles en tant que vecteur de principe actif, l'encapsulation et le relargage de molécules hydrophobes ont été étudiés sur les systèmes. Le protocole de relargage a dans un premier temps été mis en place à partir du système pH-sensible L-PAA puis appliqué aux systèmes L-PiPrOx et L-PDMAEMA. Pour cela, la vitamine K1 (VK1) a été sélectionnée comme modèle du fait de sa structure chimique proche de la nature du cœur des micelles et des taux d'encapsulation satisfaisants ont été obtenus (de 6 à 26 % m). Pour le système thermo-sensible L-PiPrOx un relargage contrôlé par la température a été observé. En revanche, les profils de relargage de la VK1 pour le L-PDMAEMA sont indépendants des conditions appliquées. Ces derniers résultats ont mené à l'étude d'une seconde molécule moins hydrophobe, la progestérone (PG). Une encapsulation efficace de la molécule (1,4 % en masse) par le système est démontrée. Si le pH n'a que très peu d'effet sur la cinétique de relargage, le système L-PDMAEMA est capable de relarguer la PG de manière progressive lorsqu'une température supérieure à la T_{PT} du copolymère à pH 10 est appliquée.

Suite aux différents résultats obtenus au cours de ce travail, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. En effet, face aux difficultés de caractérisation des

micelles mixtes, dont l'existence est en général démontrée de façon indirecte via l'étude des propriétés plutôt que par des analyses directes, une approche originale basée sur le phénomène de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) sera envisagée. Pour cela, l'introduction de fluorophore (un donneur et un accepteur (d'énergie)) sur les chaînes lipidiques de chacun des copolymères pourrait permettre d'analyser les interactions dans le cœur hydrophobe. Lors de la formation de micelles mixte, du fait de la proximité spatiale de ces deux molécules dans le cœur, l'excitation lumineuse du donneur devrait conduire à un transfert d'énergie vers l'accepteur et à l'émission d'une longueur d'onde caractéristique de celui-ci. Ainsi il serait possible de démontrer beaucoup plus simplement, via l'accrochage de fluorophores, la formation de micelles mixtes et peut être de quantifier leur ratio par rapport à d'éventuelles micelles « pures ».

Il serait également intéressant de poursuivre les essais de relargage et d'encapsulation sur le système L-PDMAEMA mais également d'en faire l'étude sur les systèmes mixtes stimuli-sensibles afin d'étudier si l'ajustement fin des T_{PT} se répercute sur un contrôle précis de la température de relargage. La progestérone semblant être un bon candidat, des études de stabilité d'encapsulation dans le temps devront par ailleurs être effectuées.

Ensuite, de nouvelles natures de blocs hydrophiles pourraient être envisagées afin d'étudier le mélange physique de copolymère de natures chimiques très différentes (poly(styrène sulfoné), PEG) et ainsi d'approfondir l'approche de mixité.

Les polymérisations utilisées donnant lieu à des polymères fonctionnels, leurs extrémités pourraient être modifiées afin de décorer la surface des micelles par des molécules cibles telles que l'acide folique par exemple. En effet, le récepteur folate, surexprimé par un grand nombre de cellules cancéreuses est quasi absent sur les cellules saines. Pour ce faire, à l'issue de la CROP, une réaction de couplage pourrait être réalisée entre l'acide folique et l'hydroxyle présent à l'extrémité des copolymères L-POx. L'approche de mélange physique des copolymères serait ensuite particulièrement intéressante pour exprimer la concentration optimale de molécules cibles à la surface.

Partie expérimentale

I. Produits utilisés

1. Solvants

Le tétrahydrofurane anhydre (THF), l'éther diéthylique anhydre (Et₂O), le dichlorométhane anhydre (DCM), le chloroforme anhydre (CHCl₃), l'acétonitrile anhydre (CH₃CN), le toluène anhydre et le diméthylformamide anhydre (DMF) proviennent de VWR et ont été utilisés sans purification préalable.

Le méthanol (VWR, 99%), l'acétonitrile (VWR, 99%), le cyclohexane (VWR, 99%), l'acétate d'éthyle (VWR, 99,9%), l'éthanol (VWR, 99%), la N-méthyl-pyrrolidone (NMP) (VWR, 99%), et le solvant deutéré CDCl₃ (Acros, 99,9%) sont commerciaux et utilisés sans purification préalable.

2. Réactifs pour les synthèses des lipoamorceurs de CROP

L'huile de lin fournie par Novance a été utilisée sans aucune purification préalable. Le chlorure de mésyle (98%), le chlorure de tosyle (99%) et la N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) proviennent de Sigma Aldrich. L'Aluminohydru de lithium (LiAlH₄) et la 4-((diméthylamino)pyridine) (DMAP) sont fournis par Acros, la triéthylamine (Et₃N) par VWR.

3. Réactifs pour la synthèse du lipoamorceur d'ATRP

L'Aluminohydru de lithium (LiAlH₄) est fourni par Acros et le 2-bromo-2-méthylpropionyl bromide par Alfa-Aesar.

4. Réactifs pour la synthèse du L-CTA de la RAFT

L'Aluminohydru de lithium (LiAlH₄) et la 4-((diméthylamino)pyridine) (DMAP) sont fournis par Acros. La N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et le 4-Cyano-4-(thiobenzoylthio)pentanoic acid (CTA) proviennent de Sigma Aldrich.

5. Réactif pour la polymérisation CROP

Le 2-méthyl-2-oxazoline (MeOx, >98%, TCI), le 2-éthyl-2-oxazoline (EtOx, >99%, Sigma Aldrich), le 2-isopropyl-2-oxazoline (iPrOx, >97%, TCI) ainsi que le méthyle p-toluène sulfonate (98%, Sigma Aldrich) sont des produits commerciaux utilisés sans purification préalable.

6. Réactifs pour la polymérisation par ATRP

Le monomère méthacrylate de diméthyl(aminoéthyle) (DMAEMA, 99%, Acros) a été passé à travers une colonne d'alumine (Acros, 50-200 μ m) avant utilisation. Le ligand 1,1,4,7,10,10-Hexaméthyltriéthylènetetramine (HMTETA, 99%, Alfa Aesar) et le catalyseur Bromure de cuivre (I) (CuBr, 99,999%, Sigma Aldrich) sont des produits commerciaux utilisés tels quels.

7. Réactifs pour la polymérisation par RAFT

Le méthacrylate de diméthyl(aminoéthyle) (DMAEMA, 99%, Acros) et le méthacrylate de tertbutyl(aminoéthyle) (tBAEMA, 97%, Sigma Aldrich) sont des produits commerciaux et ont été passés à travers une colonne d'alumine avant utilisation. Le 2,2'-azobis(2-méthylpropionitrile) (AIBN, 98%) et le 4-cyano-4-(thiobenzoylthio)pentanoic acid (CTA) proviennent de Sigma Aldrich et ont été utilisés sans purification préalable.

8. Autres réactifs

Les produits suivants sont commerciaux et ont été utilisés sans purification préalable : l'acétone, le LiCl, l'acide chlorhydrique (Acros, 37 %), l'hydrogénocarbonate de sodium, le chlorure de sodium, l'acide acétique anhydre, l'acétate de sodium, l'hydrogénophosphate de sodium, le dihydrogénophosphate de sodium, l'hydroxyde de potassium, le sulfate de magnésium, l'éthylène glycol dithioacétate, le rouge de soudan, la vitamine K1, la progesterone, et le SDS (Aldrich, > 99 %).

II. Méthodes d'analyses

1. Chromatographie sur colonne

Les purifications par chromatographie sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merk (0,063-200 mm) et suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque Merck de gel de silice 60 F254 prête à l'emploi. La révélation a été effectuée soit à l'aide d'une lampe UV, soit par une solution d'acide sulfurique à 10%.

2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ^1H (300 MHz) et du carbone ^{13}C (75 MHz) ont été enregistrés sur des appareils Bruker. Les déplacements chimiques (δ) 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).

3. Spectroscopie Infra Rouge (IR)

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés dans la région $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ avec un spectromètre Perkin Elmer Spectrum 2000 FTIR équipé d'un diamant en mode ATR (Attenuated Total Reflection). 16 scans ont été effectués pour chaque analyse. Les absorptions reportées sont exprimées en nombre d'ondes (cm^{-1}).

4. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Les masses molaires et les dispersités ont été mesurées par SEC sur un appareil Spectra-Physics pour les copolymères thermo-sensibles et sur un appareil Varian PL-GPC50 Plus pour les copolymères pH-sensibles. Dans chaque cas, les échantillons sont préalablement filtrés sur des filtres de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ et l'étalonnage est assuré par des standards PMMA.

Parties expérimentales

L'appareil Spectra-Physics est équipé de deux colonnes mixtes (Polymer Laboratories, PolarGel-L 2x300x7,5 mm) et d'un détecteur RI Shodex. L'éluant utilisé est le diméthylacétamide (DMAc) (+ 0,1 M de LiBr) à un débit de 0,8 mL/min à 50 °C.

L'appareil Varian PL-GPC50 Plus est équipé d'un four à 50°C, d'une pré-colonne (Polymer Laboratories, PolarGel-M 8µm Guard, 50x7,5 mm), de deux colonnes (Polymer Laboratories, PolarGel-M 8 µm 2x300x7,5 mm), d'une pompe SpectraSeries P100 et d'un réfractomètre Shimadzu RID-10A. La NMP contenant 0,1 M de LiCl est utilisé comme éluant avec un débit de 1 mL/min à 50°C.

5. MALDI-TOF

Les analyses MALDI-TOF-MS ont été effectuées par Olinda Gimello à l'ICGM, Université de Montpellier, sur un spectromètre de masse Bruker Ultraflex III équipé d'un laser à azote pour MALDI ($\lambda = 337$ nm). Un mélange de peptides a été utilisé pour la calibration externe. Les échantillons sont solubilisés à 10 mg/mL dans un mélange acétonitrile et eau (50/50 v/v). Les matrices HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) and DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) ont été utilisées, chacune solubilisées à 10 mg/mL dans un mélange acide trifluoroacétique / acétonitrile (0,1% TFA/CH₃CN: 70/30).

Les solutions de matrices et de polymères ont été mélangées dans un ratio volumique de 10:4. Le mélange obtenu a été déposé sur le support MALDI et laissé sécher.

La masse théorique est exprimée selon l'équation suivante:

$$M_{th} = n \times M_{EtOx, th} + m \times M_{iPrOx, th} + RM_{th}$$

Avec M_{th} la masse de (co)polymère calculée à partir du X_n , $M_{EtOx, th}$ et $M_{iPrOx, th}$ les masses molaires des unités répétitives éthyle et isopropyle (99 et 113 g/mol, respectivement), et RM_{th} représente la masse résiduelle calculée (groupements terminaux C₁₈H₃₃- et -OH).

6. ESI-MS

Les analyses par spectrométrie de masses ont été réalisées par le Dr. Corinne 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). Les solutions ont été préparées à 10 mg/L dans un mélange LiI aqueux (1 mmol/L)/acétonitrile (50/50).

7. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les mesures par HPLC ont été réalisées sur un appareil Agilent Serie 1100-DAD équipé d'un dégazeur, d'une pompe, d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV-visible. La colonne utilisée est une Luna C18 100A (5 μ 150 $\times$ 4,6mm).

Paramètres pour l'analyse de la vitamine K1 : La phase mobile est un mélange acétonitrile/éthanol (85 :15 v/v) et circule à un débit de 1,5 mL/min. La colonne est fixée à une température de 50°C. La longueur d'onde de détection est de 330 nm et le temps de rétention de 7,8 min.

Paramètres pour l'analyse de la progestérone : La phase mobile est un mélange acétonitrile/eau (65 :35 v/v) circulant à un débit de 1,5 mL/min. La colonne est fixée à une température de 25°C. La longueur d'onde de détection est de 242 nm et le temps de rétention de 4,4 min.

8. Caractérisation physico-chimique

8.1. *Préparation des micelles*

Sans co-solvant :

Les copolymères ont été directement solubilisés dans une solution tampon à pH connu et contenant 0,1 M de NaCl. Les solutions ont été agitées pendant 4 heures avant d'être analysées.

Avec co-solvant :

Le copolymère (20mg) est tout d'abord solubilisé dans le méthanol (2mL) puis ajouté goutte à goutte dans un milieu tampon contenant 0,1 M de NaCl. La solution est agitée toute la nuit afin de laisser le méthanol s'évaporer puis complétée par ajout du medium approprié afin d'atteindre la concentration en copolymère souhaitée. La solution de copolymère est agitée pendant au moins 3 heures avant toute analyse.

Micelles mixtes :

Parties expérimentales

Les solutions micellaires préparées comme décrits précédemment sont mélangées afin d'obtenir des micelles mixtes. La solution finale en micelles mixtes est agitée pendant 4 heures avant analyse.

8.2. *Spectroscopie de fluorescence*

Les mesures de spectroscopie en fluorescence ont été réalisées sur un appareil Cary Eclipse Varian.

Une solution mère de pyrène dans l'acétone ($4.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) est tout d'abord préparée. Une quantité précise de cette solution est ensuite introduite dans des fioles jaugées de façon à ce que la concentration finale en pyrène dans celles-ci soit de $4.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. L'acétone est ensuite évaporée par circulation d'air comprimé puis une quantité précise d'une solution mère de copolymère à 2 g/L et à pH tamponné contenant 0,1 M NaCl est ajoutée dans ces fioles jaugées afin d'atteindre des concentrations variables en copolymère allant de $5.10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ à 2 g.L^{-1} .

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

8.3. *Spectrophotomètre UV-visible*

Les températures de point de trouble ont été déterminées par mesure de l'absorbance des solutions de copolymères sur un spectrophotomètre Cary 100 Varian. La longueur d'onde appliquée est de 500 nm et la vitesse de balayage $0,5 \text{ }^{\circ}\text{C/min}$. La T_{PT} est déterminée lorsque l'absorbance augmente de 10%.

8.4. *Diffusion de la lumière*

Diffusion statique de la lumière :

La diffusion statique de la lumière permet de déterminer la masse molaire moyenne en poids (M_w) et le rayon de giration (R_g) des particules analysées.

Parties expérimentales

Les mesures ont été effectuées sur un goniomètre ALV-CGS-8F équipé d'un laser He-Ne émettant une lumière incidente polarisée verticalement et de longueur d'onde $\lambda_0 = 632,8$ nm (ALV-GmbH, Germany) couplé à un système de corrélation à multiple tau (τ) ALV-5003 (ALV-GmbH, Germany). L'échantillon à analyser est placé dans une cuve et l'intensité de la lumière diffusée a été mesurée à différents angles θ allant de 12 à 150 ° afin d'obtenir une dizaine de vecteur d'onde de diffusion (de $2,77 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$ à $2,55 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$ dans l'eau, d'indice de réfraction $n = 1,33$) nommé q :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \times \left(\sin \frac{\theta}{2} \right)$$

Les solutions de copolymères à analyser ont été préparées dans le PBS à pH 7,4 et à une concentration de 10 g/L puis filtrées sur des filtres de porosité 0,22 μm . La valeur de dn/dc utilisée est de 0,2 mL/g.

Diffusion dynamique de la lumière :

La diffusion dynamique de la lumière donne accès au diamètre hydrodynamique (D_h). Les mesures ont été effectuées sur un Zétasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) équipé d'une source laser Ar-Ne à 630 nm à un angle de 90°. Les mesures ont été réalisées dans des cuves en polystyrène à température contrôlée. Les données sont traitées en utilisant la distribution en nombre donnée par la méthode CONTIN

Les solutions aqueuses de copolymères en milieu tamponné (+ 0,1 M NaCl) à analyser sont préalablement filtrées sur un filtre en cellulose de porosité 0,45 μm . Une série de 8 mesures est effectuée par analyse.

8.5.Tension de surface

Les mesures de tension de surface ont été réalisées sur un tensiomètre Krüss K12 avec la méthode du plateau de Wilhelmy et les paramètres d'analyses suivants :

- Vitesse de détection : 6 mm/min
- Sensibilité de détection : 0,01 g
- Profondeur d'immersion : 2 mm

Parties expérimentales

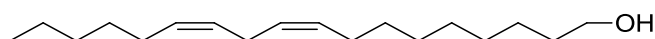
- Nombre de mesures : 10
- Acquisition : linéaire
- Temps par mesure : 300 s

Une gamme de concentration en copolymère allant de 0,05 à 2 g/L a été préparée dans des solutions tampon et aux pH connus contenant 0,1 mol/L de NaCl.

III. Protocoles expérimentaux

1. Synthèse des lipoamorceurs et du L-CTA

1.1. Alcool gras



Une solution d'huile de lin (1 éq., 4,0 g) dans le THF anhydre (60 mL) est ajoutée goutte à goutte et sous atmosphère inerte à un mélange de LiAlH_4 (9 éq., 1,5 g) solubilisé dans le THF anhydre (60 mL) et refroidi par un bain de glace. La réaction est agitée pendant une nuit à température ambiante. Après hydrolyse du LiAlH_4 non réagit par ajout goutte à goutte de 40 mL d'eau, le milieu réactionnel est filtré puis concentré. Le milieu est dilué dans 30 mL de DCM et lavé avec une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis séchée. L'alcool gras obtenu est jaune clair et le rendement de réaction est de 80%.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) : 5,34 (m, 2H, $-\text{HC}=\text{CH}-$), 3,60 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OH}$), 2,79 (m, 2H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-$), 2,04 (m, 2H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1,77 (m, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 1,25 (m, 16H, CH_2 aliphatique), 0,97 (t, 3H, CH_3 acide linoléique), 0,88 (m, 3H, CH_3 autres acides).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm): 131,9-127,1 ($-\text{HC}=\text{CH}-$), 63 ($-\text{CH}_2-\text{OH}$), 32,7-20,5 (CH_2 aliphatique), 14,2 (CH_3 chaînes aliphatiques).

MS [$\text{M} + \text{Na}^+$]: m/z 271 (linoléique), m/z 273 (linoléique), m/z 275 (oléique), m/z 277 (stéarique).

IR: $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ = 3010 et 1652 cm^{-1} , $\nu_{\text{CH}_2, \text{CH}_3}$ = 2924 and 2853 cm^{-1} , $\nu_{\text{O}-\text{H}}$ = 3329 cm^{-1} .

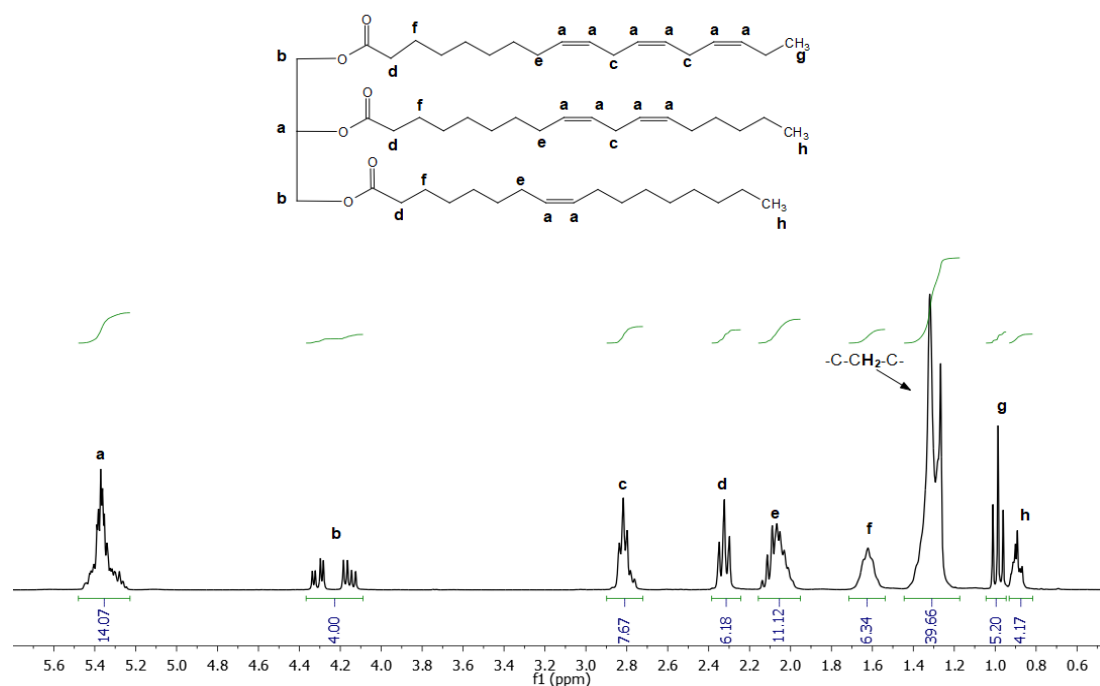


Figure A- 1 : Spectre RMN ^1H de l'huile de lin dans le CDCl_3

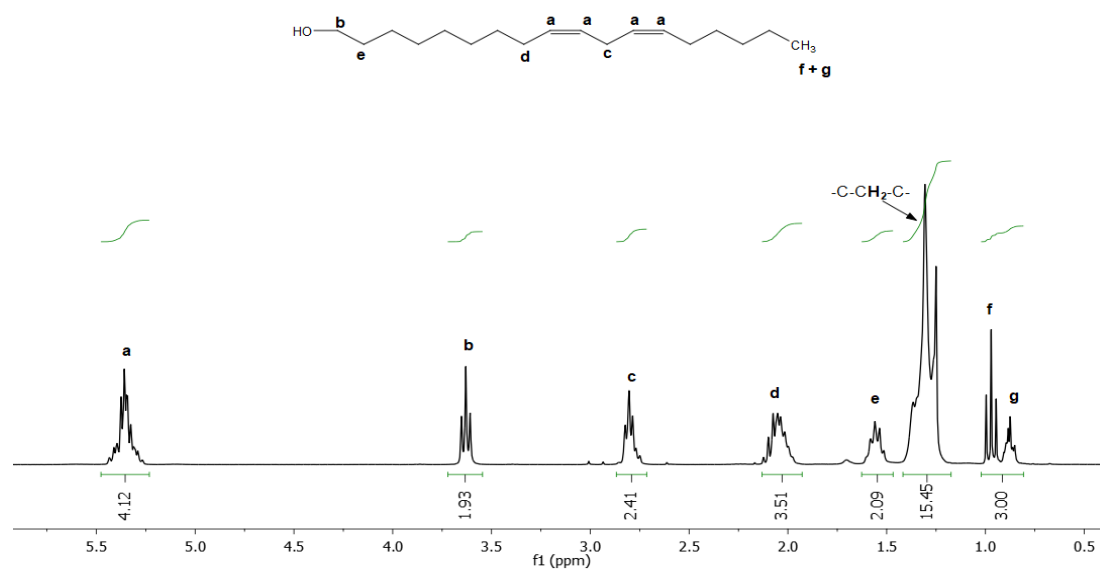
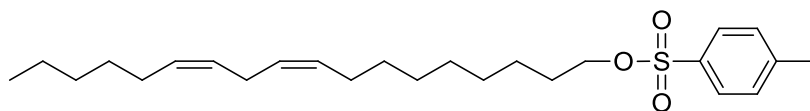


Figure A- 2 : Spectre RMN ^1H de l'alcool gras dans le CDCl_3

1.2.Lipoamorceur Tosylé (LTs)



Une solution de *p*-TsCl (2 éq., 7,05 g) dans le chloroforme anhydre (40 mL) est ajoutée goutte à goutte et sous atmosphère inerte à un mélange d'alcool gras (1 éq., 5,0 g), de TEA (3 éq., 5,63 g) et de DMAP (0,1 éq., 0,22 g) solubilisés dans le chloroforme anhydre (35 mL). La réaction est agitée pendant une nuit à dans un bain chauffé à 30°C. Après évaporation du solvant, le milieu réactionnel est solubilisé dans 50 mL d'AcOEt puis lavé avec une solution saturée de NaHCO₃ puis de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis concentrée. Le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de silice élué avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (91 :9). Le produit pur obtenu avec un rendement de 57% est un liquide jaune.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) : 7,80 and 7,35 (d, 4H aromatique), 5,34 (m, 4H, –HC=CH–), 4,01 (t, 2H, –CH₂–OS), 2,80 (m, 2H, –HC=CH–CH₂–HC=CH–), 2,44 (s, 1H, CH₃), 2,05 (m, 2H, –HC=CH–CH₂–CH₂), 1,63 (m, CH₂–CH₂–OS), 1,25 (m, 16H, CH₂ aliphatique), 0,97 (t, 3H, CH₃ acide linoléique), 0,88 (m, 3H, CH₃ autres acides).

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm): 144,8 (aromatique), 139-127,3 (–HC=CH–), 71 (–CH₂–OS), 32,1-20,9 (CH₂ aliphatique), 14,6 (chaînes aliphatiques).

MS [M+ Na⁺] : *m/z* 441 (linoléique), *m/z* 443 (linoléique), *m/z* 445 (oléique).

IR: $\nu_{C=C}$ = 3009 cm⁻¹, ν_{CH_2, CH_3} = 2924 and 2853 cm⁻¹, $\nu_{S=O}$ = 1361 cm⁻¹, $\nu_{S=O}$ = 1180 cm⁻¹.

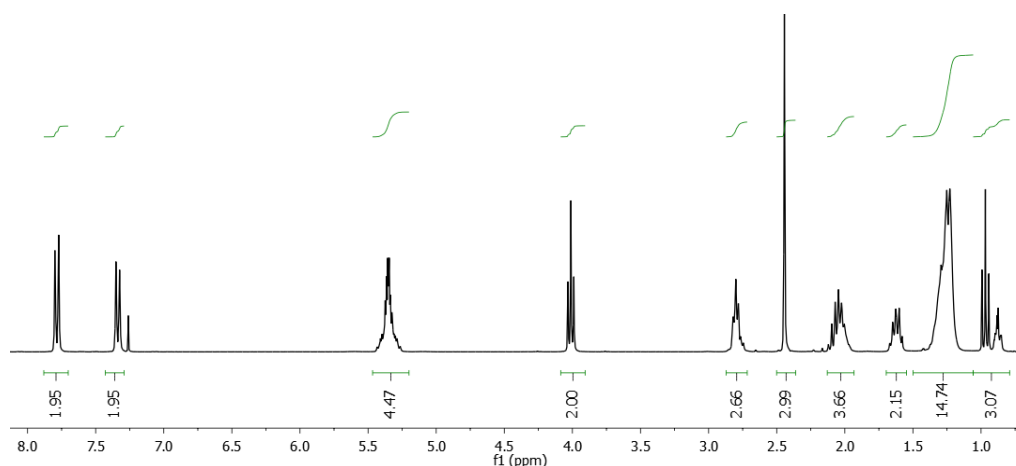
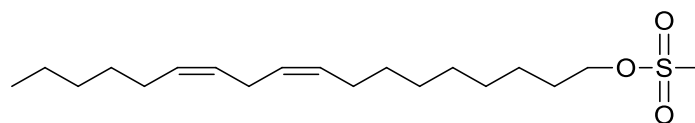


Figure A- 3 : Spectre RMN ^1H du lipoamorceur tosylé dans le CDCl_3

1.3.Lipoamorceur Mésylé (LMs)



Une solution de chlorure de mésyle (MsCl) (1,05 éq., 0,89 g) dans l'éther diéthylique anhydre (35 mL) est ajoutée goutte à goutte et sous atmosphère inerte à un mélange d'alcool gras (1 éq., 2,0 g) et de TEA (1 éq., 0,75 g) solubilisés dans l'éther diéthylique anhydre (42 mL). La réaction est agitée pendant 4h à température ambiante puis stoppée par ajout goutte à goutte de 20 mL d'eau. Le milieu réactionnel est lavé 4 fois avec 20 mL d'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis concentrée. Le produit pur obtenu avec un rendement de 80% est un liquide jaune.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) : 5,34 (m, 2H, $-\text{HC}=\text{CH}-$), 4,22 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OS}$), 3 (s, $\text{S}-\text{CH}_3$), – 2,81 (m, 2H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-$), 2,05 (m, 2H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1,74 (m, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OS}$), 1,25 (m, 2H, CH_2 aliphatique), 0,97 (t, 3H, CH_3 acide linoléique), 0,88 (m, 3H, CH_3 autres acides).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm): 139-127 ($-\text{HC}=\text{CH}-$), 70 ($-\text{CH}_2-\text{OS}$), 37,3 (CH_3-OS), 32-20,5 (CH_2 aliphatique), 14,1 (chaînes aliphatiques).

MS [$M + Li^+$] : m/z 342 (linolénique), m/z 344 (linoléique), m/z 346 (oléique).

IR: $\nu_{C=C} = 3010\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{CH_2, CH_3} = 2924\text{ and }2853\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{S=O} = 1353\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{S=O} = 1175\text{ cm}^{-1}$.

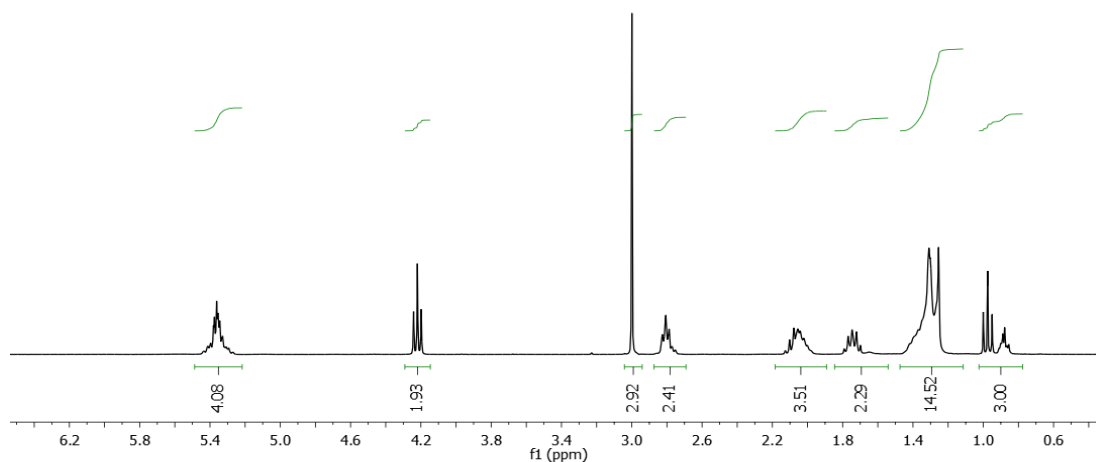
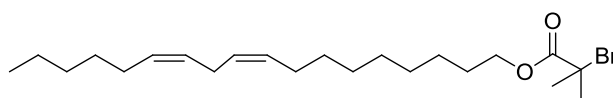


Figure A- 4 : Spectre RMN ^1H du lipoamorceur mésylé dans le $CDCl_3$

1.4.Lipoamorceur bromé (LBr)



Une solution de 2-bromo-2-méthylpropionyle (2,2 éq., 2,72 mL) dans le DCM anhydre est ajouté goutte à goutte et sous atmosphère inerte à un mélange d'alcool gras (1éq., 1,45 g) et de triéthylamine (3,3 éq., 1,79 mL) dans le DCM refroidi dans un bain de glace. Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures puis lavé successivement par une solution d'HCl 10 % (20 mL), une solution d'hydrogencarbonate à 10 % (20 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (20 mL). La phase organique est ensuite séchée sur $MgSO_4$, filtrées puis concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de silice (silicagel pour chromatographie, 0,06-0,2 mm, 60 Å) éluée avec un mélange

Parties expérimentales

diéthyléther/cyclohexane (10/90, v/v). Le produit pur obtenu avec un rendement de 65% est un liquide incolore.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ (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, CH_2 aliphatique), 0,9 (t, CH_3 acide linoléique), 0,8 (m, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : δ (ppm) = 171,7 ($\text{C}=\text{O}$), 131,9-127,0 ($-\text{HC}=\text{CH}-$), 66,1 ($-\text{CH}_2\text{-OCO}$), 55,9 (C-Br), 31,8-22,6 (CH_2 aliphatique), 30,7 ($\text{Br}(\text{CH}_3)_2\text{C}-$), 14,1 (CH_3 chaîne alkyle).

MS $[\text{M-Li}^+]$: $m/z=421$ (linoléique), 423 (linoléique), 425 (oléique), 427 (stéarique).

IR: $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ = 3010 et 1652 cm^{-1} , $\nu_{\text{CH}_2, \text{CH}_3}$ = 2924 and 2853 cm^{-1} , $\nu_{\text{C}=\text{O}}(\text{ester})$ = 1735 cm^{-1} , $\nu_{\text{C-Br}}$ = 646 cm^{-1} .

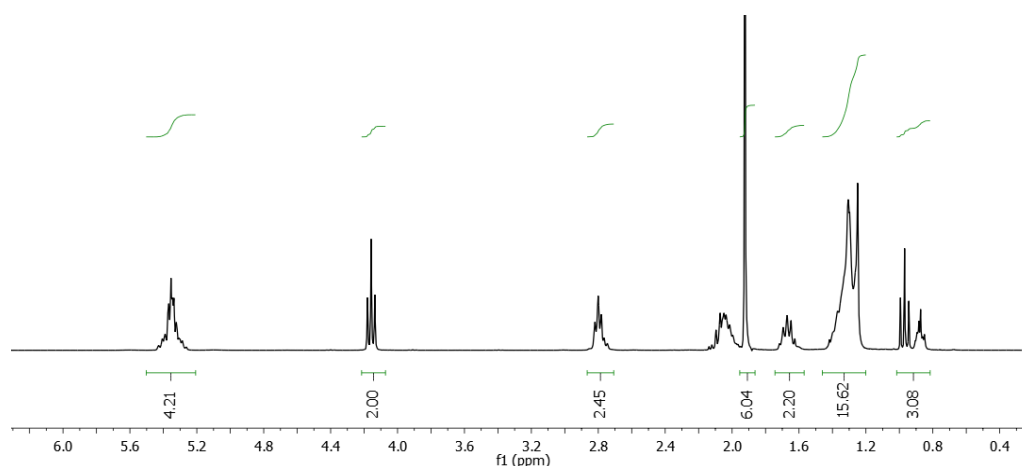
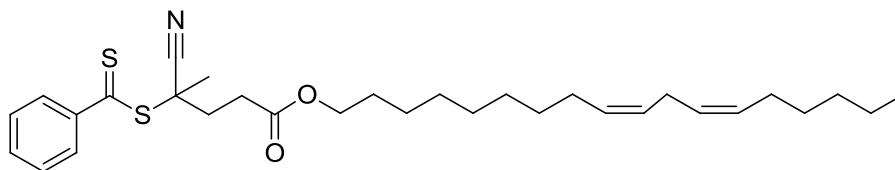


Figure A- 5 : Spectre RMN ^1H du lipoamorceur bromé dans le CDCl_3

1.5.Lipo-Chain Transfert Agent (LCTA)



Une solution de DCC (1,22 éq., 0,18 g) dans le chloroforme anhydre (8 mL) est ajoutée goutte à goutte et sous atmosphère inerte à un mélange d'alcool gras (1,2 éq., 0,23 g), de CTA (1 éq., 0,20 g) et de DMAP (0,16 éq., 0,014 g) solubilisés dans le chloroforme anhydre (10 mL). La réaction est agitée pendant une nuit à 25°C. Le milieu réactionnel est filtré sur Büchner plusieurs fois afin d'éliminer le DCU (précipité blanc), sous-produit de réaction. Le filtrat est lavé avec une solution d'HCl 10%, une solution saturée de NaHCO₃ et enfin de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrées puis concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne chromatographique de silice éluée avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (91 :9). Le produit pur obtenu avec un rendement de 63% est un liquide visqueux rose (conversion : 90%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) : 7,89 (d, 2H aromatique), 7,56(t, 1H aromatique) et 7,40 (t, 2H aromatique), 5,34 (m, 4H, -HC=CH-), 4,01 (t, 2H, -CH₂-OCO), 2,80 (m, 2H, -HC=CH-CH₂-HC=CH-), 2,65 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CO), 2,05 (m, 4H, -HC=CH-CH₂-CH₂), 1,94 (s, 3H, NC-C-CH₃), 1,63 (m, 2H, -CH₂-CH₂-O), 1,25 (m, 16H, CH₂ aliphatique), 0,97 (t, 3H, CH₃ acide linoléique), 0,88 (m, 3H, CH₃ autres acides).

IR: $\nu_{C=C}$ = 3086, 3060, 3025 et 1604 cm⁻¹, ν_{CH_2, CH_3} = 2924 et 2854 cm⁻¹, $\nu_{C=O}$ = 1736 cm⁻¹, $\nu_{C=S}$ = 1180 cm⁻¹.

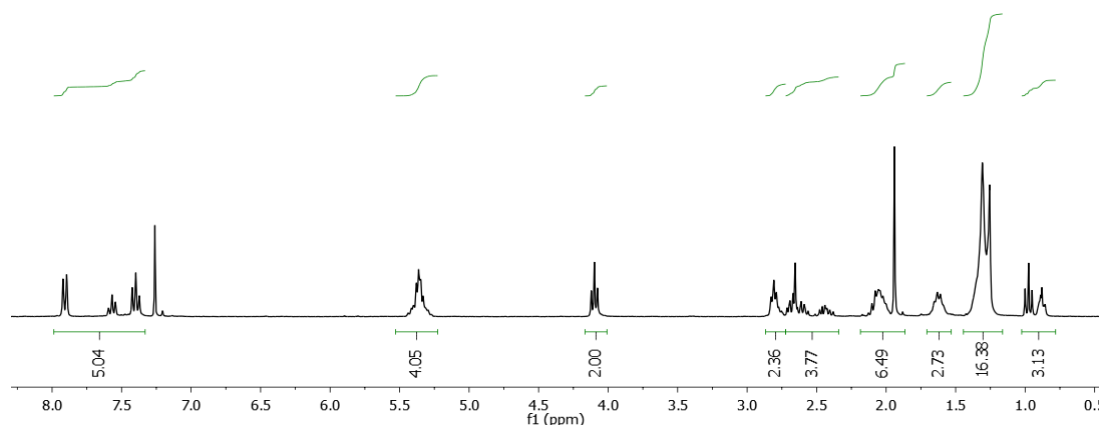
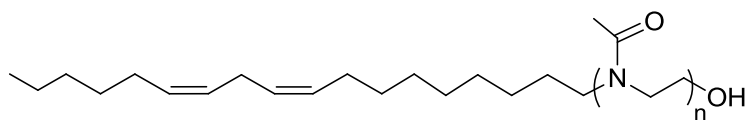


Figure A- 6 : Spectre RMN ^1H du LCTA dans le CDCl_3

2. Synthèse des polymères thermo-sensible

2.1.Synthèse du L-PMeOx par polymérisation CROP par voie thermique



Dans un schlenk contenant le lipoamorceur (LTs ou LMs) (1 éq.) et le CD₃CN (3,8 mL) est introduit goutte à goutte et sous atmosphère inerte le MeOx (26 éq.). Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C et des prélèvements sont effectués afin de suivre la cinétique de polymérisation par RMN ¹H. Après 24h de polymérisation, un excès de solution méthanolique de KOH à 1M est ajoutée au milieu réactionnel pour terminer la réaction. Le polymère est ensuite purifié par précipitation dans l'éther diéthylique puis séché sous vide à 40°C pendant 24h.

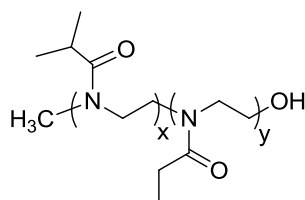
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) : 5,34 (m, 2H, -HC=CH-), 3,7-3,1 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 2,80 (m, 2H, -HC=CH-CH₂-HC=CH-), 2,24-1,98 (m, 3H, CH₃), 1,85 (m, 2H, -HC=CH-CH₂-CH₂), 1,25 (m, 2H, CH₂ aliphatique), 1,15 (m, 3H, CH₃), 0,97 (t, 3H, CH₃ acide linoléique), 0,88 (m, 3H, CH₃ autres acides).

Parties expérimentales

2.2.Synthèse de (Lipo-)poly(oxazoline)s par polymérisation CROP assistée par micro-ondes

Pour toutes les polymérisations assistées par micro-ondes, l'amorceur (LTs ou MeOTs) (1 éq.) et l'acétonitrile anhydre sont introduits dans un tube à micro-onde purgé à l'azote. Le(s) monomère(s) (4M) est/sont ajouté(s) via une seringue. La polymérisation a lieu à 140°C pendant une durée propre à chaque monomère puis terminée par ajout d'une solution méthanolique de KOH à 1M en excès. Le polymère est ensuite purifié par dialyse dans l'eau miliQ (cut-off 500 Da) pendant 2 jours puis lyophilisé.

Synthèse de (co)polymères hydrophiles à partir de MeOTs :



PEtOx [EtOx]₀:[MeOTs]₀ = 18:1,

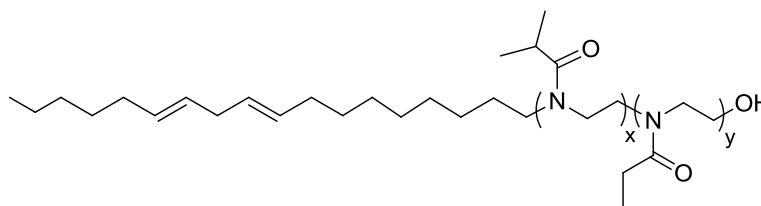
PiPrOx [iPrOx]₀:[MeOTs]₀ = 26:1,

P(EtOx)-co-(iPrOx) [EtOx]₀:[iPrOx]₀:[MeOTs]₀ = 2:17:1.

Le temps de polymérisation est de 30 min et les polymères obtenus sont des poudres blanches.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) : 3,7-3,1 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 3 (s, 1H, -CH₃), 3,0-2,5 (m, 1H, -CH-(CH₃)₂), 2,4-2,1 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 1,15 (m, 9H, CH₃ groupements isopropyle et éthyle).

Synthèse de copolymères amphiphiles à partir de LTs :



L-PMeOx [MeOx]₀:[LTs]₀ = 26:1, 20 minutes de polymérisation,

L-PEtOx [EtOx]₀:[LTs]₀ = 26:1, 30 minutes de polymérisation,

L-PiPrOx [iPrOx]₀:[LTs]₀ = 26:1, 30 minutes de polymérisation,

L-P(EtOx)_{21-co-(iPrOx)₇₉} [EtOx]₀:[iPrOx]₀:[LTs]₀ = 17:2:1

L-P(EtOx)_{42-co-(iPrOx)₅₈} [EtOx]₀:[iPrOx]₀:[LTs]₀ = 13:6:1

L-P(EtOx)_{21-co-(iPrOx)₇₉} [EtOx]₀:[iPrOx]₀:[LTs]₀ = 12:5:1

Les polymères obtenus sont des poudres beiges.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) : 5,34 (m, 2H, -HC=CH-), 3,7-3,1 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 2,80 (m, 2H, -HC=CH-CH₂-HC=CH-), 3,0-2,5 (m, 1H, -CH-(CH₃)₂), 2,4-2,1 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 1,85 (m, 2H, -HC=CH-CH₂-CH₂), 1,25 (m, 2H, CH₂ aliphatique), 1,15 (m, 9H, CH₃ groupements isopropyle et éthyle), 0,97 (t, 3H, CH₃ acide linoléique), 0,88 (m, 3H, CH₃ autres acides).

IR: ν_{O-H} = 3471 cm⁻¹, ν_{C=C} = 2976 cm⁻¹, ν_{CH₂,CH₃} = 2938 et 2879 cm⁻¹, ν_{C=O amide} = 1625 cm⁻¹, ν_{C-N amide} = 1194 cm⁻¹.

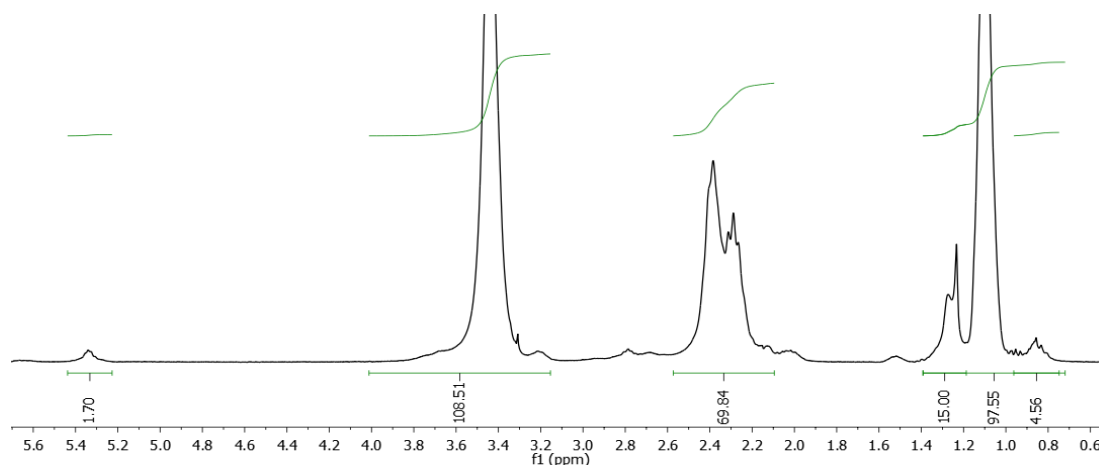


Figure A- 7 : Spectre RMN ¹H du L-PEtOx dans le CDCl₃

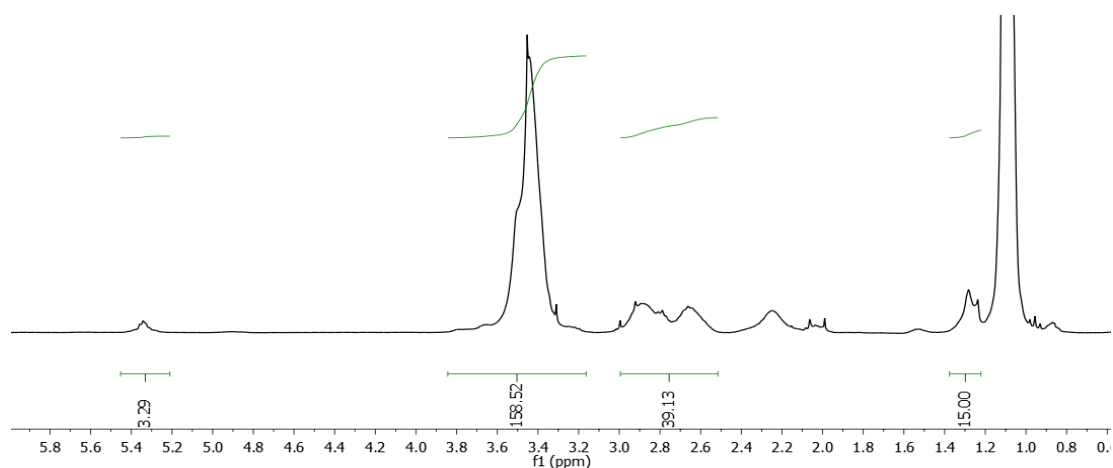


Figure A-8 : Spectre RMN ^1H du L-PiPrOx dans le CDCl_3

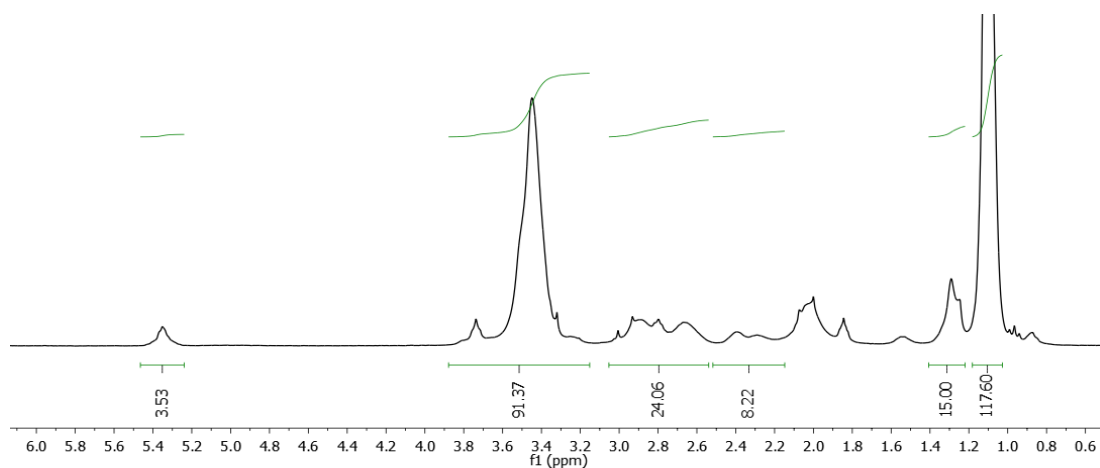


Figure A-9 : Spectre RMN ^1H du copolymère L-P(EtOx₂₁-co-iPrOx₇₉) dans le CDCl_3

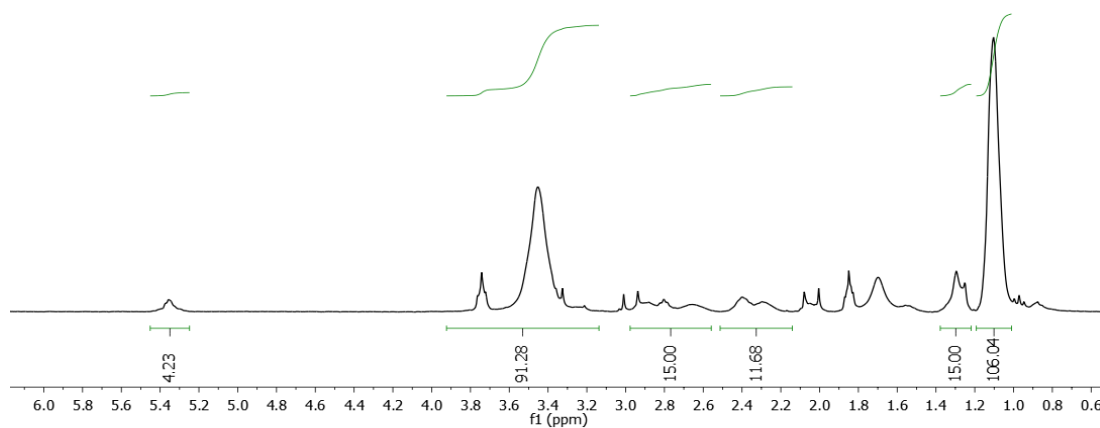


Figure A-10 : Spectre RMN ^1H du copolymère L-P(EtOx₄₂-co-iPrOx₅₈) dans le CDCl_3

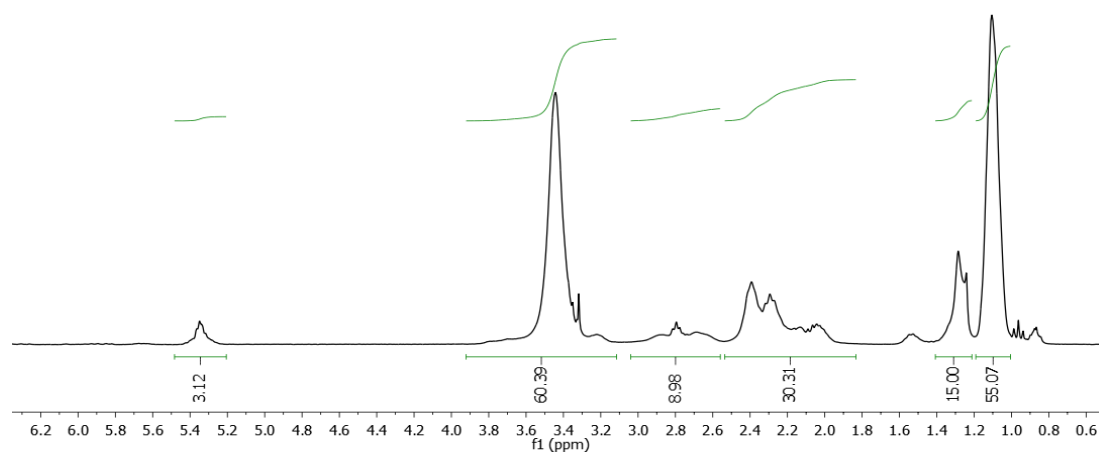


Figure A- 11 : Spectre RMN ^1H du copolymère L-P(EtOx₇₅-co-iPrOx₂₅) dans le CDCl_3

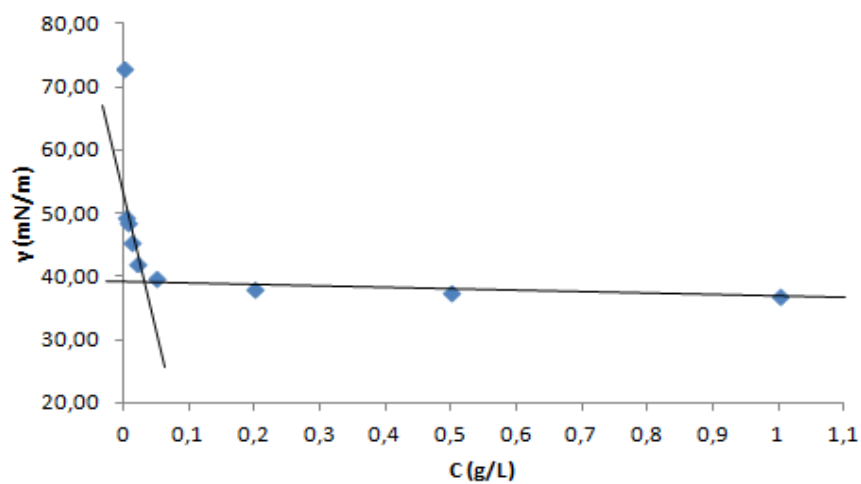
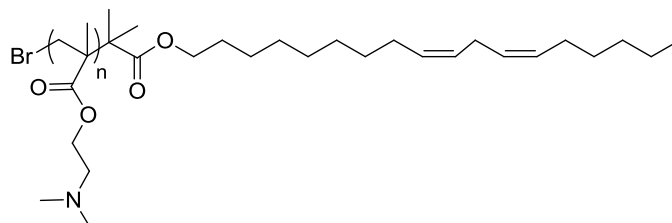


Figure A- 12 : Evolution de la tension de surface en fonction de la concentration en copolymère L-PiPrOx (5)

3. Synthèse des polymères pH-sensibles

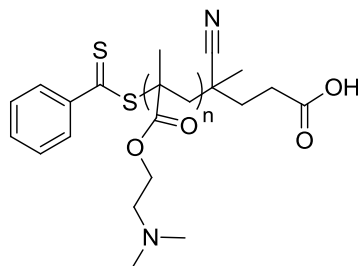
3.1. Synthèse du L-PDMAEMA par ATRP à partir du LBr



Le bromure de cuivre (I) (1 éq., 0,0849 g) est introduit dans un schlenk puis soumis à trois cycles de vide/argon afin d'éliminer l'oxygène. Le DMAEMA (100 éq., 7,5 g), le lipoamorceur (1 éq., 0,196 g), le HMTETA (1 éq., 0,1102 g) et le THF anhydre (8,5 mL) sont introduits dans un second schlenk, dégazé par trois cycles de congélation/décongélation et transféré via une canule dans le premier schlenk. La polymérisation a lieu à 60°C pendant 5h. La polymérisation est stoppée par ajout de THF et le milieu est filtré à travers une colonne d'alumine afin d'éliminer les traces de catalyseur. Le polymère est purifié par précipitation dans l'hexane à froid.

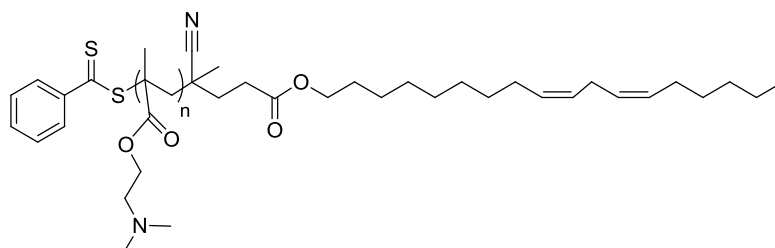
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) : 5,34 (m, 4H, $-\text{HC}=\text{CH}-$), 4,03 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OCO}$), 2,79 (m, 2H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-$), 2,54 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2-$), 2,26 (m, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2,05 (m, 4H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1,93 (s, 3H, $-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3$), 1,63 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCO}$), 1,43 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}-$), 1,25 (m, 16H, CH_2 aliphatique), 1,12-0,88 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}-$), 0,97 (t, 3H, CH_3 acide linolénique), 0,88 (m, 3H, CH_3 autres acides).

3.2. Cinétique de polymérisation du DMAEMA par RAFT à partir du CTA



Un mélange de DMAEMA (40 éq., 1,95 g), CTA (1 éq., 0,085 g) et AIBN (0,205 éq., 0,0108 g) solubilisé dans le toluène anhydre (1,03 mL) est introduit dans un ballon. Un bullage à l'azote est effectué pendant 15 min sous agitation. La polymérisation a lieu à 70°C et des prélèvements sont effectués afin de suivre la cinétique de polymérisation.

3.3. Synthèse du L-PDMAEMA par RAFT à partir du LipoCTA



Un mélange de DMAEMA (40 éq., 1,02 g), lipo-CTA (1 éq., 0,086 g) et AIBN (0,205 éq., 5,75 mg) solubilisé dans le toluène anhydre (0,54 mL) est introduit dans un ballon. Un bullage à l'azote est effectué pendant 15 min sous agitation. La polymérisation a lieu à 70°C pendant 7h30. La polymérisation est stoppée par ajout de THF. Après évaporation des solvants, le polymère est dilué dans le toluène puis purifié par précipitation dans le cyclohexane à froid. Après lyophilisation on obtient un solide rose.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) : 7,94-7,31 (m, 5H aromatique), 5,34 (m, 4H, $-\text{HC}=\text{CH}-$), 4,05 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OCO}$), 3,74 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OCO}$), 2,80 (m, 2H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-$), 2,70-2,48 (m, 4H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}$) et (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2-$), 2,41-2,17 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2,1-1,73 (m, 4H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), (s, 3H, $\text{NC}-\text{C}-\text{CH}_3$) et (s, 3H, $-\text{C}-\text{CH}_3$).

Parties expérimentales

$\text{CH}_2\text{-C-CH}_3$), 1,62 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 1,3 (m, 16H, CH_2 aliphatique), 1,14-0,78 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-C-}$), 0,97 (t, 3H, CH_3 acide linoléique), 0,88 (m, 3H, CH_3 autres acides).

IR: $\nu_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 2940, 2855 \text{ et } 2820 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{N-}(\text{CH}_3)_2} = 2769 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C=O}_{amide}} = 1724 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C-N}_{amide}} = 1240 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C=S}} = 1146 \text{ cm}^{-1}$.

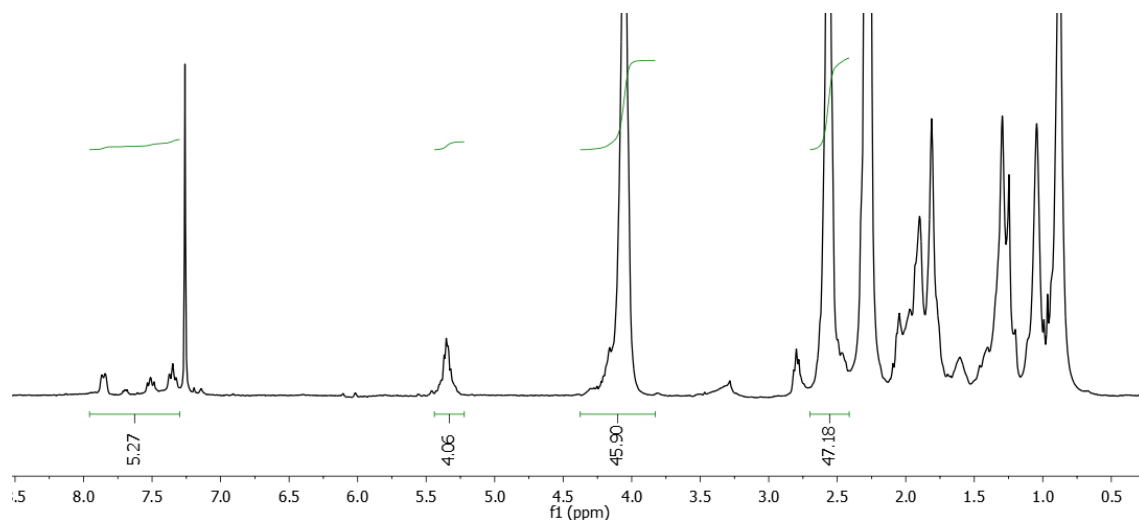


Figure A- 13 : Spectre RMN ^1H du copolymère L-PDMAEMA 4a dans le CDCl_3

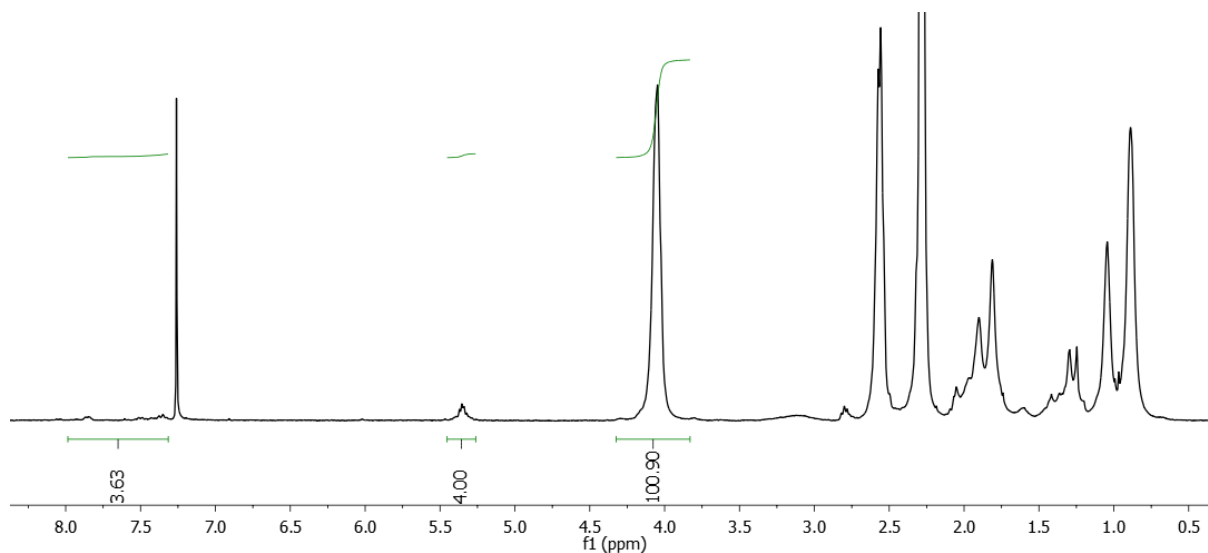


Figure A- 14 : Spectre RMN ^1H du copolymère L-PDMAEMA 6a dans le CDCl_3