



**HAL**  
open science

# Fonctionnalisation photochimique de polyesters dégradables pour applications en santé

Assala Al Samad

► **To cite this version:**

Assala Al Samad. Fonctionnalisation photochimique de polyesters dégradables pour applications en santé. Matériaux. Université Montpellier; Université Libanaise, 2016. Français. NNT : 2016MONTT209 . tel-01761856

**HAL Id: tel-01761856**

**<https://theses.hal.science/tel-01761856v1>**

Submitted on 9 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.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par l'**UNIVERSITE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale **ED 459**

**Sciences Chimiques Balard**

Et de l'unité de recherche

Institut des Biomolécules Max Mousseron

Spécialité : **Chimie des matériaux**

Présentée par **Assala AL SAMAD**

## **FONCTIONNALISATION PHOTOCHIMIQUE DE POLYESTERS DEGRADABLES POUR APPLICATIONS EN SANTÉ**

Soutenue le 1<sup>er</sup> septembre 2016 devant le jury composé de

Youssef BAKKOUR	Professeur	Université Libanaise	Examineur
Jean COUDANE	Professeur	Université Montpellier	Examineur
Fawaz EL OMAR	Professeur	Université Libanaise	Co-directeur
Benjamin NOTTELET	MCU	Université Montpellier	Directeur
Cécile NOUVEL	Professeur	ENSIC	Rapporteur
Thomas TRIMAILLE	MCU	Université Aix-Marseille	Rapporteur



## Remerciements

Cette thèse constitue une importante expérience qui ne peut pas terminer sans remercier les personnes qui m'ont encadré, soutenu et aidé au cours de plusieurs années de recherche. Pourtant il est difficile de n'oublier personne. C'est pourquoi je commence mes remerciements à ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Benjamin Nottelet, pour toute son aide, sa compétence, sa rigueur scientifique, sa gentillesse, son caractère très optimiste qui me motive à mieux travailler et son encouragement qui m'a donné beaucoup de confiance en moi. Sans lui, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail.

Je remercie Jean Coudane pour m'avoir accueilli dans l'unité de recherche crba, IBMM, pour sa participation scientifique à l'avancement de travaux de recherche, ainsi que pour sa relecture finale attentive de chacun des chapitres de la thèse.

Je remercie également co-directeur de thèse, Fawaz El Omar, et mon co-encadrant de thèse, Youssef Bakkour, pour la suivie de la thèse et leurs conseils. Je leur suis reconnaissante pour m'avoir encouragé à découvrir le travail passionnant de recherche à travers une thèse.

Je remercie également Madame Cécile Nouvel et Monsieur Thomas Trimaille pour l'honneur qu'il me fait d'être les rapporteurs dans mon jury de thèse.

Au cours de trois années j'ai fait partie de l'équipe « crba » au sein de l'IBMM. Je tiens à remercier tous les membres de mon équipe. Je remercie Xavier Garric pour son aide et ses conseils, ainsi que Helene Van-Den-Berghe et Vincent Darcos. Je remercie également Sylvie Hunger, Stéphane Dejean et Cédric Paniagua pour les analyses RMN et GPC. Je tiens à remercier Audrey Bethry pour toutes les analyses biologiques et les discussions qui m'ont apporté beaucoup des connaissances biologiques. Je tiens à remercier aussi Adrien Leroy, Fanny Coumes, Anita Schulz et Sytze Buwalda pour leur aide et leurs conseils. Je remercie aussi Mira Younis et Salomé Leprince pour leur gentillesse.

J'adresse mes remerciements aussi à Sylvie Begu, Anne Aubert, Marie Morille et Taher Hatahet pour m'avoir aidé à réaliser des analyses sur le zétasizer et la fluorométrie. Mes remerciements s'adressent aussi à Danielle Laurencin, Yannick Guari et Xavier Dumail pour leur collaboration.

Je remercie Aurelien Lebrun pour toutes les analyses RMN DOSY, et Mohammad El Haj pour les analyses RMN à l'EDST, Liban. Je remercie également l'équipe de l'Institut de Chimie Macromoléculaire à Prague, surtout Tomas Etryth de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir consacré de temps pour des discussions scientifiques, Eva Koziolová, Miloš Netopilík et Olga Janouskova pour leur aide et leur participation à la réalisation de mes travaux de recherche pendant un mois de séjour à Prague.

J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont à ma famille, et surtout à papa et maman qui ont tout fait pour m'aider, et qui me supporte dans tout ce que je fais.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE I.....</b>	<b>23</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>23</b>
1. <i>Applications des copolymères amphiphiles pour la libération de principes actifs.....</i>	24
1.1. Généralités sur la libération de PA en oncologie.....	24
1.2. Développement des générations de systèmes de délivrance des PA.....	26
1.3. Stratégies de l'accumulation des nanoparticules par effet EPR .....	28
1.4. Stratégies de ciblage passif et stimuli-dépendance : les nanoparticules se dévoilent. ....	29
1.5. Stratégies de « ciblage actif » .....	32
2. <i>Polyesters aliphatiques.....</i>	36
2.1. Les familles .....	37
2.2. Le poly(acide lactique) (PLA).....	38
2.3. Le poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLAGA) .....	41
2.4. La poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) .....	41
2.5. Dégradation des polyesters aliphatiques : .....	43
3. <i>Fonctionnalisation des polyesters aliphatiques.....</i>	45
3.1. Lactones fonctionnelles .....	46
3.2. Modification chimique post-polymérisation : surface et solution .....	51
3.2.1. Modification de surface par hydrolyse et aminolyse.....	51
5.2.1. L'hydrolyse .....	51
5.2.2. L'aminolyse .....	52
3.2.2. Modification anionique de chaînes et surfaces de polyesters.....	53
3.2.3. Modification de surface par plasma .....	56
3.2.4. Réactions de chimie click utilisées pour la modification de polyesters .....	58
4. <i>Copolyesters amphiphiles.....</i>	65
4.2. Copolymères en étoile .....	71
4.3. Copolyesters amphiphiles greffés .....	72
4.3.1. Grafting from .....	73
4.3.2. Grafting through .....	75
4.3.3. Grafting to.....	77

5. Bilan et cadre de la thèse .....	80
6. References Bibliographiques .....	83
<b>CHAPITRE II .....</b>	<b>98</b>
<b>MODIFICATION ANIONIQUE ET PHOTOCHEMIE DE LA PCL :</b>	
<b>OPTIMISATION DE LA PROPARGYLATION ET MISE AU POINT DU</b>	
<b>PHOTOGREFFAGE THIOL-YNE .....</b>	<b>98</b>
1. Introduction à la propargylation de la PCL.....	99
2. Biodegradable networks for soft tissue engineering by thiol-yne photo cross-linking of multifunctional polyesters .....	101
2.1. Abstract .....	101
2.2. Introduction.....	101
2.3. Materials and methods.....	103
2.4. Results .....	106
2.5. Conclusion .....	116
2.6. References .....	116
2.7. Supplementary data .....	119
3. Introduction à la synthèse de copolymères amphiphiles PCL-g-PEG par greffage photochimique thiol-yne.....	123
4. From nanospheres to micelles: simple control of PCL-g-PEG copolymers amphiphilicity through thiol-yne photografting.....	125
4.1. Abstract .....	126
4.2. Introduction.....	126
4.3. Materials and Methods .....	128
4.4. Results and Discussion.....	134
4.5. Conclusion .....	148
4.6. References .....	148
<b>CHAPITRE III.....</b>	<b>157</b>
<b>COPOLYMERES PCL-g-PEG EN TANT QUE SYSTEMES DE LIBERATIONS</b>	
<b>DE PA : SYSTEMES PASSIFS, SYSTEMES ACTIFS OU SYSTEMES</b>	
<b>STIMULABLES.....</b>	<b>157</b>

1.	<i>Introduction sur la modulation de l'amphiphilie des copolymères greffés PCL-g-PEG : Effets sur la formation de micelles, l'encapsulation de PA et la cytotoxicité cellulaire .....</i>	158
2.	<i>PCL-PEG graft copolymers with tunable amphiphilicity as efficient drug delivery systems .....</i>	161
2.1.	Abstract .....	162
2.2.	Introduction .....	162
2.3.	Materials and Methods .....	164
2.4.	Results And Discussion .....	170
2.5.	Conclusion .....	186
2.6.	References .....	187
2.7.	Supplementary data .....	191
3.	<i>Introduction sur les copolymères PCL-PEG comme plateforme unique de synthèse de vecteurs clivables ou de ciblages.....</i>	199
4.	<i>Single PCL-PEG copolymers platform for flexible drug delivery strategies: targeting or MMP-sheddable vectors though simple photochemistry .....</i>	201
4.1.	Abstract .....	202
4.2.	Introduction .....	202
4.3.	Materials And Methods .....	204
4.4.	Discussion .....	211
4.5.	Conclusion .....	221
4.6.	References .....	222
4.7.	Supplementary data .....	225
5.	<i>MODIFICATION ANIONIQUE DES sPEG-(NHCO)-PLC<sub>8</sub> ET ACTIVATION PHOTOCHEMIQUE THIOL-YNE</i>	228
5.1.	Introduction.....	228
5.2.	Synthèse de sPEG-(NHCO)-PCL <sub>8</sub> propargylé et modification par le benzyl-mercaptan .....	228
5.2.1.	Propargylation des copolymères étoiles sPEG-(NHCO)-PCL <sub>8</sub> .....	228
5.2.2.	Couplage entre sPEG-(NHCO)-PCL <sub>8</sub> -Pg et benzyl mercaptan .....	234
5.3.	Conclusion.....	236
5.4.	Partie expérimentale .....	236
	<b>CHAPITRE IV .....</b>	<b>238</b>
	<b>MODIFICATION EN SURFACE.....</b>	<b>238</b>
1.	<i>Modification anionique du PLA .....</i>	239

2.	<i>Modification des fibres de PLA par des SPIONS</i> .....	240
2.1.	Propargylation des fibres de PLA.....	240
2.2.	Greffage de nanoparticules Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> sur la surface des fibres de PLA .....	244
3.	<i>Conclusions</i> .....	251
4.	<i>Partie expérimentale</i> .....	252
	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>256</b>



## TABLE DES FIGURES

### Chapitre I

Figure I 1 : Différence entre tissu sain et tissu cancéreux. (a) Dans les tissus normaux, seules les petites molécules diffusent à travers les cellules endothéliales ; (b) dans la tumeur, les macromolécules et les nanoparticules diffusent dans les tissus grâce à des défauts de vascularisation (figure adaptée de Barreto et al. <sup>12</sup> ).....	25
Figure I 2 : a) liposome ; b) micelle ; c) vésicule polymérique (PEG-PLA <sup>18</sup> ) ; d) hydrogel (PNIPAAm : poly(N-isopropylacrylamide) non dégradabile (changement de volume et libération dépendant de la température) <sup>19</sup> ; e) nanoparticule hybride (poly(L-histidine/silice mésoporeuse/DOX) <sup>20</sup> ; f) nanoparticule inorganique (pour les recherches sur le cancer du sein) <sup>21</sup> .....	25
Figure I 3 : Biodistribution des NPs en fonction de leur type. 1 <sup>er</sup> génération : particules non hydrophilisées détectées par les protéines de SRE et éliminées au niveau de le foie et la rate ; 2 <sup>ème</sup> génération : particules PEGylées avec peu d'opsonisation, circulation sanguine plus longue ; 3 <sup>ème</sup> génération : particules PEGylées et possédant des ligands pour des récepteurs spécifiques (adaptée de Aggarwal et al. <sup>41</sup> ).....	28
Figure I 4 : Illustration schématique de la circulation des NPs dans les vaisseaux sanguins jusqu'à accumulation dans la tumeur par effet EPR puis internalisation avec libération de PA 1) Vaisseau sanguin : Longue circulation, effet EPR ; 2) Tissue tumorale : acidité faible (pH 6,8), température anormale, enzymes surexprimés (MMPs, glycosidase) ; 3) Cellule cancéreuse : pH plus faible (pH 4,5 ; 6,5) ; endolysosome (figure adaptée de Ge et al. <sup>44</sup> ).....	29
Figure I 5 : Description schématique de dévoilement des particules par des MMP au niveau du cancer (figure adaptée de Harris et al. <sup>47</sup> ).....	30
Figure I 6 : Schématisation d'une micelle PCL-OPEG-PCL (figure adaptée de Liu Chen et al. <sup>56</sup> ).....	32
Figure I 7 : Accumulation des NPs au niveau de tumeur suite à l'effet EPR et ciblage actif grâce à la fonctionnalisation des NPs par des ligands qui favorisent la reconnaissance spécifique par des récepteurs surexprimés au niveau des cellules cancéreuses. i) Les NPs peuvent libérer le PA à proximité de la cellule cible ; ii)	

attachement des NPs à la membrane et libération prolongée extracellulaire ; ou iii) internalisation dans la cellule (figure adaptée de Peer et al. <sup>59</sup> ).....	33
Figure I 8 : Structures chimiques basées sur le motif RGD. A : La séquence originale de RGD ; B : RGD cyclique ou cyclopentapeptide (c(RGDf[N-Me]V) qui est un ligand selectif des intégrines $\alpha_v\beta_3$ .....	34
Figure I 9 : Représentation schématique a) démasquage et libération extracellulaire b) Démasquage avec exposition aux ligands de ciblage résultant une internalisation et une libération intracellulaire (figure adaptée de Romberg et al. <sup>46</sup> ) .....	35
Figure I 10 : NPs PCL-PEI-FA/PCL-S-S-PEG (figure adaptée de Ahmed et al. <sup>65</sup> ).....	36
Figure I 11 : Cycle de vie du PLA .....	38
Figure I 12 : Synthèse de poly(acide lactique) par polycondensation(figure adaptée de Lopes et al. <sup>75</sup> ).....	39
Figure I 13 : Synthèse de polylactide (figure adaptée de Rasal et al. <sup>76</sup> ).....	39
Figure I 14 : Monomères optiques de l'acide lactique (acide L-lactique et acide D-lactique).....	39
Figure I 15 : Structures des stéréoisomères du lactide : (A) L-lactide ; (B) D-lactide ; (C) meso-lactide .....	40
Figure I 16 : Voie d'obtention de polyglycolide.....	41
Figure I 17 : Oxidation de cyclohexanol en acide adipique par l'acinetobacter (figure adaptée de Labet et al. <sup>95</sup> ).....	42
Figure I 18 : Production de l' $\epsilon$ -caprolactone à partir de cyclohexane (figure adaptée de Labet at al. <sup>95</sup> ).....	42
Figure I 19 : Synthèse de 2-oxepanedione .....	46
Figure I 20 : Synthèse de $\alpha$ -iodo- $\epsilon$ -caprolactone .....	47
<b>Figure I 21</b> : Synthèse de l' $\alpha$ -( $\gamma$ - $\epsilon$ -caprolactone)- $\omega$ -methoxy-poly(ethylene oxide)(figure adaptée de Rieger et al. <sup>128</sup> ).....	48
Figure I 22 : Synthèse des diesters cycliques à partir d'un $\alpha$ -hydroxy acide (figure adaptée de Pounder et al. <sup>135</sup> ).....	49
Figure I 23 : Synthèse des monomères cycliques à partir d'acide aminé (figure adaptée de Gerhardt et al. <sup>136</sup> ) Conditions : (i) NaNO <sub>2</sub> , TFA, H <sub>2</sub> O, 25°C, 6 h ; (ii) NaNO <sub>2</sub> , aq. KHSO <sub>4</sub> ,	

0-25°C, 3 h ; (iii) 75°C, 6h; (iv) DIEA, Et <sub>2</sub> O, 0-40°C, 12 h; (v) KI, acetone, 65°C, 12 h ; (vi) DIEA, acetone, 75°C, 10 h.....	49
Figure I 24 : Synthèse de polyesters fonctionnels à partir de dilactones fonctionnelles (figure adaptée de Gerhardt et al. <sup>136</sup> ) .....	50
Figure I 25 : Synthèse de 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione (4). Conditions : (i) Zn/THF/Et <sub>2</sub> O, 0°C, 15 h, (ii) H <sub>2</sub> O, 100°C, 72 h, (iii) DMPA, bromure de bromoacétyle, Et <sub>3</sub> N, DCM, RT, 16 h et (iv) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , DMF, RT, 16 h. (figure adaptée de Coumes et al. <sup>142</sup> ) .....	50
Figure I 26 : Aminolyse de la PCL avec le 1,6-hexanediamine (figure adaptée de Zhu et al.) <sup>149</sup> .....	52
Figure I 27 : Modification de PCL par activation anionique .....	54
Figure I 28 : PCL modifiée par (i) méthyl, (ii) 1-méthyl-1-hydroxybenzyl et (iii) acide carboxylique.....	54
Figure I 29 : Synthèse de PCL-g-PEG après une activation anionique de la PCL .....	55
Figure I 30 : Propargylation en surface de PLA (figure adaptée de Sardo et al. <sup>165</sup> ).....	56
Figure I 31 : Représentation de la réaction de CuAAC .....	58
Figure I 32 : Modification photochimique en surface des fibres de PCL (figure adaptée de Kim et al. <sup>184</sup> ) .....	60
Figure I 33 : Génération de carbène à partir de diazirine (figure adaptée de Mogal et al. <sup>189</sup> ).....	62
Figure I 34 : Greffage de lysine sur PCL-b-PEG à travers un clip (figure adaptée de Pourcelle et al. <sup>191</sup> ) .....	63
Figure I 35 : Mécanisme de la réaction thiol-yne .....	64
Figure I 36 : Stratégie de modification de PLA en surface par voie thiol-yne (figure adaptée de Sardo et al. <sup>165</sup> ) .....	65
Figure I 37 : Différentes architectures des copolymères : a) copolymères à blocs, b) copolymères greffés, c) copolymères étoiles, d) copolymères hyperbranchés, et e) copolymères dendritiques. ....	66
Figure I 38 : Etoile PCL-PEG à cœur dendrimère PAMAM (figure adaptée de Wang et al. <sup>237</sup> ) .....	72
Figure I 39 : Stratégies de synthèse des copolymères greffés à squelette PCL .....	73

Figure I 40 : Synthèse de PEAG-g-PCL (figure adaptée de Li et al. <sup>241</sup> ) .....	74
Figure I 41 : Copolymérisation de $\epsilon$ CL et $\gamma$ PEO.CL (poly( $\epsilon$ CL-co- $\gamma$ PEO.CL)).....	76
Figure I 42 : Structure de PDMAEMA-g-PCL (figure adaptée de Mespouille et al. <sup>243</sup> )..	76
Figure I 43 : Structure de poly(PEO-alt-PCL).....	77
Figure I 44 : caprolactone-co-(valérolactone-g-PEG) .....	78
Figure I 45 : PCL-g-PEG par voie alcyne-azoture (figure adaptée de Zhang et al. <sup>245</sup> ) ....	79

## Chapitre II-2

Figure II-2 1 : Gel fraction of UV-crosslinked PCL / propargylated PCL mixes with or without photoinitiator as a function of propargylated PCL content. ....	110
Figure II-2 2 : Swelling of UV-crosslinked PCL / propargylated PCL mixes with or without photoinitiator as a function of propargylated PCL content. ....	110
Figure II-2 3 : TGA thermograms of non-modified PCL, propargylated PCL and UV-crosslinked propargylated PCL with or without photoinitiator. ....	112
Figure II-2 4 : Melting temperature and melting enthalpy (measured by DSC) of propargylated PCL and UV-crosslinked propargylated PCL with or without photoinitiator.....	113
Figure II-2 5 : Mechanical tensile properties of UV-crosslinked PCL / propargylated PCL mixes with or without photoinitiator as a function of propargylated PCL content. ....	115
Figure II-2 6 : In vitro proliferation of L929 cells on TCPS positive control and UV-crosslinked propargylated PCL with or without photoinitiator. ....	115

## Chapitre II-4

Figure II-4 1 : <sup>1</sup> H NMR (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) spectrum of PCL-g-PEG <sub>1.15</sub> .....	138
Figure II-4 2 : SEC traces of PEG-SH (blue line), PCL-yne (green line) and PCL-g-PEG <sub>1.15</sub> (red line).....	138
Figure II-4 3 : DLS spectra of self-assembling nanospheres obtained from PCL-g-PEG <sub>0.10</sub> (plain line) and micelles obtained from PCL-g-PEG <sub>1.15</sub> (dashed line). ....	142
Figure II-4 4 : Plot of the intensity ratios (I <sub>384</sub> /I <sub>373</sub> from pyrene emission spectra) as a function of concentration for self-assembling micelles in aqueous media from PCL-g-PEG <sub>1.15</sub> . ....	144

Figure II-4 5 : Visual aspect of curcumin solutions (a) without copolymer, (b) within PCL-g-PEG micelles using conditions (b) Ultra-Turrax stirring (Table II-4 2 entry 2) or (c) magnetic stirring (Table II-4 2 entry 1)..... 146

Figure II-4 6 : Cumulative curcumin release from PCL-g-PEG<sub>1.15</sub> micelles (PBS, pH = 7.4, Tween 80 0.1%w/v; ascorbic acid 0.6wt%). Data are expressed as means ± SD and correspond to measurements in triplicate. .... 147

### Chapitre III-2

Figure III-2 1 : Degradation of PCL-g-PEG copolymers in PBS (pH 7.4, 37°C) with a) EG/CL = 1.2 and b) EG/CL = 5.4 (SEC analyses were run in THF) ..... 175

Figure III-2 2 : Dosy-NMR spectra of PCL-g-PEG<sub>0.7k<sub>1.2</sub></sub> as a function of the degradation time in PBS (pH = 7.4) at 37°C. (DMSO<sub>d6</sub>, 600 MHz, black crosses correspond to DMSO and water) ..... 176

Figure III-2 3 : Cumulative release of curcumin from PCL-g-PEG nanoaggregates as a function of EG/CL ratio. Inset corresponds to the comparison between PCL-g-PEG<sub>2k<sub>2.6</sub></sub> and PCL-*b*-PEG<sub>5k<sub>2.6</sub></sub> copolymers. (Data are expressed as means ± SD and correspond to measurements in triplicate). .... 181

Figure III-2 4 : Dose dependence viability of MCF-7 cells after 24h treatment (a) with blank nanoaggregates (concentration of nanoaggregates corresponds to the quantity required to encapsulate the determined dose of curcumin in the range 0.18 to 18µg/mL) and (b) with free curcumin (squares) or curcumin loaded PCL-g-PEG<sub>0.7k<sub>1.2</sub></sub> nanoaggregates (diamonds). (concentrations corresponds to µg/mL of curcumin in the culture medium and data are expressed as means ± SD and correspond to measurements in triplicate)..... 182

Figure III-2 5 : *In vitro* cell cytotoxicity of curcumin and curcumin-loaded nanoaggregates as a function of the PCL-g-PEG copolymer amphiphilicity after (a) 24 h and (b) 48 h. (Data are expressed as means ± SD and correspond to measurements in triplicate)..... 183

### Chapitre III-4

Figure III-4 1 : Uptake of PCL-g-(PEG-cRGD) copolymers in three cell-lines as a function of the cRGD amount and of the EG/CL ratio (a) after 2 hours of incubation and (b) after 0.5 hour of incubation. (Data are expressed as mean values and correspond to measurements in duplicate).....	218
Figure III-4 2 : <i>In vitro</i> HEK293-β3 cells cytotoxicity of curcumin-loaded nanoaggregates as a function of the curcumin concentration after 48 h with (a) comparison between copolymers with same initial hydrophilicity with or without MMPcp moieties, and (b) influence of the number of MMPcp moieties in the copolymer. (Data are expressed as means ± SD and correspond to measurements in triplicate).....	220
Figure III-4 3 : <i>In vitro</i> HEK293-β3 cellular uptake of blank nanoaggregates after 48 h with (a) non-sheddable copolymer PCL-g-PEG <sub>2.0</sub> and (b) sheddable copolymer PCL-g-(MMPcp <sub>4.0</sub> -PEG <sub>1.8</sub> ) .....	221

### Chapitre III-5

Figure III-5 1 : Structure du copolymère sPEG-(NHCO)-PCL <sub>8</sub> .....	228
Figure III-5 2 : Analyses SEC de PEG-(NHCO)-(PCL <sub>17</sub> ) <sub>8</sub> et PEG-(NHCO)-(PCL <sub>17</sub> ) <sub>8</sub> -Pg <sub>x</sub> .....	230
Figure III-5 3 : Quelques intermédiaires formées durant l'activation anionique par le LDA .....	231
Figure III-5 4 : Analyse SEC PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> ,PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> -Pg <sub>8%</sub> et PEG-(NHCO)-(PCL <sub>17</sub> ) <sub>8</sub> -Pg <sub>16%</sub> (Tableau III-5 3 ; copolymères 2, 4 et 5).....	232
Figure III-5 5 : RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ) de PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> et PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> -Pg <sub>16%</sub> (Tableau III-5 3 ; copolymères 2 et 5) .....	233
Figure III-5 6 : RMN 1H (DMSO) de a) PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> -Pg <sub>16%</sub> (Tableau III-5 3 ; copolymère 5) et b) PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> -benzyl mercaptan <sub>30%</sub> (Tableau III-5 4 ; copolymère 2) .....	235
Figure III-5 7 : Chromatogrammes de sPEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> , sPEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> -Pg <sub>16%</sub> (Tableau III-5 5 ; copolymère 3) et sPEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> -benzyl mercaptan (Tableau III-5 6 ; copolymère 2).....	236

## Chapitre IV

Figure IV 1 : Fonctionnalisation des fibres PLA .....	239
Figure IV 2 : Modification de surface de PLA .....	240
Figure IV 3 : Fibres non modifiées (a) et fibres propargylées (b) dans un mélange Et <sub>2</sub> O/THF : 95/5 .....	241
Figure IV 4 : Fibres ( a) Non propargylées ; b) propargylées dans un mélange Et <sub>2</sub> O/THF : 95/5) puis couplées avec des FITC-N <sub>3</sub> par CuAAC .....	242
Figure IV 5 : a) Fibres non modifiées et b) fibres propargylées dans Et <sub>2</sub> O.....	243
Figure IV 6 : Chromatogrammes de PLA non modifié et PLA propargylé dans Et <sub>2</sub> O ..	243
Figure IV 7 : Fibres propargylées dans Et <sub>2</sub> O puis couplées avec des FITC-N <sub>3</sub> par CuAAC (a) image microscope optique ; b) image par microscope optique de fluorescence).....	244
Figure IV 8 : Image électronique de SPIONs .....	245
Figure IV 9 : Fibres propargylées et couplées avec des SPIONs (lot 1) a) 5 min ; b) 10 min ; fibres contrôles non propargylées ayant subi le même traitement c) 5 min ; d) 10 min .....	246
Figure IV 10 : Fibres propargylées et couplées avec des SPIONs, conditions dans le tableau 2 ; lot 2 :a) essai 1, b) essai 2, c) essai 3 ; (lot 3) : d) essai 4; e) essai 5 .....	248
Figure IV 11 : Fibres propargylées et couplées avec des NPs thiolés, conditions dans le tableau 2, a) sans TCEP : essai 3 ; b) avec TCEP : essai 4.....	249
Figure IV 12 : Fibres propargylées et couplées avec des NPs thiolés a) essai 3, lot 2, spectre 47 ; b) essai 4 ; lot 2 en présence de TCEP), zone avec un cadre rouge : analysée par EDX.....	250
Figure IV 13 : Analyse élémentaire de surface réalisée par EDX a) Spectre 47 ; essai 3 ; lot 2 ; b) Spectre 15 ; essai 4 ; lot 2 en présence de TCEP .....	251
Figure IV 14 : Synthèse de FITC-N <sub>3</sub> .....	252

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre I

Table I 1 : Exemples des polyesters aliphatiques .....	37
Table I 2 : Exemples de monoesters cycliques à fonctionnalité intra-cycle .....	47
Table I 3 : Exemples de monoesters cycliques à fonctionnalité extra-cycle .....	48
Table I 4 : Caractérisations des copolymères PCL-b-PEG.....	68
Table I 5 : Taux de charge (drug loading, DL) et efficacité d'encapsulation (EE) de PCL <sub>1000</sub> -PEG <sub>4000</sub> -PCL <sub>1000</sub> encapsulant trois PA (cisplatine, doxorubicine et 5-fluorouracil) et leurs CI <sub>50</sub> sur 2 types de cellules cancéreuses (T47D et MCF7) .....	70
Table I 6 : Caractérisation des NPs PEAG-g-PCL .....	74
Table I 7 : Propriétés des copolymères amphiphiles PCL-g-PEG .....	79

### Chapitre II-4

Table II-4 1 : Thiol-yne coupling of PEG-SH on PCL-yne.....	141
Table II-4 2 : Encapsulation efficiency and drug loading for curcumin loaded PCL-g-PEG <sub>15</sub> micelles as a function of curcumin/polymer ratio and stirring. ....	145

### Chapitre III-2

Table III-2 1 : Synthesis of PCL-g-PEG with controlled composition using PCL-yne and PEG-SH.....	170
Table III-2 2 : Grafting number, critical aggregation concentration (CAC) and size of blank nanoaggregates as a function of copolymer composition. ....	172
Table III-2 3 : Encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) of various APIs..	177
Table III-2 4 : Curcumin encapsulation efficiency (EE), drug loading (DL) and sizes of nanoaggregates as a function of PCL-g-PEG copolymer amphiphilicity.....	179

### Chapitre III-4

Table III-4 1: Conditions for the synthesis of PCL-g-(PEG-cRGD) by thiol-yne photoaddition .....	213
Table III-4 2: Characterization of PCL-g-(PEG-cRGD) copolymers and their nanoaggregates.....	214



Table III-4 3 : Conditions for the synthesis of PCL-g-(MMPcp-PEG) by thiol-yne photoaddition .....	215
Table III-4 4 : Characterization of PCL-g-(MMPcp-PEG) blank and curcumin-loaded nanoaggregates.....	216

### **Chapitre III-5**

Tableau III-5 1 : Propargylation de PEG-(NHCO)-(PCL <sub>17</sub> ) <sub>8</sub> dans le THF.....	229
Tableau III-5 2 : Propargylation de PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> et de PEG <sub>5000</sub> -b-PCL <sub>2000</sub> dans le THF .....	230
Tableau III-5 3 : Propargylation de PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> et de PEG <sub>5000</sub> -b-PCL <sub>2000</sub> dans le toluène.....	232
Tableau III-5 4 : Couplage de PEG-(NHCO)-(PCL <sub>x</sub> ) <sub>8</sub> -Pg et de benzyl-mercaptan .....	235

### **Chapitre IV**

Tableau IV 1 : Conditions de propargylation des fibres PLA .....	241
Tableau IV 2 : Analyse élémentaire de SPIONs.....	245
Tableau IV 3 : Couplage thiol-yne entre des fibres PLA-Pg et des SPIONs (lot 1).....	246
Tableau IV 4 : Couplage thiol-yne entre des fibres PLA-Pg et des SPIONs (essais 1, 2, 3, 4 : lot 2 ; essais 5, 6 : lot 3) .....	247
Tableau IV 5 : Analyse élémentaire de surface réalisée par EDX : SPIONs ; Couplage PLA-Pg et SPION : essai sans TCEP (Spectre 47, essai 3, lot 2), essai avec TCEP (Spectre 15, essai 4, lot 2) .....	251

## GLOSSAIRE

### Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Al(OiPr) <sub>3</sub>	Isopropylate d'aluminium
ARN	Acide ribonucléique
ATDC5	Teratocarcinoma cells line
ATRP	Polymérisation radicalaire par transfert d'atome
A549	Cellules épithéliales basales alvéolaires humaines
Bu <sub>2</sub> SnO	Oxyde dibutyléthain
CAC	Concentration d'agrégation critique
CMC	Concentration micellaire critique
c-(RGDfV)	Cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)
CuAAC	Cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I)
Cur	Curcumine
DCM	Dichlorométhane
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMPA	2,2-Diméthoxy-2-phénylacétophénone
Dox	Doxorubicine
DTT	Dithiothréitol
DL	Charge de médicament (Drug loading)
EDX	Energy dispersive X-ray spectroscopy
EE	Efficacité d'encapsulation (Encapsulation efficiency)
EG	Ethylène glycol
EO	Ethylène oxyde
EPR	Effet de perméabilité et de rétention tissulaire amélioré (Enhanced Permeability and Retention Effect)
EtOH	Ethanol
Et <sub>2</sub> O	Ether diéthylique
Et <sub>3</sub> N	Triéthylamine
FA	Acide folique

FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (U.S. Food and Drug Administration)
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GA	Acide glycolique
Gd <sup>3+</sup>	Ion gadolinium
GPC	Chromatographie d'exclusion stérique (Gel Permeation Chromatography)
GSH	Glutathion
ICGM	Institut Charles Gerhardt Montpellier
ICl	Chlorure d'iode
IMNO	L'équipe « Ingénierie Moléculaire et Nano Objets »
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KOH	Hydroxyde de potassium
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LiAlH <sub>4</sub>	Tétrahydroaluminate de lithium
LNCaP	Lymph Node Cancer of the Prostate
L929	Lignée cellulaire de fibroblaste de souris
MCF-7	Human mammary gland adenocarcinoma cell line
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MeOH	Méthanol
MPEG	Monométhoxy-polyéthylène glycol
MMPcp	peptide clivable par les métalloprotéases de la matrice extracellulaire
NCA	<i>N</i> -carboxyanhydride
NPs	Nanoparticules
PA	Principe actif
PAA	Polyaspartate
PAMAM	Polyamidoamine
PEI	Polyéthylènimine
Pep	Peptide
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline)
PC3	Human prostate adenocarcinoma cell line

PCL	Poly( $\epsilon$ -caprolactone)
PDLA	Poly(D-lactide)
PDLLA	Poly(D,L-lactide)
PDMAEMA	Poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)
PEEP	Poly(éthyle éthylène phosphate)
PEG	Poly(éthylène glycol)
PgBr	Bromure de propargyl
PGA	Poly(glycolide)
pH	Potentiel hydrogène
PhCH <sub>2</sub> OH	Alcool benzylique
PHPMA	Poly(2-hydroxypropyl methacrylate)
PLA	Poly(lactide)
PLGA	Poly(lactide- <i>co</i> -glycolide)
PLLA	Poly(L-lactide)
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
POC	Polymérisation par ouverture de cycle
PVGLIG	Prolyne-Valyne-Glycine-Leucine-Isoleucine-Glycine
PXT	Paclitaxel
P4VP	Poly(4-vinylpyridine)
RGD	Arginine-glycine-acide aspartique
RMN	Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire
S	Star copolymer
Saos-2	Lignée de cellules d'ostéosarcome humain (Human Osteosarcoma cell line)
Sn(Oct) <sub>2</sub>	Ethylhexanoate d'étain
Sn(OTf) <sub>2</sub>	Trifluoromethanesulfonate d'étain
SPIONs	Super paramagnetic iron oxide nanoparticles
SRE	Système réticuloendothélial
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
T47D	Human ductal breast epithelial tumor cell line
293T	Cellules souches de rein embryonnaire humain

4T1	Cellules de tumeur du sein de souris
V	Volume

**Notations**

Mn	Masse molaire moyenne en nombre
Mw	Masse molaire moyenne en masse
Tg	Température de transition vitreuse
Đ	Dispersité des masses molaires

## INTRODUCTION GENERALE

---

L'utilisation des biomatériaux polymères dans des applications médicales a connu une gigantesque augmentation au cours des dernières décennies. On les trouve dans un grand nombre de domaines allant des systèmes de délivrance des médicaments (poly(vinylpyrrolidone), dérivés polyméthacryliques, poly(lactide) (PLA) etc...) aux implants et matrices pour ingénierie tissulaire (collagène, acide hyaluronique, PLA etc...), aux matériaux dentaires (hydrocolloïdes, résines acryliques), aux sutures et soins de plaies (polyéthylène glycol, Vicryl®, méthyl cellulose etc...)¹.

Ils peuvent être classés en polymères synthétiques (bio)dégradables ou non, et polymères d'origine naturelle. Les polymères (bio)dégradables synthétiques sont divisés en produits issus de biotechnologies, qui sont synthétisés à partir des biomonomères (cas des polylactides), et des produits obtenus de la pétrochimie par synthèse conventionnelle (cas de la poly( $\epsilon$ -caprolactone) et des copolyesters aromatiques). De manière similaire, les polymères d'origine naturelle ont aussi deux origines, ceux extraits de la biomasse tels que les polysaccharides (amidon, cellulose, chitosane) et les protéines (animales et végétales), et les polymères extraits des microorganismes (polyhydroxyalcanoates PHA, chitosane)².

L'intérêt porté aux biomatériaux (bio)dégradables s'explique par le fait qu'ils peuvent se dégrader *in vivo* par voie enzymatique et/ou non enzymatique. Dans le cadre de leur utilisation dans le domaine médical, ils doivent en plus être biocompatibles. La biocompatibilité a connu plusieurs définitions, parmi lesquelles la définition donnée par Williams en 2008. Elle est définie comme « la capacité d'un matériau à remplir la fonction souhaitée dans le cadre d'un traitement médical, sans provoquer d'effet indésirable chez le bénéficiaire de la thérapie d'une part, et d'autre part tout en générant la réponse cellulaire ou tissulaire la plus appropriée, et en entraînant une performance clinique améliorée³ ». Cela inclut entre autres que les biomatériaux ne doivent pas provoquer d'effets toxiques dans les tissus. En outre, les produits de dégradation ne

doivent pas interférer ou affecter les tissus<sup>4</sup>. De ce fait, les produits de dégradation doivent être eux-mêmes biocompatibles, non toxiques, et éliminables par voies métaboliques.

Les polyesters aliphatiques, développés depuis plus de 40 ans pour des applications médicales (tableau 1)<sup>5</sup>, rassemblent tous ces avantages et seront l'objet de l'étude bibliographique qui suit. Après une première partie décrivant les grandes stratégies mises en place pour la délivrance de principes actifs, en particulier en oncologie, on s'intéressera plus spécifiquement aux polyesters aliphatiques et à leurs modifications. On terminera enfin cette étude bibliographique par une étude des stratégies d'obtention des copolymères amphiphiles en se limitant à ceux contenant des blocs PCL.

**Tableau 1 :** Applications biomédicales des polyesters aliphatiques<sup>5</sup>

Polymères	Applications médicales
Poly(glycolide)	Suture
Poly(acide-L-lactique-co-acide glycolique)	Suture, implants orles, fixation de fractures, microsphères pour délivrance des médicaments
Poly(L-lactide)	Fixation des fractures
Poly(acide-L-lactique-co-ε-caprolactone)	Suture
Poly(ε-caprolactone)	Implants de délivrance de contraceptifs, suture, fixation des fractures
Poly(orthoester)	Implants de délivrance de contraceptifs

**CHAPITRE I**  
**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---



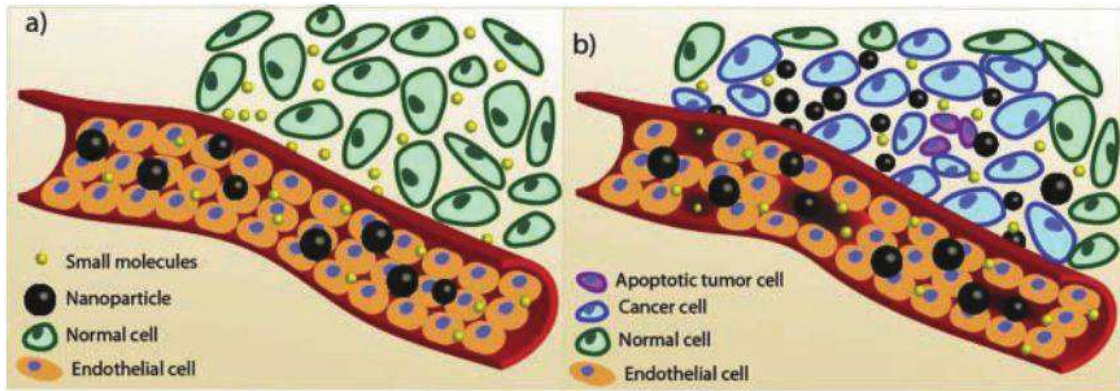
## ***1. Applications des copolymères amphiphiles pour la libération de principes actifs***

### ***1.1. Généralités sur la libération de PA en oncologie***

Un des domaines majeurs d'utilisation des copolymères amphiphiles est l'oncologie. Les traitements oncologiques reposent en effet essentiellement sur la combinaison de chimiothérapie et de radiothérapie. La chimiothérapie conventionnelle consiste en l'administration des médicaments anticancéreux conduisant à une distribution non spécifique dans tout le corps, et par conséquent à la destruction non différenciée des tissus cancéreux et des tissus sains<sup>6-7</sup>. La radiothérapie sert à traiter les cancers de façon locorégionale, en utilisant des radiations qui détruisent les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier. Les rayonnements administrés à de fortes doses détruisent les cellules cancéreuses en endommageant l'ADN des gènes de la zone traitée. Ces rayonnements peuvent avoir des effets secondaires sur le patient tels que la fatigue, le changement cutané de la partie traitée, la perte des cheveux ou des poils sur la partie traitée, l'anxiété ou la dépression<sup>8</sup>.

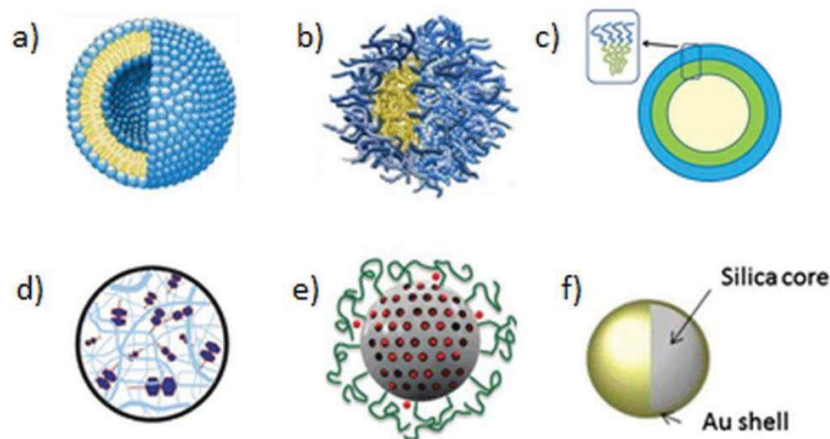
Dans le but d'améliorer la spécificité de délivrance des médicaments avec un minimum d'effets secondaires, des systèmes à base de nanomatériaux pour diagnostiquer et traiter le cancer ont été développés. Ces nanosystèmes peuvent être liés de façon covalente aux agents thérapeutiques (mPEG-PLA-SS-Cur)<sup>9</sup> ou les encapsuler.

Ces nanosystèmes présentent plusieurs avantages par rapport aux petites molécules conventionnelles et aux nanosystèmes de très faibles tailles. Par exemple les molécules conventionnelles peuvent diffuser à travers l'endothélium normal vers les tissus sains et avoir des effets secondaires sur ces derniers (Fig. 1). De même, si les nanosystèmes ont des diamètres inférieurs à 6 nm, ils peuvent s'extravaser dans les tissus sains diminuant ainsi la chance de PA d'atteindre la cible thérapeutique<sup>10-11</sup>.



**Figure 1 1 :** Différence entre tissu sain et tissu cancéreux. (a) Dans les tissus normaux, seules les petites molécules diffusent à travers les cellules endothéliales ; (b) dans la tumeur, les macromolécules et les nanoparticules diffusent dans les tissus grâce à des défauts de vascularisation (figure adaptée de Barreto et al.<sup>12</sup>).

Parmi les nanosystèmes destinés à traiter le cancer, on peut citer : les liposomes<sup>13</sup>, les micelles polymériques et les vésicules<sup>14-15</sup>, les nanogels<sup>16</sup>, les nanoparticules inorganiques<sup>17</sup> et les nanoparticules hybrides organiques/inorganiques<sup>12</sup> (Fig. 2). Ces systèmes ont la capacité d'optimiser les caractéristiques pharmaceutiques et pharmacologiques de médicaments. En outre, ils peuvent prolonger le temps de circulation sanguine, ce qui favorise l'effet de perméation et rétention (effet EPR, voir 1.3) au niveau des tissus tumoraux.



**Figure 1 2 :** a) liposome ; b) micelle ; c) vésicule polymérique (PEG-PLA<sup>18</sup>) ; d) hydrogel (PNIPAAm : poly(N-isopropylacrylamide) non dégradabile (changement de volume et libération dépendant de la température)<sup>19</sup> ; e) nanoparticule hybride (poly(L-histidine/silice mésoporeuse/DOX)<sup>20</sup> ; f) nanoparticule inorganique (pour les recherches sur le cancer du sein)<sup>21</sup>.

Parmi les systèmes cités, les micelles polymères à blocs sont utilisées fréquemment grâce à plusieurs caractéristiques. Tout d'abord, elles peuvent s'auto-organiser sous plusieurs formes telles que des sphères, des lamelles ou des vésicules lorsqu'elles sont mises en milieu aqueux<sup>22-23</sup>. Ensuite, en comparant ces systèmes aux liposomes par exemple, on trouve que :

- Les micelles ont une stabilité plus élevée, même à faible concentration, grâce à leur faible concentration micellaire critique (CMC).
- La taille et la morphologie des micelles peuvent être contrôlées selon l'application visée.
- Il est possible de concevoir et de préparer des copolymères afin d'incorporer des fonctionnalités aux micelles telles que le caractère furtif (stealthness), une capacité d'évasion endosomale, ou de les rendre visibles par imagerie<sup>24-25</sup>.

Les micelles à base de copolymères amphiphiles à blocs sont donc utilisées comme des systèmes nanotransporteurs de médicaments mais aussi de gènes pour les thérapies géniques ou d'agents d'imagerie pour le diagnostic. Elles permettent en outre de surmonter les multirésistances aux médicaments qui se développent durant le traitement et qui ont comme résultat de diminuer l'efficacité thérapeutique<sup>26-27</sup>. A ce titre, il est d'ailleurs intéressant de noter que deux copolymères sont en cours d'évaluation clinique à différentes phases: le Genexol-PM (PEG-*b*-PLA) et le NK105 (PEG-*b*-PAA). Ces deux composés sont destinés à délivrer le paclitaxel. Le Genexol-PM est déjà approuvé par la FDA et le NK105 est en troisième phase d'essais cliniques<sup>28</sup>.

Les copolymères amphiphiles classiques représentent la deuxième génération des systèmes de délivrance des médicaments. Avant de présenter les vecteurs de troisième génération il est nécessaire d'expliquer et schématiser les trois générations classiquement.

### ***1.2. Développement des générations de systèmes de délivrance des PA***

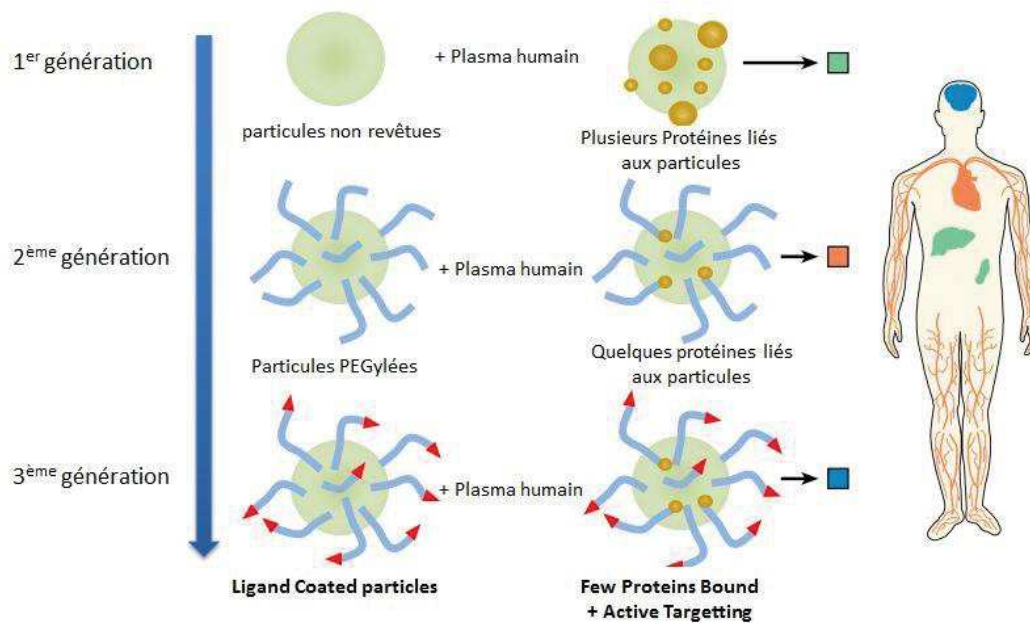
Les systèmes de délivrance des PA ont subi de nombreux développements dans les dernières décennies (Fig. 3). La première génération est formée de nanoparticules nues, souvent hydrophobes (PLGA, PLA etc..) qui sont facilement reconnues par les

macrophages et stockées puis éliminées par le foie et la rate. Ces particules sont captées par le système réticuloendothélial (SRE) par suite des interactions de ces objets avec les protéines du plasma, les opsonines, suivies par une élimination par phagocytose.

Pour éviter cette élimination, une deuxième génération de nanoparticules a été synthétisée. Ces nanoparticules sont décorées par des polymères hydrophiles et biocompatibles tel que le polyéthylène glycol (PEG), le poly(2-hydroxypropyl methacrylate) (PHPMA), la poly(methyloxazoline) ou la poly(carboxybetaine) pour donner des caractéristiques de furtivité aux particules dans le sang. Dans ce qui suit, on ne s'intéressera qu'aux particules PEGylées. Les PEG forment une couronne hydrophile qui améliore la solubilisation des particules et assure leur protection vis-à-vis du SRE en offrant un caractère « furtif » à ces dernières, ce qui entraîne une diminution de l'opsonisation<sup>29-30</sup>. Le PEG augmente le temps de circulation dans le sang et ce d'autant plus que le degré de fonctionnalisation est important<sup>31-32</sup>. La taille des nanoparticules est aussi un facteur important qui affecte le temps de circulation, il est considéré que la taille optimale du point de vue de la circulation est d'environ 50 nm<sup>33</sup>. L'augmentation du temps de circulation sanguine et l'optimisation des tailles des nanoparticules favorisent l'accumulation de ces dernières au niveau des cellules tumorales grâce à l'effet EPR. Cet effet est expliqué dans la partie suivante (paragraphe 1.3). L'accumulation des nanoobjets est nommée ciblage passif quand ces objets restent bloqués au niveau des cellules cancéreuses. Cela peut se faire en mettant un lien clivable entre les chaînes PEG et le polymère hydrophobe. Ce type d'objets est qualifié de « unweiling particles » ou « sheddable particles » que l'on pourrait traduire par « particules dévoilables » ou « particules démasquables ». Ce concept sera développé dans le paragraphe 1.4.

Pour continuer, et dans le but de favoriser cette accumulation via un ciblage actif, la troisième génération de vecteurs a été créée. Le ciblage repose ici sur l'affinité entre un ligand lié aux particules et un récepteur au niveau cellulaire et il est discuté dans le paragraphe 1.5. L'effet EPR, le ciblage passif et le ciblage actif se font grâce aux différences existant entre les tissus normaux et cancéreux en termes de microstructures (anomalies vasculaires)<sup>34-35</sup>, de propriétés physico-chimiques (faible acidité,  $\text{pH} \approx 6.8$ )<sup>36</sup>, de gradients anormaux des température<sup>37-38</sup>, et de surexpression de protéines et d'enzymes<sup>39-40</sup>.

Ces stratégies font l'objet des paragraphes suivants.



**Figure I 3 :** Biodistribution des NPs en fonction de leur type. 1<sup>er</sup> génération : particules non hydrophilisées détectées par les protéines de SRE et éliminées au niveau de le foie et la rate ; 2<sup>ème</sup> génération : particules PEGylées avec peu d'opsonisation, circulation sanguine plus longue ; 3<sup>ème</sup> génération : particules PEGylées et possédant des ligands pour des récepteurs spécifiques (adaptée de Aggarwal et al.<sup>41</sup>)

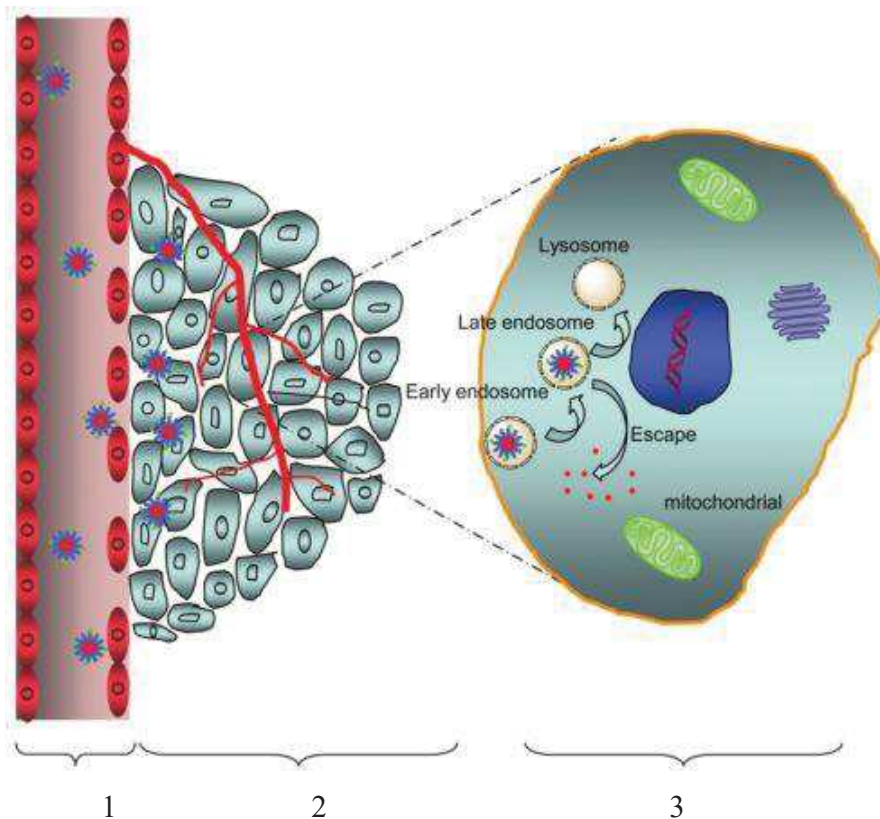
### 1.3. Stratégies de l'accumulation des nanoparticules par effet EPR

L'acronyme EPR signifie « Enhanced Permeability and Retention », ou « effet de perméabilité et de rétention tissulaire amélioré ». Pour comprendre cet effet EPR, il faut tout d'abord faire une introduction descriptive du cancer. C'est une pathologie caractérisée par la présence de tumeurs formées à partir d'une cellule initialement normale. Il se traduit par une transformation des propriétés physiques normales qui préservent l'homéostasie cellulaire. Cette dernière maintient une balance entre la mort et la réparation cellulaire. Mais elle est altérée dans le cas de tumeurs, où il y a une réduction de la mort cellulaire et une augmentation de la croissance cellulaire. Cette croissance rapide en nombre des cellules nécessite la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà existants par un processus d'angiogenèse. En effet, pour un volume tumoral de 1 à 2 mm<sup>3</sup>, les cellules reçoivent suffisamment de nutriments par diffusion. Puis les besoins en nutriments et en oxygène et la nécessité d'éliminer les déchets nécessitent la formation de nouveaux capillaires sanguins. Ces capillaires, au contraire des capillaires normaux, sont tortueux, chaotiques, dilatés, percés, ont des



diamètres irréguliers et subissent des détachements des péricytes (cellules localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires qui ont une fonction contractile des capillaires)<sup>42</sup>.

Cela a pour résultat de produire une hyperperméabilité pour la circulation des macromolécules et des nanoparticules, qui, après une circulation prolongée dans le sang, s'accumulent dans la tumeur grâce à ce phénomène d'EPR<sup>43</sup>(Fig. 4).



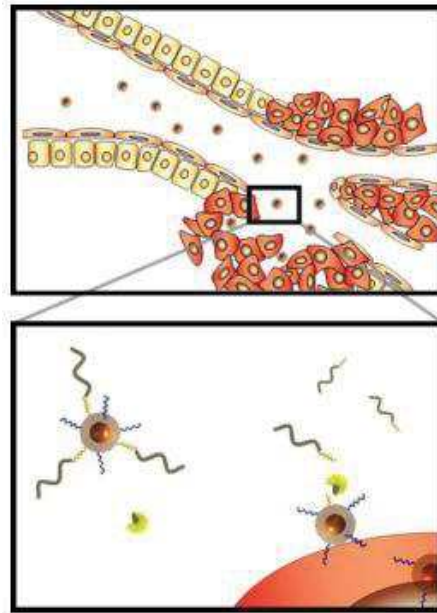
**Figure I 4** : Illustration schématique de la circulation des NPs dans les vaisseaux sanguins jusqu'à accumulation dans la tumeur par effet EPR puis internalisation avec libération de PA 1) Vaisseau sanguin : Longue circulation, effet EPR ; 2) Tissue tumorale : acidité faible (pH 6,8), température anormale, enzymes surexprimés (MMPs, glycosidase) ; 3) Cellule cancéreuse : pH plus faible (pH 4,5 ; 6,5) ; endolysosome (figure adaptée de Ge et al.<sup>44</sup>)

#### ***1.4. Stratégies de ciblage passif et stimuli-dépendance : les nanoparticules se dévoilent.***

On a déjà parlé de l'importance de la couronne hydrophile dans l'augmentation du temps de circulation et la diminution des interactions des particules avec les protéines du sang jusqu'à pénétration dans les tumeurs par EPR<sup>45</sup>. Une fois les particules dans la tumeur, la

couronne hydrophile devient inutile pour l'internalisation et la libération intra-cellulaire de leur contenu de manière efficace.

Les nanoparticules amphiphiles classiques ayant le PEG comme couronne hydrophile libèrent les PA d'une manière soutenue contrôlée par la diffusion. Il a été rapporté que dans certains cas la couronne PEG sert à moduler, voire ralentir, la libération de PA<sup>28</sup>. La perte de la couronne de PEG, *ie.* le démasquage des particules (Fig. 5), peut faciliter la libération de PA et l'internalisation par le biais d'interactions hydrophobes avec les membranes et/ou le processus de ciblage actif si cette perte s'accompagne d'une exposition de ligands initialement masqués par les chaînes de PEG<sup>46</sup>. De ce fait, afin de garantir la nature furtive offerte par les chaînes PEG puis faciliter la libération des PA grâce au dévoilement des particules<sup>46</sup>, des nanoparticules à couronnes clivables ont été développées. Ce démasquage peut être obtenu par l'incorporation de liaisons stimuli-sensibles dans le polymère, permettant une perte de la couronne hydrophile et un blocage physique des particules au niveau de la cible. Ces objets sont souvent regroupés sous la dénomination de « sheddable particles » ou « unveiling particles ».



**Figure I 5 :** Description schématique de dévoilement des particules par des MMP au niveau du cancer (figure adaptée de Harris et al.<sup>47</sup>)

Plusieurs stratégies sont décrites dans la littérature, parmi lesquelles la réduction de pont disulfure<sup>48</sup>, la dégradation d'une liaison sensible au pH (dégradation à faible pH de liaisons hydrazone, ester, etc...)<sup>49</sup> et le clivage d'un lien peptidique par une protéase<sup>50-47</sup>.

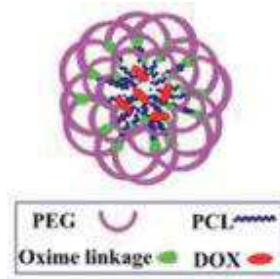
Plus en détails, parmi les polymères clivables, les polymères amphiphiles à block sensibles à la réduction des ponts disulfures ont montré une efficacité dans le transport intracellulaire des PA. Les ponts disulfure sont stables dans le milieu extracellulaire, mais ils sont réduits à l'intérieur des cellules humaines sous l'action de glutathion (GSH)<sup>51-52</sup>. La création d'une liaison disulfure entre les blocs hydrophiles et les blocs hydrophobes permet donc la formation de micelles clivables. L'un des premiers copolymères de ce type a été synthétisé par Wang *et al.*<sup>53</sup>. Le copolymère à blocs à base de poly(éthyle éthylène phosphate) et poly(caprolactone) (PEEP-SS-PCL) avec un pont disulfure a été utilisé pour libérer la DOX, et la libération rapide à concentration élevée de GSH produit un effet toxique sur les cellules A549.

On trouve ensuite les polymères sensibles au pH : le pH extracellulaire dans des sites pathologiques est inférieur au pH physiologique. C'est le cas pour les tissus tumoraux (le pH extracellulaire est de 6.5 à 7.2 et le pH endolysosomal est de 5.0 à 6.5)<sup>52</sup>, et les tissus inflammatoires. L'introduction de groupes fonctionnels hydrolysables à faible pH permet le détachement d'une partie de la structure polymère. Parmi ces groupes fonctionnels on cite les esters, les diorthoesters, les orthoesters, les acétals, les esters vinyliques et les hydrazones<sup>54</sup>. Voici à titre d'exemples quelques copolymères issus de la littérature disponible sur le sujet :

Ulbrich *et al.* ont synthétisé un système micellaire pour le transport de DOX à base d'un copolymère diblock formé de polyéthylène glycol-*b*-poly(allyl glycidyl ether) possédant des ponts hydrazone liés de façon covalente à la DOX. Après 24 h d'incubation, une libération plus rapide de la DOX a été montrée à pH 5 (43% à pH 5 vs 16% à pH 7.4)<sup>55</sup>. On trouve aussi des copolymères triblocs PCL-OPEG-PCL (polycaprolactone-oxime-poly(éthylène glycol)-oxime-polycaprolactone) (Fig. 6) ayant des liaisons oxime clivables à faible pH (pH = 5-6)<sup>56</sup>. Le clivage des liaisons oxime a été testé *in vitro* dans un tampon d'acétate à pH 5 pendant 12h. Un effritement de la structure micellaire et une



libération de DOX plus importante à pH 5 (80% contre 10% à pH 7.4) grâce à la perte de la partie hydrophile des micelles ont été observés.

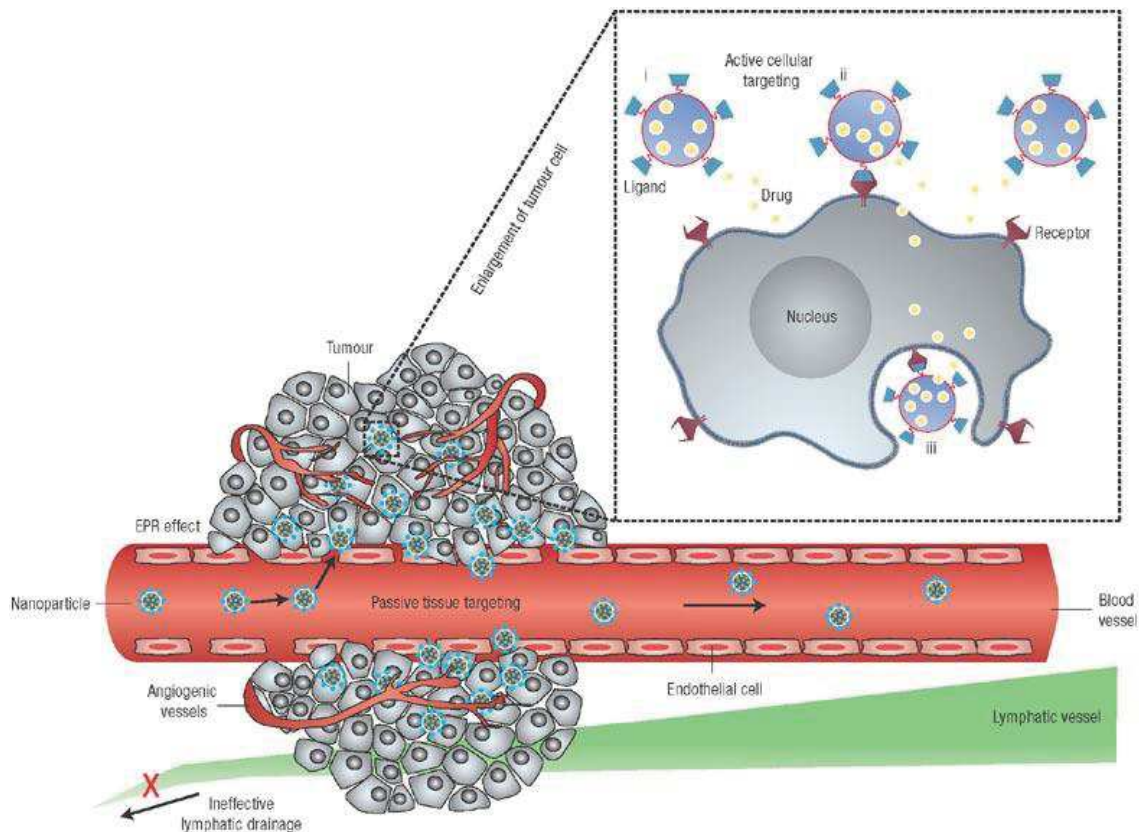


**Figure I 6 :** Schématisation d'une micelle PCL-OPEG-PCL (figure adaptée de Liu Chen et al.<sup>56</sup>)

Une troisième possibilité d'introduction de liaisons clivables est l'utilisation d'un peptide sensible aux métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPcp). Cette stratégie est moins développée et repose sur les différences qui existent entre les tissus tumoraux et les tissus normaux. L'insertion d'une chaîne peptidique clivable par des MMP surexprimées au niveau de tumeur a été reportée dans quelques publications. La synthèse de PCL-Pep-PEG ayant un peptide sensible aux gélatinases (PVGLIG) entre les 2 blocs a été synthétisée par Li *et al.* Une agrégation des nanoobjets préparés à partir de PCL-Pep-PEG a été montrée en présence de gélatinase, ce qui confirme la coupure des chaînes peptidiques. Outre cette agrégation, une internalisation plus importante des copolymères PCL-Pep-PEG par rapport aux diblocs PCL-*b*-PEG non clivables correspondants par des cellules exprimant plus de gélatinase (293T)<sup>57</sup>.

### ***1.5. Stratégies de « ciblage actif »***

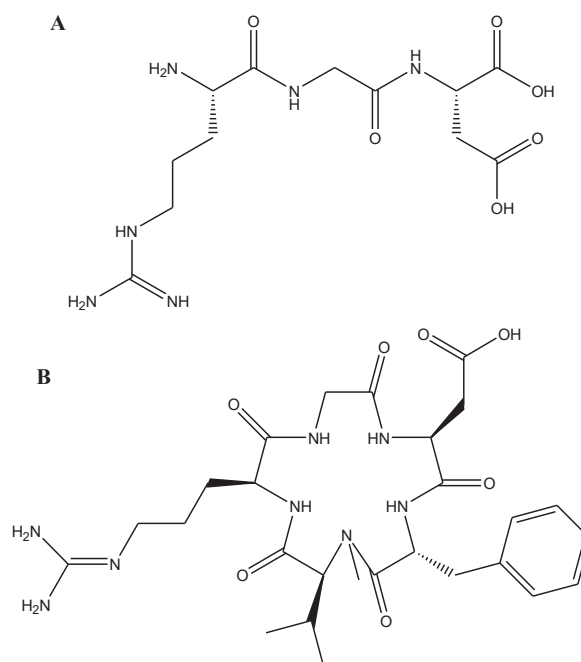
Afin de minimiser les effets secondaires liés à la toxicité des PA anticancéreux et d'augmenter la concentration de PA au niveau de cible afin de traiter de façon plus spécifique, des chercheurs ont créé des nanovecteurs de troisième génération. Ces nanovecteurs à base de polymères amphiphiles ont, en plus de la couronne hydrophile, des ligands spécifiques. La décoration des particules par des ligands spécifiques qui peuvent cibler des récepteurs (en particulier les intégrines) au niveau des certains tissus est nommé « ciblage actif » et permet l'accumulation des particules au niveau des tumeurs (Fig. 7)<sup>58</sup>.



**Figure I 7 :** Accumulation des NPs au niveau de tumeur suite à l'effet EPR et ciblage actif grâce à la fonctionnalisation des NPs par des ligands qui favorisent la reconnaissance spécifique par des récepteurs surexprimés au niveau des cellules cancéreuses. i) Les NPs peuvent libérer le PA à proximité de la cellule cible ; ii) attachement des NPs à la membrane et libération prolongée extracellulaire ; ou iii) internalisation dans la cellule (figure adaptée de Peer et al.<sup>59</sup>)

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques existant sur la surface cellulaire et composés des glycoprotéines transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$ , qui se connectent aux protéines dans la matrice extracellulaire (MEC) de façon non covalente. Il y a 18 sous-unités différentes de glycoprotéines  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  formant ainsi 24 récepteurs différents pour les ligands extracellulaires. Il a été montré qu'il y a une modification des intégrines au niveau des tumeurs. Cette modification induit une dysrégulation soit positive (si l'intégrine est active) soit négative (si l'intégrine n'est pas active)<sup>60</sup>. Ici on s'intéresse seulement aux intégrines  $\alpha\beta3$  reconnaissant la séquence peptidique arginine-glycine-acide aspartique (RGD) qui est un ligand classique<sup>61</sup>. Parmi les tumeurs exprimant les intégrines  $\alpha\beta3$ , on peut citer les cancers du sein, de la prostate, du pancréas, des ovaires et du col utérin.

La forme linéaire du RGD (Fig. 8A) n'a entraîné d'accumulation suffisante dans la tumeur dans des études cliniques<sup>62</sup>, cela est dû à la dégradation protéolytique et au changement de conformation réduisant ainsi l'affinité vis-à-vis des intégrines. Pour ces raisons une cyclisation a été introduite pour améliorer la stabilité et les propriétés de liaison en rigidifiant la structure. Quelques peptides cycliques ont été développés tels que le cyclopentapeptide c-(RGDfV) (Fig. 8, b) qui est un ligand sélectif pour les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ . Le cyclopentapeptide-RGD est utilisé pour la vectorisation des agents thérapeutiques et la détection de tumeurs<sup>63</sup>.

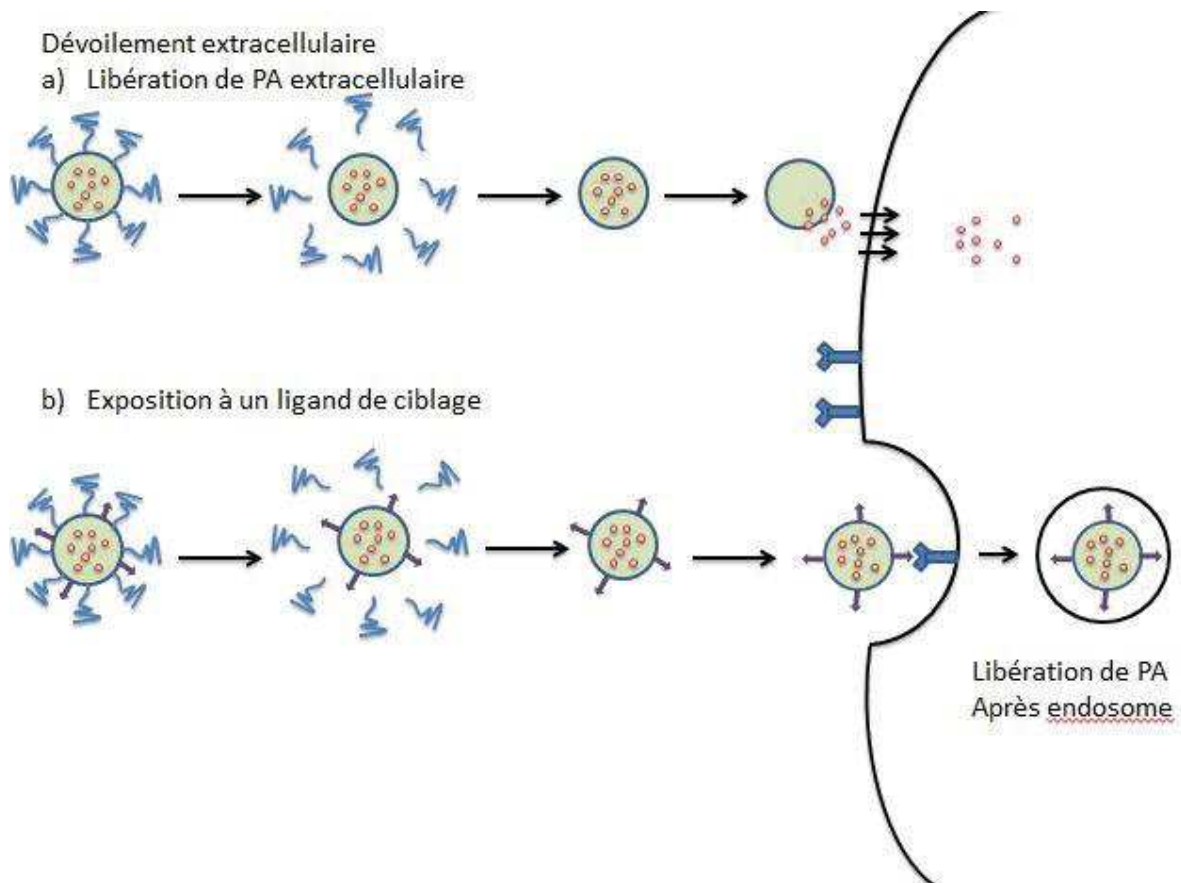


**Figure I 8 :** Structures chimiques basées sur le motif RGD. A : La séquence originale de RGD ; B : RGD cyclique ou cyclopentapeptide (c(RGDf[N-Me]V) qui est un ligand sélectif des intégrines  $\alpha_v\beta_3$

Le RGD cyclique est déjà utilisé pour le ciblage du cancer. Par exemple, un système à base de PCL-*b*-PEG fonctionnalisé par cRGD a été synthétisé et formulé sous forme de micelles. Ces dernières ont montré une meilleure internalisation dans les cellules endothéliales tumorales (human Kaposi's sarcoma) par rapport à leurs analogues sans cRGD<sup>64</sup>.

La combinaison des deux stratégies de démasquage et de ciblage actif apparaît comme une stratégie prometteuse en raison de la capacité qui est alors offerte i) de bloquer les particules au niveau des cellules cancéreuses (démasquage de PEG) et ii) d'améliorer

l'internalisation grâce à l'hydrophobie et aux interactions récepteurs-ligands. La figure 9,a illustre ces approches pour la libération des PA. Si les nanoobjets présentent des liaisons stimuli-sensibles, ils se dévoilent et permettent une libération extracellulaire. Ils peuvent également être internalisés plus facilement grâce à leur hydrophobie augmentée (non montré). Dans le cas de composés porteurs de ligands, les nanoobjets peuvent être internalisés par les endosomes pour conduire à une libération intracellulaire (Fig. 9, b). Cependant, si la libération se fait au niveau extracellulaire, elle peut être suffisante dans le cas des petites molécules car elles peuvent facilement traverser la membrane cellulaire<sup>46</sup>.



**Figure 19 :** Représentation schématique a) démasquage et libération extracellulaire b) Démasquage avec exposition aux ligands de ciblage résultant une internalisation et une libération intracellulaire (figure adaptée de Romberg et al.<sup>46</sup>)

Un exemple qui combine les deux stratégies de ciblage passif et actif a été décrit récemment. Il repose sur des nanoparticules hybrides formées de deux types de copolymères : le polycaprolactone-polyéthylèneimine-acide folique (PCL-PEI-FA) et le PCL-S-S-PEG (Fig. 10)<sup>65</sup>. Ces nanoparticules ont des tailles de 230 nm.

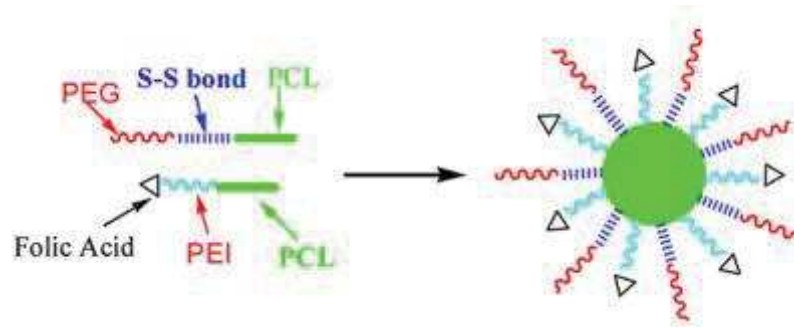


Figure I 10 : NPs PCL-PEI-FA/PCL-S-S-PEG (figure adaptée de Ahmed et al.<sup>65</sup>)

La couche externe est formée principalement des chaînes PEG qui diminuent les interactions des NPs avec les protéines réduisant ainsi la reconnaissance des NPs par le SRE dans la circulation sanguine. Cette couche empêche aussi la couche moyenne (FA) d'interagir avec d'autres macromolécules biologiques. La couche externe sera éliminée au niveau des tumeurs par réduction des ponts disulfure par les antioxydants présents au niveau des tumeurs (glutathion)<sup>66</sup>. Le DTT est utilisé *in vitro* pour provoquer un environnement réductif similaire à celui des cellules cancéreuses. Le détachement des chaînes PEG expose les récepteurs d'acide folique, ce qui augmente les interactions entre les NPs et la tumeur. La libération *in vitro* du PXT est limitée à 8% pendant 20h, montrant une stabilité des NPS. Cette libération a été augmentée à 82% en présence du DTT montrant l'importance de dévoilement des NPs pour une libération rapide.

Cette première partie de l'étude bibliographique nous a permis de faire un tour d'horizon des diverses stratégies développées pour libérer un PA de manière efficace et localisée. Dans ce qui suit, on va s'intéresser aux polyesters permettant de générer ce type de polymères amphiphiles utilisés dans le transport et la libération des PA.

## 2. Polyesters aliphatiques

Les polyesters aliphatiques sont des polymères dont les motifs de répétition contiennent des fonctions ester qui peuvent être hydrolysées, en accord avec la réversibilité thermodynamique qui caractérise l'estérification. La biocompatibilité et la facilité de dégradation des liaisons ester expliquent l'intérêt porté à ces polymères dans les domaines biomédicaux.

## 2.1. Les familles

Parmi les polyesters aliphatiques on distingue les poly( $\alpha$ -hydroxyacides), tels que le poly(acide lactique) (PLA) et le poly(acide glycolique) (PGA), les poly( $\beta$ -hydroxyacides), tel que le poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) (PHB), les poly( $\delta$ -hydroxyacides), comme la poly( $\delta$ -valérolactone) (PVL), et les poly( $\epsilon$ -hydroxyacides), tels que la poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) et la poly( $\epsilon$ -décylactone) (PDL) (Tableau I-1)<sup>67</sup>. Au regard des axes de travail développés dans de ce manuscrit, on se limitera dans ce qui suit à la description des poly(acide lactique)s (PLA), des poly(acide lactique-co-acide glycolique)s (PLGA) et de la poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL).

**Tableau I 1** : Exemples des polyesters aliphatiques

Entrée	Types de polyesters	Polymère et acronyme	Structure du motif répétitif
1	Poly( $\alpha$ -hydroxyacides)	Poly(acide lactique) PLA	$\left[ \text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_m$
2		Poly(acide glycolique) PGA	$\left[ \text{O}-\text{C}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_m$
3	Poly( $\beta$ -hydroxyacides)	Poly(hydroxybutyrate) PHB	$\left[ \text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{C}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_m$
4	Poly( $\delta$ -hydroxyacides)	Poly(valérolactone) PVL	$\left[ \text{O}-\left( \overset{\text{H}_2}{\text{C}} \right)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_m$
5	Poly( $\epsilon$ -hydroxyacides)	Poly( $\epsilon$ -caprolactone) PCL	$\left[ \text{O}-\left( \overset{\text{H}_2}{\text{C}} \right)_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_m$
6		Poly( $\epsilon$ -décylactone) PDL	$\left[ \text{O}-\left( \overset{\text{H}_2}{\text{C}} \right)_4-\underset{\text{H}}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_m$

## 2.2. Le poly(acide lactique) (PLA)

Le PLA est un polyester aliphatique linéaire qui a retenu beaucoup d'attention grâce à sa disponibilité à partir des sources renouvelables d'une part et à sa dégradabilité d'autre part. Il est de plus recyclable et compostable<sup>68-69</sup>. Schématiquement, il provient des constituants à base d'amidon présents dans le maïs, le blé ou le riz qui, par fermentation, donnent accès à l'acide lactique<sup>70</sup>. Ce dernier est utilisé pour la polymérisation du PLA. Sa dégradation conduit à la formation de produits ultimes de dégradation, eau et dioxyde de carbone, qui peuvent entrer à nouveau dans le cycle de croissance des plantes (Fig. 11)<sup>71</sup>.

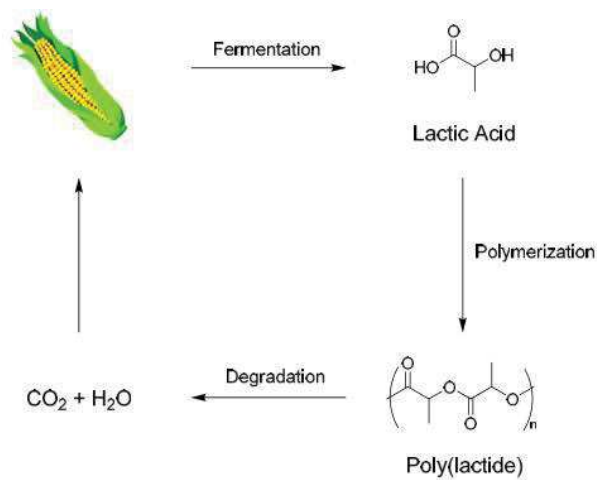
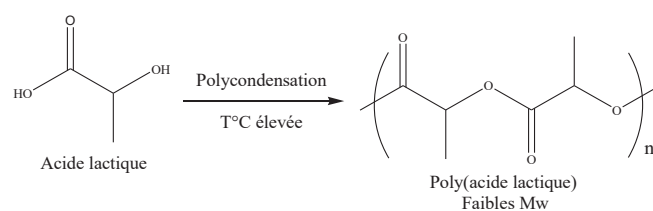


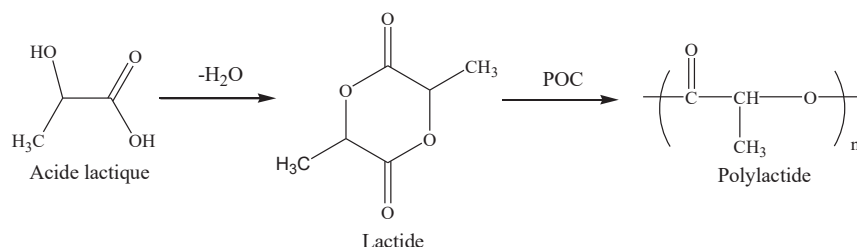
Figure I 11 : Cycle de vie du PLA

La polymérisation de l'acide lactique en poly(acide lactique) peut être obtenue par une polycondensation entre les groupes hydroxyle et les groupes acide carboxylique de l'acide lactique (Fig. 12), mais les polymères résultants présentent de faibles masses molaires ( $M_w \sim 2-10 \text{ kg/mol}$ )<sup>72</sup>. En outre, pour être efficace, cette méthode nécessite l'élimination d'eau, élimination qui devient de plus en plus difficile avec l'augmentation de la masse molaire du PLA en raison de l'augmentation de viscosité du mélange réactionnel. La polycondensation nécessite des températures élevées (entre  $160^\circ\text{C}$  et  $200^\circ\text{C}$ )<sup>73</sup> et s'accompagne de la racémisation du PLA<sup>74</sup>.



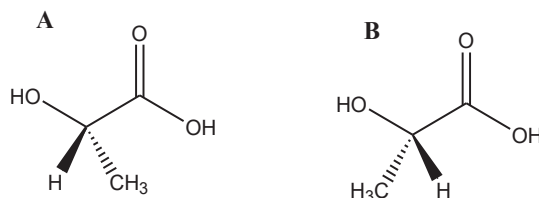
**Figure I 12 :** Synthèse de poly(acide lactique) par polycondensation (figure adaptée de Lopes et al.<sup>75</sup>)

A cause de ces inconvénients, un procédé alternatif est préféré : la polymérisation par ouverture du cycle<sup>74</sup>. C'est un procédé qui peut se faire en passant par un dimère cyclique de l'acide lactique, le lactide, qui est polymérisé par ouverture de cycle (POC, ROP en anglais) catalysée (Fig. 13). Dans ce second cas on parle préférentiellement de poly(lactide).



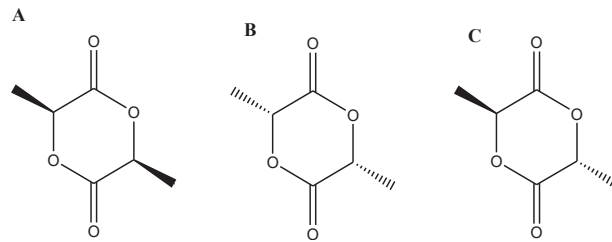
**Figure I 13 :** Synthèse de polylactide (figure adaptée de Rasal et al.<sup>76</sup>)

L'acide lactique existe sous forme de deux isomères optiques, l'acide L-lactique et l'acide D-lactique (Fig. 14). Grâce à l'activité optique de l'acide lactique, le lactide est donc présent sous forme de trois stéréoisomères : le L-, le D- et le meso-lactide qui correspondent respectivement aux conformations R,R ; S,S et R,S (Fig. 15)<sup>77</sup>. La nomenclature de PLA selon Vert *et al.*<sup>78</sup> est PLA<sub>x</sub> où x correspond au pourcentage de L-lactide dans le polymère.



**Figure I 14 :** Monomères optiques de l'acide lactique (acide L-lactique et acide D-lactique)





**Figure I 15 :** Structures des stéréoisomères du lactide : (A) L-lactide ; (B) D-lactide ; (C) meso-lactide

La composition stéréochimique du PLA et la proportion des monomères lactide utilisés, déterminent les propriétés des polymères tels que le point de fusion, la vitesse de cristallisation, le taux de cristallinité, ainsi que les propriétés mécaniques et de dégradation<sup>69</sup>. Le PLLA est un polymère très cristallin, mais la cristallinité diminue avec la diminution de la pureté optique jusqu'à l'obtention de PDLA qui est amorphe. Il est à noter que les stéréocopolymères de PLA sont amorphes dès que le pourcentage de L-lactide est inférieur à 90%. Le poly(D-lactide) et le poly(L-lactide) purs ont un point de fusion de 207°C<sup>79-80</sup>. En raison d'une cristallinité imparfaite, les points de fusion typiques des PLA semi-cristallins sont plutôt aux alentours de 170-180°C<sup>72</sup>. La formation de stéréocomplexes par mélange racémique de poly(L-lactide) et poly(D-lactide) permet d'augmenter le point de fusion à 230°C et d'améliorer les propriétés mécaniques par rapport aux PLLA et PDLA purs. Les propriétés optiques de PLLA et PDLA sont presque identiques mais ils ont une polarisation de lumière inversée.

Grâce à leurs biodégradabilité et biocompatibilité, les applications dans le domaine biomédical des PLA sont très nombreuses : systèmes de délivrance de médicaments (implant *in situ* commercialisé par la compagnie Tolmar sous le nom Atridox pour la délivrance de Dococycline)<sup>81</sup>, sutures dégradables (copolymère à base de PGA/PLA commercialisé sous le nom Vicryl composé de 8% L-LA et 92% GA<sup>82</sup>), implants chirurgicaux (comme les marques Bio-Anchor et Meniscal Stinger qui sont des dispositifs de fixation orthopédiques et qui ont des bonnes résistances à la traction)<sup>83</sup> etc... Pour plus de détails on peut se reporter à une revue récentes traitant du sujet « synthèse de poly(acide lactique) pour des applications en dispositifs biomédicaux »<sup>84</sup>.

### 2.3. Le poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLAGA)

Le PLAGA un copolymère biodégradable approuvé par la FDA. Il est obtenu par copolymérisation entre le lactide et le glycolide (GA). L'acide glycolique, comme l'acide lactique, est lui aussi issu de ressources renouvelables: betterave, canne à sucre ou raisin. Le glycolide, dimère cyclique de l'acide glycolique, est utilisé pour la POC du PGA (Fig. 16). Ce dernier est un polymère aliphatique semi-cristallin, ayant un haut point de fusion et une faible solubilité dans les solvants organiques.

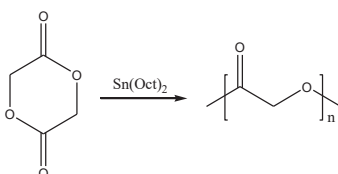


Figure I 16 : Voie d'obtention de polyglycolide

Son utilisation sous forme d'homopolymères est limitée à cause de son instabilité hydrolytique. Il est donc généralement copolymérisé avec le lactide (LA) pour former le PLAGA<sup>79-85</sup>. Les propriétés du PLAGA sont donc modifiables en contrôlant des paramètres tels que la masse moléculaire ou le rapport lactide / glycolide.

La composition chimique n'affecte pas seulement la vitesse de dégradation, mais aussi les propriétés mécaniques et physiques, qui sont aussi dépendantes de la masse molaire et de la dispersité du copolymère<sup>86</sup>. Par exemple, la température de transition vitreuse augmente avec l'augmentation de la masse molaire et le contenu en unité lactique dans le copolymère<sup>87</sup>.

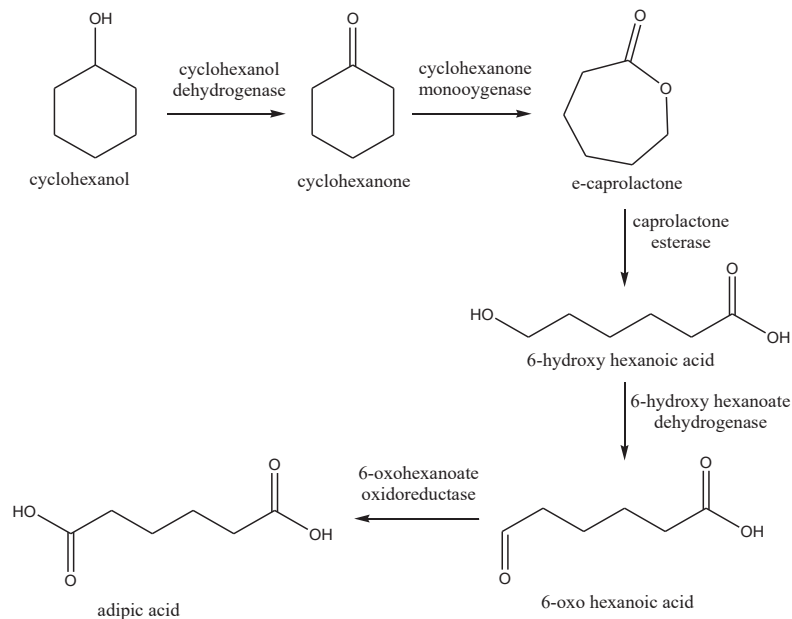
Comme pour le PLA, sa biocompatibilité et sa dégradabilité expliquent l'intérêt qui lui est porté, en particulier pour les applications de délivrance de principes actifs, de protéines, de peptides, ou d'ADN et ARN<sup>88</sup>. Outre ces applications en libération d'actifs, on le trouve dans le domaine de la réparation osseuse, des échafaudages d'ingénierie tissulaires, des greffes vasculaires et de la cicatrisation<sup>83</sup>.

### 2.4. La poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL)

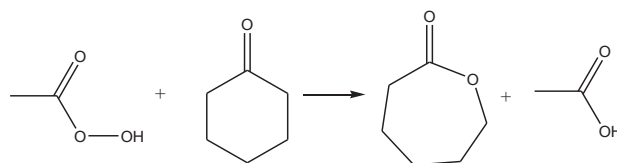
La poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) est aussi un polyester aliphatique largement utilisé dans des applications médicales grâce à sa biocompatibilité. C'est un polymère hydrophobe et semi-cristallin avec un degré de cristallinité qui peut atteindre 69%<sup>89</sup>. Comme pour les

PLA et PLAGA, ses propriétés physiques, mécaniques, thermiques et de dégradation dépendent de la masse molaire et du degré de cristallinité. Mais contrairement à eux, il n'est pas possible de jouer sur la stéréochimie du polymère pour moduler ces propriétés. Une grande gamme de polymères à base de PCL avec différentes masses molaires est connue ( $M_n$  variant de 530 g/mol à 630 000 g/mol). La densité peut varier entre 1,07 et 1,20<sup>90-91</sup>. La gamme de  $T_g$  se situe entre -65 et -60°C, la température de fusion est comprise quant à elle entre 58 et 65°C<sup>90</sup> et la température de décomposition est de 350°C<sup>92</sup>.

La PCL est obtenue par polymérisation par ouverture de cycle de l' $\epsilon$ -caprolactone ( $\epsilon$ -CL). Cette dernière peut être obtenue naturellement par le biais de microorganismes qui oxydent la cyclohexanone en acide adipique en passant par l' $\epsilon$ -CL et l'acide 6-hydroxyhexanoïque (Fig. 17)<sup>93</sup>. Cependant, industriellement l' $\epsilon$ -CL est produite par l'oxydation du cyclohexane par l'acide peracétique(Fig. 18)<sup>94</sup>.



**Figure I 17 :** Oxydation de cyclohexanol en acide adipique par l'acinetobacter (figure adaptée de Labet et al.<sup>95</sup>)



**Figure I 18 :** Production de l' $\epsilon$ -caprolactone à partir de cyclohexane (figure adaptée de Labet et al.<sup>95</sup>)

Comme pour les autres polyesters aliphatiques décrits, il y a deux méthodes de préparation de la PCL : la polycondensation et la polymérisation par ouverture du cycle (POC). La polycondensation donne des polymères de faibles masses molaires et une dispersité élevée alors qu'une masse molaire élevée et une faible dispersité sont obtenues par POC. Quatre mécanismes de POC sont connus pour la PCL, en fonction du type de catalyse : anionique, cationique, activé par monomère et coordination-insertion. Ces mécanismes sont expliqués d'une façon très développée dans le revu de M. Labet *et al.*<sup>95</sup>. Un inconvénient majeur de la PCL, comme du PLA et du PLAGA, est son manque de fonctionnalité accompagné d'une hydrophobie marquée. Pour pallier à ces problèmes, de nombreux copolymères amphiphiles à base de PCL ont été synthétisés. Ces copolymères feront l'objet du chapitre 4 de cette bibliographie.

La PCL, grâce ses propriétés (biocompatibilité, dégradation contrôlée et miscibilité avec d'autres polymères), est utilisée dans plusieurs applications médicales telles que l'ingénierie tissulaire<sup>96-97</sup>, ou les systèmes de délivrance de médicaments à long terme<sup>98-99</sup>. Une revue récente publiée par Mondal *et al.*<sup>100</sup> détaille les applications des biomatériaux à base de PCL dans l'ingénierie tissulaire et dans la délivrance des médicaments. Parmi les produits commerciaux à base de PCL, on peut citer le Capronor qui est un dispositif contraceptif à long terme<sup>83</sup>.

### ***2.5. Dégradation des polyesters aliphatiques :***

Deux voies sont connues pour la dégradation des polyesters : la voie enzymatique et la voie hydrolytique.

#### *Dégradation enzymatique :*

Plusieurs microorganismes dans la nature participent à la dégradation des polyesters par voie enzymatique. Cette dégradation se fait dans l'environnement grâce aux estérases. Parmi les estérases, les lipases sont connues comme des enzymes de dégradation des polyesters aliphatiques. Par exemple le *phizopus arrhizus* contient une lipase dégradant la PCL<sup>5</sup>. Le PLA est aussi dégradé par la protéinase K<sup>101</sup>. Salthouse et Matlaga ont détecté la présence d'estérases (leucine amino peptidase et acide phosphatase) au niveau des implants PLA montrant une dégradation enzymatique<sup>102</sup>.

Contrairement aux deux précédents, les données de la littérature tendent à indiquer que la dégradation des PLAGA ne passe pas par des voies enzymatiques mais reste purement hydrolytique. Toutefois, un rôle enzymatique dans la dégradation a été avancé comme explication des différences de cinétiques de dégradation observées *in vitro* et *in vivo*. Les produits de dégradation sont l'acide lactique et l'acide glycolique. Les produits de dégradation de PLA sont incorporés dans le cycle de l'acide tricarboxylique et par la suite éliminés sous forme de dioxyde de carbone et d'eau<sup>103</sup>. L'acide glycolique est aussi éliminé de la même manière. La PCL aussi subit une activité métabolique et s'élimine dans le cycle de l'acide tricarboxylique ou bien s'élimine par voie rénale<sup>104</sup>.

#### *Dégradation hydrolytique :*

La dégradation hydrolytique des polyesters tels que la poly( $\epsilon$ -caprolactone), les polyacides DL- et L-lactiques et le polyacide glycolique a été montrée dans l'eau et dans divers tampons aqueux, mais aussi *in vivo*<sup>105-106</sup>. La dégradation se produit par scissions aléatoires des chaînes au niveau des liaisons esters pour former au final des hydroxyacides. Dans le cas de la PCL, il y a formation de l'acide 6-hydroxyhexanoïque, l'acide lactique est le résultat de dégradation de PLA et l'acide glycolique est obtenu par dégradation de PGA. Les étapes clés de la dégradation sont i) la dégradation de la partie amorphe qui tend à augmenter la cristallinité, sans entraîner de perte de masse en raison de l'absence de diffusion des chaînes rompues au sein de la matrice polymère<sup>92</sup>; ii) la diminution importante de la masse de polymère par formation d'oligomères pouvant diffuser hors de la matrice polymère<sup>106-107</sup>. La dégradation hydrolytique des polyesters (PLA et PGA) est autocatalysée par les groupes carboxyles formés durant ce processus<sup>108</sup>.

La PCL se dégrade sur des durées allant de quelques mois à quelques années en fonction de la masse molaire, des conditions de dégradation, ainsi que du degré de cristallinité<sup>91-104</sup>. On distingue les scissions aléatoires des chaînes à faible température et des scissions des extrémités des chaînes à température élevée<sup>109</sup>. L'acide 6-hydroxyhexanoïque étant un produit moins acide que l'acide lactique et l'acide glycolique, la PCL est bien adaptée pour les applications médicales.

La dégradation du PLA peut être influencée par plusieurs facteurs : la structure chimique, la masse moléculaire, la distribution des poids moléculaires, la morphologie, la vitesse de

diffusion de l'eau et la quantité d'eau à l'intérieur de polymère. Sa dégradation est influencée aussi par la composition en unités D et L, ce qui explique l'intérêt particulier que représentent ces composés. En effet, le PDLLA a une vitesse de dégradation largement supérieure à celle du PLLA. De plus, la dégradation peut être catalysée par un acide ou une base. La vitesse de dégradation est déterminée par l'accessibilité et la réactivité des groupes esters avec l'eau<sup>111</sup>. Le PLA s'hydrolyse en  $\alpha$ -hydroxy acide lorsqu'il est implanté dans les organismes vivants, y compris le corps humain. Il est noté que les produits de dégradation du PLA sont ensuite incorporés dans le cycle de l'acide tricarboxylique et excrétés<sup>4</sup>. En outre, les produits de dégradation sont non toxiques, ce qui en fait un bon choix pour les applications biomédicales.

Le PGA étant plus hydrophile que le PLA, il se dégrade plus rapidement<sup>86</sup>. Il est possible d'adapter la vitesse de dégradation de PLAGA à l'application visée en contrôlant le rapport entre unités LA et GA. D'une façon générale, l'augmentation de pourcentage de GA dans le PLAGA augmente la vitesse de dégradation mais ce n'est pas une relation linéaire puisqu'il a été démontré que le copolymère avec une composition PLA<sub>25</sub>GA<sub>50</sub> a la vitesse de dégradation la plus élevée<sup>112</sup>.

Les polyesters aliphatiques, grâce à leurs caractéristiques citées ci-dessus (biocompatibilité et dégradabilité) sont des produits de choix pour un grand nombre d'applications médicales. Cependant, dans l'optique de les utiliser dans un éventail encore plus vaste d'applications, leur caractère hydrophobe a été modulé par fonctionnalisation par des polymères hydrophiles.

### ***3. Fonctionnalisation des polyesters aliphatiques***

L'absence de groupes fonctionnels sur la chaîne et leur caractère hydrophobe limitent l'utilisation des polyesters aliphatiques dans de nombreuses applications. L'incorporation de groupes fonctionnels permet entre autres de contrôler leurs propriétés physiques, leur vitesse de dégradation<sup>113</sup>, leur hydrophobie<sup>114 115</sup>, et leurs propriétés thermiques<sup>116</sup>. Certains groupes fonctionnels, comme des biomolécules, peuvent aussi améliorer la biocompatibilité du PLA<sup>117-118</sup> en favorisant l'adhésion cellulaire<sup>119</sup>. De plus, l'immobilisation de peptide RGD sur la surface de PCL améliore l'adhésion cellulaire grâce aux interactions avec les intégrines<sup>120</sup>.

L'introduction de groupes fonctionnels sur les polyesters peut se faire directement sur les monomères puis polymérisation ou sur les polymères formés. On présentera d'abord la fonctionnalisation des esters et diesters cycliques, puis dans une seconde partie la modification post-polymérisation des polyesters, en particulier pour former des copolymères amphiphiles.

### 3.1. Lactones fonctionnelles

Les lactones fonctionnelles sont obtenues en suivant plusieurs stratégies décrites dans la suite de ce paragraphe. Elles sont utilisées comme comonomères pour la synthèse d'une large gamme de copolymères fonctionnels.

#### 3.1.1. Esters cycliques fonctionnels:

On distingue deux types d'esters cycliques fonctionnalisés : le premier consiste en un ester cyclique incluant dans le cycle le groupe fonctionnel d'intérêt (fonction intra-cycle); le second consiste en un ester cyclique fonctionnalisé par un groupe pendent (fonction extra-cycle). Parmi les groupes fonctionnels insérés dans le cycle, on peut citer les groupes éther, cétone et amide (on parle alors de depsipeptides) (tableau I-2). Parmi les groupes fonctionnels hors cycle on trouve: les halogènes, les groupes insaturés (alcynes et alcènes), les amines, les acides carboxylique etc... (tableau I-3). Les polymérisations par ouverture de cycle se font grâce à des amorceurs et catalyseurs listés dans le tableau I-3, en regard des lactones correspondantes.

Un exemple de synthèse d'un ester cyclique incluant dans le cycle un groupe fonctionnel est la synthèse de 2-oxepanedione qui se fait suivant la méthode Baeyer-Villiger par l'oxydation de 1,4-cyclohexanedione par l'acide m-chloroperbenzoïque (Fig. 19)<sup>121</sup>.

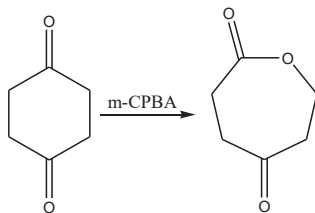
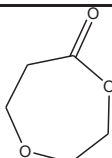
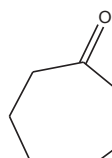
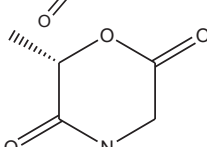


Figure I 19 : Synthèse de 2-oxepanedione

Tableau I 2 : Exemples de monoesters cycliques à fonctionnalité intra-cycle

Entrée	Monomère	Amorceur catalyseur	et/ou	Reference
1		$Bu_2SnO$ , $Sn(Oct)_2$ $Al(OiPr)_3$		Mathisen <i>et al.</i> (1989) <sup>122</sup> Lofgren <i>et al.</i> (1994) <sup>123</sup>
2		1-Phenyl-2-propanol, $Sn(Oct)_2$		Latere <i>et al.</i> (2002) <sup>121</sup>
3		<i>lipase</i> <i>porcine</i>	<i>pancréatique</i>	Feng <i>et al.</i> (2000) <sup>124</sup>

La synthèse d'esters ayant des groupes fonctionnels hors cycle peut se faire par une activation anionique. On peut citer la synthèse d' $\alpha$ -iodo- $\epsilon$ -caprolactone à partir de  $\epsilon$ -caprolactone en utilisant le LDA suivi par l'ajout d'ICl (Fig. 20)<sup>125</sup>. L' $\alpha$ -propargyl- $\delta$ -valerolactone a été synthétisée de la même manière par activation anionique de  $\delta$ -valerolactone suivi par l'ajout de  $PgBr$ <sup>126</sup>. Un autre exemple est l' $\alpha,\alpha$ -diallyl- $\delta$ -valerolactone. Cette dernière a en particulier été copolymérisée avec l' $\epsilon$ -caprolactone dans le cadre de la synthèse de polyester-*g*-PEG<sup>127</sup>.

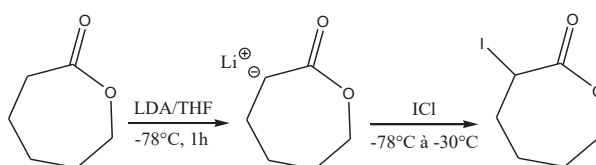


Figure I 20 : Synthèse de  $\alpha$ -iodo- $\epsilon$ -caprolactone

Rieger *et al.* ont rapporté la synthèse de  $\gamma$ -PEG.CL à partir de 1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol. Les étapes de synthèse sont présentées dans la figure 21<sup>128</sup>.

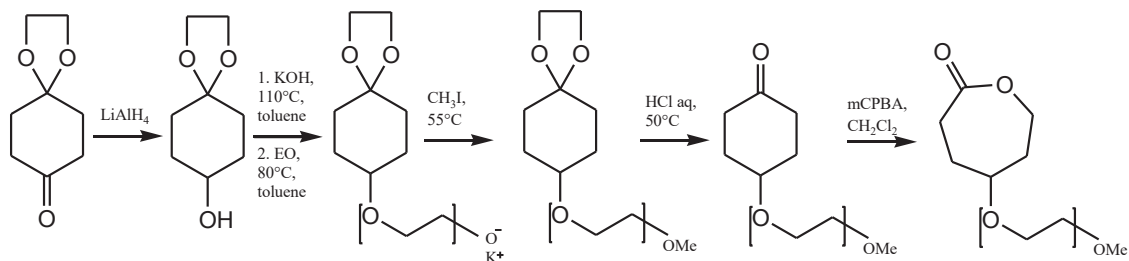
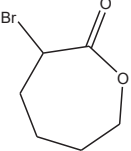
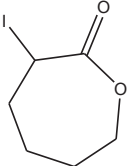
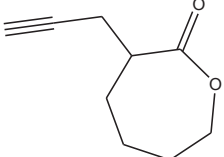
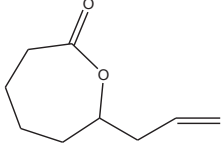
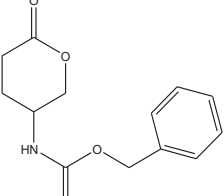
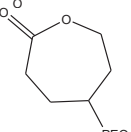




Figure I 21 : Synthèse de l' $\alpha$ -( $\gamma$ - $\epsilon$ -caprolactone)- $\omega$ -methoxy-poly(ethylene oxide)(figure adaptée de Rieger et al.<sup>126</sup>)

Tableau I 3 : Exemples de monoesters cycliques à fonctionnalité extra-cycle

Entrée	Monomère	Amorceur <i>et/ou</i> catalyseur	Reference
1		$Al(OiPr)_3$	Wang <i>et al.</i> (2005) <sup>129</sup>
2		MeOH, $Sn(Oct)_2$	El Hablouni <i>et al.</i> (2009) <sup>130</sup>
3		EtOH, $Sn(OTf)_2$	Parrish <i>et al.</i> (2005) <sup>131</sup>
4		$PhCH_2OH$ , $Sn(Oct)_2$	Mecerreyes <i>et al.</i> (2000) <sup>132</sup>
5		$Sn(Oct)_2$	Blanquer <i>et al.</i> (2010) <sup>133</sup>
6		$Al(OiPr)_3$	Rieger <i>et al.</i> 2006 <sup>134</sup>

### 3.1.2. Diesters cycliques fonctionnels:

La synthèse des diesters cycliques fonctionnalisés peut se faire grâce à deux stratégies : i) l'auto-condensation des  $\alpha$ -hydroxy acides sous l'action de l'acide *p*-toluenesulfonique (*p*TsOH) (voie 1) ou ii) la condensation étape par étape d'un  $\alpha$ -hydroxy acide et d'un  $\alpha$ -halogéno halogénure d'acyle suivi par une cyclisation sous l'action d'une base (voie 2) (Fig. 22)<sup>135</sup>.

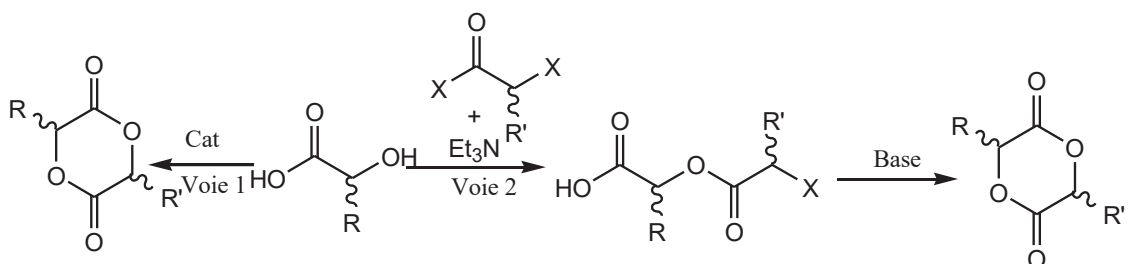


Figure I 22 : Synthèse des diesters cycliques à partir d'un  $\alpha$ -hydroxy acide (figure adaptée de Pounder et al.<sup>135</sup>)

Il est possible d'obtenir un diester cyclique fonctionnalisé à partir d'un acide aminé commercial (Fig. 23)<sup>136</sup>. La stratégie de synthèse commence par la protection de la fonction latérale de l'acide aminé suivie de la conversion de l'acide aminé en  $\alpha$ -hydroxyacide avant la formation de la dilactone. L'homopolymérisation ou la copolymérisation, suivie par une déprotection des groupes fonctionnels, génère le copolymère correspondant (Fig.24). Parmi les groupes fonctionnels classiques introduits sur les dilactones on peut citer les amines<sup>136</sup>, les acides carboxyliques<sup>136</sup> et les alcools<sup>114</sup>. Mais on trouve aussi les halogènes<sup>137</sup>, les groupes alkyls<sup>138-139</sup>, les alcynes et alcènes<sup>140</sup> ou les PEG<sup>141</sup>.

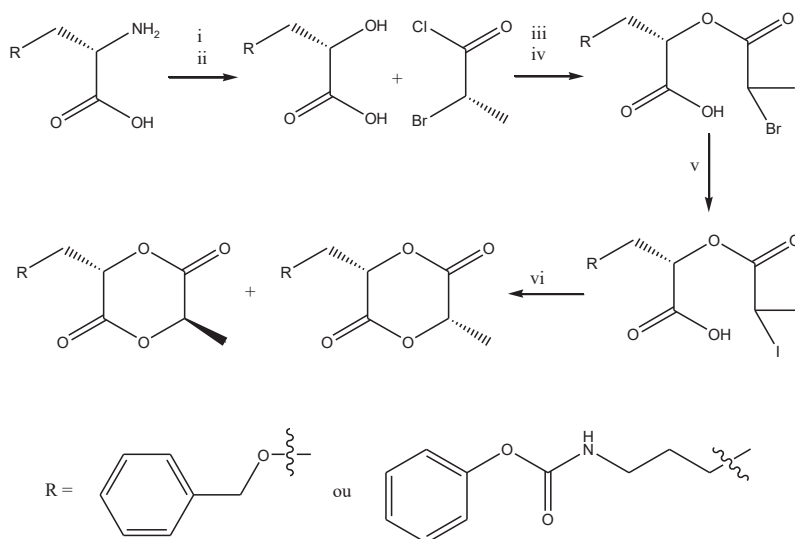
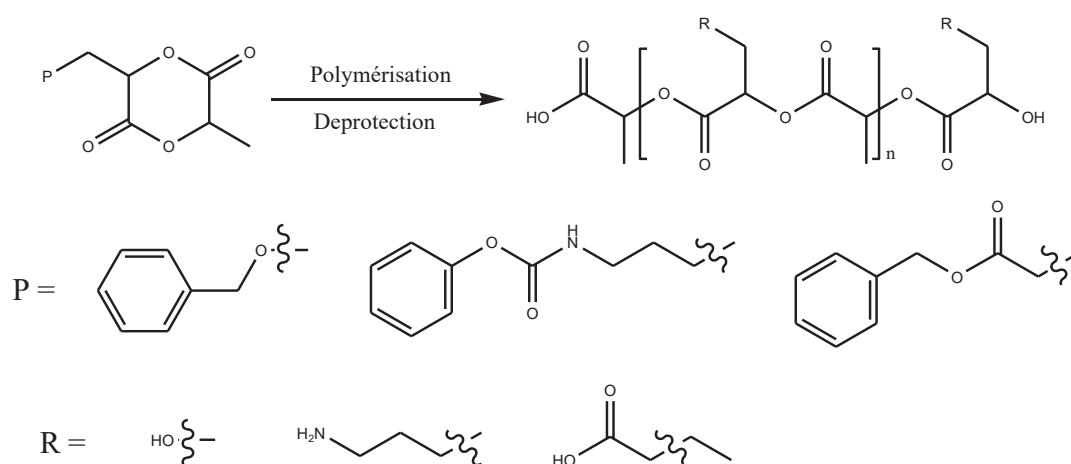
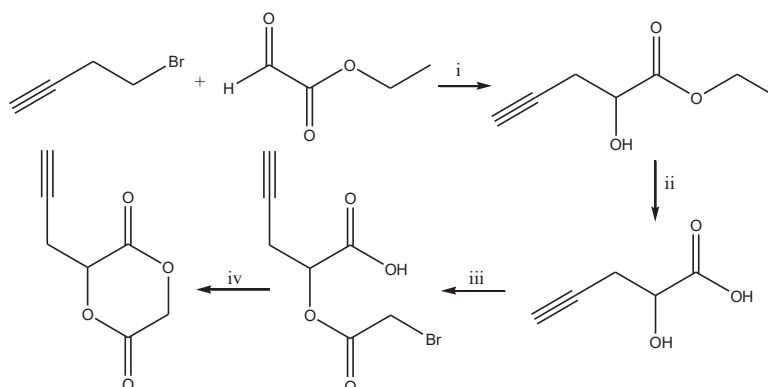


Figure I 23 : Synthèse des monomères cycliques à partir d'acide aminé (figure adaptée de Gerhardt et al.<sup>136</sup>)  
 Conditions : (i) NaNO<sub>2</sub>, TFA, H<sub>2</sub>O, 25°C, 6 h ; (ii) NaNO<sub>2</sub>, aq. KHSO<sub>4</sub>, 0-25°C, 3 h ; (iii) 75°C, 6h; (iv) DIEA, Et<sub>2</sub>O, 0-40°C, 12 h; (v) KI, acetone, 65°C, 12 h ; (vi) DIEA, acetone, 75°C, 10 h.



**Figure I 24 :** Synthèse de polyesters fonctionnels à partir de dilactones fonctionnelles (figure adaptée de Gerhardt et al.<sup>136</sup>)

A titre d'exemple, notre groupe s'est récemment intéressé à la 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione (Fig. 25) synthétisée par Coumes *et al*<sup>142</sup>.



**Figure I 25 :** Synthèse de 3-(2-propynyl)-1,4-dioxane-2,5-dione (4). Conditions : (i) Zn/THF/Et<sub>2</sub>O, 0°C, 15 h, (ii) H<sub>2</sub>O, 100°C, 72 h, (iii) DMPA, bromure de bromoacétyle, Et<sub>3</sub>N, DCM, RT, 16 h et (iv) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, RT, 16 h. (figure adaptée de Coumes et al.<sup>142</sup>)

### 3.1.3. Avantages et limites des (di)lactones fonctionnelles:

L'emploi de monomères fonctionnels présente l'avantage de permettre le contrôle du taux de fonctionnalisation du polyester par contrôle du taux de monomères fonctionnalisés incorporés pour la copolymérisation<sup>143</sup>. Mais cette méthode souffre de la nécessité de faire une synthèse multi-étapes, souvent accompagnée d'un coût élevé, de difficultés de purification et il est difficile d'obtenir des quantités notables de produit. La polymérisabilité de ces (di)lactones est souvent faible ce qui peut conduire à des hétérogénéités de composition et/ou de faibles rendements de polymérisation.

En réponse à ces problématiques, des méthodes de modification post-polymérisation permettant d'obtenir des copolyesters fonctionnels ont été proposées et sont présentées dans ce qui suit.

### **3.2. Modification chimique post-polymérisation : surface et solution**

La modification chimique post-polymérisation est un outil polyvalent qui permet la préparation de polymères diversement fonctionnalisés à partir d'un unique polymère de départ. Plusieurs méthodes permettent la modification post-polymérisation de polyesters aliphatiques, que ce soit en surface ou en solution.

#### **3.2.1. Modification de surface par hydrolyse et aminolyse**

##### **5.2.1. L'hydrolyse**

L'hydrolyse est utilisée comme traitement des surfaces des polyesters pour les rendre hydrophiles. C'est une approche simple et efficace pour générer différents types de surfaces dégradables qui peuvent servir pour des applications biologiques. L'hydrolyse permet de former des groupes carboxyles et hydroxyles en surface d'une matrice en présence d'un acide ou d'une base.

A titre d'exemple, des films de PLGA ont été hydrolysés par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium, puis les carboxylates formés ont été exploités pour greffer du chitosan<sup>144</sup>. Cette procédure a été utilisée pour modifier la surface de fibres de PCL<sup>145</sup> sans les déformer, afin de les rendre à la fois hydrophiles et supports de prolifération cellulaire par greffage de biomolécules favorisant l'interaction cellules-matériau. Il a été montré que ce type de traitement génère des nanorugosités qui améliorent aussi l'attachement cellulaire<sup>120</sup>. Le traitement de films de PCL ou PGA par l'hydroxyde de sodium a ainsi amélioré l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales et musculaires<sup>146-147</sup>.

Il s'agit cependant d'un traitement qui induit des coupures de chaînes, la surface traitée peut donc subir une dégradation hydrolytique plus ou moins importante. Miller *et al.* ont montré que ce type de traitement dégrade fortement la surface de PLAGA<sup>148</sup>, mais aussi de PCL dans le cadre de l'hydrophilisation de matrices PCL-TCP.

### 5.2.2. L'aminolyse

L'aminolyse est une modification similaire à l'hydrolyse mais permettant d'introduire des fonctions amine et alcool en surface de polyester afin de moduler l'hydrophobie de surface et/ou de greffer des groupes fonctionnels sur ces sites actifs. C'est une réaction de substitution nucléophile au niveau des groupes carbonyle conduisant à la formation d'une liaison amide en lieu et place d'une liaison ester et à la libération d'un groupe alcoxy. Puisque l'aminolyse conduit à une coupure de chaînes esters, elle est généralement utilisée pour des modifications en surface des polyesters. Elle est catalysée par une base. Ce type de réaction a aussi été réalisé pour fonctionnaliser la PCL en bout de chaîne par l'hexyldiamine (Fig. 26).

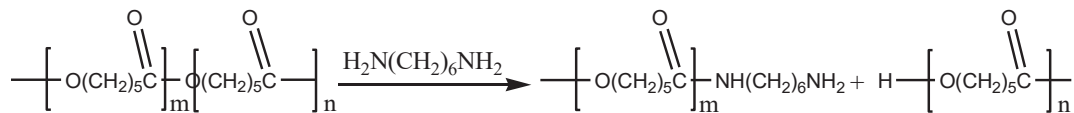


Figure I 26 : Aminolyse de la PCL avec le 1,6-hexanediamine (figure adaptée de Zhu et al.)<sup>149</sup>

L'utilisation d'une diamine permet, en plus de l'aminolyse de la fonction ester, de créer un site actif pour introduire d'autres groupes fonctionnels tels qu'une fonction acide carboxylique, un aldéhyde ou un thiol. La fonction amine libre peut également attaquer une autre fonction ester dans le polyester.

Plusieurs facteurs affectent la vitesse et le taux d'aminolyse : i) la masse molaire de la diamine utilisée (meilleure réactivité pour les diamines de faible poids moléculaire), ii) la nature du solvant (aminolyse plus rapide dans les alcools que dans l'eau) et iii) la nature du polymère. A titre d'illustration de ce dernier paramètre, il a été montré que l'aminolyse de membranes de PLLA était plus lente que celle d'une PCL, et ce malgré une densité de groupes carboxyliques plus élevée dans le cas de PLLA. Ce résultat a été expliqué par la cristallinité élevée de la surface de PLLA, ce qui la rend plus compacte et par suite moins accessible aux fonctions amines<sup>149</sup>.

L'aminolyse rend la surface des copolyesters traités plus hydrophile et ces derniers deviennent de meilleurs supports de culture cellulaire. De Luca *et al.* ont trouvé une amélioration d'adhésion et de prolifération des cellules de Schwann sur une membrane

PCL aminée par rapport à une autre non aminée<sup>150</sup>. Hong *et al.* ont modifié des microsphères de PLA par des fonctions amines puis par du collagène afin d'améliorer la culture de chondrocytes sur les microsphères<sup>151</sup>.

Bien qu'intéressante, l'aminolyse souffre toutefois de limitations. D'une façon générale l'aminolyse provoque des coupures de chaînes et une érosion de surface des polyesters. L'effet d'érosion de surface se traduit par des modifications de morphologie plus ou moins importantes en fonction du polyester<sup>152-153</sup>. Cette érosion a des effets plus ou moins graves selon la nature du polymère. Par exemple, la morphologie de membranes de PCL est peu affectée par des conditions douces d'aminolyse, tandis que la rugosité de la surface de PLA augmente énormément après traitement<sup>154</sup>. Des études de stockage à l'air à 37°C ont montré une réduction lente des fonctions amines présentes en surface de la PCL, ce phénomène étant accentué dans le PBS<sup>152</sup>.

### 3.2.2. Modification anionique de chaînes et surfaces de polyesters

La modification anionique des polyesters peut se faire en solution ou en surface. C'est une méthode versatile qui permet de modifier les polyesters par des petites molécules et des polymères par simple réaction de substitution nucléophile, mais aussi de générer des macromamorceurs anioniques ou des intermédiaires de synthèse. Pour ces raisons, ce type d'activation a été choisi pour modifier les polyesters dans notre laboratoire.

#### 3.2.2.1. Modification anionique de PCL en solution

Coudane *et al.* ont fonctionnalisé la PCL par un procédé en 2 étapes. En premier lieu l'activation anionique de la PCL est réalisée par abstraction d'un hydrogène en  $\alpha$  du carbonyle par une base forte, typiquement le diisopropylamide de lithium, afin d'obtenir le macropolycarbanion correspondant (Fig. 27, étape 1). Ce dernier réagit ensuite en tant qu'agent nucléophile sur des molécules électrophiles (Fig. 27, étape 2).

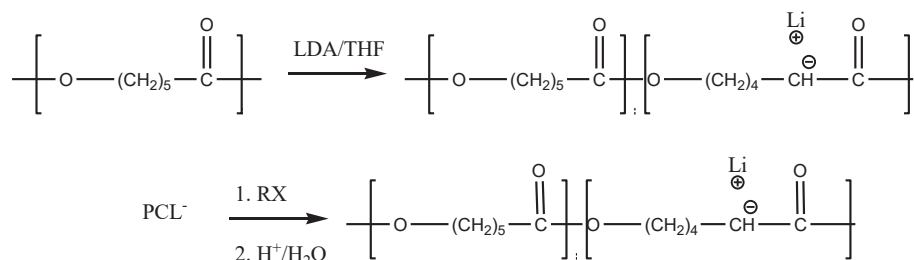


Figure I 27 : Modification de PCL par activation anionique

Plusieurs exemples de substituants sont cités dans la littérature: méthyle<sup>155</sup>, benzyl alcool<sup>156</sup>, ou acide carboxylique (Fig. 28)<sup>157</sup>.

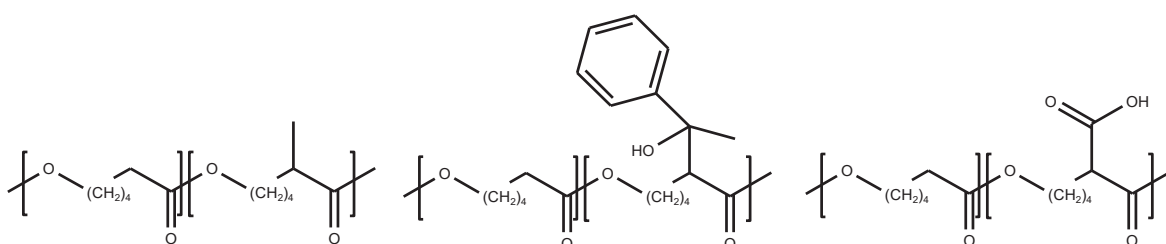


Figure I 28 : PCL modifiée par (i) méthyl, (ii) 1-méthyl-1-hydroxybenzyl et (iii) acide carboxylique

Cette méthode a ensuite été utilisée pour greffer des agents de contraste pour l'imagerie par rayon X. Le premier polyester radio-opaque portant un iode a été synthétisé par notre groupe, la poly( $\epsilon$ -caprolactone-*co*- $\alpha$ -iodo- $\epsilon$ -caprolactone) (PCL-I)<sup>158</sup> suivi plus récemment par un dérivé plus stable le poly( $\epsilon$ -caprolactone-*co*- $\alpha$ -triiodobenzoate- $\epsilon$ -caprolactone) (PCL-TIB)<sup>159</sup>. Afin de visualiser les implants à base de PCL par imagerie par résonance magnétique (IRM), Blanquer *et al.* ont greffé l'acide diéthylène triamine pentaacétique sur la PCL, suivi par une complexation des ions  $Gd^{3+}$ <sup>160</sup>.

Outre la substitution par des petites molécules, cette approche a permis de générer plusieurs structures copolymères par les stratégies « grafting to » et « grafting from ». Ces deux méthodes de greffage sont explicitées dans le dernier chapitre de cette étude bibliographique et on se limite ici à présenter quelques exemples. Nottelet *et al.* ont synthétisé la poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*g*-poly(L-lysine) par les deux stratégies « grafting to » et « grafting from ». La première stratégie est basée sur la réaction entre une poly(N- $\epsilon$ -Z-L-lysine) activée en N terminal et le macropolycarbanion  $PCL^-$ . La seconde repose sur la POC de N-carboxyanhydride de N- $\epsilon$ -benzyloxycarbonyl-L-lysine amorcée par la  $PCL^-$ . La composition des copolymères générés par ces stratégies est d'environ 40% de CL et 60% de N- $\epsilon$ -Z-L-lysine<sup>161</sup>. La  $PCL^-$  a aussi été utilisée comme macroamorceur de polymérisation anionique de monomères méthacryliques et vinyliques suivant la stratégie « grafting from » pour former la PCL-*g*-PMMA, la PCL-*g*-PDMAEMA et la PCL-*g*-P4VP.<sup>162</sup> En lien direct avec la suite de ce travail, des PCL-*g*-PEG ont aussi été

synthétisées par réaction entre la PCL<sup>-</sup> et un MeO-PEG<sub>2000</sub>-OH activé par un groupe bromoacétyl (Fig. 29)<sup>163</sup>. La densité de greffage maximale obtenue était de 1.5 chaînes PEG<sub>2000</sub> pour 100 unités CL, ce qui correspond à un rapport EG/CL = 0,68. En cours de réaction, la masse molaire de la PCL a diminué de 50 000 /mol à environ 20 000 g/mol indiquant la coupure de 1,3 liaison par chaîne PCL en moyenne.

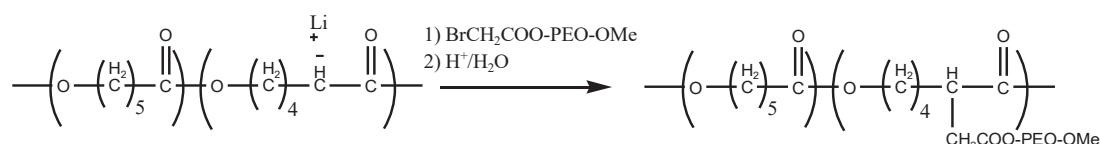


Figure I 29 : Synthèse de PCL-g-PEG après une activation anionique de la PCL

Cette stratégie de fonctionnalisation de la PCL est donc simple et permet de générer une large gamme de PCL fonctionnalisées. Elle souffre cependant de deux limitations. En premier lieu, et bien qu'à un niveau bien moindre que pour l'hydrolyse ou l'aminolyse, elle est indissociable d'une dégradation de certaines liaisons esters par l'énolate nucléophile (moins de 0,5% des liaisons esters). Cette dégradation peut être limitée en optimisant les conditions opératoires. L'autre limitation est que, contrairement à une copolymérisation, le taux de substitution est inférieur à 30% des unités CL.

Comme on va le voir dans les paragraphes suivant, ce procédé, bien que transposable à tout polyester aliphatique, n'a pas été utilisé pour l'instant en solution sur le PLA en raison de sa plus grande sensibilité à l'hydrolyse. Par contre, il est utilisé avec succès en surface de PLA.

### 3.2.2.2. Modification anionique de PLA

La fonctionnalisation de PLA par activation anionique a été développée au sein de notre laboratoire dans le cadre de la thèse de Sarah El Habnoui. Des essais de modification directe de PLA en solution sous diverses conditions ont conduit à des oligomères fonctionnalisés par l'iode ou le naphtoyle en raison de la grande sensibilité du PLA à l'hydrolyse.

Cette stratégie s'est par contre montrée très efficace en surface. L'activation anionique a été faite par le LDA dans un mélange (Et<sub>2</sub>O/THF : 2/1) suivi par l'ajout de PgBr (Fig. 30). La surface propargylée a été exploitée pour des réactions de cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre(I) (CuAAC). Des surfaces PLA antibactériennes ont ainsi



été préparées par greffage d'une famille de poly(N,N-diméthylamino-2-éthyl methacrylate) (PDMAEMA) quaternisés<sup>164</sup>.

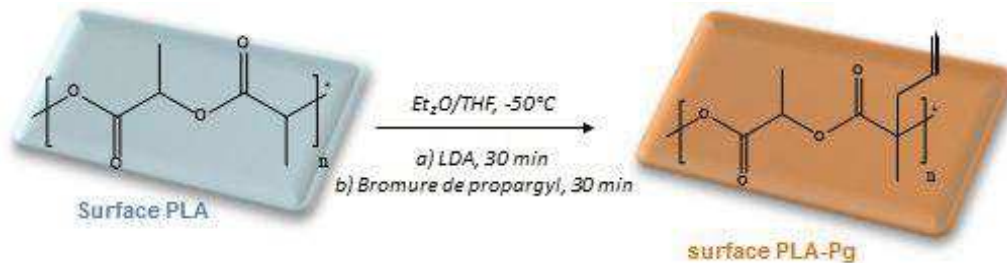


Figure I 30 : Propargylation en surface de PLA (figure adaptée de Sardo et al.<sup>165</sup>)

Une variante de cette modification de surface de PLA a été utilisée par Sardo *et al.* pour le greffage par activation photochimique thiol-yne d'un polymère antibactérien, le  $\alpha,\beta$ -poly(N-2-hydroxyethyl)-D,L-aspartamide (PHEA) quaternisé<sup>165</sup>.

Dans le cadre de ce travail, on a choisi l'activation anionique pour modifier la PCL en solution et le PLA en surface. Ces travaux feront l'objet des autres chapitres de cette thèse.

### 3.2.3. Modification de surface par plasma

Le plasma est un mélange gazeux d'ions, d'électrons, de radicaux et d'espèces neutres. Il est désigné comme le 4<sup>ème</sup> état de la matière puisque ses propriétés fondamentales diffèrent des solides, des liquides et des gaz. Le changement d'état provient de l'ajout d'énergie aux gaz<sup>166</sup>. Il y a deux types de plasma : plasma thermique et plasma non thermique (plasma froid). Pour les applications biomédicales utilisant des biomatériaux sensibles, il est préférable d'utiliser le plasma non thermique, avec un degré d'ionisation inférieure à 1% et à température ambiante (290-330 K) afin d'éviter la dégradation thermique des matériaux.

Le traitement par plasma est une modification permettant de donner un caractère hydrophile à la surface des polyesters. Cette approche de modification des biomatériaux est souple puisqu'elle permet de contrôler la morphologie et la mouillabilité. Elle a aussi les avantages d'avoir un coût faible, et un temps court de traitement (1 à 25 min)<sup>167-168</sup>.

Plusieurs stratégies de modifications par plasma sont connues : i) l'introduction de groupes fonctionnels (-NH, -OH, -COOH) sur la surface de la matrice 3D en utilisant des précurseurs tels que le O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> ou le H<sub>2</sub>O<sup>169</sup>, ii) la copolymérisation greffée par plasma basée sur l'exposition de la surface polymère au gaz inerte (argon), générant ainsi des sites radicalaires. Ces derniers réagissent sur une famille de composés tels que l'acrylamide, l'acide acrylique ou l'alcène.

La mouillabilité des surfaces de PCL est améliorée par les traitements par plasma (air, argon, NH<sub>3</sub> ou O<sub>2</sub>). Ces traitements peuvent ainsi rendre les surfaces des matrices PCL très hydrophiles avec une réduction de l'angle de contact de presque 120°-140° (surface hydrophobe) à moins de 5°<sup>166</sup>. Le traitement de nanofibres de PCL par plasma (air) favorise la prolifération cellulaire. La prolifération des neurolemmocytes après 10 jours est 17% plus élevée sur des nanofibres traitées par plasma, par rapport au matériau non traité<sup>170</sup>. Martins et *al.* ont obtenu une augmentation d'adhésions et de proliférations cellulaires de trois lignées (L929, ATDC5 et Saos-2) après traitement d'un échafaudage PCL par Ar et O<sub>2</sub><sup>171</sup>.

Il en va de même pour les PLLA et PLGA dont les angles de contact avec l'eau sont élevés. Par exemple, l'angle de contact de PLLA avec l'eau passe de 128° à 48° après traitement par plasma O<sub>2</sub>. Ce traitement a amélioré l'adhésion des cellules souches mésenchymateuses porcines (pMSCs) sur les nanofibres de PLLA<sup>172</sup>. Concernant le PLGA, l'angle de contact est réduit de 139° à 112° et 47° après 180s de traitement par plasma à l'O<sub>2</sub> ou à l'ammoniac, respectivement<sup>173</sup>.

Malgré tous les avantages offerts par ce traitement, il souffre de quelques limitations. Par exemple, le matériau obtenu peut avoir une topographie rugueuse, une interconnectivité non uniforme, une distribution et des tailles des pores aléatoires. Ces non-uniformités des matériaux sont dues au processus de traitement par plasma. Ajoutons aussi que le plasma contient une densité élevée de particules énergétiques qui peuvent interagir avec la surface de la matrice d'une façon indésirable. Cela a été montré lors du traitement d'une matrice PCL 3D dont le traitement peut détruire complètement la matrice ou modifier la

morphologie du réseau. Enfin, seuls certains gaz précurseurs sont utilisables, ce qui limite la diversité chimique potentiellement obtenue par cette méthode.

### 3.2.4. Réactions de chimie click utilisées pour la modification de polyesters

Les paragraphes précédents ont présenté les voies principales de modification des polyesters. Dans ce qui suit on va s'intéresser en particulier à deux types de réactions de chimie « click ». Ce concept a été présenté par Sharpless en 2001, et il est caractérisé par la rapidité et la facilité de couplage entre deux groupes fonctionnels, la sélectivité et le travail dans des conditions douces<sup>174</sup>.

#### 3.2.4.1. Modification post-polymérisation alcyne-azoture

La modification alcyne-azoture est une réaction de cycloaddition qui repose sur le principe de la chimie click (click chemistry) (Fig. 31).

Huisgen a découvert que la réaction entre les azotures et les alcynes peut se faire dans des conditions douces en utilisant les sels de Cu(I) comme catalyseur. On parle de cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre(I) (CuAAC).



Figure I 31 : Représentation de la réaction de CuAAC

De nombreux exemples sont cités dans la littérature sur la modification des polyesters aliphatiques par cette voie. On trouve divers niveaux de fonctionnalisation allant de la modification des extrémités de chaînes à des fonctionnalisations de l'ensemble du squelette.

La fonctionnalisation des extrémités de chaînes est décrite par Li *et al.* qui ont fait réagir un sucre contenant un azoture terminal sur une  $\alpha$ -alkynyl-PCL<sup>175</sup>. La synthèse d'un copolymère étoile à 4 bras s(PCL-*b*-PEG)<sub>4</sub> ayant la PCL comme cœur a été réalisée par greffage entre les extrémités azoture d'une étoile PCL-N<sub>3</sub> et l'alcyne terminal d'un PEG-alcyne<sup>176</sup>.

La fonctionnalisation de polyesters en positions latérales est citée par Parrish *et al.* qui ont greffé des chaînes de PEG<sub>1100</sub> sur des poly( $\alpha$ -propargyl- $\delta$ -valérolactone-co-caprolactone) par une réaction alcyne-azoture. La synthèse du copolymère a été faite par copolymérisation entre les deux monomères correspondants<sup>131</sup>. De même, El Habnoui *et al.* ont utilisé cette stratégie pour synthétiser une PCL-DTPA pour des applications en IRM par couplage entre la PCL propargylée et un diazoture de l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (diN<sub>3</sub>-DTPA)<sup>177</sup>. Des exemples à base de polymères naturels (chitosan) et PCL ont été reportés. Des PCL-g-chitosan<sup>178</sup> ont été synthétisés par couplage entre des PCL<sub>50;100</sub> ou 200-N<sub>3</sub> (20% des unités fonctionnalisées) et le chitosan-alcyne avec un rendement de greffage de 75%. Ces copolymères ont formé des micelles des  $R_H$  faibles compris entre 9 et 18 nm utilisées pour encapsuler la (EE ~ 86% et DL ~ 8,6%).

De manière similaire, la CuAAC a été exploitée pour préparer des copolymères greffés PCL-g-PEG<sup>179</sup>. La synthèse se déroule en plusieurs étapes : la synthèse des CL fonctionnalisées par un groupe chlorure, la copolymérisation des CL et des CCL ( $\alpha$ -chloro- $\epsilon$ -caprolactone), la substitution du groupe chlorure par un groupe azoture, la modification de methoxyPEG par un groupe alcyne (A-PEG), puis la réaction CuAAC entre A-PEG et PCL-N<sub>3</sub>.

Les modifications post-polymérisation azoture-alcyne catalysées par le cuivre limitent cependant l'utilisation des polymères obtenus pour des applications biologiques à cause de la toxicité de cuivre<sup>180</sup>. Pour cela, une stratégie de fonctionnalisation sans cuivre a été mise au point. Elle repose sur la réaction de Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition (SPAAC) entre une fonction azoture et une fonction cyclooctyne<sup>181</sup>. Un autre exemple est l'emploi de stratégies de modifications photochimiques qui feront l'objet du paragraphe suivant et seront utilisés dans le cadre ce de travail de thèse.

### 3.2.4.2. Modifications photochimiques

Le greffage photochimique est intéressant pour modifier les polyesters aliphatiques grâce à plusieurs avantages tels que : le faible coût, les conditions réactionnelles douces et la sélectivité de la lumière UV<sup>182</sup>. Le greffage peut s'obtenir par les 2 stratégies : « grafting to » ou « grafting from » qui sont expliquées dans la partie 4-c. Cette technique de modification est appliquée en solution et en surface et plusieurs méthodes sont possibles parmi lesquelles les modifications activées par un photoamorceur, les modifications aryl-azotures et les réactions thiol-ène ou thiol-yne. Dans ce qui suit, des exemples des modifications en surface et en solution de polyesters aliphatiques tels que PLA, PLGA et PCL sont présentés.

#### 3.2.4.2.a. Modifications en présence de photoamorceur

Parmi les traitements UV en surface qui peuvent se faire dans des conditions douces, il y a les réactions en présence d'un photoamorceur tel que la benzophénone ou le peroxyde d'hydrogène<sup>183</sup>. Par exemple, des fibres de PCL ont été modifiées photochimiquement par un agent « clickable » (lié à la benzophénone) (Fig. 32) qui permet d'attacher des fluorophores aromatiques sur la surface des fibres de PCL<sup>184</sup>. La réaction photochimique radicalaire repose sur l'insertion de la benzophénone dans la liaison C-H de la PCL comme indiqué dans le schéma suivant :

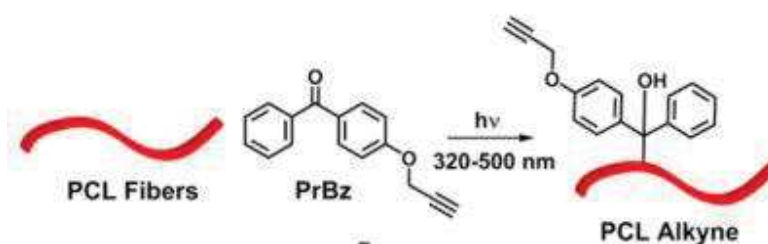


Figure I 32 : Modification photochimique en surface des fibres de PCL (figure adaptée de Kim et al.<sup>184</sup>)

La benzophénone a été utilisée aussi pour faire des modifications en surface de nanoparticules de PLA par la stratégie « grafting from ». Les surfaces des particules sont d'abord activées par la benzophénone puis, par polymérisation radicalaire photoinduite différents monomères sont greffés sur le PLA: acrylamide, acide acrylique ou anhydride maléique<sup>183</sup>.

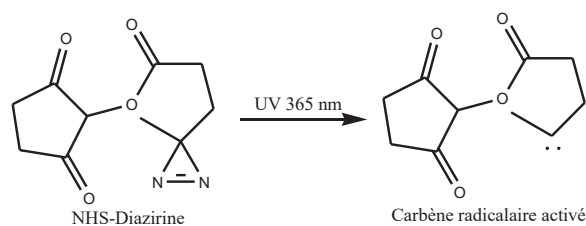
Le photogreffage en surface de la benzophénone se fait aussi en phase vapeur afin d'éviter l'effet nuisible du solvant sur la surface de PLA. Edlund *et al.*<sup>185</sup> ont utilisé la phase vapeur en une étape pour attacher le poly(acrylamide), le poly(anhydride maléique) et la poly(vinylpyrrolidone). Dans ce procédé, le film PLA est mis en présence d'une phase vapeur formée d'un mélange de monomères et de benzophénone, puis il est soumis à une irradiation UV à 50°C. Le taux de greffage augmente avec le temps d'irradiation. Källrot *et al.*<sup>186</sup> ont trouvé que les films de PLA greffé par poly(N-vinylpyrrolidone) par cette technique fournissent un bon substrat pour l'adhésion et la prolifération de 2 types de cellules : les kératinocytes et les fibroblastes de la peau.

La PCL a été modifiée en surface par le poly(acide méthacrylique) grâce au peroxyde d'hydrogène. Tout d'abord, une membrane de PCL est photooxydée par une solution d'hydroperoxyde générant ainsi des groupes peroxyde en surface de PCL. Ces derniers se décomposent sous UV en donnant des radicaux peroxydes qui amorcent la copolymérisation avec l'acide méthacrylique pour former en surface le copolymère PCL-g-PMAA<sup>187</sup>.

Le PLA a été fonctionnalisé par voie « grafting from » en 2 étapes par Ma *et al.* pour introduire des groupes hydrophiles tels que les hydroxyles (-OH), les carboxyles (-COOH) et les amides (-CONH<sub>2</sub>). Cette modification permet d'étudier l'effet de ces groupes fonctionnels sur la culture cellulaire de chondrocytes. La première étape commence par l'activation de PLA en l'immergeant dans une solution de peroxyde d'hydrogène, suivie par une irradiation UV à 50°C pendant 40 min. Le PLA photo-oxydé est ensuite immergé dans une solution des monomères sous UV pendant 60 min à 50°C<sup>188</sup>.

#### 3.2.4.2.b. Modifications radicalaires par voie carbène (diazirine)

Une autre voie de modification photochimique repose sur la photoréaction de diazirine. Le diazirine est biocompatible et permet la formation in situ d'un carbène en libérant du diazote après exposition à la lumière UV (320 – 370 nm) (Fig. 33). Ce carbène, hautement réactif, peut s'insérer facilement dans une liaison C–H.

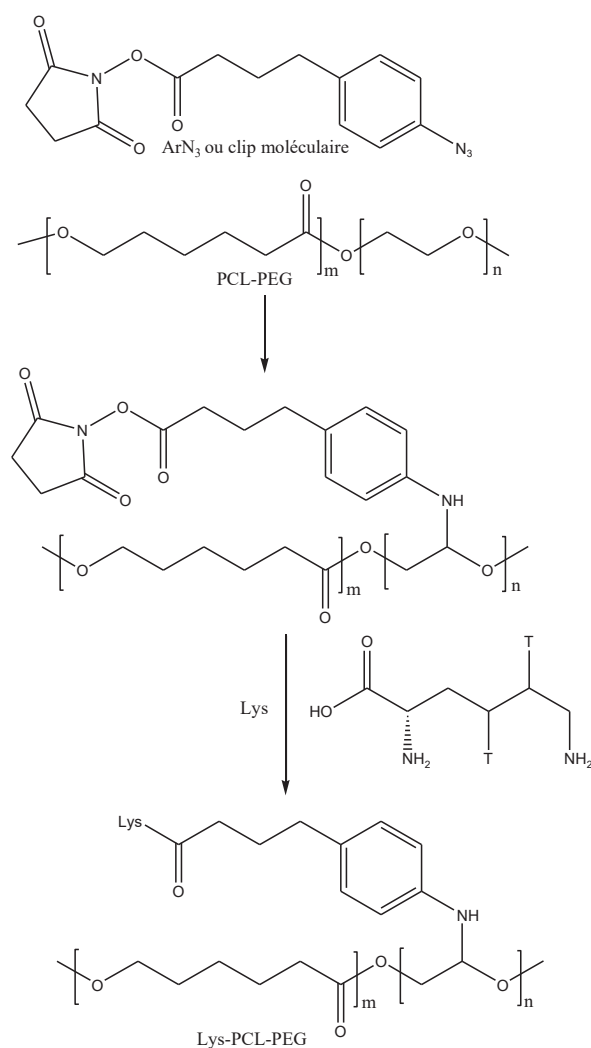


**Figure I 33** : Génération de carbène à partir de diazirine (figure adaptée de Mogal et al. <sup>189</sup>)

Des films de PLGA aminés par traitement plasma ont été modifiés par le NHS-diazirine. Ils ont ensuite été irradiés sous UV formant ainsi le carbène qui a servi ensuite à greffer des protéines. Les surfaces ainsi formées montrent une bioadhésion plus importante que celle du copolymère de départ<sup>189</sup>.

#### 3.2.4.2.c. Modifications radicalaires par voie aryl-azoture

Le motif aryl-azoture, suite à une activation UV, libère du diazote et forme un nitrene très réactif qui s'insère dans des liaisons C-H. Ce type de réaction a été utilisé pour greffer des peptides à base de RGD sur des nanoparticules PCL-PEG grâce à un motif réactif nommé « clip », par analogie avec la chimie « click », correspondant dans ce cas au butanoate de 4-(p-azidophenyl)-N-succinimidyl<sup>190</sup>. Pourcelle *et al.* ont aussi greffé des lysines sur des copolymères PCL-PEG de différentes  $M_w$  en utilisant le même motif clip<sup>191</sup>. Le mécanisme est montré dans la figure 34. Il est cependant intéressant de noter que l'insertion s'est faite préférentiellement sur les unités EG et pas sur les CL.



**Figure I 34 :** Greffage de lysine sur PCL-b-PEG à travers un clip (figure adaptée de Pourcelle et al.<sup>191</sup>)

Zhu *et al.* ont utilisé la stratégie « grafting to » pour greffer des chaînes de chitosane sur la surface d'un film de PLA et PLGA en utilisant l'acide 4-azidobenzoïque<sup>192-193</sup>. La présence de chitosane a été exploitée pour lier en surface du matériau de la gélatine, ce qui a permis d'améliorer l'adhésion des fibroblastes 3T3 par rapport à la surface de PLGA non traité.

#### 3.2.4.2.d. Modification photochimique thiol-yne et thiol-ène

La réaction thiol-yne est une hydrothiolation de triple liaison carbone-carbone, elle permet l'addition de deux molécules thiolées. La réaction thiol-ène quant à elle ne permet



l'addition que d'une seule molécule thiolée. La stratégie photocimique thiol-yne présente plusieurs avantages telles que i) la rapidité de la réaction de fonctionnalisation, ii) l'absence d'un catalyseur métallique, ce qui est bénéfique pour les applications médicales, iii) les conditions douces utilisées. La réaction thiol-yne a montré son importance dans la chimie des polymères après les travaux de Fairbanks *et al.*<sup>194</sup> et Chan *et al.*<sup>195</sup>. Ils ont préparé des réseaux basés sur des thioéthers hautement réticulés par chimie thiol-yne. Le radical thiyl R-S' est généré par voie thermique ou en utilisant un photoamorceur. Ce radical réagit avec l'alcyne par une addition anti-Markovnikov formant ainsi un intermédiaire sulfure de vinyle. Ce dernier, sous l'action d'un autre radical thiyl R-S' subit une deuxième addition donnant un dithioéther (Fig. 35).

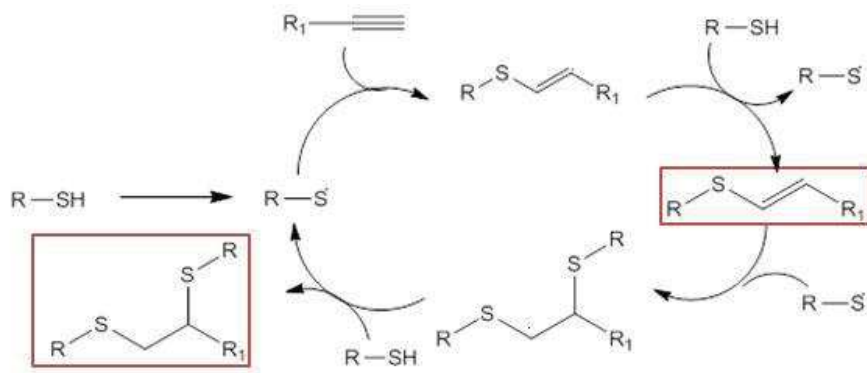
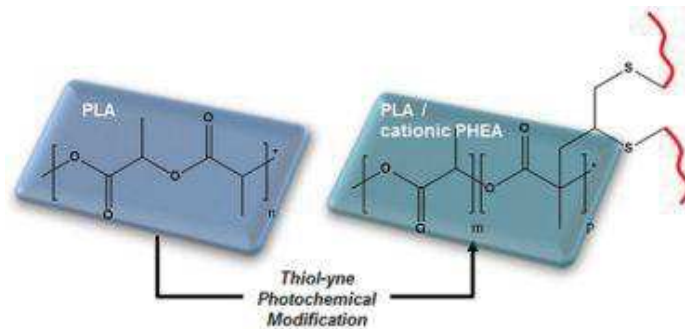


Figure I 35 : Mécanisme de la réaction thiol-yne

La réaction thiol-yne a été largement utilisée pour greffer des petites molécules sur des polymères. Par exemple, le greffage de molécules thiolées (acide mercaptopropionique, dodecanthiol, thioglycérol...) a été fait sur le (propargyl methacrylate-trimethylsilyl (PgMA-SiMe<sub>3</sub>)) par voie thiol-yne en utilisant l'irgacure 2959 comme photoamorceur<sup>196</sup>. Billiet *et al.* ont modifié des polyamides aliphatiques fonctionnalisés par des alcynes avec des benzyl mercaptan. La fonctionnalisation a été réalisée en utilisant 5 eq. de thiol et 0,2 eq. de DMPA (par rapport aux groupes alcynes présents) dans l'acide formique à 365 nm. 60% de conversion des groupes alcynes ont été obtenus après 60 min d'irradiation<sup>197</sup>. Le greffage de l'acide 2-mercaptopuccinique sur un groupe alcyne lié dans le copolymère poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*b*-poly(propargyl methacrylate-co-poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate) a été réalisé dans le DMF en présence d'un photoamorceur, le DMPA, avec 2h d'irradiation<sup>198</sup>. Un PLA à fonction terminale allyle a été modifié par

voie thiol-ène par le benzyl mercaptan et le PLA-propargyl a été substitué par l'acide mercaptopropionique et l'acide mercaptosuccinique en utilisant le DMPA comme photoamorceur<sup>199</sup>.

Au niveau de la synthèse de matériaux, l'activation thiol-ène a été utilisée pour greffer une PCL-thiolée sur des celluloses modifiées par des alcènes<sup>200</sup>. On peut aussi citer la synthèse de PCL hyperbranchée obtenue par polycondensation de poly( $\epsilon$ -caprolactone) téléchélique porteuse de groupes terminaux  $\alpha$ -thiol et  $\omega$ -alcyne. La réaction se fait dans le THF en utilisant le DMPA comme photoamorceur à 365 nm<sup>201</sup>. Le photogreffage thiol-yne en surface de PLA<sub>94</sub> a été réalisé par Sardo *et al.* (Fig. 36). La modification se fait en 2 étapes : une propargylation du PLA par le système LDA/PgBr puis greffage de dérivés thiolés et quaternisés de  $\alpha,\beta$ -poly (N-2-hydroxyethyl)-D,L-aspartamide (PHEA) sur le PLA<sup>165</sup>.



**Figure I 36** : Stratégie de modification de PLA en surface par voie thiol-yne (figure adaptée de Sardo et al.<sup>165</sup>)

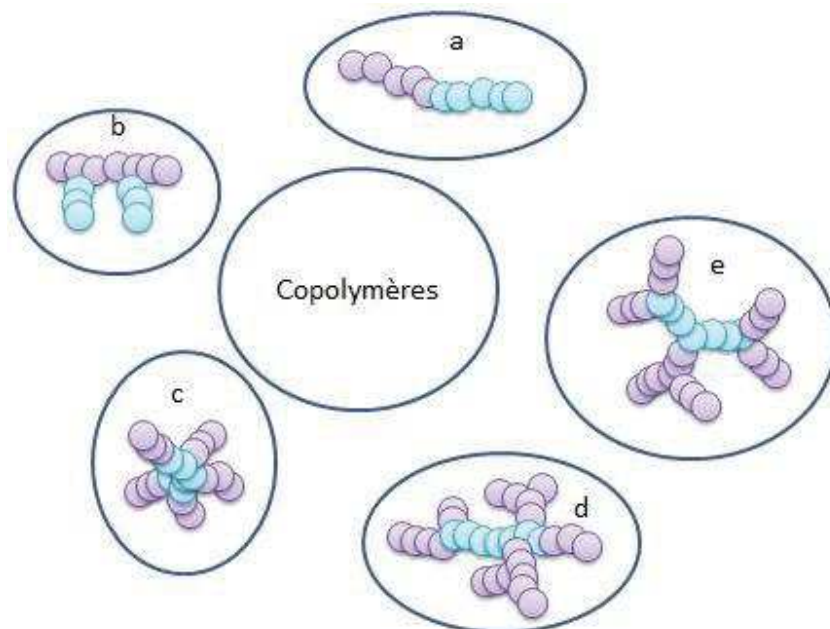
La modification thiol-yne présente donc des avantages indéniables pour modifier des polymères grâce à sa rapidité, son orthogonalité et à l'absence des catalyseurs métalliques. Pour ces raisons, elle a été choisie dans la suite de ce travail pour modifier des polyesters hydrophobes (PCL et PLA) et générer en particulier des familles de copolyesters amphiphiles qui font l'objet du paragraphe suivant.

#### 4. Copolyesters amphiphiles

On a vu dans la partie qui précède les stratégies utilisées pour modifier les polyesters aliphatiques. Nous allons maintenant illustrer ceci en se focalisant sur les copolyesters

amphiphiles, en particulier ceux à base de PCL. L'intérêt des copolymères amphiphiles est qu'ils peuvent s'auto-assembler dans les milieux aqueux formant ainsi des micelles utilisées pour le transport des principes actifs hydrophobes. On trouve dans la littérature de nombreux exemples de copolymères constitués de PCL comme composant hydrophobe associée à des blocs hydrophiles tels que les polyéthylène glycol (PEG), poly(acide acrylique) (PAA), poly(2-éthyl-2-oxazoline) (PEtOz) etc.<sup>202</sup>. Ces polymères forment des objets de tailles et de natures diverses comme des nanoparticules décorées, des micelles, des vésicules et ou des (nano)hydrogels<sup>203-204</sup>.

Les copolymères amphiphiles présentent différentes architectures parmi lesquelles les copolymères à blocs, les copolymères greffés, les copolymères hyperbranchés, les copolymères dendritiques et les copolymères étoiles (Fig. 37). Dans ce qui suit on s'intéressera uniquement aux copolyesters amphiphiles à base de PCL et hydrosolubles, voire hydrodispersibles. Bien que largement étudiés et décrits pour des applications temporaires, on ne citera pas les copolymères à base de PLA, PGA, PLGA ou ceux à base de PCL à caractère hydrophobes.



**Figure I 37** : Différentes architectures des copolymères : a) copolymères à blocs, b) copolymères greffés, c) copolymères étoiles, d) copolymères hyperbranchés, et e) copolymères dendritiques.

#### 4.1. Copolymères à blocs

Les copolymères amphiphiles dégradables les plus classiques sont les copolymères à blocs. Une vaste gamme est connue, en particulier à base de PLA, mais on se limite ici à discuter les copolymères amphiphiles à base de PCL.

##### 4.1.1. Copolymères diblocs PEG-*b*-PCL :

La famille des copolymères diblocs PEG-*b*-PCL a été largement étudiée et a fait l'objet de nombreux articles et revues. L'objet de ce paragraphe n'est donc pas de faire un listing exhaustif des diblocs existants, mais de pointer certaines particularités de ces copolymères. Afin d'avoir plus d'information sur les copolymères à bloc PEG-*b*-PCL, on peut se reporter à la revue récente publiée par Li *et al.* sur ce sujet<sup>202</sup>.

D'une manière générale, il est possible de contrôler leur comportement d'auto-assemblage, leurs propriétés mécaniques et physiques en ajustant le rapport hydrophile / hydrophobe. Les copolymères à bloc PEG-*b*-PCL sont principalement synthétisés par POC d' $\epsilon$ -caprolactone en utilisant le monométhoxy-polyéthylène glycol (MPEG) comme macroamorceur. Ce type de copolymère a en particulier été étudié par Li *et al.* à travers différentes études portant sur l'influence de la composition ((MPEG: Mn = 1000-2000 g/mol ; CL/EG entre 0,2 et 3,0) et sur leurs propriétés physiques (cristallisation du cœur)<sup>205</sup>. De manière générale, les concentrations micellaires critiques (CMC) des PEG-*b*-PCL sont faibles et varient entre 0,6 et 8,2 mg/L<sup>206-202-207-208-209</sup>. Les valeurs de CMC augmentent avec la diminution de la longueur de chaîne PCL et l'augmentation de la teneur en PEG. A titre d'exemple, une gamme de copolymères PEG-*b*-PCL (MPEG: Mn = 5000 g/mol) avec des masses molaires comprises entre 7500 et 21000 g/mol a été synthétisée par Mohanty *et al.*<sup>208</sup>. Ils ont montré que les CMC sont 5.9 mg/L pour MPEG60-PCL40, 4.8 mg/L pour MPEG40-PCL60 et 3.9 mg/L pour MPEG20-PCL80. En termes de taille, les copolymères diblocs PEG-*b*-PCL conduisent à la formation de micelles de tailles réduites (généralement < 100 nm), fonction là aussi de la composition et de la longueur des blocs. Des copolymères PEG<sub>114</sub>-*b*-PCL avec des longueurs différentes de PCL (1900-18300 g/mol) forment des micelles de diamètres compris entre 30 et 80 nm<sup>209</sup>. Un autre exemple issu du travail de Choi *et al.*<sup>206</sup> permet d'illustrer ces évolutions de taille et de CMC (Tableau I-4).

**Tableau I 4** : Caractérisations des copolymères PCL-b-PEG.

<b>Copolymère</b>	<b>PEGMw (g/mol)</b>	<b>PCLMw (g/mol)</b>	<b>EG/CL</b>	<b>CMC (mg/L)</b>	<b>D<sub>H</sub> (nm)</b>
<b>PEG-<i>b</i>-PCL</b>	2 K	900	5,8	5,9	65 ± 8
<b>PEG-<i>b</i>-PCL</b>	2 K	1900	2,7	2,1	192 ± 24
<b>PEG-<i>b</i>-PCL</b>	2 K	2800	1,9	0,8	266 ± 35

Outre les micelles, dans le cas où le rapport EG/CL reste faible il est aussi possible de former des nanoparticules pegylées ou des polymersomes<sup>210</sup> en fonction de la méthode d'auto-assemblage utilisée. Il est enfin intéressant de noter que les copolymères diblocs PEG-*b*-PCL ont montré un potentiel excellent pour l'internalisation dans le cytoplasme cellulaire par endocytose<sup>207-211</sup>.

#### **4.1.2. Autres copolymères diblocs à base de PCL**

La PCL forme aussi des copolymères amphiphiles avec des polymères autres que le PEG. On trouve des dérivés (méth)acryliques, (méth)acrylamides, vinyliques, peptidiques etc. Par exemple, la PCL a été couplée avec le polyacide acrylique (PAA) pour former PCL-*b*-PAA. La synthèse se fait par combinaison de polymérisation par ouverture de cycle (POC) de l' $\epsilon$ -CL et polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) de terbutyl-acrylate, suivie par l'hydrolyse de l'ester terbutylique en acide acrylique<sup>212</sup>. Ce copolymère a donné une CMC de 1 mg/mL. On trouve aussi la PCL-*b*-poly(N,N-diméthylamino-2-ethyl methacrylate) (PDMAEMA)<sup>213</sup>, PCL-*b*-poly(4-vinylpyridine)<sup>214</sup> ou PCL-*b*-poly(N-isopropylacrylamide)<sup>215</sup>. Parmi les polymères présentés comme des remplaçants potentiels du PEG pour les applications biomédicales, on peut citer les copolymères diblock substituant le PEG par la polysarcosine<sup>216</sup> ou les poly(oxazoline)s<sup>217</sup>. Une revue a été publiée sur ce type de diblocs présentant d'autres exemples<sup>202</sup>.

#### **4.1.3. Copolymères triblocs à base de PCL**

Des copolymères triblocs de type A-B-C et contenant la PCL sont connus. Par exemple, des séries de copolymères MPEG-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA sont préparées en combinant la POC, la transésterification et l'ATRP<sup>218</sup>. Ces copolymères ont des CMC dépendantes du pH et peuvent s'organiser dans le PBS en micelles ou vésicules en fonction de la longueur du PDMAEMA<sup>219</sup>. En outre, les copolymères triblocs PEG-*b*-PCL-*b*-PAA

forment aussi des micelles ou des vésicules<sup>220</sup>. Des copolymères PEG-*b*-PCL-*b*-PEI (PEI : polyéthylène imine) destinés à délivrer des ARN ont aussi été synthétisés<sup>221</sup>.

Les copolymères triblocs formés de deux types de polymères sont aussi cités dans la littérature. Dans ce cas, deux possibilités existent : A-B-A ou B-A-B, où A représente la PCL et B représente le polymère hydrophile. Par exemple, PCL-*b*-PEG-*b*-PCL est synthétisé par POC de l' $\epsilon$ -caprolactone en présence de PEG-diol comme amorceur<sup>222</sup>. Une série de copolymères avec des longueurs de blocs PCL entre 2600 et 27000 g/mol et PEG entre 1000 et 5000 g/mol a été synthétisée et a donné des CMC variant entre 0.4 et 1.2 mg/L<sup>222</sup>. Ces copolymères ont été utilisés pour préparer des particules monodisperses de tailles inférieures à 200 nm sans utilisation de surfactant, permettant la libération des hormones<sup>223</sup>. Citons aussi la PCL-*b*-OPEG-*b*-PCL, où PEG et PCL sont liés par une liaison oxime ( $M_n = 4,31 \times 10^3$  g/mol), et qui forme des micelles en forme de fleurs avec une CMC de 12 mg/L<sup>56</sup>. Ces micelles ont des diamètres de 135 nm (mesurés par TEM) et permettent l'encapsulation de DOX, ce qui entraîne une augmentation de taille (175 nm en TEM). Un autre exemple de type A-B-A est la PCL-*b*-PNIPAAm-*b*-PCL qui est synthétisée avec différentes masses molaires. Ces copolymères ont des CMC relativement élevées, entre 33.8 et 41.7 mg/L et ils s'organisent en solution aqueuse sous forme de nanosphères de diamètres aux alentours de 100 nm<sup>224</sup>.

La deuxième possibilité est d'avoir deux blocs hydrophiles aux extrémités et la PCL au centre, soit l'architecture B-A-B. Là encore, les groupes hydrophiles les plus classiques sont le PEG, le PNIPAAm, le PDMAEMA, etc... Par exemple, le PEG-*b*-PCL-*b*-PEG est obtenu par couplage entre le MPEG-*b*-PCL-OH et le MPEG-COOH en utilisant les agents d'estérification dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et 4-diméthylaminopyridine (DMAP)<sup>225</sup>. Ces copolymères forment des micelles avec des tailles comprises entre 40 et 92 nm. Ces dernières servent à encapsuler des médicaments dans les cœurs hydrophobes suivis par des libérations *in vitro* pH dépendantes (plus rapide à pH 5.4 qu'à pH 7.4). D'autres PEG-*b*-PCL-*b*-PEG sont bien sûr décrits<sup>226</sup> mais la liste serait trop longue pour tous les citer. Comme pour les diblocs, on trouve aussi d'autres triblocs B-A-B comme les PNIPAAm-*b*-PCL-*b*-PNIPAAm<sup>227</sup> et PDMAEMA-*b*-PCL-*b*-PDMAEMA<sup>228</sup>.

Concernant leurs applications dans le transport des PA, les copolymères amphiphiles à base de PCL-PEG, au même titre que le Genexol et le NK105, peuvent encapsuler des principes actifs hydrophobes dans le cœur de PCL. Le PEG entoure le cœur hydrophobe et sert à solubiliser l'ensemble et permet d'augmenter le temps de circulation des nanoobjets dans le sang et de diminuer l'opsonisation. De nombreuses études ont ainsi été réalisées sur la libération de PA par des nanoobjets à base de PCL-PEG. Des exemples seront cités dans ce qui suit.

Une étude récente a été menée sur l'effet des nanoparticules à base de PCL<sub>1000</sub>-PEG<sub>4000</sub>-PCL<sub>1000</sub> encapsulant des PA anticancéreux sur les cellules cancéreuses MCF7<sup>229</sup>. Une comparaison entre l'encapsulation de trois PA (cisplatine, doxorubicine et 5-fluorouracil) et leurs effets sur deux types de cellules de cancers du sein est montrée dans le tableau I.5.

**Tableau I 5 :** Taux de charge (drug loading, DL) et efficacité d'encapsulation (EE) de PCL<sub>1000</sub>-PEG<sub>4000</sub>-PCL<sub>1000</sub> encapsulant trois PA (cisplatine, doxorubicine et 5-fluorouracil) et leurs CI<sub>50</sub> sur 2 types de cellules cancéreuses (T47D et MCF7)

PA	DL	EE	CI <sub>50</sub> T47D (24h)		CI <sub>50</sub> MCF7 (24h)	
			μM		μM	
			PA libre	PA encapsulé	PA libre	PA encapsulé
<b>Cisplatine</b>	13,53%	98,8%	70,91	50,32	44,17	26,39
<b>Doxorubicine</b>	16,12%	99,1%	3,001	1,626	2,286	1,23
<b>5-fluorouracil</b>	14,24%	98,9%	28,46	39,11	33,65	23,79

Les encapsulations de ces trois principes actifs ont montré une amélioration d'effet thérapeutique *in vitro* par rapport aux PA libres. La concentration inhibitrice médicale (CI<sub>50</sub>) pour la doxorubicine est plus faible que celles de deux autres PA. Les trois PA ont montré plus de cytotoxicité sur MCF7 que sur T47D.

Une autre étude a été menée sur les cellules cancéreuses 4T1 avec le copolymère à blocs MPEG<sub>2000</sub>-*b*-PCL<sub>1950</sub> encapsulant la curcumine. Les micelles ainsi formées ont des tailles aux alentours de 28 nm, le DL est 14,84 ± 0,11% et l'EE est 98,91 ± 0,70%.



L'encapsulation de la curcumine dans ces micelles a entraîné une amélioration de la toxicité sur les cellules cancéreuses par rapport à la curcumine libre<sup>230</sup>.

Enfin, il faut noter que les copolymères à blocs à base de PCL sont très diversifiés et qu'on trouve aussi des exemples de copolymères multiblocs comme le PCL-*b*-PEG-*b*-PPG-*b*-PEG-*b*-PCL<sup>231</sup>.

#### **4.2. Copolymères en étoile**

La PCL peut être copolymérisée sous forme d'architectures plus complexes que les structures linéaires, par exemple des structures « étoile » qui ont des caractéristiques différentes. Ils ont tout d'abord des rayons hydrodynamiques et des viscosités plus faibles par rapport à leurs analogues linéaires de même composition et masse molaire. En outre les copolymères à blocs en forme d'étoile forment des micelles plus stables que celles de copolymères linéaires<sup>232</sup>.

Il y a deux méthodes de préparation des copolymères en étoile : le « bras en premier » (arm-first) ou bien le « cœur en premier » (core-first). La première méthode nécessite la synthèse des bras sur un macroamorceur contenant un nombre précis de sites actifs tandis que la deuxième repose sur la synthèse des chaînes de copolymères en utilisant des amorceurs de faibles masses molaires<sup>233</sup>.

Plusieurs structures en étoile avec des nombres de bras différents sont connues. Citons tout d'abord un copolymère en étoile à trois bras à base de PCL-PEG. La synthèse a été faite en utilisant un amorceur tri-fonctionnel : le glycérol<sup>234</sup>. Ces copolymères forment des micelles par dispersion par les ultrasons sans ajout de solvant organique.

On trouve ensuite des copolymères en étoile à 4 bras, le sPEG-*b*-(PCL)<sub>4</sub> dont la synthèse est initié par un PEG en étoile à 4 bras à fonctions hydroxyles terminales<sup>232</sup>.

Zhang *et al.* ont développé un copolymère en étoile à 4 bras sPCL-*b*-(PEG-GA)<sub>4</sub> (acide glycyrrhétinique) en utilisant le pentaerythritol (PTOL) comme catalyseur<sup>235</sup>. En plus, La PCL forme des copolymères étoiles à 2, 3 et 4 bras à cœur hydrophobe avec le PEG. Les tailles et les CMC de ses nanoobjets diminuent avec l'augmentation du nombre de bras,



montrant que la formation des micelles devient plus facile quand le nombre de bras augmente<sup>236</sup>.

Outre les étoiles classiques, on trouve aussi dans cette catégorie les copolymères étoiles avec des cœurs dendrimères. Wang *et al.*<sup>237</sup> ont synthétisé des polymères étoiles à cœur dendrimère polyamidoamine (PAMAM) lié à des PCL puis à des bras PEG (Fig. 38). La masse moléculaire théorique du cœur PCL est 51300 g/mol et la masse molaire de l'étoile PCL-PEG est 131300 g/mol. Ce copolymère n'est pas directement soluble dans l'eau malgré un rapport EG/CL ~ 4 mais a pu être solubilisé par dialyse dans l'eau après dissolution dans le DMF. La CMC, déterminée par fluorométrie en utilisant le pyrène comme sonde fluorescente, est de 3 mg/L avec une distribution bimodale où 80% des particules ont des diamètres de 17 nm et 20% un diamètre de 75 nm. La capacité d'encapsuler des PA a été testée sur l'indométacine (anti-inflammatoire), la doxorubicine et l'étoposide (anticancéreux).

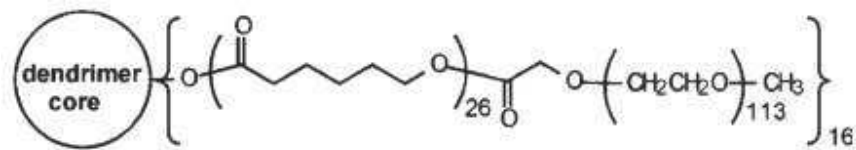


Figure I 38 : Etoile PCL-PEG à cœur dendrimère PAMAM (figure adaptée de Wang *et al.*<sup>237</sup>)

#### 4.3. Copolyesters amphiphiles greffés

Un polymère ramifié est un polymère présentant au moins un point de ramification entre ses deux groupes terminaux, un point de ramification étant un point d'une chaîne sur lequel est fixée une chaîne latérale également appelée branche ou chaîne pendante. La chaîne latérale est dite greffon lorsque sa composition est différente de celle de la chaîne principale.

Le greffage des chaînes latérales permet de distribuer les caractéristiques des chaînes des polymères latéraux sur la totalité de la chaîne principale, ce qui influence ensuite les caractéristiques et l'auto-assemblage des copolymères formés. Les copolymères amphiphiles greffés sont caractérisés par 5 paramètres : la nature de la chaîne principale (hydrophile ou hydrophobe), la nature des greffons, la longueur de la chaîne principale, la longueur des chaînes latérales et le nombre des chaînes greffées. Ces 5 paramètres

influencent le rapport hydrophile / hydrophobe mais aussi les propriétés d'auto-assemblage et d'encapsulation. Les stratégies développées pour la synthèse des copolymères amphiphiles greffés sont : le grafting through, le grafting to et le grafting from (Fig. 39).

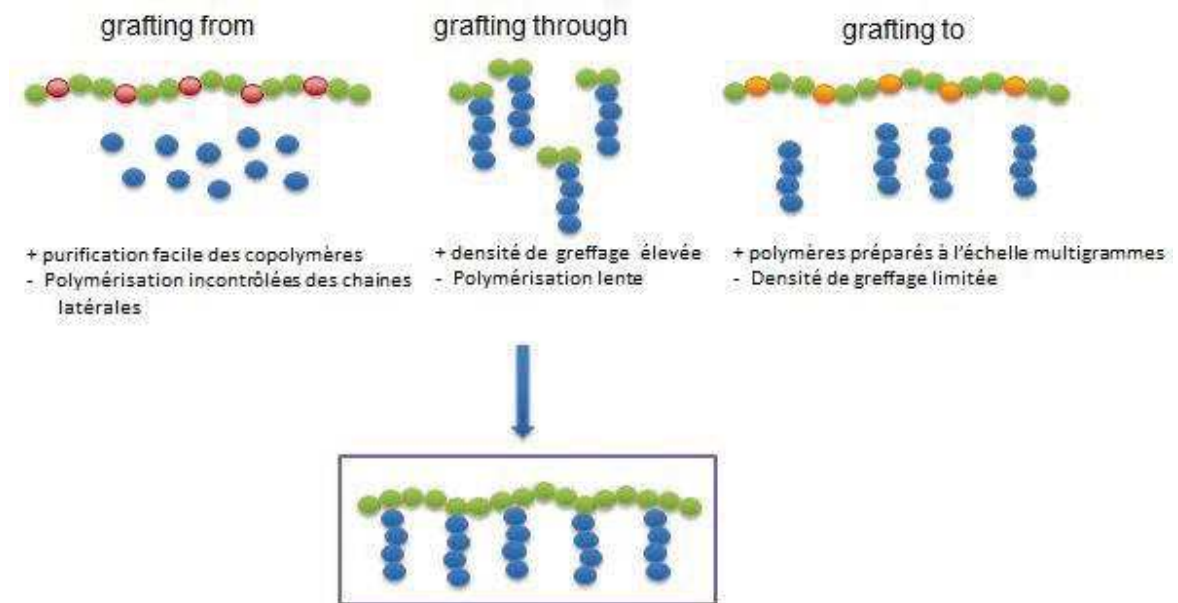


Figure I 39 : Stratégies de synthèse des copolymères greffés à squelette PCL

#### 4.3.1. Grafting from

La stratégie « grafting from » repose sur la polymérisation des chaînes latérales directement sur le squelette polymérique portant des sites fonctionnels jouant le rôle d'amorceur de polymérisation. Cette méthode présente l'avantage d'une purification rapide des polymères résultants mais elle souffre de polymérisations souvent incontrôlées qui donnent des chaînes latérales de tailles différentes.

D'une manière générale, les structures les plus classiques sont celles à chaîne principale hydrophile dont les groupes fonctionnels (en particulier hydroxyles) sont utilisés pour réaliser la POC de (di)lactones. Cependant on trouve aussi des exemples où des (co)polyesters hydrophobes biodégradables à base de PCL ou PLA ont été utilisés comme macroamorceurs.

Pour la première catégorie (chaîne principale hydrophile), on peut citer le travail de Nouvel *et al.* qui ont utilisé la même stratégie pour greffer des PLA par une polymérisation par ouverture du cycle lactide à partir des hydroxyles de dextrane et obtenir ainsi un copolymère de structure inverse Dextrane-*g*-PLA<sup>238</sup>. La même stratégie a été utilisée pour la PCL<sup>239</sup>. La synthèse de poly(oxyde d'éthylène-*co*-allyl glycidyl éther)-*g*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) ayant le polymère hydrophile (PEAG) comme chaîne principale greffée par le polymère hydrophobe (PCL) a été rapportée par Li *et al.*<sup>240-241</sup> (Fig. 40). Le copolymère a été préparé par copolymérisation entre l'EG et l'AGE et une protection du groupe hydroxyle terminal par un groupe acyle. Puis une addition radicalaire thiol-ène entre le groupe alcène d'AGE et le mercaptothiol a permis de générer des groupes hydroxyle le long de la chaîne polymérique, permettant d'amorcer la POC de l' $\epsilon$ -CL.

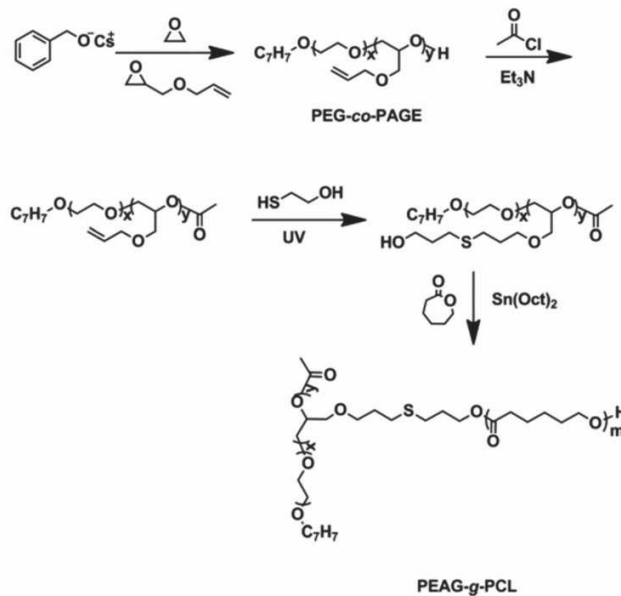


Figure I 40 : Synthèse de PEAG-*g*-PCL (figure adaptée de Li *et al.*<sup>241</sup>)

Tableau I 6 : Caractérisation des NPs PEAG-*g*-PCL

Copolymère	Composition	Taille (nm)	CAC ( $10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ )
PEAG <sub>6K</sub> -OH	Poly(EG <sub>122</sub> - <i>co</i> -AGE <sub>6</sub> - <i>g</i> -CL <sub>108</sub> )	139	2,1
	Poly(EG <sub>122</sub> - <i>co</i> -AGE <sub>6</sub> - <i>g</i> -CL <sub>142</sub> )	108	1,4
	Poly(EG <sub>122</sub> - <i>co</i> -AGE <sub>6</sub> - <i>g</i> -CL <sub>198</sub> )	137	1,1
PEAG <sub>10K</sub> -OH	Poly(EG <sub>122</sub> - <i>co</i> -AGE <sub>9</sub> - <i>g</i> -CL <sub>149</sub> )	222	1,2
	Poly(EG <sub>122</sub> - <i>co</i> -AGE <sub>9</sub> - <i>g</i> -CL <sub>237</sub> )	142	1,0
	Poly(EG <sub>122</sub> - <i>co</i> -AGE <sub>9</sub> - <i>g</i> -CL <sub>294</sub> )	299	0,5

Le tableau I-6 montre la formation des copolymères amphiphiles avec des longueurs de chaînes PCL différentes. Ces copolymères ont des CAC assez faibles, mais les tailles des nanoobjets obtenus étaient grandes par rapport aux nanoobjets utilisés dans la délivrance des médicaments anticancéreux. Ces copolymères ont été utilisés pour encapsuler les hémoglobines<sup>241</sup>.

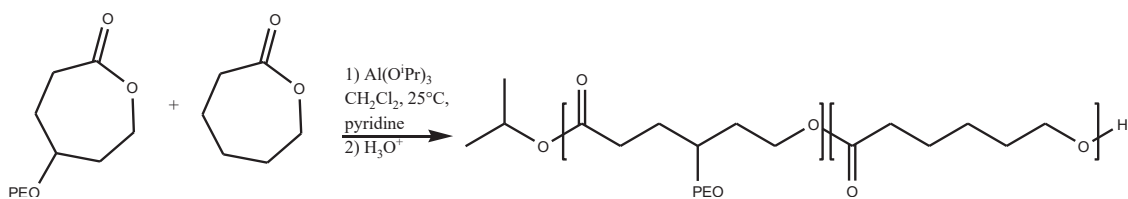
En ce qui concerne la seconde catégorie (chaîne principale hydrophobe), à notre connaissance les seuls travaux rapportant une approche « grafting from » pour la PCL sont ceux de Nottelet *et al.* qui ont reporté la synthèse de poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*g*-poly(L-lysine)<sup>161</sup>. La polymérisation est déclenchée par une activation anionique de la PCL permettant la formation d'un macropolycarbanion utilisé pour amorcer la POC anionique de NCA de lysine. Ils ont aussi décrit la synthèse de poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*g*-poly(4-vinyl pyridine) (PCL-*g*-P4VP) et de poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*g*-poly(diméthylaminoéthyl méthacrylate) (PCL-*g*-PDMAEMA) par polymérisation anionique des doubles liaisons méthacryliques et vinyliques en utilisant le même macropolycarbanion de PCL<sup>242</sup>.

En résumé, cette stratégie a été suivie pour synthétiser une gamme de copolymères amphiphiles, mais à notre connaissance, aucun exemple de synthèse de PCL-*g*-PEG par cette méthode n'a été rapportée à ce jour.

#### 4.3.2. *Grafting through*

La stratégie « grafting through » est basée sur la copolymérisation de macro-monomères. Le copolymère ainsi formé présente parfois une densité de greffage élevée, mais l'encombrement stérique des macro-monomères rend souvent la polymérisation lente et difficile.

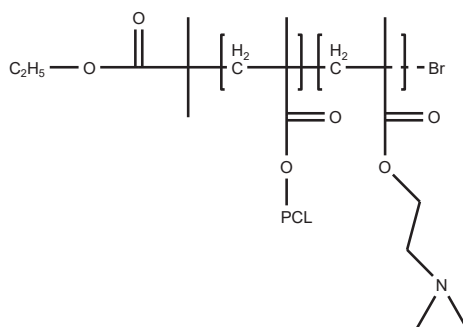
Un exemple de synthèse de PCL-*g*-PEG par la stratégie « grafting through » est donné par Rieger. La production se fait par copolymérisation entre le  $\gamma$ PEG-CL et l' $\epsilon$ -CL par une POC<sup>134</sup> (Fig. 41).



**Figure I 41** : Copolymérisation de  $\epsilon$ CL et  $\gamma$ PEO.CL (poly( $\epsilon$ CL-co- $\gamma$ PEO.CL))

Pendant la réaction, l' $\epsilon$ -CL est consommée beaucoup plus rapidement que le macromonomère  $\gamma$ PEG-CL. La réaction continue jusqu'à ce que l' $\epsilon$ -CL réagisse complètement puis elle s'arrête, par conséquent le rapport EG/CL dans le copolymère final est plus faible que le rapport du départ utilisé et des copolymères greffés gradients sont obtenus. Les copolymères synthétisés par cette stratégie présentaient des rapports EG/CL entre 0,65 et 1,4 pour des masses molaires comprises entre 10000 et 37000 g/mol.

La synthèse de copolymères à squelette hydrophile et chaîne latérale hydrophobe a été rapportée par Mespouille *et al.* qui ont synthétisé le poly(*N,N*-diméthylamino-2-éthyl méthacrylate)-*g*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) par la méthode « grafting through » en polymérisant un méthacrylate-PCL. La structure du copolymère formé est présentée dans la figure 42<sup>243</sup>.



**Figure I 42** : Structure de PDMAEMA-*g*-PCL (figure adaptée de Mespouille et al.<sup>243</sup>)

La stratégie « grafting through » a été employée aussi pour synthétiser des poly (PEO-*alt*-PCL). Le polymère formé est obtenu par copolymérisation radicalaire entre la PCL portant un groupement maléimide et le PEO portant un groupe vinylbenzyl<sup>244</sup>. Le degré de polymérisation est amélioré par l'augmentation de la concentration des macromonomères et du temps de réaction. Les résultats montrent des degrés de polymérisation variant entre 18 et 310 pour des temps de réaction entre 24 et 72h.

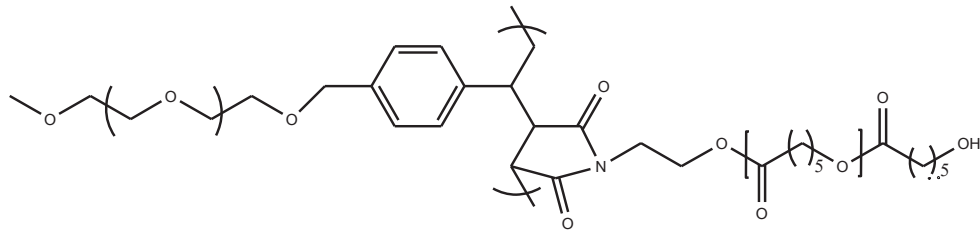


Figure I 43 : Structure de poly(PEO-alt-PCL)

Pour conclure, cette stratégie nécessite généralement un temps de réaction élevé et la copolymérisation peut être gênée par la faible réactivité des macro-monomères conduisant souvent à des copolymères possédant un nombre limité des groupes latéraux.

#### 4.3.3. Grafting to

Cette méthode implique l'utilisation de polymères possédant des groupes fonctionnels distribués le long de la chaîne principale. La formation des copolymères greffés provient de la réaction de couplage entre les groupes fonctionnels latéraux de la chaîne principale et les bouts de chaîne du polymère à greffer. Elle présente l'avantage que les deux polymères sont préparés et caractérisés séparément. Par suite il est facile d'étudier la composition finale du copolymère greffé. Par contre, cette stratégie souffre d'une densité de greffage généralement faible en raison de l'encombrement stérique des deux polymères. Le challenge réside alors dans le contrôle et l'augmentation de la densité de greffage des chaînes PEG sur le squelette de PCL pour former des PCL-g-PEG.

Un exemple de synthèse de PCL-g-PEG par la stratégie « grafting to » a été fait par une modification anionique de la PCL<sup>163</sup>. Le greffage se fait entre un dérivé bromé de MPEG-OH et le macropolycarbanion de PCL à 78°C. Les densités de greffages obtenus, en changeant des paramètres de réaction, se situent entre 0,13 et 1,2 chaînes PEG<sub>2000</sub> pour 100 unités CL. La densité 1,2 correspond à un rapport EG/CL = 0,54, donc ces copolymères forment des nanoparticules relativement hydrophobes et de grandes tailles (PCL-g-PEG<sub>0,74</sub> D<sub>H</sub> = 150 nm).

Le copolymère PCL-g-PEG a été synthétisé aussi par Zhang *et al.* en couplant la POC et la méthode de « grafting to »<sup>179</sup>. La CL a été modifiée par un chlorure avant d'être

copolymérisée avec la CL non modifiée. Puis une substitution nucléophile des chlorures par  $\text{NaN}_3$  a conduit à une PCL à fonctions azotures. Ces derniers réagissent finalement avec des PEG-alcyne, suivant une chimie click au cuivre (CuAAC), pour former le copolymère correspondant. Par une stratégie similaire, le copolymère PCL-g-PDMAEMA a été synthétisé par Darcos *et al.*<sup>130</sup>. La synthèse commence par une copolymérisation de  $\alpha$ -propargyl- $\epsilon$ -CL et de  $\epsilon$ -CL, suivie par une conjugaison avec le  $\alpha$ -azido-PDMAEMA (DMAEMA : *N,N*-diméthyl-amino-2-éthyl méthacrylate). Le copolymère ainsi formé présente une CMC très faible de 0,03 mg/L, et les micelles formées ont 2 populations de 25 nm (majoritaire) et 200 nm. Ce copolymère a été utilisé pour encapsuler un médicament anti-micobactérien, la clofazimine. Coumes *et al.* ont préparé des copolymères greffés à base de P(GA-co-LA)-g-PEG en utilisant la même stratégie<sup>142</sup>. Ces copolymères présentent des compositions différentes en GA, LA et PEG avec des rapports molaires EG/(LA+GA) de 1,6 et 3,5. Les  $D_H$  correspondant des nanoobjets formulés sont 186 et 198 nm pour des CAC de 17 et 41 mg/L.

Parrish *et al.* ont greffé des chaînes de PEG<sub>1100</sub> sur des poly( $\alpha$ -propargyl- $\delta$ -valérolactone-co-caprolactone) par la stratégie « grafting to ». La synthèse du copolymère a été faite par copolymérisation entre les deux monomères correspondant<sup>131</sup>.

Le taux d'incorporation de l' $\alpha$ -propargyl- $\delta$ -valérolactone dans le copolymère varie entre 10 et 100%, et la masse molaire maximale obtenue est de 8000 g/mol. Le couplage entre le copolymère propargylé et le  $\alpha,\omega$ -PEG-1100 monométhyl éther azide est mené à 80°C pendant 10 à 12h en utilisant le système  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /ascorbate de sodium comme catalyseur. Le rapport motif hydrophile/motif hydrophobe (EG/(VL+CL)) obtenu pour ces copolymères greffés est compris entre 1.8 et 20.4. Mais il ne faut pas négliger les nombreuses étapes de synthèse pour obtenir ce copolymère et les faibles masses molaires des copolymères hydrophobes.

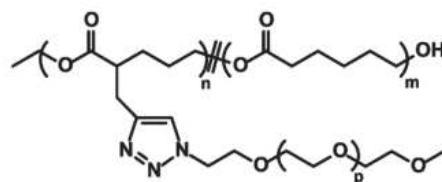


Figure I 44 : caprolactone-co-(valérolactone-g-PEG)

De manière similaire, la CuAAC a été exploitée pour préparer des copolymères greffés PCL-g-PEG par la méthode « grafting to »<sup>245</sup>. La copolymérisation entre la CL et la Cl-CL a donné des copolymères de faibles masses molaires qui diminuent avec l'augmentation de l'incorporation de Cl-CL (10000 g/mol pour 5% de Cl-CL et 4000 g/mol pour 50% de Cl-CL). Ces copolymères ont réagi après avec le PEG-alcyne et ont donné des copolymères amphiphiles de différentes masses molaires (Tableau I-7).

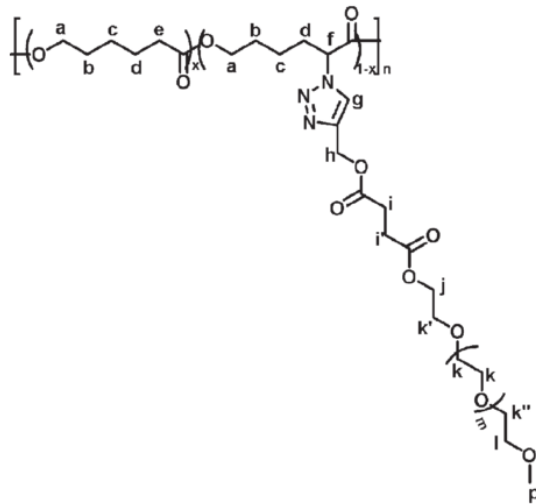


Figure I 45 : PCL-g-PEG par voie alcynes-azoture (figure adaptée de Zhang et al.<sup>245</sup>)

Tableau I 7 : Propriétés des copolymères amphiphiles PCL-g-PEG

Copolymère greffé	Mn x 10 (g/mol)	Đ	Fraction massique de PEG (%)	CMC (mg/L)	D <sub>h</sub> (nm)	PDI <sup>d</sup>
PCL-g-PEG-5	10,1	1,56	29,6	1,82	41,5	0,278
PCL-g-PEG-10	7,9	1,51	45,3	3,09	18,8	0,269
PCL-g-PEG-30	6,1	1,47	69,9	30,2	15,6	0,372
PCL-g-PEG-50	4,6	1,33	80,1	83,2	10,8	0,326

Les masses molaires de PCL-g-PEG ne sont que légèrement augmentées par rapport à celles des copolymères hydrophobes (PCL-CL), Ceci s'explique par la conformation plus compacte du copolymère branché. Ces copolymères forment des micelles avec des CMC qui augmentent avec l'augmentation de fraction massique de PEG. D'autre part, les copolymères ayant un faible nombre des chaînes PEG tendent à former des micelles de



grandes tailles en raison de leur nature plus hydrophobe par suite les interactions de Van der Waals.

## **5. Bilan et cadre de la thèse**

Cette étude bibliographique nous a permis de mettre en évidence l'intérêt de la synthèse des copolymères amphiphiles à base de polyesters aliphatiques (PCL, PLA) dans le cadre d'applications médicales. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à la synthèse des PCL-g-PEG par la stratégie « grafting to ». On a choisi cette méthode pour plusieurs raisons :

- La possibilité de partir de copolymères commerciaux préformés sur lesquels une fonctionnalisation post-polymérisation est applicable (contrairement aux stratégies grafting through ou from).
- La formulation des copolymères avec des greffons de même longueur (contrairement à la stratégie grafting from).
- La possibilité de former des copolymères avec des masses molaires élevées et une répartition plus homogène des chaînes latérales (contrairement à la stratégie grafting through qui consomme les monomères non substitués préférentiellement aux monomères substitués).

On s'est en outre appliqué à surmonter l'un des inconvénients de la stratégie « grafting to » à savoir le manque de contrôle du nombre de greffons par chaîne.

La méthode choisie de greffage est la réaction photochimique thiol-yne puisque cette méthode :

- est applicable en solution et en surface.
- ne nécessite pas l'utilisation d'un catalyseur métallique qui peut être gênant pour les applications biologiques.
- est rapide et versatile.

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire s'articule comme suit. Le chapitre 2 décrit la mise au point de la modification photochimique de PCL par voie thiol-yne. Un travail publié en 2014 est tout d'abord présenté qui décrit la propargylation de la PCL. Ce synthon, qui a été initialement préparé en vue d'applications en ingénierie tissulaire, est à

la base de notre stratégie de synthèse des PCL-g-PEG. Un second article publié en 2015 est ensuite présenté qui décrit la mise au point des conditions de greffage de petites molécules, puis de PEG de bas poids moléculaire sur le squelette PCL-alcyne. Des copolymères amphiphiles PCL-g-PEG à caractère relativement hydrophobe sont présentés. La possibilité de contrôle du taux de greffage et donc de la balance hydrophile/hydrophobe (EG/CL) offerte par l'approche thiol-yne est démontrée. L'influence de ce facteur sur la nature des objets formés est enfin discutée.

Dans le chapitre 3, un projet d'article concerne la synthèse de copolymères PCL-g-PEG à caractère hydrophile et leur utilisation pour l'encapsulation de PA. Une famille de copolymères est préparée avec des degrés d'hydrophilie contrôlés. Ces copolymères sont ensuite utilisés pour l'encapsulation de diverses classes de PA, en particulier la curcumine comme agent anti-cancéreux. L'impact de la balance hydrophile/hydrophobe sur la formation de nanoagrégats, l'efficacité d'encapsulation et de libération sont discutés. Enfin, une étude de cytotoxicité sur des cellules cancéreuses MCF7 est présentée.

Une seconde partie de ce chapitre est dédiée à la préparation de vecteurs de 3<sup>ème</sup> génération.

On a vu l'importance des systèmes de troisième génération dans l'amélioration de l'effet anticancéreux par rapport à ceux de deuxième génération. Afin de démontrer la robustesse de l'approche thiol-yne proposée, et dans un but de passer de vecteurs de 2<sup>nde</sup> génération à un ciblage actif ou stimuli-dépendant, un second projet d'article est présenté qui s'intéresse à la synthèse des copolymères PCL-g-(PEG-cRGD) et PCL-g-(MMPcp-PEG). L'effet de ces modifications sur l'internalisation et la toxicité de ces vecteurs chargés par de la curcumine est discuté et comparé à celui de leurs analogues PCL-g-PEG.

Enfin, dans la troisième partie du chapitre 3, une transposition de l'approche thiol-yne est proposée sur des architectures en étoile mPEG-(NHCO)-PCL<sub>8</sub> afin de générer des micelles stabilisées.

Le dernier chapitre de ce manuscrit a pour but de démontrer la versatilité offerte par ces approches de modifications pour des applications biologiques nécessitant des surfaces fonctionnalisées. Ce chapitre s'intéresse donc à des modifications en surface de nanofibres de PLA qui ont pour objectif la préparation de matériaux hybrides pour applications en ingénierie tissulaire. La possibilité d'immobiliser de manière covalente des nanoparticules d'oxyde de fer en surface de nanofibres de PLA par approche thiol-yne photochimique est discutée.

## 6. References Bibliographiques

1. Kumar, S. Biopolymers in Medical Applications. 1–15
2. Avérous, L. Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review. *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **44**, 231–274 (2004).
3. Elshahawy, W. Waleed Elshahawy College of Dentistry/Tanta University Egypt 1. Introduction. (2008).
4. Athanasiou, K. a., Niederauer, G. G. & Agrawal, C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* **17**, 93–102 (1996).
5. Ikada, Y. & Tsuji, H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromol. Rapid Commun.* **21**, 117–132 (2000).
6. Ross, J. S. *et al.* Targeted therapies for cancer 2004. *Am J Clin Pathol* **122**, 598–609 (2004).
7. Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M. D. & Heifets, L. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 1487–1490 (2005).
8. Institut National du Cancer, Ligue Nationale Contre le Cancer & Société Française de Radiothérapie Oncologique (SFRO). La radiothérapie. (2007).
9. Cao, Y. *et al.* Triggered-release polymeric conjugate micelles for on-demand intracellular drug delivery. *Nanotechnology* **26**, 115101 (2015).
10. Lammers, T. SMART drug delivery systems: Back to the future vs. clinical reality. *Int. J. Pharm.* **454**, 527–529 (2013).
11. Sarin, H. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J. Angiogenes. Res.* **2**, 14 (2010).
12. Barreto, J. A. *et al.* Nanomaterials: Applications in cancer imaging and therapy. *Adv. Mater.* **23**, (2011).
13. Huang, S. L. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1167–1176 (2008).
14. Kwon, G. S. & Okano, T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **21**, 107–116 (1996).
15. Jones, M. C. & Leroux, J. C. Polymeric micelles - A new generation of colloidal drug carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **48**, 101–111 (1999).
16. Truong, W. T., Su, Y., Meijer, J. T., Thordarson, P. & Braet, F. Self-assembled gels for biomedical applications. *Chem. - An Asian J.* **6**, 30–42 (2011).
17. Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K. & Rege, K. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *J. Control. Release* **155**, 344–357 (2011).
18. Ahmed, F. & Discher, D. E. Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: Hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *J. Control. Release* **96**, 37–53 (2004).
19. Ferreira, P., Coelho, J. F. J., Almeida, J. F. & Gil, M. H. Photocrosslinkable Polymers for Biomedical Applications. *Biomed. Eng. - Front. Challenges* 55–74 (2009). doi:10.5772/1019
20. Bilalis, P., Tziveleka, L.-A., Varlas, S. & Iatrou, H. pH-Sensitive nanogates based on poly(L-histidine) for controlled drug release from mesoporous silica

- nanoparticles. *Polym. Chem.* **7**, 1475–1485 (2016).
21. Lee, J., Chatterjee, D. K., Leeb, M. H. & Krishnana, S. Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. *Cancer Lett.* **347**, 46–53 (2014).
  22. Mai, Y. & Eisenberg, A. Self-assembly of block copolymers. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 5969 (2012).
  23. Ge, Z. & Liu, S. Supramolecular self-assembly of nonlinear amphiphilic and double hydrophilic block copolymers in aqueous solutions. *Macromol. Rapid Commun.* **30**, 1523–1532 (2009).
  24. Kataoka, K., Harada, A. & Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 113–131 (2001).
  25. Adams, M. L., Lavasanifar, A. & Kwon, G. S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **92**, 1343–55 (2003).
  26. Pérez-Tomás, R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr. Med. Chem.* **13**, 1859–76 (2006).
  27. Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. a, Booth-Genthe, C. & Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev.* **5**, 219–234 (2006).
  28. Thambi, T. & Park, J. H. Recent advances in shell-sheddable nanoparticles for cancer therapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* **10**, 1841–1862 (2014).
  29. Otsuka, H., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 246–255 (2012).
  30. Talelli, M., Rijcken, C. J. F., van Nostrum, C. F., Storm, G. & Hennink, W. E. Micelles based on HPMA copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 231–239 (2010).
  31. Kenausis, G. L. *et al.* Poly(1-lysine)-g-Poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Attachment Mechanism and Effects of Polymer Architecture on Resistance to Protein Adsorption †. *J. Phys. Chem. B* **104**, 3298–3309 (2000).
  32. Sofia, S., Premnath, V. & Merrill, E. Poly(ethylene oxide) Grafted to Silicon Surfaces: Grafting Density and Protein Adsorption. *Macromolecules* **31**, 5059–70 (1998).
  33. Tang, L. *et al.* Investigating the optimal size of anticancer nanomedicine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 15344–15349 (2014).
  34. Narang, A. S. & Varia, S. Role of tumor vascular architecture in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 640–658 (2011).
  35. McDonald, D. M., Thurston, G. & Baluk, P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation* **6**, 7–22 (1999).
  36. Volk, T., Jähde, E., Fortmeyer, H. P., Glüsenkamp, K. H. & Rajewsky, M. F. pH in human tumour xenografts: effect of intravenous administration of glucose. *Br. J. Cancer* **68**, 492–500 (1993).
  37. Jayasundar, R. & Singh, V. P. In vivo temperature measurements in brain tumors using proton MR spectroscopy. *Neurol. India* **50**, 436–9 (2002).
  38. Yahara, T. *et al.* Relationship between microvessel density and thermographic hot areas in breast cancer. *Surg. Today* **33**, 243–248 (2003).
  39. de la Rica, R., Aili, D. & Stevens, M. M. Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 967–978 (2012).
  40. Andresen, T. L., Thompson, D. H. & Kaasgaard, T. Enzyme-triggered

- nanomedicine: drug release strategies in cancer therapy. *Mol. Membr. Biol.* **27**, 353–63 (2010).
41. Aggarwal, P., Hall, J. B., Mcleland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. & Mcneil, S. E. NIH Public Access. **61**, 428–437 (2013).
  42. Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis Angiogenesis Review Series. *J. Cell. Mol. Med* **9**, 267–285 (2005).
  43. Iyer, A. K., Khaled, G., Fang, J. & Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today* **11**, 812–8 (2006).
  44. Ge, Z. & Liu, S. Functional block copolymer assemblies responsive to tumor and intracellular microenvironments for site-specific drug delivery and enhanced imaging performance. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7289 (2013).
  45. Gref, R. *et al.* ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **18**, 301–313 (2000).
  46. Romberg, B., Hennink, W. E. & Storm, G. Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. *Pharm. Res.* **25**, 55–71 (2008).
  47. Harris, T. J. *et al.* Protease-triggered unveiling of bioactive nanoparticles. *Small* **4**, 1307–12 (2008).
  48. Zalipsky, S., Qazen, M., Li, J. A. W., Mullah, N. & Quinn, Y. P. New Detachable Poly ( ethylene glycol ) Conjugates : Cysteine-Cleavable Lipopolymers Regenerating Natural. **10**, 0–4 (1999).
  49. Sambasivarao, S. V. NIH Public Access. **18**, 1199–1216 (2013).
  50. Bremer, C., Tung, C. H. & Weissleder, R. In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition. *Nat. Med.* **7**, 743–748 (2001).
  51. Meng, F., Cheng, R., Deng, C. & Zhong, Z. Intracellular drug release nanosystems. *Mater. Today* **15**, 436–442 (2012).
  52. Deng, C., Jiang, Y., Cheng, R., Meng, F. & Zhong, Z. Biodegradable polymeric micelles for targeted and controlled anticancer drug delivery: Promises, progress and prospects. *Nano Today* **7**, 467–480 (2012).
  53. Tang, L., Wang, Y., Li, Y., Du, J. & Wang, J. Shell-Detachable Micelles Based on Disulfide-Linked Block Copolymer As Potential Carrier for Intracellular Drug Delivery Shell-Detachable Micelles Based on Disulfide-Linked Block Copolymer As Potential Carrier for Intracellular Drug Delivery. 1095–1099 (2009).
  54. Yoshida, T., Lai, T. C., Kwon, G. S. & Sako, K. pH- and ion-sensitive polymers for drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 1497–513 (2013).
  55. Hrubý, M., Koňák, Č. & Ulbrich, K. Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. *J. Control. Release* **103**, 137–148 (2005).
  56. Liu Chen, H., Li, X., Zhao, Y., Liu, Y., Zhu, L., Deng, H., Li, J., Guo, F., Zhu, X., B. pH-responsive flower-like micelles constructed via oxime linkage for anticancer drug delivery. *RCS Adv.* **4**, 48943 (2014).
  57. Li, R. *et al.* Intelligently Targeted Drug Delivery and Enhanced Antitumor Effect by Gelatinase-Responsive Nanoparticles. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
  58. Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F. & Farokhzad, O. C. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical



- translation. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2971–3010 (2012).
59. Peer, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 751–760 (2007).
  60. Mizejewski, G. J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **222**, 124–138 (1999).
  61. PIERSCHBACHER, M. D. & RUOSLAHTI, E. CELL ATTACHMENT ACTIVITY OF FIBRONECTIN CAN BE DUPLICATED BY SMALL SYNTHETIC FRAGMENTS OF THE MOLECULE. *Nature* **309**, 30–33 (1984).
  62. Sutcliffe-Goulden, J. L. *et al.* Rapid solid phase synthesis and biodistribution of 18F-labelled linear peptides. *Eur. J. Nucl. Med.* **29**, 754–759 (2002).
  63. Garanger, E., Boturyn, D. & Dumy, P. Tumor targeting with RGD peptide ligands—design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **7**, 552–558 (2007).
  64. Nasongkla, N. *et al.* cRGD-functionalized polymer micelles for targeted doxorubicin delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 6323–6327 (2004).
  65. Ahmed, A. *et al.* Spatiotemporally programmable surface engineered nanoparticles for effective anticancer drug delivery. *Macromol. Biosci.* **14**, 1652–1662 (2014).
  66. Richie, J. P. & Balendiran. The role of glutathione in aging and cancer. *Exp. Gerontol.* **27**, 615–626 (2004).
  67. Coumes, F. Synthèse et caractérisation de copolymères amphiphiles à base de poly(acide lactique) et de poly(éthylène glycol) pour la délivrance de principes actifs. *Thesis* (2014).
  68. Sawyer, D. J. Bioprocessing – no longer a field of dreams. *Macromol. Symp.* **201**, 271–282 (2003).
  69. Drumright, R. E., Gruber, P. R. & Henton, D. E. Polylactic acid technology. *Adv. Mater.* **12**, 1841–1846 (2000).
  70. Vaidya, A. N. *et al.* Production and recovery of lactic acid for polylactide - An overview. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **35**, 429–467 (2005).
  71. Ragauskas, A. J. *et al.* The Path Forward for Biofuels. *Science (80-. )*. **311**, 484–489 (2006).
  72. Garlotta, D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *J. Polym. Environ.* **9**, 63–84 (2001).
  73. Laonud, P., Chaiyut, N. & Ksapabutr, B. Poly(lactic acid) preparation by polycondensation method. *Optoelectron. Adv. Mater. Rapid Commun.* **4**, 1200–1202 (2010).
  74. Vink, E. T. H., Rábago, K. R., Glassner, D. A. & Gruber, P. R. Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production. *Polym. Degrad. Stab.* **80**, 403–419 (2003).
  75. Lopes, M., Jardini, A. & Filho, M. R. Synthesis and Characterizations of Poly (Lactic Acid) by Ring-Opening Polymerization for Biomedical Applications. *Chem. Eng.* **38**, 331–336 (2014).
  76. Rasal, R. M., Janorkar, A. V. & Hirt, D. E. Poly(lactic acid) modifications. *Prog. Polym. Sci.* **35**, 338–356 (2010).
  77. Madhavan Nampoothiri, K., Nair, N. R. & John, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour. Technol.* **101**, 8493–501

- (2010).
78. Vert, M. Bioresorbable polymers for temporary therapeutic applications. *Die Angew. Makromol. Chemie* **166/167**, 155–168 (1989).
  79. Gilding, D. K. & Reed, a. M. Biodegradable polymers for use in surgery— polyglycolic/poly(actic acid) homo- and copolymers: 1. *Polymer (Guildf)*. **20**, 1459–1464 (1979).
  80. Kricheldorf & H. Polylactones: 31. Sn(II)octoate-initiated polymerization of L-lactide: a mechanistic study. *Polymer* **36**, 1253–1259 (1995).
  81. Shuwisitkul, D. Biodegradable Implants with Different Drug Release Profiles. 166 (2011).
  82. Pathiraja Gunatillake, P. A., Adhikari, R. & Gadegaard, N. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cells Mater.* **5**, 1–16 (2003).
  83. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T. & Kumar, D. S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, (2011).
  84. Lasprilla, A. J. R., Martinez, G. A. R., Lunelli, B. H., Jardini, A. L. & Filho, R. M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. *Biotechnol. Adv.* **30**, 321–328 (2012).
  85. Vert, M., Schwach, G., Engel, R. & Coudane, J. Something new in the field of PLA / GA bioresorbable polymers? *J. Control. Release* **53**, 85–92 (1998).
  86. Holderegger, C., Schmidlin, P., Weber, F. & Mohn, D. Preclinical in vivo Performance of Novel Biodegradable, Electrospun Poly(lactic acid) and Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanocomposites: A Review. *Materials (Basel)*. **8**, 4912–4931 (2015).
  87. Passerini, N. & Craig, D. Q. M. An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC. *J. Control. Release* **73**, 111–115 (2001).
  88. Makadia, H. K. & Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. **3**, 1377–1397 (2011).
  89. MARK, J. E. *Polymer Data Handbook*. (1999).
  90. Van De Velde, K. & Kiekens, P. Biopolymers: Overview of several properties and consequences on their applications. *Polym. Test.* **21**, 433–442 (2002).
  91. Gross, R. a & Kalra, B. Biodegradable polymers for the environment. *Science* **297**, 803–807 (2002).
  92. Lam, Teoh, 2 and & Hutmacher. Comparison of the degradation of polycaprolactone and polycaprolactone– ( $\beta$ -tricalcium phosphate) scaffolds in alkaline medium. *Polym. Int.* **57**, 718–728 (2008).
  93. Thomas, S. M., DiCosimo, R. & Nagarajan, V. Biocatalysis: Applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotechnol.* **20**, 238–242 (2002).
  94. Rocca, M., Graham, C., Lambert, B., Maxquarrie, D. & Clark, J. Process for the Oxidation of Cyclohexanoneto epsilon-caprolactone. **2**, 0–5 (2003).
  95. Labet, M. & Thielemans, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 3484 (2009).
  96. Williams, J. M. *et al.* Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* **26**, 4817–4827 (2005).



97. Yeong, W. Y. *et al.* Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering. *Acta Biomater.* **6**, 2028–2034 (2010).
98. Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R. & Trehan, A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *Int. J. Pharm.* **278**, 1–23 (2004).
99. Chandra, R. & Rustgi, R. Pergamon BIODEGRADABLE POLYMERS. *Prog. Polym. Sci.* **23**, 1273–1335 (1998).
100. Mondal, D., Griffith, M. & Venkatraman, S. S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **65**, 255–265 (2016).
101. WILLIAMS, D. F. ENZYME - POLYMER INTERACTIONS. *J. Bioeng.* **1**, 279–294 (1977).
102. SALTHOUSE, T. N. & MATLAGA, B. F. APPROACH TO NUMERICAL QUANTITATION OF ACUTE TISSUE RESPONSE TO BIOMATERIALS. *Biomater. Med. DEVICES Artif. ORGANS* **3**, 47–56 (1975).
103. Crotts, G. & Park, T. G. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. *J. Microencapsul.* **15**, 699–713 (1998).
104. Pena, J., Corrales, T., Izquierdo-Barba, I., Doadrio, A. L. & Vallet-Regi, M. Long term degradation of poly(ε-caprolactone) films in biologically related fluids. *Polym. Degrad. Stab.* **91**, 1424–1432 (2006).
105. KENLEY, R. A., LEE, M. O., MAHONEY, T. R. & SANDERS, L. M. POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) DECOMPOSITION KINETICS INVIVO AND INVITRO. *Macromolecules* **20**, 2398–2403 (1987).
106. Leenslag, J. W., Pennings, A. J., Bos, R. R. M., Rozema, F. R. & Boering, G. Resorbable materials of poly(l-lactide). VII. In vivo and in vitro degradation. *Biomaterials* **8**, 311–314 (1987).
107. Chu, C. C. & Analysis, E. Hydrolytic Degradation of Polyglycolic Acid : Tensile Strength and Crystallinity Study. **26**, 1727–1734 (1981).
108. Pitt, C. G. *et al.* Aliphatic Polyesters . I . The Degradation of Poly ( ε - caprolactone ) In Vivo. *J. Appl. Polym. Sci.* **26**, 3779–3787 (1981).
109. Joshi, P. & Madras, G. Degradation of polycaprolactone in supercritical fluids. *Polym. Degrad. Stab.* **93**, 1901–1908 (2008).
110. Vieira, A. C., Vieira, J. C., Guedes, R. M. & Marques, A. T. EXPERIMENTAL DEGRADATION CHARACTERIZATION OF PLA-PCL, PGA-PCL, PDO AND PGA FIBRES A.C.
111. Janorkar, A. V., Metters, A. T. & Hirt, D. E. Modification of poly(lactic acid) films: Enhanced wettability from surface-confined photografting and increased degradation rate due to an artifact of the photografting process. *Macromolecules* **37**, 9151–9159 (2004).
112. Middleton, J. C. & Tipton, a J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* **21**, 2335–2346 (2000).
113. Kimura, Y., Shirotani, K., Yamane, H. & Kitao, T. C o p o l y m e r i z a t i o n o f 3 - ( S ) - [ ( b e n z y l o x y c a r b o n y l ) m e t h y l ] - 1 , 4 - d i o x a n e - 2 , 5 - d i o n e a n d L - l a c t i d e : a f a c i l e s y n t h e t i c m e t h o d f o r f u n c t i o n a l i z e d b i o a b s o r b a b l e

- polymer. *Polymer (Guildf)*. **34**, 1741–1748 (1993).
114. Leemhuis, M. *et al.* Functionalized Poly ( R -hydroxy acid ) s via Ring-Opening Polymerization : Toward Hydrophilic Polyesters with Pendant Hydroxyl Groups. *Macromolecules* **39**, 3500–3508 (2006).
  115. Leemhuis, M., van Steenis, J. H., van Uxem, M. J., van Nostrum, C. F. & Hennink, W. E. A Versatile Route to Functionalized Dilactones as Monomers for the Synthesis of Poly( $\alpha$ -hydroxy) Acids. *European J. Org. Chem.* 3344–3349 (2003). doi:10.1002/ejoc.200300181
  116. Jiang, X., Vogel, E. B., Smith, M. R. & Baker, G. L. ‘Clickable’ polyglycolides: Tunable synthons for thermoresponsive, degradable polymers. *Macromolecules* **41**, 1937–1944 (2008).
  117. Lou, X., Detrembleur, C. & Jérôme, R. Novel aliphatic polyesters based on functional cyclic (Di)esters. *Macromol. Rapid Commun.* **24**, 161–172 (2003).
  118. Loontjens, C. A. M. *et al.* Synthesis and characterization of random and triblock copolymers of epsilon-caprolactone and (benzylated)hydroxymethyl glycolide. *Macromolecules* **40**, 7208–7216 (2007).
  119. BARRERA, D. A., ZYLSTRA, E., LANSBURY, P. T. & LANGER, R. SYNTHESIS AND RGD PEPTIDE MODIFICATION OF A NEW BIODEGRADABLE COPOLYMER - POLY(LACTIC ACID-CO-LYSINE). *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11010–11011 (1993).
  120. Arabi, A., Boggs, E. & Patel, M. Surface Modification of Electrospun PCL Fibers for Enhanced Cell Adhesion and Proliferation. 1–12 (2012).
  121. Latere, Lecomte, Dubois, J. Communications to the Editor. **35**, 861–863 (2002).
  122. MATHISEN, T., MASUS, K. & ALBERTSSON, A. C. POLYMERIZATION OF 1,5-DIOXEPAN-2-ONE .2. POLYMERIZATION OF 1,5-DIOXEPAN-2-ONE AND ITS CYCLIC DIMER, INCLUDING A NEW PROCEDURE FOR THE SYNTHESIS OF 1,5-DIOXEPAN-2-ONE. *Macromolecules* **22**, 3842–3846 (1989).
  123. LOFGREN, A., ALBERTSSON, A. C., DUBOIS, P., JEROME, R. & TEYSSIE, P. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF BIODEGRADABLE HOMOPOLYMERS AND BLOCK-COPOLYMERS BASED ON 1,5-DIOXEPAN-2-ONE. *Macromolecules* **27**, 5556–5562 (1994).
  124. Feng, Y., Klee, D., Keul, H. & Höcker, H. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of morpholine-2,5-dione derivatives: A novel route to the synthesis of poly(ester amide)s. *Macromol. Chem. Phys.* **201**, 2670–2675 (2000).
  125. El Habnoui, S., Darcos, V. & Coudane, J. Synthesis and ring opening polymerization of a new functional lactone, ??-iodo-??-caprolactone: A novel route to functionalized aliphatic polyesters. *Macromol. Rapid Commun.* **30**, 165–169 (2009).
  126. Parrish, B., Breitenkamp, R. B. & Emrick, T. PEG- and Peptide-Grafted Aliphatic Polyesters by Click Chemistry PEG- and Peptide-Grafted Aliphatic Polyesters by Click Chemistry. *Biomaterials* **127**, 7404–7410 (2005).
  127. Parrish, B. & Emrick, T. Aliphatic polyesters with pendant cyclopentene groups: Controlled synthesis and conversion to polyester-graft-PEG copolymers. *Macromolecules* **37**, 5863–5865 (2004).
  128. Rieger, J., Bernaerts, K. V., Du Prez, F. E., J??r??me, R. & J??r??me, C. Lactone

- end-capped poly(ethylene oxide) as a new building block for biomaterials. *Macromolecules* **37**, 9738–9745 (2004).
129. Wang, G. *et al.* Controlled synthesis of poly ( 3-caprolactone ) -graft-polystyrene by atom transfer radical polymerization with poly ( 3-caprolactone-co-a-bromo-3-caprolactone ) copolymer as macroinitiator. *Polymer (Guildf)*. **46**, 10601–10606 (2005).
  130. Darcos, V., El Habnoui, S., Nottelet, B., El Ghzaoui, A. & Coudane, J. Well-defined PCL-graft-PDMAEMA prepared by ring-opening polymerisation and click chemistry. *Polym. Chem.* **1**, 280 (2010).
  131. Parrish, B., Breitenkamp, R. B. & Emrick, T. PEG- and Peptide-Grafted Aliphatic Polyesters by Click Chemistry. 7404–7410 (2005).
  132. D. Mecerreyes, R. D. Miller, J. L. Hedrick, C. Detrembleur, R. J. Ring-Opening Polymerization of 6-Hydroxynon-8-Enoic Acid Lactone : *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **38**, 870–875 (2000).
  133. Sebastien Blanquer, B. N. Easy Synthesis and Ring-Opening Polymerization of 5-Z-Amino-d- valerolactone: New Degradable Amino-Functionalized (Co)polyesters. *Am. Chem. Soc. Polym. Prepr. Div. Polym. Chem.* **49**, 5891–5898 (2010).
  134. Rieger, J., Dubois, P. & Je, R. Controlled Synthesis and Interface Properties of New Amphiphilic PCL- g -PEO Copolymers. 7471–7479 (2006).
  135. Pounder, R. J. & Dove, A. P. Towards poly(ester) nanoparticles: recent advances in the synthesis of functional poly(ester)s by ring-opening polymerization. *Polym. Chem.* 260–271 (2010). doi:10.1039/b9py00327d
  136. Gerhardt, W. W. *et al.* Functional lactide monomers: Methodology and polymerization. *Biomacromolecules* **7**, 1735–1742 (2006).
  137. Jing, F. & Hillmyer, M. A. A bifunctional monomer derived from lactide for toughening polylactide. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13826–13827 (2008).
  138. Trimaille, T., Möller, M. & Gurny, R. Synthesis and ring-opening polymerization of new monoalkyl-substituted lactides. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **42**, 4379–4391 (2004).
  139. Nottelet, B., Di Tommaso, C., Mondon, K., Gurny, R. & Moller, M. Fully Biodegradable Polymeric Micelles Based on Hydrophobic- and Hydrophilic-Functionalized Poly(lactide) Block Copolymers. *J. Polym. Sci. Part A-Polymer Chem.* **48**, 3244–3254 (2010).
  140. Coumes, F., Darcos, V., Domurado, D., Li, S. M. & Coudane, J. Synthesis and ring-opening polymerisation of a new alkyne-functionalised glycolide towards biocompatible amphiphilic graft copolymers. *Polym. Chem.* **4**, 3705–3713 (2013).
  141. José A. Castillo, Dorothee E. Borchmann, Amy Y. Cheng, Yufeng Wang, C. H. & Andrés J. García, and M. W. Well-defined Poly(lactic acid)s Containing Poly(ethylene glycol) Side-chains. *Macromolecules* **45**, 62–69 (2012).
  142. Coumes, F., Darcos, V., Domurado, D., Li, S. & Coudane, J. Synthesis and ring-opening polymerisation of a new alkyne-functionalised glycolide towards biocompatible amphiphilic graft copolymers. *Polym. Chem.* **4**, 3705 (2013).
  143. Lecomte, P., Riva, R., Jérôme, C. & Jérôme, R. Macromolecular engineering of biodegradable polyesters by ring-opening polymerization and ‘click’ chemistry. *Macromol. Rapid Commun.* **29**, 982–997 (2008).

144. Croll, T. I., O'Connor, A. J., Stevens, G. W. & Cooper-White, J. J. Controllable surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: Physical, chemical, and theoretical aspects. *Biomacromolecules* **5**, 463–473 (2004).
145. Park, J. S. *et al.* Surface hydrolysis of fibrous poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds for enhanced osteoblast adhesion and proliferation. *Macromol. Res.* **15**, 424–429 (2007).
146. Serrano, M. C. *et al.* Vascular endothelial and smooth muscle cell culture on NaOH-treated poly(epsilon-caprolactone) films: a preliminary study for vascular graft development. *Macromol. Biosci.* **5**, 415–423 (2005).
147. Gao, J. N. L. E. L. R. S. Surface modification of polyglycolic acid meshes increases the seeding density and spreading of smooth muscle cells. *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 417–424 (1998).
148. Miller, D. C., Thapa, A., Haberstroh, K. M. & Webster, T. J. Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features. *Biomaterials* **25**, 53–61 (2004).
149. Zhu, Y., Mao, Z. & Gao, C. Aminolysis-based surface modification of polyesters for biomedical applications. *RSC Adv.* **3**, 2509–2519 (2013).
150. de Luca, A. C., Terenghi, G. & Downes, S. Chemical surface modification of poly-epsilon-caprolactone improves Schwann cell proliferation for peripheral nerve repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **8**, 153–163 (2014).
151. Gong, Y. *et al.* Layer-by-layer assembly of chondroitin sulfate and collagen on aminolyzed poly(L-lactic acid) porous scaffolds to enhance their chondrogenesis. *Acta Biomater.* **3**, 677–685 (2007).
152. Yang, Z., Zhengwei, M., Huayu, S. & Changyou, G. In-depth study on aminolysis of poly( $\epsilon$ -caprolactone): Back to the fundamentals. *Sci. China Chem.* **55**, 2419–2427 (2012).
153. Bech, L., Meylheuc, T., Lepoittevin, B. & Roger, P. Chemical Surface Modification of Poly(ethylene terephthalate) Fibers by Aminolysis and Grafting of Carbohydrates. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **49**, 487–488 (2007).
154. Zhu, Y. B., Gao, C. Y., Liu, X. Y., He, T. & Shen, J. C. Immobilization of biomacromolecules onto aminolyzed poly(L-lactic acid) toward acceleration of endothelium regeneration. *TISSUE Eng.* **10**, 53–61 (2004).
155. Ponsart, S., Coudane, J., des Rieux, A. & Vert, M. Mechanical properties and lipase-catalyzed biodegradation of  $\alpha$ -methyl,  $\epsilon$ -caprolactone/  $\epsilon$ -caprolactone copolymers obtained by chemical modification of poly( $\epsilon$ -caprolactone). *J. Polym. Environ.* **11**, 31–37 (2003).
156. Ponsart, S., Coudane, J. & Vert, M. A novel route to poly( $\epsilon$ -caprolactone)-based copolymers via anionic derivatization. *Biomacromolecules* **1**, 275–281 (2000).
157. Gimenez, S., Ponsart, S., Coudane, J. & Vert, M. Synthesis, properties and in vitro degradation of carboxyl-bearing PCL. *J. Bioact. Compat. Polym.* **16**, 32–46 (2001).
158. Nottelet, B., Coudane, J. & Vert, M. Synthesis of an X-ray opaque biodegradable copolyester by chemical modification of poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Biomaterials* **27**, 4948–4954 (2006).
159. Samuel, R. *et al.* Radiopaque poly( $\epsilon$ -caprolactone) as additive for X-ray imaging

- of temporary implantable medical devices. *RSC Adv.* **5**, 84125–84133 (2015).
160. Blanquer, S. *et al.* New magnetic-resonance-imaging-visible poly( $\epsilon$ -caprolactone)-based polyester for biomedical applications. *Acta Biomater.* **8**, 1339–1347 (2012).
  161. Nottelet, B., Ghzaoui, a El, Coudane, J. & Vert, M. Novel Amphiphilic Poly (  $\epsilon$ -caprolactone ) -g-poly ( L -lysine ) Degradable Copolymers. 2594–2601 (2007). doi:10.1021/bm700449c
  162. Nottelet, B., Vert, M. & Coudane, J. Novel amphiphilic degradable poly( $\epsilon$ -caprolactone)-graft-poly (4-vinyl pyridine), poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-graft-poly(dimethylaminoethyl methacrylate) and water-soluble derivatives. *Macromol. Rapid Commun.* **29**, 743–750 (2008).
  163. Ponsart, S., Coudane, J., McGrath, J. & Vert, M. Study of the Grafting of Bromoacetylated  $\alpha$ -Hydroxy-  $\omega$ -Methoxypoly(ethyleneglycol) onto Anionically Activated Poly( $\epsilon$ -Caprolactone). *J. Bioact. Compat. Polym.* **17**, 417–432 (2002).
  164. El Habnoui, S. *et al.* Toward potent antibiofilm degradable medical devices: A generic method for the antibacterial surface modification of polylactide. *Acta Biomater.* **9**, 7709–7718 (2013).
  165. Sardo, C. *et al.* When functionalization of PLA surfaces meets thiol-yne photochemistry: Case study with antibacterial polyaspartamide derivatives. *Biomacromolecules* **15**, 4351–4362 (2014).
  166. Cools, P., Morent, R. & De Geyter, N. Plasma Modified Textiles for Biomedical Applications. *Adv. Bioeng.* 1–32 (2015). doi:10.5772/59770
  167. Kull, K. R., Steen, M. L. & Fisher, E. R. Surface modification with nitrogen-containing plasmas to produce hydrophilic, low-fouling membranes. *J. Memb. Sci.* **246**, 203–215 (2005).
  168. Wavhal, D. S. & Fisher, E. R. Membrane surface modification by plasma-induced polymerization of acrylamide for improved surface properties and reduced protein fouling. *Langmuir* **19**, 79–85 (2003).
  169. Fisher, E. R. Challenges in the characterization of plasma-processed three-dimensional polymeric scaffolds for biomedical applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 9312–9321 (2013).
  170. Prabhakaran, M. P., Venugopal, J., Chan, C. K. & Ramakrishna, S. Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Nanotechnology* **19**, 455102 (2008).
  171. Martins, A. *et al.* Surface modification of electrospun polycaprolactone nanofiber meshes by plasma treatment to enhance biological performance. *Small* **5**, 1195–1206 (2009).
  172. Liu, W. *et al.* Effects of plasma treatment to nanofibers on initial cell adhesion and cell morphology. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **113**, 101–106 (2014).
  173. Park, K. E., Lee, K. Y., Lee, S. J. & Park, W. H. Surface characteristics of plasma-treated PLGA nanofibers. *Macromol. Symp.* **249-250**, 103–108 (2007).
  174. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40**, 2004–2021 (2001).
  175. Xu, N., Lu, F. Z., Du, F. S. & Li, Z. C. Synthesis of saccharide-terminated poly( $\epsilon$ -caprolactone) via michael addition and ‘Click’ chemistry. *Macromol. Chem.*



- Phys.* **208**, 730–738 (2007).
176. Bahadori, F. *et al.* Synthesis and Characterization of Biodegradable Amphiphilic Star and Y-Shaped Block Copolymers as Potential Carriers for Vinorelbine. *Polymers (Basel)*. **6**, 214–242 (2014).
  177. El Habnoui, S. *et al.* MRI-Visible Poly(epsilon-caprolactone) with Controlled Contrast Agent Ratios for Enhanced Visualization in Temporary Imaging Applications. *Biomacromolecules* **14**, 3626–3634 (2013).
  178. Guerry, A., Cottaz, S., Fleury, E., Bernard, J. & Halila, S. Redox-stimuli responsive micelles from DOX-encapsulating polycaprolactone-g-chitosan oligosaccharide. *Carbohydr. Polym.* **112**, 746–752 (2014).
  179. Zhang, K., Wang, Y., Zhu, W., Li, X. & Shen, Z. Synthesis, characterization, and micellization of PCL-g-PEG copolymers by combination of ROP and ‘Click’ chemistry via ‘Graft onto’ method. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **50**, 2045–2052 (2012).
  180. Link, A. J. & Tirrell, D. A. Cell surface labeling of Escherichia coli via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11164–11165 (2003).
  181. Avti, P. K., Maysinger, D. & Kakkar, A. Alkyne-azide ‘click’ chemistry in designing nanocarriers for applications in biology. *Molecules* **18**, 9531–9549 (2013).
  182. Ma, H., Davis, R. H. & Bowman, C. N. Novel sequential photoinduced living graft polymerization. *Macromolecules* **33**, 331–335 (2000).
  183. Nugroho, R. W., Odelius, K., Hoglund, A. & Albertsson, A. C. Nondestructive Covalent ‘Grafting-from’ of Poly(lactide) Particles of Different Geometries. *ACS Appl Mater Interfaces* (2012). doi:10.1021/am3003507
  184. Kim, S. *et al.* Surface Modification of Melt Extruded Poly(ε-caprolactone) Nanofibers: Toward a New Scalable Biomaterial Scaffold. (2015).
  185. Edlund, U., Källrot, M. & Albertsson, A. C. Single-step covalent functionalization of polylactide surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 8865–8871 (2005).
  186. Källrot, M., Edlund, U. & Albertsson, A. C. Surface functionalization of degradable polymers by covalent grafting. *Biomaterials* **27**, 1788–1796 (2006).
  187. Zhu, Y., Gao, C. & Shen, J. Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility. *Biomaterials* **23**, 4889–4895 (2002).
  188. Ma, Z., Gao, C., Gong, Y. & Shen, J. Chondrocyte behaviors on poly-L-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups. *Biomaterials* **24**, 3725–3730 (2003).
  189. Mogal, V. *et al.* Novel on-demand bioadhesion to soft tissue in wet environments. *Macromol. Biosci.* **14**, 478–484 (2014).
  190. Pourcelle, V., Devouge, S., Garinot, M., Pr at, V. & Marchand-Brynaert, J. PCL-PEG-based nanoparticles grafted with GRGDS peptide: Preparation and surface analysis by XPS. *Biomacromolecules* **8**, 3977–3983 (2007).
  191. Pourcelle, V. *et al.* Light induced functionalization of PCL-PEG block copolymers for the covalent immobilization of biomolecules. *Biomacromolecules* **10**, 966–74 (2009).
  192. Zhu, A., Zhang, M., Wu, J. & Shen, J. Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive hetero-bifunctional crosslinking

- reagent on PLA surface. *Biomaterials* **23**, 4657–65 (2002).
193. Zhu, A. P., Fang, N., Chan-Park, M. B. & Chan, V. Adhesion contact dynamics of 3T3 fibroblasts on poly (lactide-co-glycolide acid) surface modified by photochemical immobilization of biomacromolecules. *Biomaterials* **27**, 2566–2576 (2006).
  194. Fairbanks, B. D., Scott, T. F., Kloxin, C. J., Anseth, K. S. & Bowman, C. N. Thiol - Yne Photopolymerizations : Novel Mechanism , Kinetics , and Step-Growth Formation of Highly Cross-Linked Networks. *Macromolecules* **42**, 211–217 (2009).
  195. Chan, J. W., Zhou, H., Hoyle, C. E. & Lowe, A. B. Photopolymerization of thiol-alkynes: Polysulfide networks. *Chem. Mater.* **21**, 1579–1585 (2009).
  196. Hensarling, R. M., Doughty, V. a, Chan, J. W. & Patton, D. L. ‘Clicking’ polymer brushes with thiol-yne chemistry: indoors and out. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14673–5 (2009).
  197. Billiet, L., Hillewaere, X. K. D. & Du Prez, F. E. Highly functionalized, aliphatic polyamides via CuAAC and thiol-yne chemistries. *Eur. Polym. J.* **48**, 2085–2096 (2012).
  198. Huang, C., Neoh, K. G., Xu, L., Kang, E. T. & Chiong, E. Polymeric Nanoparticles with Encapsulated Superparamagnetic Iron Oxide and Conjugated Cisplatin for Potential Bladder Cancer Therapy. (2012).
  199. Bednarek, M. Coupling reaction with thiols as the efficient method of functionalization of ‘clickable’ polylactide. *React. Funct. Polym.* **73**, 1130–1136 (2013).
  200. Zhao, G.-L., Hafnér, J., Deiana, L. & Córdova, A. Heterogeneous ‘Organoclick’ Derivatization of Polysaccharides: Photochemical Thiol-ene Click Modification of Solid Cellulose. *Macromol. Rapid Commun.* **31**, 740–4 (2010).
  201. Liu, W. & Dong, C.-M. Versatile Strategy for the Synthesis of Hyperbranched Poly( $\epsilon$ -caprolactone)s and Polypseudorotaxanes Thereof. *Macromolecules* **43**, 8447–8455 (2010).
  202. Li, Z. & Tan, B. H. Towards the development of polycaprolactone based amphiphilic block copolymers: molecular design, self-assembly and biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* **45**, 620–634 (2014).
  203. Gong, C. *et al.* Synthesis and characterization of PEG-PCL-PEG thermosensitive hydrogel. *Int. J. Pharm.* **365**, 89–99 (2009).
  204. Ghoroghchian, P. P. *et al.* NIH Public Access. *October* **39**, 1673–1675 (2010).
  205. Xu, Y., Zhang, Y., Fan, Z. & Li, S. Melt crystallization and morphology of poly( $\epsilon$ -caprolactone)- poly(ethylene glycol) diblock copolymers with different compositions and molecular weights. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **48**, 286–293 (2010).
  206. Choi, C. *et al.* Preparation and characterizations of poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) block copolymer nanoparticles. *Bull. Korean Chem. Soc.* **26**, 523–528 (2005).
  207. Luo, L., Tam, J., Maysinger, D. & Eisenberg, A. Cellular internalization of poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) diblock copolymer micelles. *Bioconjug. Chem.* **13**, 1259–1265 (2002).
  208. Mohanty, A. K., Jana, U., Manna, P. K. & Mohanta, G. P. Synthesis and

- evaluation of MePEG-PCL diblock copolymers: surface properties and controlled release behavior. *Prog. Biomater.* **4**, 89–100 (2015).
209. Xie, W., Zhu, W. & Shen, Z. Synthesis, isothermal crystallization and micellization of mPEG-PCL diblock copolymers catalyzed by yttrium complex. *Polymer (Guildf)*. **48**, 6791–6798 (2007).
  210. Ghoroghchian, P. P. *et al.* Bioresorbable vesicles formed through spontaneous self-assembly of amphiphilic poly(ethylene oxide)-block-polycaprolactone. *Macromolecules* **39**, 1673–1675 (2006).
  211. R Savic, L Luo, A Eisenberg, D. M. Radoslav Savic', 1 Laibin Luo, 2 Adi Eisenberg, 2 Dusica Maysinger 1 \*. **300**, (2003).
  212. Hong, S. W., Kim, K. H., Huh, J., Ahn, C. H. & Jo, W. H. Drug release behavior of poly(epsilon-caprolactone)-b-poly(acrylic acid) shell crosslinked micelles below the critical micelle concentration. *Macromol. Res.* **13**, 397–402 (2005).
  213. Bougard, F., Jeusette, M., Mespouille, L., Dubois, P. & Lazzaroni, R. Synthesis and supramolecular organization of amphiphilic diblock copolymers combining poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) and poly(epsilon-caprolactone). *Langmuir* **23**, 2339–2345 (2007).
  214. Chen, L. *et al.* Reorganization of Lamellar Diblock Copolymer in the Melting Temperature Range. 2211–2220
  215. Lee, R.-S., Lin, C.-H., Aljuffali, I. A., Hu, K.-Y. & Fang, J.-Y. Passive targeting of thermosensitive diblock copolymer micelles to the lungs: synthesis and characterization of poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(epsilon-caprolactone). *J. Nanobiotechnology* **13**, 1–12 (2015).
  216. Deng, Y. *et al.* Poly(caprolactone)-block-polysarcosine by Ring-Opening Polymerization of Sarcosine N-Thiocarboxyanhydride: Synthesis and Thermoresponsive Self-Assembly. *Biomacromolecules* **16**, 3265–3274 (2015).
  217. Lee, S. C. *et al.* Synthesis and Micellar Characterization of Amphiphilic Diblock Copolymers Based on Poly ( 2-ethyl-2-oxazoline ) and Aliphatic Polyesters 1. *Macromolecules* **32**, 1847–1852 (1999).
  218. Li, Z., Yin, H., Zhang, Z., Liu, K. L. & Li, J. Supramolecular anchoring of DNA polyplexes in cyclodextrin-based polypseudorotaxane hydrogels for sustained gene delivery. *Biomacromolecules* **13**, 3162–3172 (2012).
  219. Zhang, He, Liu, Ni, Z. Green polymer chemistry: Telechelic poly(ethylene glycol)s via enzymatic catalysis. *Am. Chem. Soc. Polym. Prepr. Div. Polym. Chem.* **49**, 487–488 (2010).
  220. Wittemann, A., Azzam, T. & Eisenberg, A. Biocompatible polymer vesicles from biamphiphilic triblock copolymers and their interaction with bovine serum albumin. *Langmuir* **23**, 2224–2230 (2007).
  221. Endres, T. *et al.* Amphiphilic biodegradable PEG-PCL-PEI triblock copolymers for FRET-capable in vitro and in vivo delivery of siRNA and quantum dots. *Mol. Pharm.* **11**, 1273–1281 (2014).
  222. Piao, L., Dai, Z., Deng, M., Chen, X. & Jing, X. Synthesis and characterization of PCL/PEG/PCL triblock copolymers by using calcium catalyst. *Polymer (Guildf)*. **44**, 2025–2031 (2003).
  223. Gou, M. *et al.* Poly(??-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(??-caprolactone) (PCL-PEG-PCL) nanoparticles for honokiol delivery in vitro. *Int. J. Pharm.* **375**,



- 170–176 (2009).
224. Chang, Wei, Quan, Li, Wang, Cheng, Zhang, Z. Fabrication of Thermosensitive PCL-PNIPAAm-PCL Triblock Copolymeric Micelles for Drug Deliv. *Am. Chem. Soc. Polym. Prepr. Div. Polym. Chem.* **49**, 487–488 (2008).
  225. Cuong, Hsieh, Chen, L. Synthesis and Characterization of PEG–PCL–PEG Triblock Copolymers as Carriers of Doxorubicin for the Treatment of Breast Cancer. *J. Appl. Polym. Sci.* **21**, 3694–3703 (2010).
  226. Hwang, M. J., Suh, J. M., Bae, Y. H., Kim, S. W. & Jeong, B. Caprolactonic poloxamer analog: PEG-PCL-PEG. *Biomacromolecules* **6**, 885–890 (2005).
  227. Xu, F. J. *et al.* Thermo-responsive porous membranes of controllable porous morphology from triblock copolymers of polycaprolactone and poly(N-isopropylacrylamide) prepared by atom transfer radical polymerization. *Biomacromolecules* **9**, 331–339 (2008).
  228. Motala-Timol, S. & Jhurry, D. Synthesis of PDMAEMA-PCL-PDMAEMA triblock copolymers. *Eur. Polym. J.* **43**, 3042–3049 (2007).
  229. Eatemadi, A. *et al.* Comparison, synthesis and evaluation of anticancer drug-loaded polymeric nanoparticles on breast cancer cell lines. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 1–10 (2015). doi:10.3109/21691401.2015.1008510
  230. Liu, L. *et al.* Curcumin loaded polymeric micelles inhibit breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastasis. *Int. J. Pharm.* **443**, 175–82 (2013).
  231. Kim, S. Y., Ha, J. C. & Lee, Y. M. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres. *J. Control. Release* **65**, 345–358 (2000).
  232. Lu, C. *et al.* Micellization and gelation of aqueous solutions of star-shaped PEG-PCL block copolymers consisting of branched 4-arm poly(ethylene glycol) and polycaprolactone blocks. *Eur. Polym. J.* **43**, 1857–1865 (2007).
  233. Petrova, S., Kolev, I., Miloshev, S., Apostolova, M. D. & Mateva, R. Synthesis of amphiphilic [PEO(PCL) 2] triarm star-shaped block copolymers: A promising system for in cell delivery. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **23**, 1225–1234 (2012).
  234. Dong, P. *et al.* Self-assembled biodegradable micelles based on star-shaped PCL-b-PEG copolymers for chemotherapeutic drug delivery. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **358**, 128–134 (2010).
  235. Zhang, Y., Zhao, Q., Shao, H., Zhang, S. & Han, X. Synthesis and Characterization of Star-Shaped Block Copolymer sPCL-b-PEG-GA. **2014**, (2014).
  236. Kim, K. H. *et al.* Synthesis and micellization of star-shaped poly(ethylene glycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Macromol. Chem. Phys.* **205**, 1684–1692 (2004).
  237. Wang, F., Bronich, T. K., Kabanov, A. V., Rauh, R. D. & Roovers, J. Synthesis and evaluation of a star amphiphilic block copolymer from poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) as a potential drug delivery carrier. *Bioconjug. Chem.* **16**, 397–405 (2005).
  238. Nouvel, C., Dubois, P., Dellacherie, E. & Six, J. L. Controlled synthesis of amphiphilic biodegradable polylactide-grafted dextran copolymers. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **42**, 2577–2588 (2004).
  239. Ydens, I. *et al.* 'Surfactant-free' stable nanoparticles from biodegradable and amphiphilic poly(epsilon-caprolactone)-grafted dextran copolymers. *E-*

*POLYMERS* (2005).

240. Hui-Yun Wen , Hai-Qing Dong , Wen-juan Xie, Yong-Yong Li, Kang Wang, Giovanni M. Pauletti, and D.-L. S. < Supplementary Information > Rapidly Disassembling Nanomicelles with Disulfide-linked PEG Shells. (2011).
241. Li, B. *et al.* A novel amphiphilic copolymer poly(ethylene oxide-co-allyl glycidyl ether)-graft-poly( $\epsilon$ -caprolactone): synthesis, self-assembly, and protein encapsulation behavior. *Polym. Chem.* **3**, 2421 (2012).
242. Nottelet, B., Vert, M. & Coudane, J. Novel amphiphilic degradable poly( $\epsilon$ -caprolactone)-graft-poly(4-vinyl pyridine), poly( $\epsilon$ -caprolactone)-graft-poly(dimethylaminoethyl methacrylate) and water-soluble derivatives. *Macromol. Rapid Commun.* **29**, 743–750 (2008).
243. Mespouille, L., Degée, P. & Dubois, P. Amphiphilic poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate)-g-poly( $\epsilon$ -caprolactone) graft copolymers: synthesis and characterisation. *Eur. Polym. J.* **41**, 1187–1195 (2005).
244. Zhu, H., Deng, G. & Chen, Y. Amphiphilic polymer brushes with alternating PCL and PEO grafts through radical copolymerization of styrenic and maleimidic macromonomers. *Polymer (Guildf)*. **49**, 405–411 (2008).
245. Zhang, K., Wang, Y., Zhu, W., Li, X. & Shen, Z. Synthesis, characterization, and micellization of PCL-g-PEG copolymers by combination of ROP and ‘click’ chemistry via ‘graft onto’ method. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **50**, 2045–2052 (2012).
246. Liu, L. *et al.* Curcumin loaded polymeric micelles inhibit breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastasis. *Int. J. Pharm.* **443**, 175–82 (2013).
247. Leroy, A. *et al.* Biodegradable networks for soft tissue engineering by thiol–yne photo cross-linking of multifunctional polyesters. *RSC Adv.* **4**, 32017 (2014).
248. El Habnoui, S. *et al.* Mild methodology for the versatile chemical modification of polylactide surfaces: Original combination of anionic and click chemistry for biomedical applications. *Adv. Funct. Mater.* **21**, 3321–3330 (2011).
249. Taldone, T. *et al.* Synthesis of purine-scaffold fluorescent probes for heat shock protein 90 with use in flow cytometry and fluorescence microscopy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 5347–52 (2011).

**CHAPITRE II**  
**MODIFICATION ANIONIQUE ET**  
**PHOTOCHEMIE DE LA PCL : OPTIMISATION**  
**DE LA PROPARGYLATION ET MISE AU POINT**  
**DU PHOTOGREFFAGE THIOL-YNE**

---

Ce chapitre est consacré au développement de synthèses de copolymères amphiphiles greffés PCL-g-PEG. Il comprend deux sections. Tout d'abord, on va présenter l'activation anionique de la PCL qui permet d'ajouter des groupes fonctionnels (propargyle) le long des chaînes. Ensuite, ces copolyesters fonctionnels seront utilisés pour synthétiser des copolymères amphiphiles PCL-g-PEG par voie thiol-yne photoactivée avec du PEG thiolés. Ces deux parties ont fait l'objet de publications acceptées dans RSC Advances (2014) 4 (60), 32017 – 32023 et *Polymer Chemistry* (2015) 6, 5093–5102

## ***1. Introduction à la propargylation de la PCL***

### ***Introduction***

La synthèse de la PCL propargylée (PCL-Pg) a été reportée par notre groupe à partir de l' $\epsilon$ -CL propargylée puis polymérisée par ouverture de cycle avec l' $\epsilon$ -CL. Ces PCL-Pg ont été utilisées pour préparer des PCL greffées (PCL-g-PDMAEMA) et des PCL visibles par IRM.<sup>1-2</sup> Mais, pour obtenir une grande quantité de PCL propargylée par un nombre réduit d'étapes de synthèse, nous nous sommes intéressés à la propargylation directe sur PCL commerciale.

Dans l'article qui suit, la propargylation de la PCL était nécessaire pour créer des matériaux d'intérêt pour la régénération tissulaire (par exemple ligamentaire) sous la forme de réseaux interpénétrés. La formation de la PCL réticulée passe par une activation photochimique entre la PCL propargylée et l'agent de réticulation, le pentaérythritoltetrakis-(3-mercaptopropionate) (PETMP). Ici, nous sommes intéressés à présenter seulement la propargylation de la PCL, puisque c'était l'étape clé de la synthèse de nos copolymères amphiphiles PCL-g-PEG.

### ***Propargylation de la PCL***

L'introduction des groupes alcynes le long de la PCL a été faite dans le THF par activation anionique en utilisant le LDA, suivie par l'ajout de PgBr sur le carbanion formé. Cette réaction a montré une sensibilité importante aux conditions opératoires, en particulier à la concentration. De nombreux essais ont été faits, et les meilleures

conditions (6 g PCL / 300 mL ; 0,5 eq LDA ; 0,5 eq. PgBr) ont permis l'obtention de PCL-Pg en quantité importante et présentant des taux de propargylation variant entre 8 et 10%.

### ***Conclusion***

On a obtenu une PCL modifiée à 8% par des unités propargyle avec des rendements supérieurs à 60%. Ce taux nous a paru suffisant pour envisager d'utiliser cet intermédiaire dans le cadre de la synthèse de copolymères greffés et de PCL fonctionnelles variées.

### ***Références***

1. Darcos, V., El Habnoui, S., Nottelet, B., El Ghzaoui, A. & Coudane, J. Well-defined PCL-graft-PDMAEMA prepared by ring-opening polymerisation and click chemistry. *Polym. Chem.* **1**, 280 (2010).
2. El Habnoui, S. *et al.* MRI-Visible Poly(epsilon-caprolactone) with Controlled Contrast Agent Ratios for Enhanced Visualization in Temporary Imaging Applications. *Biomacromolecules* **14**, 3626–3634 (2013).

## ***2. Biodegradable networks for soft tissue engineering by thiol-yne photo cross-linking of multifunctional polyesters***

Adrien Leroy<sup>1</sup>, Assala Al Samad<sup>1</sup>, Xavier Garric<sup>1</sup>, Sylvie Hunger<sup>1</sup>, Danièle Noël<sup>2</sup>, Jean Coudane<sup>1</sup>, Benjamin Nottelet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomolécules Max Mousseron (IBMM - CNRS UMR 5247), Department of Artificial Biopolymers - Université Montpellier I, Université Montpellier 2, ENSCM - France

<sup>2</sup>INSERM U844, Hôpital Saint-Eloi, 80 Av. Augustin Fliche, 34091 Montpellier Cedex 5 - France

\* benjamin.nottelet@univ-montpl.fr

### ***2.1. Abstract***

Novel biodegradable networks have been prepared by combination of post-polymerization modification of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and thiol-yne photo cross-linking. In a first step, a novel multifunctional poly( $\epsilon$ -caprolactone) bearing propargyl groups (PCL-yne, 8 mol% substitution degree) was obtained in a rapid one-pot reaction and at a multigram scale. In a second step, PCL-yne and mixtures of PCL and PCL-yne were cross-linked via photoradical thiol-yne reaction in the presence of pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate) and various photoinitiators. The thermal properties and stabilities of the obtained networks have been evaluated before assessment of their mechanical properties. Finally, biocompatibility studies are reported with evaluation of the proliferation of L929 fibroblasts on the materials.

**Keywords:** thiol-yne chemistry; polyester; post-modification; photo cross-linking; degradable networks

### ***2.2. Introduction***

Degradable elastomeric and shape memory polymeric biomaterials used in FDA Class III medical devices only emerged in the late 1990s and are highly desirable for the

preparation of tissue engineering scaffolds.<sup>1-4</sup> Among them, biomaterials based on aliphatic polyesters, poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactic acid) (PLA) and their block copolymers are of particular interest, which explains that to date they remain the most frequently utilized resorbable synthetic polymers in biomedical applications, especially tissue engineering.<sup>5</sup> As a consequence, numerous studies have dealt on the preparation of degradable cross-linked polyesters. In particular the well-known step-growth polymerization strategy, historically used to prepare biostable thermosets, has been applied to synthesize a family of polycondensates based on polyols and citric acid or sebacic acid.<sup>6,7</sup> However, although being highly biocompatible, most of these materials have shown limited mechanical properties and fast degradations, which limits their application to engineering tissues with rapid healing rate.<sup>2, 4, 8</sup> A second strategy relying on the cross-linking of prepolymers functionalized by appropriate reactive groups has also been exploited for the preparation of cross-linked copolyesters. In most cases, advantage is taken from the hydroxyl and carboxylic chain ends to yield cross-linkable linear telechelic copolyesters with curable acrylate moieties.<sup>9-14</sup> Applied to PLA-PEG-PLA triblock copolymers this approach enabled us to prepare elastomeric materials exhibiting tunable mechanical and degradation properties.<sup>11</sup> Alkene groups have also been advantageously used in thiol-ene chemistry to cross-link materials as this type of reaction belongs to the click-chemistry tool-box.<sup>15, 16</sup> Various authors have therefore proposed thiol-ene thermal- or photo cross-linking of copolyesters for the preparation of gels, mainly based on PLA/PEG copolymers,<sup>17-20</sup> or elastomeric materials as exemplified by the cross-linking of telechelic PCLs,<sup>21</sup> globalide/CL copolyesters,<sup>22</sup> dendrimeric polyesters<sup>23, 24</sup> or glyceride esters thermosets.<sup>25</sup> In a recent work, we reported on the synthesis of novel mercapto-PCL bearing thiol side groups, which was cross-linked either via redox reaction, with formation of disulfide reversible bonds, or thermal thiol-ene reaction to yield a thioether-containing degradable network.<sup>26</sup> In a similar way, thiol-yne reactions can also be used for cross-linking of networks with the advantage that two equivalents of thiol per alkyne group can potentially react.<sup>27</sup> This particularity yields highly cross-linked structures compared to homologous thiol-ene systems, with an impact in thermomechanical properties.<sup>28</sup> However, thiol-yne cross-linking was mainly restricted

to non-degradable networks<sup>27, 29-32</sup> except a few examples including thiol-yne cross-linking of aliphatic hyperbranched polyesters<sup>33</sup> or hetero-telechelic  $\alpha$ -thiol  $\omega$ -yne PCL.<sup>34</sup> In the present work we therefore wish to report on the preparation of degradable networks prepared by thiol-yne photo cross-linking of an easily prepared PCL bearing multiple alkyne groups on its skeleton. The synthesis of this alkyne-PCL by post-polymerization modification is first presented. The photo cross-linking of blends of alkyne-PCL, PCL and thiols is then evaluated. Finally, the mechanical properties and biocompatibility of the resulting networks are discussed.

### ***2.3. Materials and methods***

- **Materials**

PCL ( $M_n \approx 32$  kg/mol), propargyl bromide (80 wt% in toluene), lithium diisopropylamide (2 M in THF/heptane/ethylbenzene), pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate) (PETMP, >95%), 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone or Irgacure<sup>®</sup> 651 (I651, 99%), 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone or Irgacure<sup>®</sup> 2959 (I2959, 98%) were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France).

NH<sub>4</sub>Cl (> 99%) was obtained from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France), technical grade MgSO<sub>4</sub> from Carlo Erba (Val de Reuil, France), methanol ( $\geq 99.8\%$ ), dichloromethane (DCM,  $\geq 99.9\%$ ) and anhydrous tetrahydrofuran (THF,  $\geq 99.9\%$ ) from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). THF was distilled on benzophenone/sodium until a deep blue color was obtained.

- **Characterizations**

The number average molecular weight ( $M_n$ ) and the dispersity ( $\mathcal{D}$ ) of the polymers were determined by size exclusion chromatography (SEC) using a Viscotek GPCMax autosampler system fitted two Viscotek LT5000L Mixed Medium columns (300×7.8 mm), a Viscotek VE 3580 RI detector. The mobile phase was THF at 1 mL/min flow at 30°C. Typically, the polymer (10 mg) was dissolved in THF (2 mL) and the resulting



solution was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filter before injection of 20  $\mu\text{L}$  of filtered solution.  $M_n$  was expressed according to calibration using Polystyrene standards.  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded at room temperature using an AMX300 Bruker spectrometer operating at 300 MHz. Deuterated chloroform was used as solvent, chemical shifts were expressed in ppm with respect to tetramethylsilane (TMS). Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) experiments were performed with a Bruker Avance III spectrometer operating at 600 MHz, using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO) as solvent.

The thermal properties of the polymers were characterized by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA). DSC measurements were carried out under nitrogen on a Perkin Elmer Instrument DSC 6000 Thermal Analyzer. Samples were submitted to a first heating scan to 150  $^{\circ}\text{C}$  (10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) followed by a cooling (10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  from 150  $^{\circ}\text{C}$  to 100  $^{\circ}\text{C}$ , and 5  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  from 100  $^{\circ}\text{C}$  to -65  $^{\circ}\text{C}$ ) and a second heating scan to 180  $^{\circ}\text{C}$  (10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Glass transition temperature ( $T_g$ ), crystallization temperature ( $T_c$ ), melting temperature ( $T_m$ ) and melting enthalpy ( $\Delta H_m$ ) were measured on the second heating ramp. TGA thermograms were obtained under a nitrogen flow (20 mL/min) on a Perkin Elmer Instrument TGA 6 at a scanning rate of 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  from 30 to 400  $^{\circ}\text{C}$ .

Mechanical properties of the polymers were determined by performing tensile mechanical tests on plate samples ( $\approx 30 \times 10 \times 0.5$  mm) at 37  $^{\circ}\text{C}$  on an Instron 4444 testing device at a crosshead speed rate of 5 mm/min (each sample being loaded to failure). Each sample was analyzed in triplicate and Young's modulus ( $E$ , MPa), stress at failure ( $\sigma_f$ , MPa), strain at failure ( $\varepsilon_f$ , %), yield stress ( $\sigma_y$ , MPa), and yield strain ( $\varepsilon_y$ , %) were expressed as the mean value of the three measurements.  $E$  was calculated using the initial linear portion of the stress/strain curves.

- **PCL propargylation**

Typically, PCL (0.053 mol of CL unit, 6 g) was dissolved in anhydrous THF (300 mL) in a four-necked reactor equipped with a mechanical stirrer and kept at -50  $^{\circ}\text{C}$  under argon atmosphere. A solution of LDA (0.5 eq./CL unit, 13.2 mL) was injected with a syringe

through a septum and the mixture was kept at  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  under stirring for 30 min. After this activation step, propargyl bromide (0.5 eq./CL unit, 2.8 mL) was added, the mixture was kept under stirring and raised to  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After 30 min, the reaction was stopped by addition of a saturated solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 mL) and pH was adjusted to 7 with 1M HCl. The polymer was extracted with DCM ( $3 \times 150\text{ mL}$ ). The combined organic phases were washed three times with distilled water ( $3 \times 150\text{ mL}$ ), dried on anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and filtered. After partial solvent evaporation under reduced pressure, the polymer was recovered by precipitation in cold methanol and dried overnight under vacuum. The polymer was obtained with an average yield of 79 %.

$^1\text{H NMR}$  : (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 4.0 (2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.4 (2H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 2.4-2.6 (1H,  $\text{C(O)CH(CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH)}$ ) and 2H,  $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ), 2.3 (2H,  $\text{C(O)CH}_2$ ), 2.0 (1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 1.6 (4H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 1.4 (2H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ).

- **Propargylated PCL photo cross-linking**

Typically, mixtures of non-modified PCL and propargylated PCL (PCL-yne) (1.2 g of polymer, PCL-yne weight ratios from 0 to 100%) were dissolved in DCM (10 mL) with PETMP (0.25 eq./ propargylated CL unit) as cross-linker. Depending on the films no photoinitiator ( $\text{cPCL}_x$ ) or 0.5 wt% photoinitiators I651 (6mg) ( $\text{c}_{651}\text{PCL}_x$ ) or I2959 (6 mg) ( $\text{c}_{2959}\text{PCL}_x$ ) were also added. For illustration purpose the notation  $\text{c}_{651}\text{PCL}_{75}$  represents networks cross-linked with I651 and with an initial polymer composition of 25% of PCL and 75% of PCL-yne. On the other hand  $\text{c}_x\text{PCL}_{100}$  represents all networks prepared only with PCL-yne, whatever the cross-linker. The solutions were poured in aluminum molds and let to dry slowly overnight under a hood and in the dark. The resulting films were further dried under vacuum for 24 h. The photo cross-linking reaction was carried out under UV irradiation (10 min/side) with a UV light system Dymax PC-2000 (75  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ).

- **Cross-linking evaluation**

After UV irradiation, samples of elastomers films were cut ( $\approx 100\text{ mg}$ ), precisely weighed (initial weight  $W_i$ ) and placed in DCM (15 mL). After 24 h, the insoluble cross-

linked fractions were removed from DCM and weighed (swelled weight  $W_s$ ). After drying under vacuum overnight, the samples were weighed again (dry cross-linked weight  $W_c$ ). To evaluate the cross-linking efficiency, the gel fraction and the weight swelling ratios of the polymer samples were calculated according to the following equations:

$$\text{Gel fraction (\%)} = 100 \times (W_c/W_i)$$

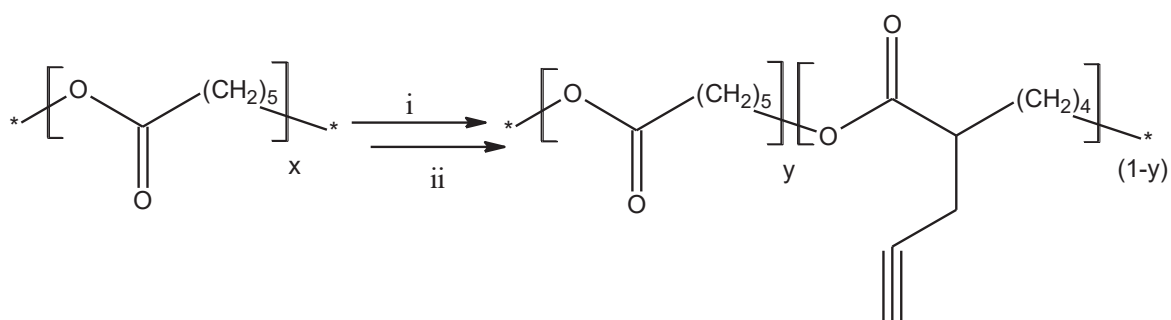
$$\text{Weight swelling ratios (\%)} = 100 \times (W_s/W_c).$$

Each result was expressed as the mean value of three measurements. The cross-linking was also evaluated by studying the thermal properties of the irradiated polymers before immersion in DCM.

## **2.4. Results**

- **PCL propargylation**

PCLs functionalized with alkyne functional groups have recently attracted attention as a result of the possibility to easily produce novel PCL-conjugates via click chemistry tools. In this regard, our group reported recently on the synthesis of  $\alpha$ -propargyl- $\epsilon$ -caprolactone to yield propargylated PCLs by copolymerization with  $\epsilon$ -caprolactone. This approach was advantageously used to prepare graft amphiphilic PCL copolymers and MRI-visible PCLs.<sup>35, 36</sup> Speaking of materials however, the synthesis of functional lactones does not appear as a convenient strategy as large amounts of products can barely be obtained. To overcome this limitation our group developed few years ago an anionic post-modification reaction that provided various functional PCLs with 5 to 15% of functional groups or polymeric side chains along the PCL backbone.<sup>26, 37-41</sup> With the aim to prepare cross-linked materials, the anionic post-polymerization modification strategy appears therefore as a sound choice to easily prepare PCL bearing multiple alkyne groups (PCL-yne).



**Scheme II-2 1** : General reaction scheme for the synthesis of propargylated PCL (PCL-yne) with i) LDA (0.5 eq./CL unit), -50 °C, 30 min and ii) propargyl bromide (0.5 eq./CL unit), -30 °C, 30 min.

Propargyl groups were chosen to introduce alkyne functionalities on the PCL backbone (Scheme II-2 1) and propargyl bromide was reacted with PCL under anionic chemical modification conditions. The parameters of the activation step with LDA (0.5 eq. ; - 50°C ; 30 min.) and of the subsequent substitution with propargyl bromide (0.5 eq. ; - 30°C ; 30 min.) have been optimized to obtain in a reproducible way PCL substituted with 8% of alkyne groups with respect to the CL units. In particular, the initial PCL concentration in the reaction medium has been optimized as lower substitutions were obtained with lower PCL concentrations (data not shown). Based on our experience, such a sensible dependence over the PCL concentration was not observed for other electrophiles. This is therefore our belief that with propargyl bromide, a higher concentration of PCL is required to favor the substitution reaction over the abstraction of the acidic alkyne proton by LDA. The polymer chemical structure was characterized by <sup>1</sup>H-NMR (ESI Figure II-2 S1). Typical signals of the propargyl group were found at 2.5 ppm, corresponding to the methylene proton and at 2.0 ppm, corresponding to the alkyne proton. A 8% substitution degree (SD) was calculated using Equation (1) by comparison of the integrations of the well-defined resonance peak at 2.0 ppm with the integration of the resonance peak at 4.0 ppm, corresponding to a methylene of PCL.

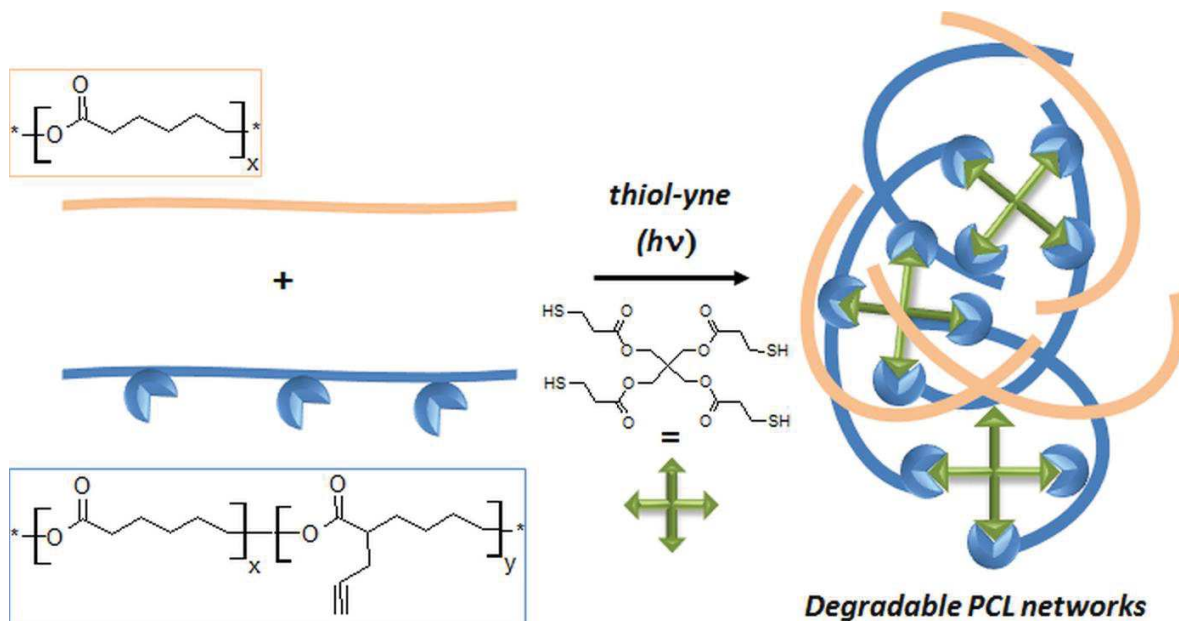
$$SD (\%) = I_{2\text{ppm}} / (I_{4\text{ppm}} / 2) \times 100 \quad (1)$$

Molecular weight of PCL-yne was measured by SEC analysis in THF. PCL-yne with molecular weight  $M_n = 12\,000$  g/mol and  $\bar{D} = 2.1$  was obtained. These values were compared with the ones of the commercial PCL used as a starting material  $M_n = 32\,000$

g/mol and  $\bar{D} = 1.9$  (ESI Figure II-2 S2). The molecular weight decrease is classically observed with the anionic activation of polyester, as a consequence of hydrolysis and backbiting side reactions.<sup>26, 41</sup> In the present case, and although remarkable in terms of influence on the final molecular weight, this corresponded to less than 1% hydrolysis of the ester groups initially present in the polymer chain. Finally, it is of importance to note that starting from commercially available PCL, this one pot and time saving reaction allowed the preparation of ca. 5 g batches of PCL-yne in a single day, including reaction and purification. Synthesized PCL-yne was further used to produce photo cross-linked materials under UV activation.

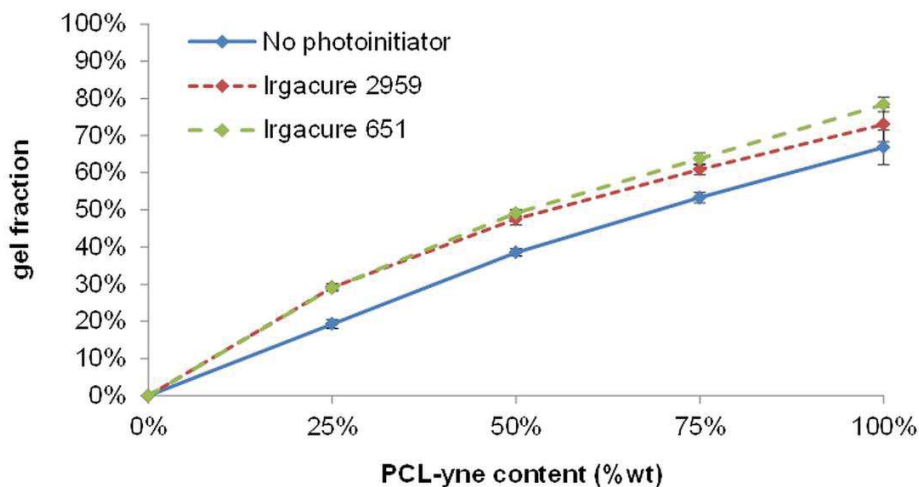
- **Photo cross-linking**

Cross-linking was obtained by photoradical-mediated thiol-yne click reaction between the alkyne pending groups of PCL-yne and the thiol groups of pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate) (PETMP). Films were prepared by the solvent evaporation method using mixtures of polymer and PETMP. I2959 and I651 Photoinitiators were also used in some films to evaluate their impact on the cross-linking efficiency. These photoinitiators were chosen due to their long track records in the field of biomaterials, especially I2959 which is known for its good biocompatibility.<sup>42</sup> Assays have been carried out with films prepared from mixtures of PCL-yne and neat PCL at different ratios. It is to note that the PCL-yne had low filmogenic properties, which made tricky to obtain large homogenous films. This is related to the lower molecular weight of PCL-yne compared to neat PCL that probably does not allow good chain entanglement. All films were photo cross-linked under UV (10 min/side) with an intensity of 75 mW/cm<sup>2</sup> to yield mixed networks as shown in Scheme II-2 2.



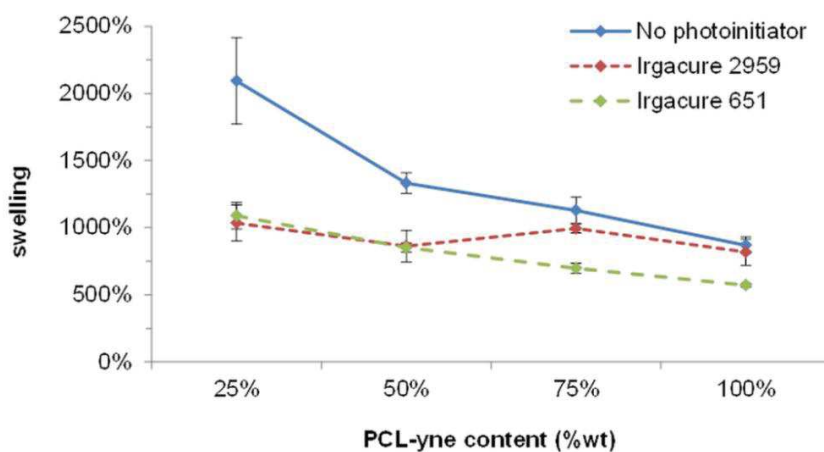
**Scheme II-2 2** : Thiol-yne photocrosslinked PCL networks

Gel fraction and swelling were first evaluated. An insoluble fraction was obtained for all samples containing PCL-yne, the gel fraction increasing almost linearly with the proportion of PCL-yne (Figure II-2 1). In the absence of photoinitiator gel fractions were slightly lower than with Irgacure®, whereas no significant differences were observed between I651 and I2959. The thiol-yne photo cross-linking efficiency with respect to the initial amount of PCL-yne was high for all samples. More in details, gel fractions were in the range 67% to 78% for samples containing only PCL-yne (cPCL<sub>100</sub>, c<sub>651</sub>PCL<sub>100</sub> and c<sub>2959</sub>PCL<sub>100</sub>) and 20% to ca. 25% for samples containing only 25% of PCL-yne. Photoinitiators led to higher cross-linking efficiencies and slightly denser network as discussed below. The impact of photoinitiators was more clearly evidenced for networks having low contents of PCL-yne. A 25% higher efficiency was obtained in the presence of Irgacure® for the c<sub>x</sub>PCL<sub>25</sub> series (c<sub>651</sub>PCL<sub>25</sub> and c<sub>2959</sub>PCL<sub>25</sub> vs. cPCL<sub>25</sub>) against 12% for the c<sub>x</sub>PCL<sub>100</sub> series (c<sub>651</sub>PCL<sub>100</sub> and c<sub>2959</sub>PCL<sub>100</sub> vs. cPCL<sub>100</sub>).



**Figure II-2 1 :** Gel fraction of UV-crosslinked PCL / propargylated PCL mixes with or without photoinitiator as a function of propargylated PCL content.

After removal of the free PCL chains, samples weight swelling ratios were characterized in DCM. The values obtained confirmed that although gel fractions were only slightly higher with Irgacure®, the resulting networks present a higher cross-linking density. This is clearly evidenced on  $c_x\text{PCL}_{25}$  samples with weight swelling ratios values of 1000% in the presence of photoinitiator ( $c_{651}\text{PCL}_{25}$  and  $c_{2959}\text{PCL}_{25}$ ) against 2100% without photoinitiator ( $c\text{PCL}_{25}$ ) (Figure II-2 2). As expected, the weight swelling ratios also decreased with increasing proportion of PCL-yne in the films, which indicates that neat PCL acted as a spacer between the alkyne groups, which led to networks of lower cross-linking density.



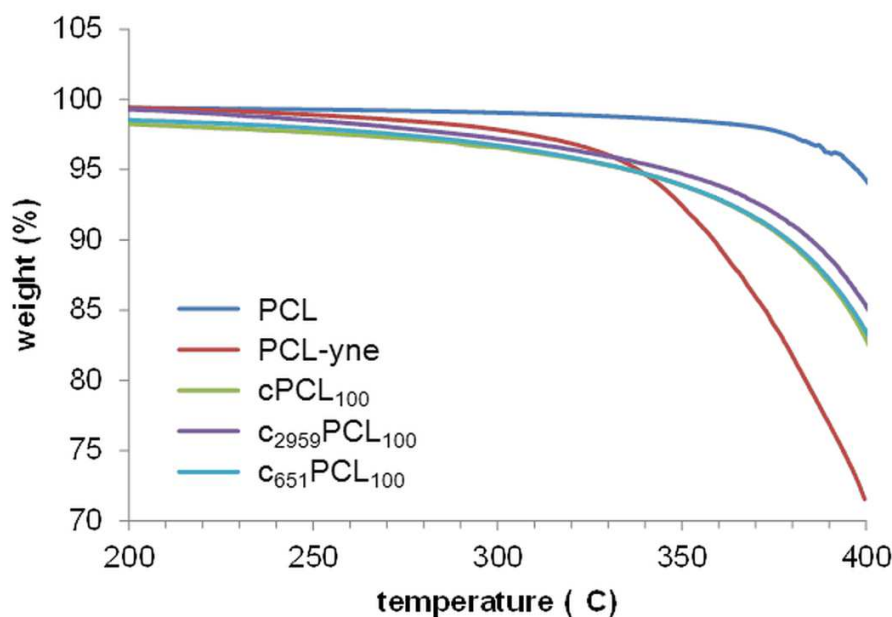
**Figure II-2 2 :** Swelling of UV-crosslinked PCL / propargylated PCL mixes with or without photoinitiator as a function of propargylated PCL content.

Finally, one should note that as residual free thiol groups of PETMP may potentially be present in the networks, disulfide bond formation could also be responsible to a limited extent for some cross-linking. In order to evaluate this point a control experiment has been done. More in details a cPCL<sub>100</sub> film was prepared and purified as described earlier. It was then swollen in DMSO under air atmosphere and heated at 70°C to favor the formation of disulfide bond.<sup>26</sup> Under these conditions, no difference in terms of gel fraction or mechanical properties was found with respect to non oxidized cPCL<sub>100</sub> (data not shown). If existing disulfide bond have therefore a negligible influence compared to thioether bonds on the networks formation and properties.

- **Thermal properties**

Thermal properties analyses were conducted on networks obtained from PCL-yne (cPCL<sub>100</sub>, c<sub>651</sub>PCL<sub>100</sub> and c<sub>2959</sub>PCL<sub>100</sub>). TGA analyses have first been performed on the cross-linked and non-cross-linked PCL-yne and compared to the commercial PCL (Figure II-2 3). Thermograms showed that the presence of alkyne groups causes an early thermal degradation of PCL-yne compared to neat PCL with an onset temperature around 350°C against 420°C. After thiol-yne photo cross-linking in the presence of the PETMP, PCL-yne networks gained as expected thermal stability with respect to the starting PCL-yne as shown by the delayed thermal degradation occurring between 395°C and 410 °C, *i.e.* at temperatures similar to the ones obtained for the commercial PCL. No difference was observed for the networks cross-linked in the presence (c<sub>651</sub>PCL<sub>100</sub> and c<sub>2959</sub>PCL<sub>100</sub>) or absence (cPCL<sub>100</sub>) of photoinitiator.

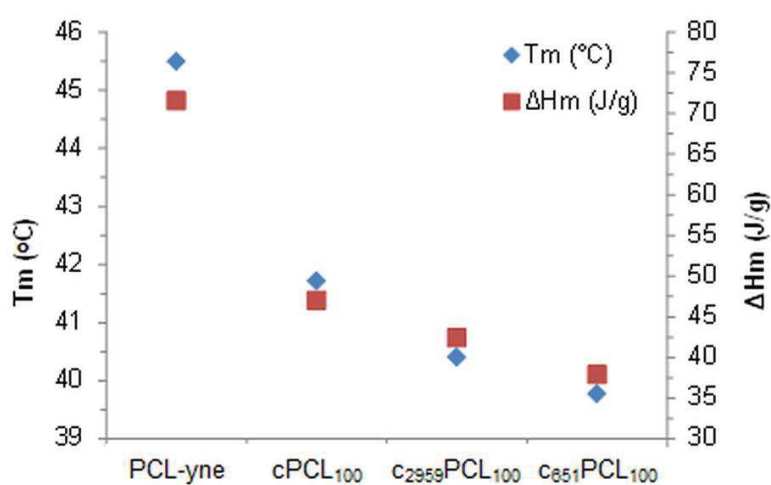




**Figure II-2 3 :** TGA thermograms of non-modified PCL, propargylated PCL and UV-crosslinked propargylated PCL with or without photoinitiator.

DSC analyses show that PCL is a semi-crystalline polyester (Figure II-2 4). For commercially available PCL ( $M_n = 10000$  g/mol) with a molecular weight close to the one of PCL-yne, a glass transition temperature ( $T_g$ ) of  $-60^\circ\text{C}$ , a melting temperature ( $T_m$ ) of  $65^\circ\text{C}$  and a melting enthalpy  $\Delta H_m$  of  $105$  J/g were measured (data not shown). As a result of its lower molecular weight and of the pending propargyl group, PCL-yne had lower  $T_m$  ( $45^\circ\text{C}$ ) and melting enthalpy  $\Delta H_m$  ( $70$  J/g). After cross-linking, all networks were still semi-crystalline with  $\Delta H_m$  in the range  $35$ - $45$  J/g. These lower values indicate a decrease of crystallinity, as expected for cross-linked polymers. However, the PCL segments between cross-links are still long enough to induce crystallization, PCL oligomers with low molecular weight ( $M_n = 1200$  g/mol) being known to crystallize.<sup>2</sup> In the present case, this crystallization results in semi-crystalline materials. Again, like for swelling and gel fraction experiments, results show that a higher density of cross-linking is obtained with a photoinitiator, as shown by the lower  $T_m$  and  $\Delta H_m$  obtained with Irgacure®. They also confirm that I651 ( $c_{651}\text{PCL}_{100}$ ,  $T_m = 39.5^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H_m = 38$  J/g) is more efficient for thiol-yne curing of PCL-yne with PETMP than I2959 ( $c_{2959}\text{PCL}_{100}$ ,  $T_m =$

40.5°C,  $\Delta H_m = 43$  J/g). Notably, all  $T_m$  were above the physiological temperature. Considering a melting enthalpy of 142 J/g for a 100% crystalline PCL,<sup>43</sup> crystallinities of PCL-yne, cPCL<sub>100</sub>, c<sub>651</sub>PCL<sub>100</sub> and c<sub>2959</sub>PCL<sub>100</sub> have been calculated with values of 50%, 33%, 29% and 26%, respectively. Glass transition temperatures were measured and found equal for all networks with values in the range -8°C to -6°C (ESI Figure II-2 S3). As expected cross-linked networks had therefore higher  $T_g$  compared to PCL-yne whose  $T_g$  was not detectable in the experimental range.

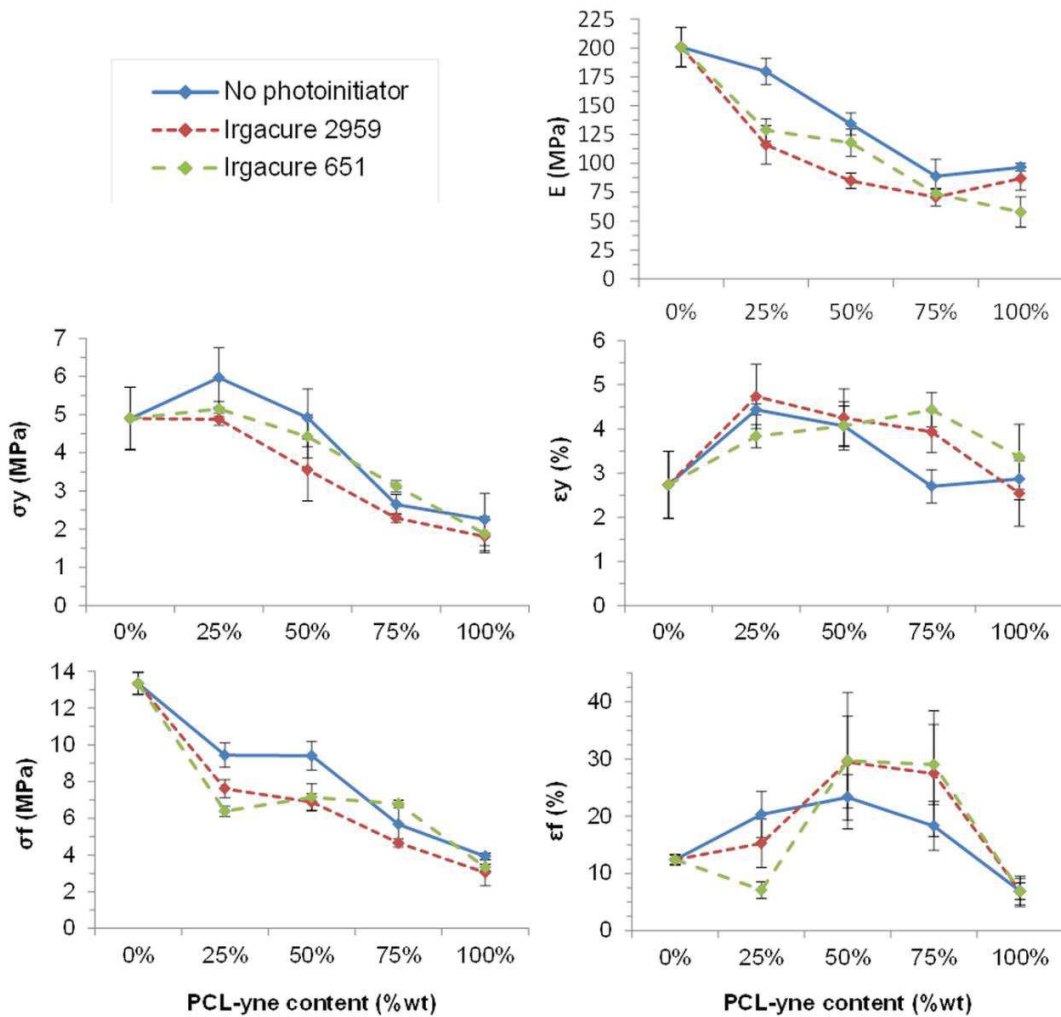


**Figure II-2 4 :** Melting temperature and melting enthalpy (measured by DSC) of propargylated PCL and UV-crosslinked propargylated PCL with or without photoinitiator.

- **Tensile Mechanical properties**

Tensile mechanical tests have been carried out to evaluate the new PCL networks. As for gel fraction, tests were carried out on the cross-linked films prepared from mixtures of PCL-yne and neat PCL at different ratios. It was also compared to non-cross-linked PCL-yne films. Typical stress-strain curves are provided as Supplementary Information (ESI Figure II-2 S4). Cross-linking strongly improved the mechanical properties of PCL-yne as non-cross-linked polymer was barely testable under the conditions used, samples being broken even at low stresses with stress at failure  $\sigma_f < 1$  MPa and Young's modulus  $E < 20$  MPa (ESI Figure II-2 S4). In opposition, c<sub>x</sub>PCL<sub>100</sub> networks had higher mechanical

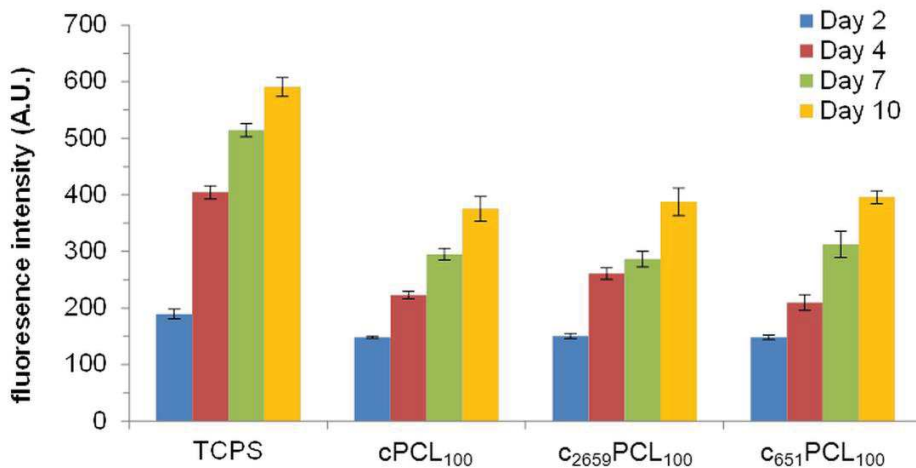
properties with  $\sigma_f \approx 4$  MPa,  $\sigma_y \approx 2$  MPa and  $E \approx 100$  MPa (Figure II-2 5). Upon addition of neat PCL in the cross-linked networks, a general increase of Young's moduli and characteristic stresses was observed as a result of the higher molecular weight of the PCL. Typical values for  $c_x\text{PCL}_0$  films were  $\sigma_f \approx 14$  MPa,  $\sigma_y \approx 5$  MPa and  $E \approx 200$  MPa. For strain at failure ( $\epsilon_f$ ) and yield strain ( $\epsilon_y$ ), results were quite different. Maximum values were obtained for films containing between 25% and 75% of PCL-yne ( $c_x\text{PCL}_{25}$ ,  $c_x\text{PCL}_{50}$  and  $c_x\text{PCL}_{75}$ ). For example, maximum  $\epsilon_f$  values in the range 20% ( $c\text{PCL}_{50}$ ) to 30% ( $c_{651}\text{PCL}_{50}$  and  $c_{2959}\text{PCL}_{50}$ ) were obtained, against 10% for pure PCL and  $c_x\text{PCL}_{100}$ . Regarding  $\epsilon_y$ , the observed increase was more limited with a maximal improvement factor of 2 compared to neat PCL. Networks with intermediate polymer ratios showed therefore improved strains with respect to PCL and PCL-yne and moduli corresponding to soft tissues, for example ligaments.<sup>44</sup>



**Figure II-2 5 :** Mechanical tensile properties of UV-crosslinked PCL / propargylated PCL mixes with or without photoinitiator as a function of propargylated PCL content.

- **Networks Biocompatibility**

Residual photoinitiators and cross-linkers in the polymer networks can be a problem for biomedical applications. In the present case, although PCL is well known for its biocompatibility, the potential toxicity of the cross-linked materials containing PETMP and Irgacure® residues had to be assessed. This was achieved by seeding L929 fibroblasts on sterilized samples and assessing the cell viability over a 10 days period. Behavior of the cells on the networks was compared to their behavior when cultured on TCPS control plates. Results are shown in Figure II-2 6. L929 fibroblasts adhere and proliferate on all materials. Similar level of cell viability was observed for all networks, with no statistical differences in cell number in the presence or absence of photoinitiator during the curing. In particular, no difference was found between I651 and I2959 although the latter is generally recognized as being more biocompatible. In addition, for all samples the number of cells present on the surface of the network at different time points was between 60% and 75% of the one observed on TCPS control plates and cell proliferation steadily increased with time, which demonstrated the good biocompatibility of these materials.



**Figure II-2 6 :** In vitro proliferation of L929 cells on TCPS positive control and UV-crosslinked propargylated PCL with or without photoinitiator.

## 2.5. Conclusion

Degradable cross-linked biomaterials were easily prepared via thiol-yne photochemistry between an alkyne functional PCL and PETMP. For the first time, a one pot and timely efficient post-polymerization modification reaction of PCL was reported to yield the multifunctional PCL-yne. Pure PCL-yne and mixtures of PCL-yne and PCL were cross-linked under UV via photoradical thiol-yne reaction in short times and with high efficiencies. These novel biocompatible networks have mechanical properties close to the ones of soft tissues, which is an open route for the design of biomedical scaffolds.

## Acknowledgements

The authors wish to thank the French Ministry of Education and Research for Adrien Leroy's fellowship and Aurélien Lebrun of the Laboratoire de mesures physiques (LMP)-University Montpellier 2 for NMR analyses.

## 2.6. References

1. B. G. Amsden, *Expert Opin. Drug Del.*, 2008, **5**, 175-187.
2. Q. Z. Chen, S. L. Liang and G. A. Thouas, *Prog. Polym. Sci.*, 2013, **38**, 584-671.
3. Q. Y. Liu, L. Jiang, R. Shi and L. Q. Zhang, *Prog. Polym. Sci.*, 2012, **37**, 715-765.
4. M. C. Serrano, E. J. Chung and G. A. Ameer, *Adv. Funct. Mater.*, 2010, **20**, 192-208.
5. *Biodegradable polymers in clinical use and in clinical development*, ed. A.J. Domb, N. Kumar and A. Ezra John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2011.
6. J. P. Bruggeman, B. J. de Bruin, C. J. Bettinger and R. Langer, *Biomaterials*, 2008, **29**, 4726-4735.
7. J. Yang, A. R. Webb, S. J. Pickerill, G. Hageman and G. A. Ameer, *Biomaterials*, 2006, **27**, 1889-1898.
8. I. Pomerantseva, N. Krebs, A. Hart, C. M. Neville, A. Y. Huang and C. A. Sundback, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2009, **91A**, 1038-1047.
9. E. Bat, B. H. M. Kothman, G. A. Higuera, C. A. van Blitterswijk, J. Feijen and D. W. Grijpma, *Biomaterials*, 2010, **31**, 8696-8705.
10. S. J. Bryant, C. R. Nuttelman and K. S. Anseth, *J. Biomat. Sci.-Polym. E.*, 2000, **11**, 439-457.
11. A. Harrane, A. Leroy, H. Nouailhas, X. Garric, J. Coudane and B. Nottelet, *Biomed. Mater.*, 2011, **6**, 065006.

12. B. G. Ilagan and B. G. Amsden, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 2429-2440.
13. R. S. I. Serra, J. L. E. Ivirico, J. M. M. Duenas, A. A. Balado, J. L. G. Ribelles and M. S. Sanchez, *J. Polym. Sci. Pol. Phys.*, 2009, **47**, 183-193.
14. C. Wischke, G. Tripodo, N. Y. Choi and A. Lendlein, *Macromol. Biosci.*, 2011, **11**, 1637-1646.
15. C. E. Hoyle, A. B. Lowe and C. N. Bowman, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1355-1387.
16. A. B. Lowe, *Polym. Chem.*, 2010, **1**, 17-36.
17. M. C. Cushing and K. S. Anseth, *Science*, 2007, **316**, 1133-1134.
18. C. R. Nuttelman, M. A. Rice, A. E. Rydholm, C. N. Salinas, D. N. Shah and K. S. Anseth, *Prog. Polym. Sci.*, 2008, **33**, 167-179.
19. A. E. Rydholm, C. N. Bowman and K. S. Anseth, *Biomaterials*, 2005, **26**, 4495-4506.
20. C. N. Salinas and K. S. Anseth, *Macromolecules*, 2008, **41**, 6019-6026.
21. N. Simpson, M. Takwa, K. Hult, M. Johansson, M. Martinelle and E. Malmstrom, *Macromolecules*, 2008, **41**, 3613-3619.
22. M. Claudino, I. van der Meulen, S. Trey, M. Jonsson, A. Heise and M. Johansson, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 2012, **50**, 16-24.
23. C. Nilsson, E. Malmstrom, M. Johansson and S. M. Trey, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 2009, **47**, 589-601.
24. S. M. Trey, C. Nilsson, E. Malmstrom and M. Johansson, *Prog. Org. Coat.*, 2010, **68**, 151-158.
25. D. A. Echeverri, V. Cadiz, J. C. Ronda and L. A. Rios, *Eur. Polym. J.*, 2012, **48**, 2040-2049.
26. B. Nottelet, G. Tambutet, Y. Bakkour and J. Coudane, *Polym. Chem.*, 2012, **3**, 2956-2963.
27. A. B. Lowe, C. E. Hoyle and C. N. Bowman, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 4745-4750.
28. B. D. Fairbanks, T. F. Scott, C. J. Kloxin, K. S. Anseth and C. N. Bowman, *Macromolecules*, 2009, **42**, 211-217.
29. R. Cervera-Procas, C. Sanchez-Somolinos, J. L. Serrano and A. Omenat, *Macromol. Rapid Commun.*, 2013, **34**, 498-503.
30. J. W. Chan, J. Shin, C. E. Hoyle, C. N. Bowman and A. B. Lowe, *Macromolecules*, 2010, **43**, 4937-4942.
31. J. W. Chan, H. Zhou, C. E. Hoyle and A. B. Lowe, *Chem. Mater.*, 2009, **21**, 1579-1585.
32. D. Konkolewicz, A. Gray-Weale and S. Perrier, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 18075-18077.
33. M. Lomba, L. Oriol, R. Alcala, C. Sanchez, M. Moros, V. Grazu, J. L. Serrano and J. M. De la Fuente, *Macromol. Biosci.*, 2011, **11**, 1505-1514.
34. W. Liu and C. M. Dong, *Macromolecules*, 2010, **43**, 8447-8455.
35. V. Darcos, S. El Habnoui, B. Nottelet, A. El Ghzaoui and J. Coudane, *Polym. Chem.*, 2010, **1**, 280-282.
36. S. El Habnoui, B. Nottelet, V. Darcos, B. Porsio, L. Lemaire, F. Franconi, X. Garric and J. Coudane, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 3626-3634.
37. B. Nottelet, J. Coudane and M. Vert, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4948-4954.

38. B. Nottelet, V. Darcos and J. Coudane, *J. Polym. Sci. Pol Chem.*, 2009, **47**, 5006-5016.
39. B. Nottelet, A. El Ghzaoui, J. Coudane and M. Vert, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 2594-2601.
40. B. Nottelet, M. Vert and J. Coudane, *Macromol. Rapid Commun.*, 2008, **29**, 743-750.
41. S. Ponsart, J. Coudane and M. Vert, *Biomacromolecules*, 2000, **1**, 275-281.
42. C. G. Williams, A. N. Malik, T. K. Kim, P. N. Manson and J. H. Elisseeff, *Biomaterials*, 2005, **26**, 1211-1218.
43. H. Tsuji and T. Ishizaka, *Macromol. Biosci.*, 2001, **1**, 59-65.
44. A. C. Vieira, R. M. Guedes and A. T. Marques, *J Biomech*, 2009, **42**, 2421-2430.

## ***2.7. Supplementary data***

Biodegradable networks for soft tissue engineering by thiol-yne photo cross-linking of  
multifunctional polyesters

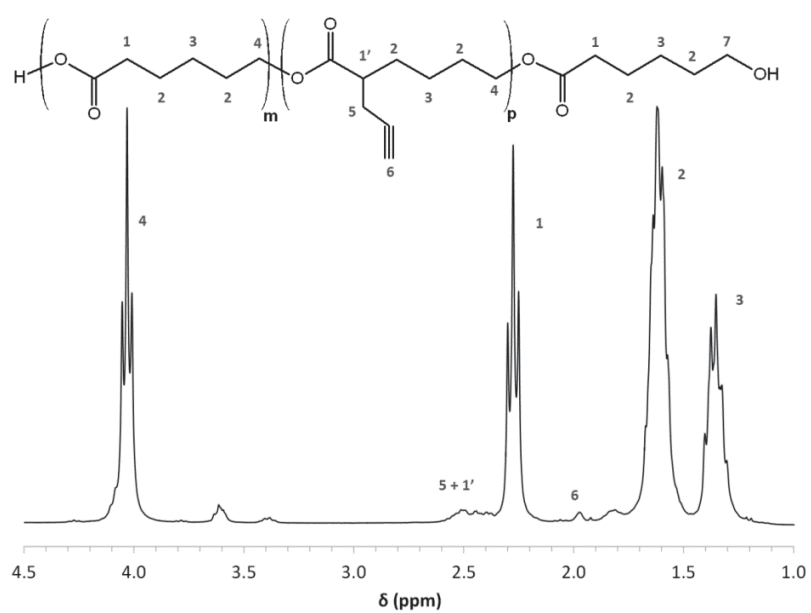
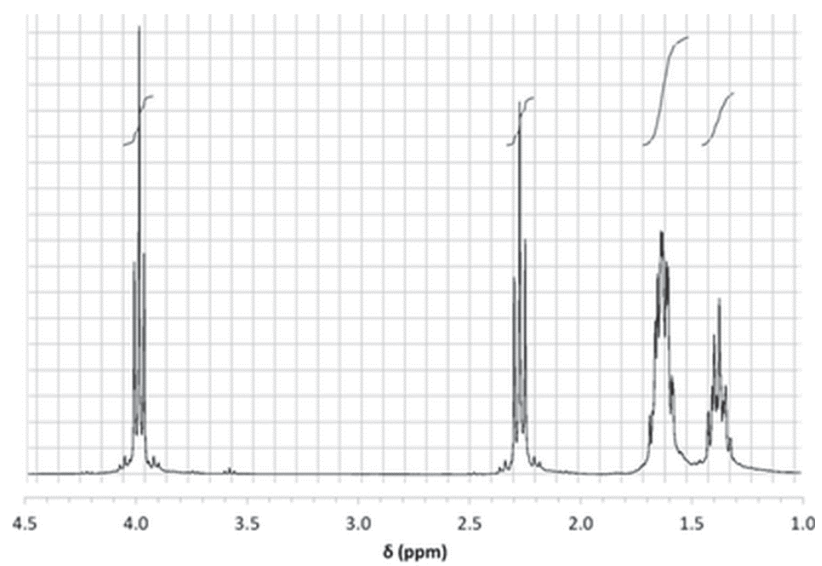
Adrien Leroy<sup>1</sup>, Assala Al Samad<sup>1</sup>, Xavier Garric<sup>1</sup>, Sylvie Hunger<sup>1</sup>, Danièle Noël<sup>2</sup>, Jean Coudane<sup>1</sup>, Benjamin Nottelet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomolecules Max Mousseron (IBMM - CNRS UMR 5247), Department of Artificial Biopolymers - Université Montpellier I, Université Montpellier 2, ENSCM - France

<sup>2</sup>INSERM U844, Hôpital Saint-Eloi, 80 Av. Augustin Fliche, 34091 Montpellier Cedex 5 - France

\* [benjamin.nottelet@univ-montpl.fr](mailto:benjamin.nottelet@univ-montpl.fr)





**Figure II-2 S 1:**  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of PCL (top spectrum) and propargylated PCL (bottom spectrum).

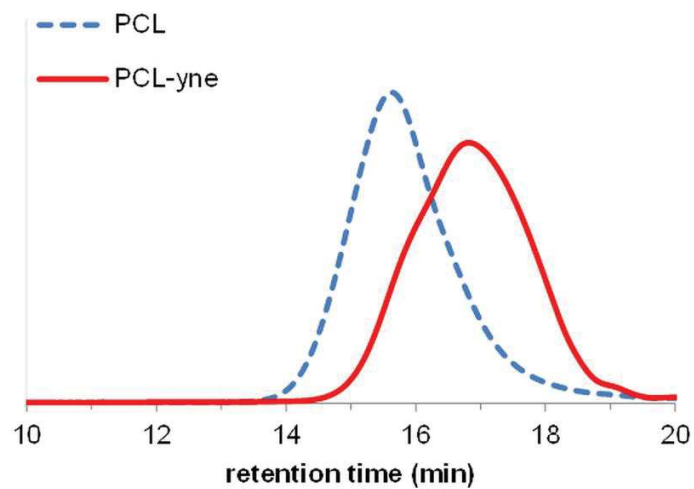


Figure II-2 S 2 : SEC traces of unmodified PCL and propargylated PCL (PCL-yne).

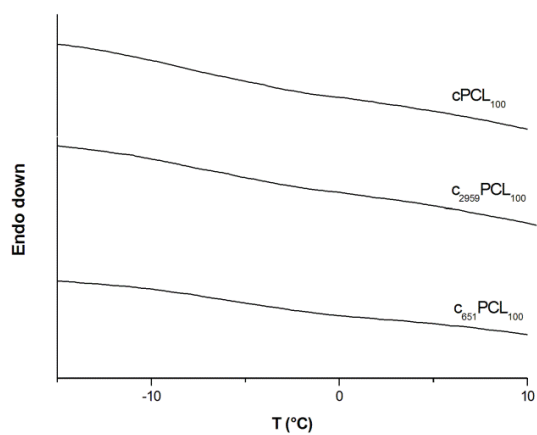
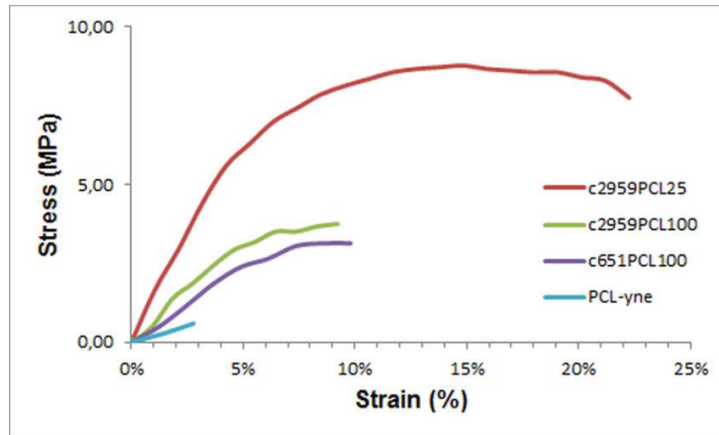


Figure II-2 S 3 : Thermograms of networks in the glass transition region.



**Figure II-2 S 4 :** Non exhaustive selection of typical strain-stress curves obtained with PCL-yne and photo cross-linked networks.

### ***3. Introduction à la synthèse de copolymères amphiphiles PCL-g-PEG par greffage photochimique thiol-yne***

#### **Introduction**

Les copolymères à base de PCL-PEG ont montré un grand intérêt dans la délivrance de PA. Les copolymères aux architectures complexes y compris les copolymères greffés ont retenu beaucoup d'attention grâce à leurs caractères (ils sont connus pour leurs CAC et leurs tailles plus faibles que leurs analogues linéaires) et au développement de techniques de greffage. Parmi les trois stratégies citées dans la bibliographie (grafting from, grafting through et grafting to) on a choisi la stratégie « grafting to » puisqu'elle nous permet de fonctionnaliser de polymères commerciaux. Comme cela a été évoqué, l'inconvénient de cette approche pour la synthèse de copolymères greffés est que la densité de greffage est généralement faible en raison de l'encombrement stérique de polymères utilisés. L'idée présentée dans l'article qui suit est que la photo-addition thiol-yne, en permettant l'addition de 2 thiols par alcynes, peut permettre de contrôler et augmenter la densité de greffage de chaînes PEG sur la PCL propargylée. Les copolymères ainsi formés seront destinés à des applications biomédicales, domaine dans lequel l'activation photochimique thiol-yne présente l'avantage supplémentaire de ne pas nécessiter l'utilisation de catalyseurs métalliques.

#### **Synthèse et caractérisation de PCL-g-PEG**

Dans un premier temps, on a utilisé le benzyle mercaptan (BM) comme molécule modèle pour évaluer la possibilité de greffage de dérivés thiolés sur les chaînes PCL-yne par activation photoradicalaire thiol-yne. Les analyses RMN ont montré que 75% des groupes propargyle ont réagi avec le BM. Dans un deuxième temps, on a synthétisé une famille de copolymères amphiphiles avec des rapports contrôlés EG/CL (0,1-1,3) à partir de PCL-yne et PEG-SH. L'augmentation des densités de greffage a été favorisée par l'augmentation du nombre d'équivalents de PEG<sub>750</sub>-SH et de photoamorceur utilisés. Ces copolymères, en fonction de leur amphiphilie, ont formé des nanoobjets particuliers et micellaires (micelles gelées appelés ici nanogrégats). Les nanoparticules (EG/CL = 0,1) formulées par nanoprecipitation ont des diamètres de 55 nm et les nanoagrégats (EG/CL = 1,15) formulées par autoassemblage ont des diamètres 30 nm. La CAC des

nanoagrégats est de l'ordre de 1 mg/L, ce qui montre la stabilité des nanoagrégats en solution aqueuse. Un essai préliminaire d'encapsulation de PA est ensuite présenté.

### **Encapsulation et libération de curcumine**

Les nanoagrégats sont utilisés pour encapsuler un PA anticancéreux, la curcumine. Les rapports curcumine/copolymère et le type d'agitation ont été étudiés dans le but d'augmenter l'efficacité d'encapsulation et le taux de charge (notés EE et DL). Le copolymère PCL-g-PEG<sub>1,2</sub> s'est avéré être le plus prometteur avec un DL de 12,1% et une taille de nanoagrégats de 40 nm. Finalement, on a vérifié la libération de curcumine dans le PBS à 37°C en présence de tween et d'acide ascorbique. Le tween sert à solubiliser la curcumine après libération et l'acide ascorbique protège cette dernière de la dégradation. On a obtenu une libération atteignant 90% en 80 jours. Cette libération lente est supposée due à la structure compacte des micelles gelées, à l'hydrophobie de la PCL et à l'existence d'interactions favorables entre PCL et curcumine.

### **Conclusion**

En conclusion, la modification post-polymérisation thiol-yne apparaît comme une méthode efficace et rapide pour modifier les polyesters porteurs de groupes alcyne. Le taux de fonctionnalisation des groupes propargyle est affecté par l'encombrement stérique des molécules à greffer (75% pour les benzyl mercaptans contre 50% pour le PEG<sub>750</sub>). Cette méthode nous a permis d'obtenir une famille de copolymères amphiphiles PCL-g-PEG avec de rapports contrôlés EG/CL inférieurs à 1,2, c'est-à-dire relativement peu hydrophiles. Ces copolymères ont formé des nanoparticules ou des nanoagrégats de type micelles gelées en fonction de leur hydrophilie. Les nanoagrégats de PCL-g-PEG<sub>1,15</sub> ayant une CAC faible (1 mg/L) ont été testés comme nanosystèmes de délivrance de médicaments. Ils ont montré un taux d'encapsulation élevé et une libération quasi-quantitative mais lente de la curcumine.

L'amélioration de ces systèmes de délivrance, en particulier l'influence de l'hydrophilie des copolymères, et leur utilisation seront développées dans le chapitre 3 de cette thèse.

***4. From nanospheres to micelles: simple control of PCL-g-PEG copolymers amphiphilicity through thiol-yne photografting.***

Assala Al Samad<sup>1,2</sup>, Youssef Bakkour<sup>2</sup>, Coumes Fanny<sup>1</sup>, Fawaz El Omar<sup>2</sup>, Jean Coudane<sup>1</sup>, Benjamin Nottelet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomolecules Max Mousseron (IBMM - CNRS UMR 5247), Department of Artificial Biopolymers – University of Montpellier - France

<sup>2</sup>Laboratory of Applied Chemistry, Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Lebanon

\* [benjamin.nottelet@univ-montpl.fr](mailto:benjamin.nottelet@univ-montpl.fr)

#### ***4.1. Abstract***

A simple method for the synthesis of a family of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*g*-polyethylene glycol (PCL-*g*-PEG) copolymers of controlled amphiphilicity and their use to generate nanospheres or micelles are reported. PCL-*g*-PEG with various compositions are prepared from a single strategy relying on a combination of post-polymerization modification and subsequent thiol-yne photografting. Alkyne-functional PCL (PCL-yne) are first obtained by anionic activation and reaction with propargyl bromide to yield PCL-yne with 8% alkyne groups. PEG-thiol is then reacted on PCL-yne under UV activation to yield the targeted graft copolymer by thiol-yne photoaddition. The advantage of the approach is that control over the composition is easily achieved yielding to amphiphilic graft copolymers with ethylene glycol/ caprolactone (EG/CL) ratios ranging from 0.1 to 1.3. Starting from this single strategy, it was therefore possible to obtain nanospheres ( $D_H \sim 55$  nm) or micelles ( $D_H \sim 30$  nm) by copolymers self-assembly depending on the ratio EG/CL. The potential of the PCL-*g*-PEG micelles as a drug carrier was finally evaluated with curcumin that was efficiently encapsulated, protected and released over 80 days. Interestingly it was found that drug encapsulation efficiency and drug loading were higher for PCL-*g*-PEG copolymers compared to block PCL-*b*-PEG.

**Keywords:** thiol-yne photochemistry; graft polymer; amphiphilic copolyester; micelles; drug delivery; nanoparticles

#### ***4.2. Introduction***

With almost one-third of newly discovered drugs being highly insoluble in water, the last decades witnessed increasing number of researches focused on drug delivery systems able to overcome this solubility limitation.<sup>1</sup> Although various systems exists, including molecular complexation systems based on cyclodextrins, nanosuspensions, lipid formulations, prodrugs, etc.,<sup>2</sup> amphiphilic polymeric systems have been widely investigated for their potential applications in pharmaceutical fields. In particular polymeric micelles and stealth nanospheres have attracted great interest as a result of their unique combination of advantages: drugs solubilization and protection, increased

circulation times, stability, controlled drug release rate, enhanced therapeutic efficacy, reduced side effects and targeting possibilities.<sup>3-6</sup>

Classical self-assembled polymeric drug carriers involve AB- or ABA-type block copolymers, which spontaneously form nano-sized objects in aqueous medium as a result of the hydrophobic and hydrophilic blocks interacting differently with the solvent. Most studies have focused on linear block copolymers based on poly(ethylene glycol) PEG and polyesters like poly(lactide) (PLA), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) or poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) because of their biocompatibility and biodegradability.<sup>7-11</sup> However, micelles properties can advantageously be improved by using alternative polymers or architectures. For example, degradation and drug loading can be modulated by using more hydrophobic poly(hexyl-lactide) blocks,<sup>12, 13</sup> while micelles stability can be increased towards serum and lyophilization by using graft structures instead of block copolymers.<sup>14, 15</sup> Indeed graft copolymers are known to have lower critical micellar concentrations (CMC) over their linear analogs because of the side chains reducing their mobility and due to their higher polydispersity.<sup>16, 17</sup> In addition graft copolymers have the advantage of allowing an easy variation of the number of PEG chains along the polymer backbone.

Various strategies have therefore been reported to synthesize polyesters-*g*-PEG structures with the two main ones being the “grafting through” and “grafting to” strategies. The “grafting through” strategy is based on the ring opening polymerization of PEG-functional lactones and leads to high grafting density.<sup>18, 19</sup> However, in addition to low yield for the lactones synthesis due to multistep reactions, the bulky nature of the monomers can result in polymerizations being slow and limited to low monomer conversions and chain lengths. On the other hand the “grafting to” strategy allows the polymer backbone and side arms to be separately prepared and characterized prior to their coupling, but at the cost of limited grafting density as a consequence of steric hindrance between the bulky side arms.<sup>20</sup> This strategy has however gained considerable interest in the recent years as a consequence of the use of the click chemistry toolbox to yield graft copolymers in an efficient manner. In particular various alkyne, alkene functional lactones were synthesized including glycolide and caprolactone (CL) derivatives.<sup>21-28</sup> Halogenated lactones were also used to yield after derivatization



copolyesters bearing clickable moieties.<sup>29-31</sup> The use of copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) or thiol-ene thermal radical addition for the coupling of PEG-azide or PEG-thiol functions led to polyesters-g-PEG structures in an elegant and controlled manner. Like for the “grafting through”, one drawback of this approach relies however in the difficulty to synthesize functional lactones in good yields. To overcome this limitation an alternative “grafting to” approach was followed by the Coudane's group with use of anionic post-polymerization modification to graft carboxyl PEG at the  $\alpha$ -position of the carbonyl of pristine PCL.<sup>32, 33</sup> This one pot method was rapid and versatile, and the graft copolymer was easily prepared at the multigram scale from a commercially available PCL. Unfortunately a low control of the grafting density, and as a consequence on the self-assembly behavior, was obtained.

To overcome this limitation, we present a simple and straightforward strategy to yield original amphiphilic PCL-g-PEG copolymers with controlled amphiphilicity. Advantage is taken of i) the scale-up friendly post-polymerization modification technique to easily prepare in one step poly( $\alpha$ -propargyl- $\epsilon$ -caprolactone-co- $\epsilon$ -caprolactone) (PCL-yne) and ii) of the fast, efficient and metal-free photo thiol-yne chemistry to synthesize the graft copolymers by reaction with a thiolated PEG (PEG-SH). Additionally, we demonstrate that a good control of the copolymer composition, ie. grafting density, is easily achieved. This is illustrated through the synthesis of PCL-g-PEG with EG/CL ratios ranging from 0.1 to 1.3 using the same reaction, namely photoradical thiol-yne reaction. The family of amphiphilic PCL-g-PEG is then used to prepare pegylated nanospheres or core-shell micelles depending on the copolymers composition. As proof of concept for use in drug delivery applications, we finally demonstrate the capacity of the polymeric micelles to encapsulate and release curcumin, a sensitive and potent chemotherapeutic anticancer drug with poor water solubility.

### ***4.3. Materials and Methods***

- **Materials**

PCL ( $M_n \approx 45$  kg/mol), propargyl bromide (80 wt% in toluene), lithium diisopropylamide (2 M in THF/heptane/ethylbenzene), 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA,

>99%), benzyl mercaptan (BM, >99%), p-toluenesulfonic acid monohydrate (>98%), mercaptopropionic acid (>99%), curcumin, Tween 80 and Span 80 were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France).  $\alpha$ -methoxy, $\omega$ -hydroxyl poly(ethylene glycol) (MeO-PEG) was obtained from Acros Organic Belgium. L(+)-ascorbic acid puriss was obtained from Riedel-de Haen. Phosphate buffered saline (PBS) 10x was purchased from Gibco.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (> 99%) was obtained from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France), technical grade  $\text{MgSO}_4$  from Carlo Erba (Val de Reuil, France), methanol ( $\geq 99.8\%$ ), dichloromethane (DCM,  $\geq 99.9\%$ ) and anhydrous tetrahydrofuran (THF,  $\geq 99.9\%$ ) from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). THF was distilled on benzophenone/sodium until a deep blue color was obtained. Spectra/por® dialysis tubes (cut-off, 6kDa-8kDa or 3.5 kDa) were obtained from Spectrum Labs.

- **Characterizations**

*NMR spectroscopy.*  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded at room temperature using an AMX300 Bruker spectrometer operating at 300 MHz. Deuterated chloroform and deuterated dimethyl sulfoxide were used as solvent, chemical shifts were expressed in ppm with respect to tetramethylsilane (TMS). Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) experiments were performed with a Bruker Avance III spectrometer operating at 600 MHz, using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO) as solvent.

*Size exclusion chromatography (SEC)* was performed with a Waters equipment fitted with a 60 cm long 5  $\mu\text{m}$  mixed C PLgel column and a Waters 410 refractometric detector. The mobile phase was chloroform at 1 mL/min flow rate at 30°C. Typically, the polymer (10 mg) was dissolved in chloroform (2 mL) and the resulting solution was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filter before injection of 20  $\mu\text{L}$  of filtered solution. The number average molecular weight ( $M_n$ ) and the dispersity ( $D$ ) of the polymers were expressed according to calibration using polystyrene standards.

*Fluorescence measurements and CAC determination.* The CAC of the copolymers was determined by fluorescence spectroscopy using pyrene as a hydrophobic fluorescent probe. Measurements were carried out on an RF 5302 Shimadzu spectrofluorometer (Japan) equipped with a Xenon light source (UXL-150S, Ushio, Japan). Briefly, an aliquot of pyrene solution ( $6 \times 10^{-6}$  M in acetone, 1 mL) was added to different vials, and

the solvent was evaporated. Then, 10 mL of aqueous solutions of different concentrations were added to the vials. The final concentration of pyrene in each vial was  $6 \times 10^{-7}$  M. After overnight equilibration at room temperature, the fluorescence emission spectra of the solutions were recorded from 350 to 400 nm at an excitation wavelength of 340 nm. The emission and excitation slit widths were 5 nm and 3 nm, respectively. The emission fluorescence values  $I_{373}$  and  $I_{384}$ , at 373 and 384 nm respectively, were used for subsequent calculations. The CAC was determined from the intersection of linear regression lines of the  $I_{384}/I_{373}$  ratio versus polymer concentration plots.

*Light scattering measurements.* Dynamic light scattering (DLS) was carried out with a Malvern Instrument Nano-ZS equipped with a He-Ne laser ( $\lambda = 632.8$  nm). Polymer solutions at  $1.0 \text{ mg.mL}^{-1}$  were filtered through a  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  PTFE microfilter before measurements. The correlation function was analyzed via the general purpose method (NNLS) to obtain the distribution of diffusion coefficients (D) of the solutes. The apparent equivalent hydrodynamic diameter ( $D_H$ ) was determined from the cumulant method using the Stokes-Einstein equation. Mean radius values were obtained from triplicate runs. Standard deviations were evaluated from hydrodynamic radius distribution.

*Transmission electron microscope (TEM)* micrographs were obtained with a JEOL 1200 EXII (working voltage of 120 kV). A drop of polymer solution at  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  was placed onto a carbon-supported copper grid for 5 min. The excess liquid was removed by capillarity with a filter paper. Mean particle size was determined by measuring the particles diameter with Image J software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014)

*UV-spectrometry* was performed on a Perkin-Elmer Precisely Lambda 35 spectrometer, with 1 cm optical path quartz cuvettes.

- **PCL propargylation (PCL-yne)**

The anionic chemical post-modification of PCL was obtained according to our previous work.<sup>34</sup> Typically, PCL (0.053 mol of CL unit, 6 g) was dissolved in anhydrous THF (300 mL) in a four-necked reactor equipped with a mechanical stirrer and kept at  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$  under argon atmosphere. A solution of LDA (0.5 eq./CL unit, 13.2 mL) was injected with

a syringe through a septum and the mixture was kept at -50 °C under stirring for 30 min. After this activation step, propargyl bromide (0.5 eq./CL unit, 2.8 mL) was added, the mixture was kept under stirring and raised to -30 °C. After 30 min, the reaction was stopped by addition of a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl (100 mL) and pH was adjusted to 7 with 1M HCl. The polymer was extracted with DCM (3 × 150 mL). The combined organic phases were washed three times with distilled water (3 × 150 mL), dried on anhydrous MgSO<sub>4</sub> and filtered. After partial solvent evaporation under reduced pressure, the polymer was recovered by precipitation in cold methanol and dried overnight under vacuum. The polymer was obtained with an average yield of 79 %.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) = 4.0 (2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.4 (2H, CH<sub>2</sub>-OH), 2.4-2.6 (1H, C(O)CH(CH<sub>2</sub>-C≡CH) and 2H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 2.3 (2H, C(O)CH<sub>2</sub>), 2.0 (1H, C≡CH), 1.6 (4H, C(O)CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.4 (2H, C(O)CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

- **PEG thiolation (PEG-SH)**

MeO-PEG was dissolved in dry toluene in a round bottom flask and distilled by azeotropic distillation 3 times, then dissolved in freshly distilled toluene. Mercaptopropionic acid (1.3 eq.) and para-toluene sulfonic acid (0.25 eq.) were added. The reaction was performed using a Dean-Stark apparatus under reflux of solvent for 3 days. The solvent was evaporated under vacuum to yield oil that was precipitated in cold diethyl ether. The obtained polymer was filtrated and dried under vacuum.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 4.2 (2H, CH<sub>2</sub>COO), 3.6 (4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.4 (3H, OCH<sub>3</sub>), 2.8 (2H, CH<sub>2</sub>SH), 2.7 (2H, COOCH<sub>2</sub>), 1.6 (1H, -SH).

- **Model coupling reaction with benzyl mercaptan**

In a typical experiment, PCL-yne (50 mg; 7% alkyne groups with respect to CL units) was dissolved in THF (1.5 mL) in a Schlenk flask (Table II-4 S1, entry 2). Benzyl mercaptan (70 μl; 20 eq.) and DMPA (3.8 mg; 0.5 eq.) were added. The flask was covered by aluminum foil and purged with nitrogen for 10 min before closing. The reaction medium was then irradiated with UV light for 2 hours at room temperature under constant stirring using a DYMAX BlueWave™ 200 equipment (100 mW.cm<sup>-2</sup>). After

completion, the mixture was concentrated under vacuum and the oil was precipitated in heptane, before filtration of the polymer and drying under vacuum.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.2 (5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 3.9 (2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2.2 (2H,  $\text{C(O)CH}_2$ ), 1.5 (4H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 1.2 (2H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ).

- **Synthesis of PCL-g-PEG**

In a typical experiment, PCL-yne (0.2 g; 8% alkyne groups with respect to CL units) and PEG-SH (1.0 g; 10 eq. with respect to alkyne groups) were dissolved in THF (15 ml) in a Schlenk flask (Table II-4 1, entry 3). In parallel, DMPA (36 mg; 1 eq.) was dissolved in THF (15 ml) in a Schlenk flask covered by aluminum foil. The 2 flasks were purged with nitrogen for 10 min before closing with septums. The PCL-yne/PEG-SH reaction medium was irradiated with UV light for 2 hours ( $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) while DMPA was introduced by successive additions with a syringe at fixed intervals over the reaction time. After completion, the mixture was concentrated under vacuum and dialyzed against THF using cellulose tubing (molecular weight cut-off, 6000-8000 g/mol) until no residual free PEG was detected in SEC analyses. PCL-g-PEG was finally recovered after THF removal under vacuum and drying.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = PCL backbone 4.0 (2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2.3 (2H,  $\text{C(O)CH}_2$ ), 1.6 (4H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 1.3 (2H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ); PEG side chains 4.2 (2H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 3.5 (4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.3 (3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.8 (2H,  $\text{CH}_2\text{SCH}_2$ ), 2.6 (2H,  $\text{COOCH}_2$ ).

- **Preparation of micelles and nanospheres**

**Preparation of nanospheres** PCL-g-PEG nanospheres were prepared by the nanoprecipitation method. Briefly, PCL-g-PEG<sub>0.1</sub> (200 mg, EG/CL = 0.1) and Span 80 (100 mg) were dissolved in acetone (50 ml). The organic solution was slowly poured in 100 ml aqueous phase containing 200 mg of Tween 80 and maintained under vigorous stirring (9500 rpm) using an Ultra-Turrax stirrer. After 4 hours of stirring, acetone and part of aqueous phase were evaporated under vacuum. The solution was further dialyzed against water (cut-off, 6000-8000 g/mol) to eliminate Tween 80 and Span 80. For

cryoprotection, 20 mg of glucose were added to the solution prior freeze-drying of the nanospheres.

**Preparation of micelles** PCL-g-PEG micelles were prepared by self-assembly method. Briefly, PCL-g-PEG<sub>1.15</sub> (10 mg, EG/CL = 1.15; Table II-4 1, entry 3) was dissolved in acetone (10 ml), and then rapidly poured into water (10 ml). The slow evaporation of acetone under atmospheric pressure for 24 h followed by a rapid evaporation under vacuum allowed formation of the micelles.

**Preparation of curcumin loaded micelles (Cur/PCL-g-PEG)** The curcumin-loaded micelles were prepared by self-assembly method. In a typical experiment, curcumin (5 mg) and PCL-g-PEG<sub>1.15</sub> (35 mg, EG/CL = 1.15; Table II-4 1, entry 3) were dissolved in acetone (2 ml) before water (5 mL) addition. The resulting mixture was vigorously stirred for 1 hour using an Ultra-Turrax stirrer (8000 rpm). Remaining acetone was then removed by evaporation under vacuum. The resulting solution was centrifuged for 10 min at 10°C at 3600 rpm prior to filtration through a 0.45 µm filter to eliminate the unloaded precipitated curcumin.

- **Determination of drug loading and encapsulation efficiency**

Drug loading (DL) and encapsulation efficiency (EE) were determined by UV/Vis spectrophotometry at 425 nm. Quantification was performed with respect to a calibration curve of curcumin in acetone / water (20:80). The DL content and EE were calculated based on the following formulae:

$$DL (\%) = 100 \times (M_C) / (M_P + M_C)$$

$$EE (\%) = 100 \times (M_C) / (M_{Ci})$$

with  $M_C$  = mass of curcumin in micelles,  $M_P$  = mass of copolymer and  $M_{Ci}$  = mass of curcumin initially added to prepare micelles.

- **In Vitro drug release assay**

The release of curcumin from PCL-g-PEG micelles was assessed in phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) containing 0.1% w/v Tween 80 and 0.6% w/v ascorbic acid at 37 °C under constant orbital shaking (100 rpm ; Heidolph Unimax 1010). Tween is classically used to provide water-solubility to curcumin in such assays.<sup>35-37</sup> Ascorbic acid is a

biomolecule naturally present in plasma, which is used to enhance the stability and avoid the degradation of the released curcumin.<sup>38</sup> In a typical release study, 2 mL of Cur/PCL-g-PEG micellar solution were poured in a dialysis bag (cut-off 3.5 kDa) that was immersed in 20 ml of buffer solution at 37°C. At specific time points, the entire release medium was removed and replaced with 20 mL fresh buffer solution. Collected samples were analyzed by UV–Vis spectrophotometry at 425 nm with reference to a calibration curve of curcumin in acetone:water (20:80). The amount of released curcumin (Rc) was calculated based on the following formula:

$$Rc (\%) = 100 \times (M_{RC}) / (M_C)$$

with  $M_{RC}$  = mass of released curcumin and  $M_C$  = mass of curcumin in micelles.

#### ***4.4. Results and Discussion***

- **Synthesis of PCL-yne and PEG-SH**

This work aims at developing a single chemical strategy to produce both micelles and nanospheres based on graft amphiphilic PCL-g-PEG copolymers. To this end, photoradical thiol-yne chemistry was chosen to graft PEG-SH to PCL-yne in a straightforward manner yet allowing control over the hydrophilicity/hydrophobicity balance. The strategy was chosen over the existing methods described in literature and mentioned in the introduction part due to some important advantages : i) time consuming and low yield synthesis of functional lactones is not required, ii) PCL-yne can be prepared rapidly in high quantities, iii) thiol-yne “click” grafting does not require metals, like copper, which is of benefit for medical use, and iv) photo-chemical reactions are much faster than thermal thiol-ene or copper catalyzed reactions, thus preserving integrity of the degradable polymeric chain.

In a first step, PCL bearing multiple alkyne groups (PCL-yne) was synthesized according to the anionic modification methodology recently reported by our group.<sup>34</sup> This method was chosen over copolymerization of  $\alpha$ -propargyl- $\epsilon$ -caprolactone and  $\epsilon$ -caprolactone as it allows to easily obtain the functional PCL-yne at a multigram scale with substitution degrees of about 10 mol%. Optimized conditions defined in our previous work were used. The polymer chemical structure was characterized by <sup>1</sup>H-NMR (ESI Figure II-4



S1). Typical signals of the propargyl group are found at 2.5 ppm, corresponding to the methylene proton and at 2.0 ppm, corresponding to the alkyne proton. Substitution degree (SD) in the range 7% to 8% was calculated by comparison of the integrations of the resonance peak at 2.0 ppm with the integration of the resonance peak at 4.0 ppm, corresponding to a methylene of PCL. Molecular weight of PCL-yne was measured by SEC analysis in THF (Figure II-4 1). PCL-yne with molecular weight  $\overline{Mn} = 21300$  g/mol and  $\overline{D} = 2.4$  is obtained. These values were compared with the ones of the commercial PCL used as a starting material  $\overline{Mn} = 40000$  g/mol and  $\overline{D} = 1.5$ . The molecular weight decrease is classically observed with the anionic activation of polyester, as a consequence of hydrolysis and backbiting side reactions.<sup>39, 40</sup> In the present case, and although remarkable in terms of influence on the final molecular weight, this corresponded to less than 0.3% hydrolysis of the ester groups initially present in the polymer chain. Noteworthy, starting from commercially available PCL, 5 g of PCL-yne was prepared in a single day, including reaction and purification thanks to this one pot and time saving reaction.

In a second step, PEG-SH was synthesized by esterification of the hydroxyl chain-end of MeO-PEG-OH by mercaptopropionic acid under classic conditions using a Dean-Stark continuous water distillation in toluene with *p*-toluene sulfonic acid as a catalyst. The extent of esterification was determined by <sup>1</sup>H NMR by comparison of the integration of the resonance peak at 4.2 ppm corresponding to the terminal methylene group of PEG in  $\alpha$  position of the ester group, with the integration of the resonance peak at 3.3 ppm, corresponding to the methylene groups of the PEG chain (ESI Figure II-4 S2). Esterification extent is found superior to 95 %. PEG-SH was further characterized by SEC analysis in THF. A molecular weight of  $\overline{Mn} = 1050$  g/mol ( $\overline{D} = 1.1$ ) was calculated which is in good agreement with  $\overline{Mn} = 780$  g/mol ( $\overline{D} = 1.1$ ) for the starting MeO-PEG.

- **Model coupling reaction with benzyl mercaptan**

Recent efforts dedicated to post-polymerization modification of aliphatic polyesters are mainly focused on CuAAC reactions, with for example functional and graft PLA and PCL copolymers recently reported by our group.<sup>22, 24, 41</sup> Photoreadical thiol-ene or thiol-yne, on the other hand, has been much less studied with few examples of chain-end functionalization,<sup>42-44</sup> and one recent example of PLA surface functionalization by our



group.<sup>45</sup> To the best of our knowledge, only one example of photoradical thiol-yne multiple functionalization of polyesters has been reported by Zhang et al. who prepared amino-functional PLA analogues using alkyne O-carboxyanhydride derived from tyrosine.<sup>46</sup> In that regard, benzyl mercaptan (BM) was first chosen as a model compound to evaluate the possibility to graft multiple thiol derivatives on the PCL-yne backbone via photoradical thiol-yne addition. Parameters were selected based on reported conditions of literature.<sup>42</sup> In particular a large excess of BM was initially used (20 eq./alkyne group). PCL-yne with 7% of CL units substituted with propargyl groups ( $\overline{Mn}$  = 21200g/mol  $\overline{D}$  = 2.4) and DMPA (0.5 eq./alkyne group) as photoinitiator were used for all experiments. Conditions are listed in Table S1 (ESI, Table II-4 S1). SD was calculated from <sup>1</sup>H NMR analyses, by comparison of the integrations of the resonance peak at 7.2 ppm corresponding to the aromatic protons of BM, with the integration of the resonance peaks at 2.2 and 1.2 ppm, corresponding to methylene protons of PCL. One should note that the higher possible ratio BM/CL is 14% if quantitative diaddition of BM on alkyne groups is achieved. Under the classic conditions (ESI Table II-4 S1, entry 1), high efficiency of the grafting is achieved with 75% reaction yield (1.5 BM grafted per alkyne group) and a resulting PCL bearing 10.5 mol% of BM groups with respect to CL units.

With final aim to reduce the number of PEG-SH equivalents used in the next step, the impact of BM equivalents decrease was then evaluated with 10 eq. and 5 eq. (ESI Table II-4 S1, entries 2 and 3). Similar reaction yield was obtained with 10 eq. whereas a lower yield (65%) was obtained with 5 eq. In both cases, higher dispersities were calculated with even a limited increase of molecular weight when 5 eq. BM were used. Our belief is that when low thiol equivalents are used, and taking account that DMPA is already present in the mixture, part of the radicals that are generated under UV leads to a low extent of crosslinking side reactions instead of thiol-yne addition.

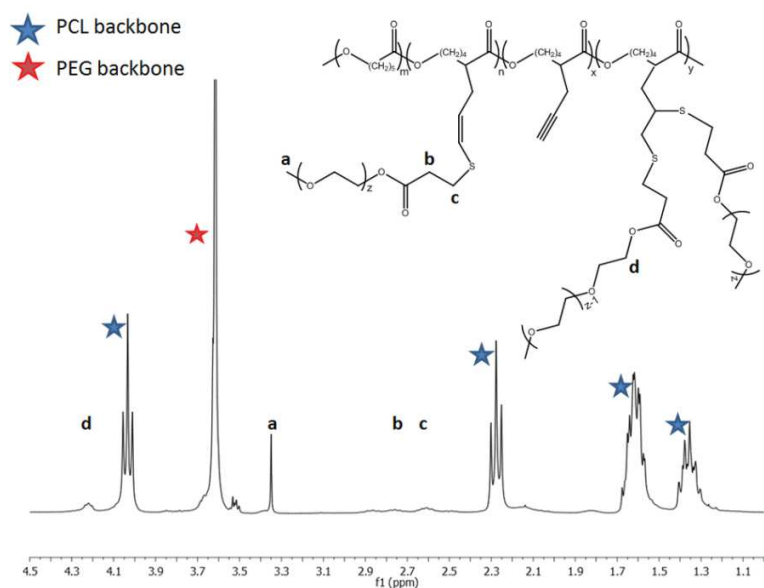
For that reason, further experiments were conducted with 10 eq., but with other parameters such as the use of quartz cuvette and successive additions of the DMPA over the reaction time. Under these conditions, final SD was unchanged (ESI Table II-4 S1, entries 4-6) but successive addition of DMPA effectively reduced the impact on final dispersity. Molecular weights  $\overline{Mn}$  in the range 15000 g/mol to 22000 g/mol and dispersity  $\overline{D}$  in the range 2.0 to 2.8 were obtained for all conditions except for the entry 2

carried out in a quartz cuvette. In that case similar molecular weight is obtained ( $\overline{Mn} = 19000$  g/mol) but with a very large distribution ( $\mathcal{D} = 5.1$ ) and bimodality. This result is believed to be due to the strong impact of UV-B which are not filtered by quartz vessel and may lead to both crosslinking and degradation of PCL-yne. For that reason quartz vessel was not used in the rest of this study.

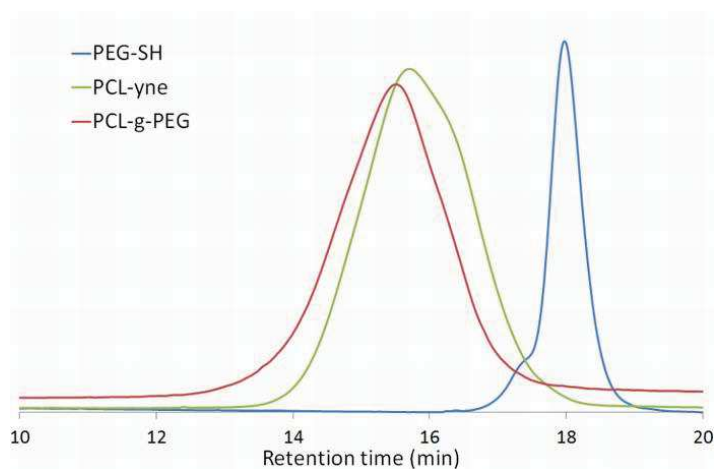
Although a quantitative BM thiol-yne coupling could not be reached, the extent of functionalization was high enough to further consider this approach for the synthesis of PCL-g-PEG. At this point one should note that, when considering polymer backbone functionalization, an important advantage of the thiol-yne reaction over the thiol-ene reaction is the ability for an yne-bond to react with two equivalents of thiol and to form a double addition product. This should be clearly of advantage to compensate the expected lower reaction efficiency with a sterically hindered PEG-SH compared to BM.

- **Synthesis of PCL-g-PEG**

Although model coupling only focused on conditions aiming at a maximal grafting of BM, we were interested in evaluating the opportunities offered by the photoradical thiol-yne addition to generate a family of PCL-g-PEG amphiphilic copolymers with controlled hydrophilic/hydrophobic ratio. To this end, a parameters study was carried out by varying the number of PEG-SH and DMPA equivalents with respect to alkyne groups. These experiments are summarized in Table II-4 1. Copolymers were analyzed by SEC and DOSY NMR to make sure that no free PEG-SH was remaining before  $^1\text{H}$  NMR analysis to evaluate the grafting efficiency and the EG/CL ratio. As illustration PCL-g-PEG<sub>1,15</sub>  $^1\text{H}$  NMR spectrum is provided. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum exhibits signals corresponding to the PCL block ( $\delta = 4.0$  ppm, 2.3 ppm etc.; Figure II-4 1 blue stars) and to the PEG branches ( $\delta = 3.5$  ppm; Figure II-4 1 red star). As shown in the DOSY pattern (ESI Figure II-4 S3),  $^1\text{H}$  NMR signals of the polyester backbone and PEG branches present the same diffusion coefficient consistent with efficient grafting of PEG-SH on the PCL-yne backbone. Moreover, no residual PEG-SH was observed as confirmed by the DOSY spectrum and the SEC trace of PCL-g-PEG copolymers (Figure II-4 2).



**Figure II-4 1 :**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) spectrum of PCL-g-PEG<sub>1.15</sub>.



**Figure II-4 2 :** SEC traces of PEG-SH (blue line), PCL-yne (green line) and PCL-g-PEG<sub>1.15</sub> (red line).

Considering the results obtained with BM, multiple additions of DMPA were done along the reaction time to avoid side reactions (*ie*, dimerization of PEG-SH or alkyne curing) and increase the addition efficiency. Under this condition, increasing the number of DMPA equivalents from 0.25 up to 0.5 showed a beneficial effect on the grafting efficiency (entry 1 *vs.* entry 2). However, above 1 eq. DMPA further increase was

detrimental without impact on the EG/CL ratio but with an increase of the dispersity that may be due to side reactions (*ie.* alkyne curing) occurring when high levels of radicals are present in the medium (entry 3 *vs.* entry 4). In a similar way, it was observed that although an increase of PEG-SH equivalents was beneficial, a limit was reached around 10 eq. as no drastic improvement of EG/CL ratio was obtained at 15 eq. (entry 3 *vs.* entry 5).

Molecular weights measured by SEC were in the range 16000 g/mol to 25000 g/mol with no significant changes in dispersities ( $\bar{D}$  = 1.8 to 2.6) except for the aforementioned entry 4 using 5 eq. of DMPA. Further discussion of the molecular weights of the copolymers with respect to PCL-yne ( $\bar{M}_n$  = 21200 g/mol  $\bar{D}$  = 2.4) or comparison between the copolymers is not provided as hydrodynamic behavior of the copolymers is known to be strongly impacted by their amphiphilicity and architectures. In particular underestimation in molecular weight of graft copolymers was reported in the literature and is believed to be due to the impact of grafting density on hydrodynamic radius, which gives these graft copolymers more compact structures than their linear counterparts.<sup>25, 27</sup> Typical SEC trace of copolymer PCL-g-PEG<sub>1,15</sub> is however provided in Figure II-4 2 for illustration. In that case a slight shift toward higher molecular weight is visible for the graft copolymer in comparison with the starting PCL-yne. More interesting is the efficiency of the coupling reaction. Starting with a PCL-yne with SD = 8%, the higher reachable EG/CL ratio with a theoretical PEG molecular weight of  $\bar{M}_n$  = 750 g/mol is 2.6, which corresponds to 16% SD of a quantitative diaddition of thiol groups on alkyne groups. With a maximum of 1.3 the thiol-yne addition yield is of ca. 50%. Not surprisingly this is lower than the 75% obtained with BM, but the grafting efficiency remained high when considering the disfavored grafting of multiple sterically hindered PEG-SH chains on a PCL-yne backbone. The determination of the extent of single hydrothiolation (monoaddition) and double hydrothiolation (diaddition) products was assessed by NMR analyses. No peaks corresponding to vinyl sulfides double bonds due to monoaddition and expected in the area 5.5-6.0 ppm could be found in the <sup>1</sup>H NMR spectra. Two explanations can be proposed. First hypothesis is that only diaaddition occurred in our system, which is in agreement with the previous studies of Fairbanks et al. who observed that subsequent addition of a thiol to the vinyl sulfide intermediate is

significantly faster (ca. 3 time faster) than the initial addition of a thiol to the alkyne.<sup>47</sup> Considering the strong sterical hindrance generated by the successive PEG-SH additions, one can expect that only the more reactive site - vinyl sulfide - will react. Another more trivial explanation is that the extent of vinyl sulfide present on the polymer might be too low for an accurate quantification under the experimental conditions.

To summarize, controlling the various parameters discussed above, it was possible to synthesize a family of amphiphilic PCL-*g*-PEG copolymers with a good control over the EG/CL ratios.

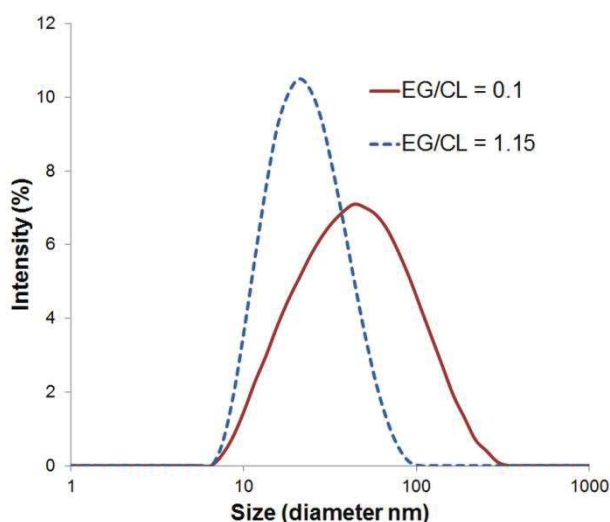
**Table II-4 1** : Thiol-yne coupling of PEG-SH on PCL-yne.

Entry	Copolymer	PEG-SH (eq. / alkyne)	Photoiniator (DMPA) eq. / alkyne	addition	EG/CL	thiol-yne efficiency (%)	Mn	(Đ)
1	PCL-g-PEG <sub>0.35</sub>	5	0.25	multiple	0.35	14	16 000	2.2
2	PCL-g-PEG <sub>0.65</sub>	5	0.5	multiple	0.65	24	20 000	2.6
3	PCL-g-PEG <sub>1.15</sub>	10	1	multiple	1.15	45	20 000	1.8
4	PCL-g-PEG <sub>1.10</sub>	10	5	multiple	1.1	44	24 500	3.0
5	PCL-g-PEG <sub>1.30</sub>	15	1	multiple	1.3	47	18 000	1.8

- **Self-assembly behavior of amphiphilic graft copolymers**

The hydrophilic/hydrophobic balance has a significant effect on the self-assemblies that can be obtained. Being able to control the EG/CL ratio by thiol-yne coupling, we therefore used PCL-*g*-PEG copolymers to form various nanoaggregates. As illustration, we chose to use a hydrophilic PCL-*g*-PEG<sub>1.15</sub> (Table II-4 1, entry 3) to form micelles and to prepare an additional more hydrophobic PCL-*g*-PEG with EG/CL = 0.10 to generate nanospheres.

PCL-*g*-PEG<sub>0.10</sub> ( $\overline{M}_n = 24000$  g/mol  $\overline{D} = 1.9$ ) was synthesized using 2 eq. of PEG-SH and a single addition of DMPA (0.5 eq.), all other conditions being the same as the one previously used. Nanospheres were prepared by the nanoprecipitation method. PCL-*g*-PEG<sub>0.10</sub> might be seen as a block or a single branched copolymer as the EG/CL ratio of 0.1 roughly corresponds to one PEG<sub>750</sub> side chain per PCL backbone. The nanospheres obtained were characterized by DLS and hydrodynamic diameter  $D_H = 55$  nm was found with PDI = 0.32 (Figure II-4 3).



**Figure II-4 3 :** DLS spectra of self-assembling nanospheres obtained from PCL-*g*-PEG<sub>0.10</sub> (plain line) and micelles obtained from PCL-*g*-PEG<sub>1.15</sub> (dashed line).

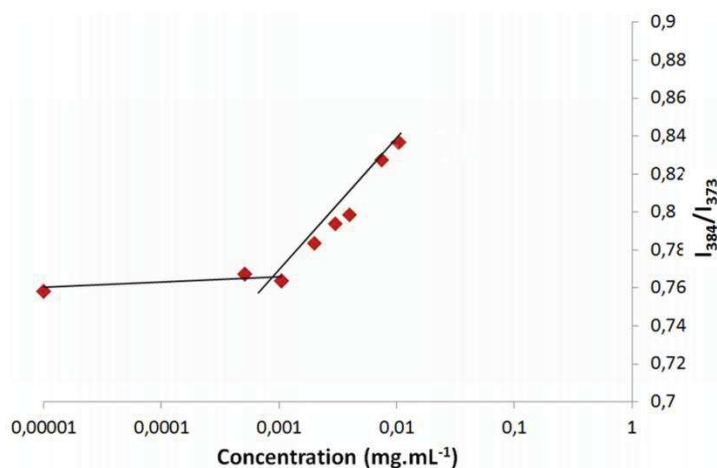
Besides nanospheres, micelles were prepared from the copolymer PCL-*g*-PEG<sub>1.15</sub> that might be seen as a PCL backbone grafted with an average of 10 PEG<sub>750</sub> segments. With a ratio EG/CL = 1.15 the direct dissolution method could not be used to induce self-assembly of the copolymers into micellar aggregates. Co-dissolution in acetone/water mixture followed by acetone removal was used to produce the polymer micelles.

Formation of micellar aggregates was first investigated by measuring the critical aggregation concentration (CAC) using fluorescence spectroscopy. Fluorimetry was achieved in emission

with an excitation wavelength at  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm using pyrene as a fluorescent probe. The intensities of emission peaks at  $\lambda_{\text{em}} = 373$  and 384 nm, denoted  $I_{373}$  and  $I_{384}$  respectively, were chosen as they are related to the polarity of the microenvironment in which pyrene was dissolved. Pyrene will preferentially partition into hydrophobic microdomains with a concurrent change in the molecule's photophysical properties. In the emission spectra a sharp rise in intensity ratio of peaks at 373 and 384 nm of pyrene indicates the on-set of aggregation (CAC) of copolymers (ESI, Figure II-4 S4). Figure II-4 4 shows the plot of the  $I_{384}/I_{373}$  intensity ratio against the copolymer concentration that was used for CAC calculation. The CAC value was determined from the intersection of the best-fit lines, which corresponded to the minimum polymer concentration required for formation of aggregates in the aqueous medium. The CAC value of the PCL-*g*-PEG<sub>1.15</sub> copolymer was found equal to 1 mg/L (*ca.*  $4 \times 10^{-8}$  M) confirming the stability of the self-assembled micelles in aqueous solution. It is generally recognized that graft copolymers have low CMC because of the side chains reducing their mobility. Additionally, the relatively high dispersity of our copolymers ( $\bar{D} = 1.8$ ) might also explain this low CAC as it has been demonstrated that for block copolymers the CMC is dependent on the dispersity, with lower CMC for higher  $\bar{D}$ .<sup>16</sup>

Size distribution of micelles in water was determined by DLS. Figure II-4 3 shows the monodisperse distribution of the hydrodynamic diameter of the micelles with a mean hydrodynamic diameter  $D_{\text{H}} = 32$  nm and PDI = 0.24. These values are in good agreement with previous studies on PCL-*g*-PEG copolymers. For example Zhang et al. reported on PCL<sub>10k</sub>-*g*-PEG<sub>1k</sub> copolymers ( $\overline{Mn} = 10100$  g/mol  $\bar{D} = 1.6$ ) with a similar ratio EG/CL = 1.1 that formed micellar aggregates with  $D_{\text{H}} = 40$  nm and PDI = 0.28 above a CAC = 1.8 mg/L.<sup>31</sup> For comparison, PCL-*b*-PEG-*b*-PCL triblock copolymers with close ratio EOG/CL = 0.94 had  $D_{\text{H}} = 47$  nm with higher CAC = 11 mg/L whereas PCL-*b*-PEG diblock copolymer with EG/CL = 1.2 had a reported CAC of  $1 \times 10^{-7}$  M (*ca.* 1.3 mg/L).<sup>48</sup>





**Figure II-4 4 :** Plot of the intensity ratios ( $I_{384}/I_{373}$  from pyrene emission spectra) as a function of concentration for self-assembling micelles in aqueous media from PCL-*g*-PEG<sub>1,15</sub>.

This confirms that the self-assembly behavior of PCL-PEG copolymer is influenced not only by the hydrophobic–hydrophilic weight fraction but also by the macromolecular architecture.<sup>49</sup> Architecture influences the CAC, but also the morphology of the aggregates. For example, it has been shown in literature that PCL-*b*-PEG diblock copolymers with low hydrophilic weight fraction prefer to form complex morphologies such as vesicle, cylindrical, and wormlike. PCL-*b*-PEG diblock copolymers with a PEG weight fraction of 30% (*ie.* the same as the one calculated for our PCL-*g*-PEG<sub>1,15</sub>) were reported to form short cylindrical micelles,<sup>50</sup> whereas spherical micelles are obtained with the PCL-*g*-PEG graft copolymers of the present work and of Zhang’s *et al.*<sup>31</sup>

Finally, destabilization of the formed micellar aggregates was evaluated upon dilution of a micellar solution below CAC. In that case, no disappearance of micelles was observed which tends to demonstrate that the self-assemblies are not dynamic and that so-called frozen micelles have been formed. This is in agreement with literature where it has been reported that, in opposition to small surfactants, the aggregates formed by copolymers are often not dynamic. The absence of copolymer chains exchange between the aggregates is responsible for this frozen state. In our case, this frozen state can be due to the crystallinity of the PCL core that physically blocks the copolymer chains in the aggregates. Frozen state can also be due to a very slow rate of exchange (kinetically frozen aggregates) that can be slowed down by the length of the hydrophobic PCL core, or the graft architecture.<sup>51</sup>

- **Curcumin loaded PCL-g-PEG micelles**

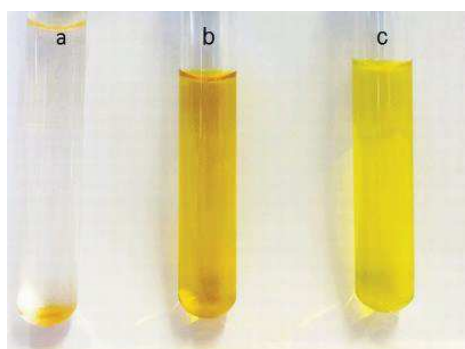
The development of suitable drug delivery systems for insoluble drugs represents a major focus for pharmaceutical research and nanotechnology. Beside improved solubility, drug delivery systems can provide protection to the drug and thus increase its stability, while decreasing its associated side-effects. Micelles formed by PCL-g-PEG<sub>1.15</sub> have therefore been evaluated for drug encapsulation of an unstable drug, namely curcumin. Curcumin is extracted from the plant *Curcuma Longa* and has demonstrated many pharmacological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, chemo-preventive and anti-proliferative activities against a variety of cancers. However, the major disadvantages of curcumin are its low bioavailability, due to its poor aqueous solubility (11 ng/ml), and its poor stability.<sup>38, 52</sup> Curcumin loaded micelles were prepared like blank micelles. The only difference was that curcumin was co-dissolved in acetone with the copolymer. Process parameters were optimized to increase the drug loading (DL) and encapsulation efficiency (EE). In that frame, the curcumin/copolymer ratios and the stirring rate were investigated (Table II-4 2).

**Table II-4 2 :** Encapsulation efficiency and drug loading for curcumin loaded PCL-g-PEG<sub>15</sub> micelles as a function of curcumin/polymer ratio and stirring.

Entry	Type of copolymer	Curcumin/ polymer (g:g)	Stirring conditions (rpm)	EE (wt%)	DL (wt%)
1	PCL-g-PEG <sub>1.15</sub>	1 : 5	Magnetic (1000 rpm)	11	4.8
2	PCL-g-PEG <sub>1.15</sub>	1 : 5	Ultra-Turrax (8000 rpm)	55	10.2
3	PCL-g-PEG <sub>1.15</sub>	1 : 7	Ultra-Turrax (8000 rpm)	92	12.1

Magnetic stirring was less efficient to load micelles (low EE = 11 wt% and DL = 4.8 wt%). These values were greatly enhanced by stirring with Ultra-Turrax (EE = 55 wt% and DL = 10.2 wt%). This is clearly visible in Figures II-4 5b and II-4 5c with a stronger yellow color obtained in the latter case compared to magnetic stirring. It is also important to note that in the absence of copolymer curcumin was totally insoluble as shown in Figure II-4 5a where precipitated curcumin is visible at the bottom of the test tube while no coloration of the solution appeared. Final improvement was obtained by changing the initial curcumin/copolymer ratio from 1:5 to 1:7. Under these conditions, near quantitative

encapsulation was obtained (EE = 92 wt% and DL = 12.1 wt%). The influence of drug loading on the micelles size was evaluated by DLS analysis. Encapsulation of curcumin in the core of the micelles led to a small size increase from  $D_H = 32$  nm for the blank micelles to  $D_H = 40$  nm for the loaded micelles. TEM pictures (ESI, Figure II-4 S5) confirmed the spherical shape of the curcumin-loaded micelles. For comparison, data of the literature with diblock or triblock PCL/PEG copolymers with the same ratio EG/CL are provided as supporting information (ESI Table II-4 S2). The results confirm the superiority of the graft copolymer compared to the block copolymers that led to limited EE = 77 wt% and DL = 9.6 wt% (ESI Table II-4 S2). In all cases EE and DL are lower than in our graft copolymers with EE and DL in the order PCL-*g*-PEG > PCL-*b*-PEG-*b*-PCL > PCL-*b*-PEG. The compaction of the resulting self-assemblies is probably responsible for this result with an expected more compact PCL core with graft copolymers compared to the di- and triblock copolymers counterparts.

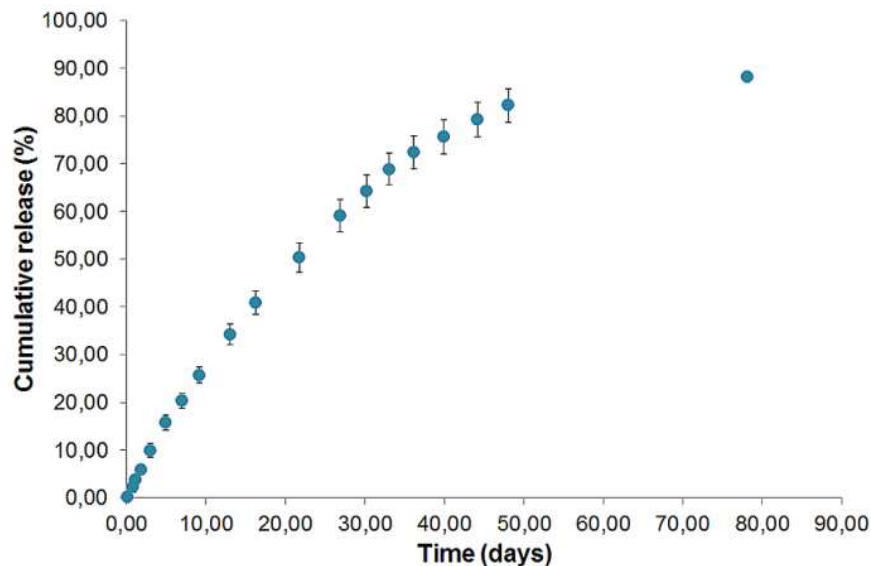


**Figure II-4 5 :** Visual aspect of curcumin solutions (a) without copolymer, (b) within PCL-*g*-PEG micelles using conditions (b) Ultra-Turrax stirring (Table II-4 2 entry 2) or (c) magnetic stirring (Table II-4 2 entry 1).

Finally, *in vitro* curcumin release was evaluated in PBS (pH = 7.4) at 37°C. As classically described in literature, low amounts of Tween 80 (0.1%w/v) were used to allow the solubilization of the released curcumin in PBS. In a first assay (data not shown), only 18% of curcumin were released after 16 days and no further release was then detected by UV-VIS analysis. This was due to the degradation of curcumin. As a consequence of its poor stability, once released from the micelles, curcumin was indeed rapidly degraded in the release medium, thus making analysis impossible for the longer time points. To overcome this limitation, various solutions have been proposed in literature including pH lowering, or

addition of glutathione, N-acetyl-L-cysteine or ascorbic acid.<sup>38</sup> This last option was retained and ascorbic acid was added to the release medium at a concentration of 0.6 wt%.

Under these conditions, the stability of curcumin in the release medium was dramatically improved, thus allowing detection of the released drug over the all assay. Typical UV-visible absorption spectra recorded during the release study are provided as supplementary data (ESI, Figure II-4 S6), and typical release profile is shown in Figure II-4 6. Curcumin release from the PCL-*b*-PEG<sub>1,1</sub> micelles was very slow over an 80 days period of time and without burst effect. Noteworthy is the almost complete release with up to 90% of initial curcumin being released, which proves that curcumin was efficiently protected from degradation in the micelles. This is remarkable as most studies related to curcumin encapsulation report on much faster kinetics and by far incomplete releases. Typically reported curcumin releases show a plateau at ca. 60% which is reached within 1 day to 12 days.<sup>35-37, 53</sup> We believe that this difference can be ascribed to the graft architecture of our copolymer that yields to frozen micelles with a more compact and probably crystallized PCL core. The higher molecular weight of the copolymer compared to the reported systems might also be responsible for this behavior. As a result the release obtained with the PCL-*g*-PEG<sub>1,15</sub> frozen micelles is more similar to the one expected with PCL nanospheres.



**Figure II-4 6 :** Cumulative curcumin release from PCL-*g*-PEG<sub>1,15</sub> micelles (PBS, pH = 7.4, Tween 80 0.1%w/v; ascorbic acid 0.6wt%). Data are expressed as means  $\pm$  SD and correspond to measurements in triplicate.

#### 4.5. Conclusion

A straightforward method for the synthesis of PCL-g-PEG copolymers has been reported. Using a combination of post-polymerization anionic chemical modification of PCL and thiol-yne photochemistry, a family of copolymers with controlled EG/CL ratios ranging from 0.1 to 1.3 was prepared. The chosen thiol-yne coupling approach, although suffering from a yield limited to 50% for the sterically hindered PEG<sub>750</sub>, presents many advantages that make it a tool of choice for post-polymerization modification of PCL. Indeed, thiol-yne “click” grafting allows control of the composition, does not require metals, which is of benefit for medical use, and is fast compared to thermal reactions, which is of benefit to preserve the integrity of the degradable polymeric chains. Advantageously, this simple approach also offered opportunities for self-assemblies of nanospheres or micelles. The potential of PCL-g-PEG for drug encapsulation was demonstrated with curcumin. A slow but quasi-quantitative release was obtained, while efficient protection of the drug, higher encapsulation efficiency and higher drug loading than their linear counterparts were observed. We thus believe that the ease of PCL-g-PEG synthesis combined to the promising results shown with regard to drug delivery can offer opportunities in the field of encapsulation. Further study of drug encapsulation and anticancer activity based on these novel PCL-g-PEG copolymers are underway and will be reported in due course.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank the Azm & Saade Association for Assala Al Samad’s fellowship, Stéphane Dejean for <sup>1</sup>H NMR analyses and Aurélien Lebrun of the Laboratoire de mesures physiques (LMP)-University Montpellier 2 for DOSY NMR analyses.

#### 4.6. References

- 1 C. Timpe, *Am .Pharm. Rev.*, 2007, **3**, 104-109.
- 2 Y. Shi, W. Porter, T. Merdan and L. C. Li, *Expert Opin.Drug Del.*, 2009, **6**, 1261-1282.
- 3 Z. S. Ge and S. Y. Liu, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 7289-7325.
- 4 G. S. Kwon and K. Kataoka, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2012, **64**, 237-245.
- 5 H. Otsuka, Y. Nagasaki and K. Kataoka, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2012, **64**, 246-255.
- 6 Y. Wang and S. M. Grayson, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2012, **64**, 852-865.
- 7 K. Avgoustakis, *Curr. Drug Deliv.* 2004, **1**, 321-333
- 8 G. Gaucher, R. H. Marchessault and J. C. Leroux, *J. Control. Release*, 2010, **143**, 2-12.

- 9 J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz and P. Couvreur, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 1147-1235.
- 10 X. W. Wei, C. Y. Gong, M. Y. Gou, S. Z. Fu, Q. F. Guo, S. Shi, F. Luo, G. Guo, L. Y. Qiu and Z. Y. Qian, *Int. J. Pharm.*, 2009, **381**, 1-18.
- 11 R. Z. Xiao, Z. W. Zeng, G. L. Zhou, J. J. Wang, F. Z. Li and A. M. Wang, *Int. J. Nanomed.*, 2010, **5**, 1057-1065.
- 12 B. Nottelet, C. Di Tommaso, K. Mondon, R. Gurny and M. Moller, *J. Polym. Sci.-Pol. Chem.*, 2010, **48**, 3244-3254.
- 13 B. Nottelet, M. Vert and J. Coudane, *Macromol. Rapid Comm.*, 2008, **29**, 743-750.
- 14 C. Hoskins, P. K. Thoo-Lin and W. P. Cheng, *Ther. Deliver.*, 2012, **3**, 59-79
- 15 J. Logie, S. C. Owen, C. K. McLaughlin and M. S. Shoichet, *Chem. Mater.*, 2014, **26**, 2847-2855.
- 16 Z. S. Gao and A. Eisenberg, *Macromolecules*, 1993, **26**, 7353-7360.
- 17 C. L. Lo, C. K. Huang, K. M. Lin and G. H. Hsiue, *Biomaterials*, 2007, **28**, 1225-1235.
- 18 X. W. Jiang, M. R. Smith and G. L. Baker, *Macromolecules*, 2008, **41**, 318-324.
- 19 J. Rieger, P. Dubois, R. Jerome and C. Jerome, *Langmuir*, 2006, **22**, 7471-7479.
- 20 R. J. Williams, R. K. O'Reilly and A. P. Dove, *Polym. Chem.*, 2012, **3**, 2156-2164.
- 21 D. E. Borchmann, N. ten Brummelhuis and M. Weck, *Macromolecules*, 2013, **46**, 4426-4431.
- 22 F. Coumes, V. Darcos, D. Domurado, S. M. Li and J. Coudane, *Polym. Chem.*, 2013, **4**, 3705-3713.
- 23 V. Darcos, S. Antoniacomi, C. Paniagua and J. Coudane, *Polym. Chem.*, 2012, **3**, 362-368.
- 24 S. El Habnoui, B. Nottelet, V. Darcos, B. Porsio, L. Lemaire, F. Franconi, X. Garric and J. Coudane, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 3626-3634.
- 25 X. Jiang, E. B. Vogel, M. R. Smith and G. L. Baker, *Macromolecules*, 2008, **41**, 1937-1944.
- 26 S. Onbulak, S. Tempelaar, R. J. Pounder, O. Gok, R. Sanyal, A. P. Dove and A. Sanyal, *Macromolecules*, 2012, **45**, 1715-1722.
- 27 B. Parrish, R. B. Breitenkamp and T. Emrick, *J Am Chem Soc*, 2005, **127**, 7404-7410.
- 28 Y. Yu, J. Zou, L. Yu, W. Jo, Y. K. Li, W. C. Law and C. Cheng, *Macromolecules*, 2011, **44**, 4793-4800.
- 29 H. Y. Li, R. Riva, R. Jerome and P. Lecomte, *Macromolecules*, 2007, **40**, 824-831.
- 30 R. Riva, P. Schmeits, F. Stoffelbach, C. Jerome, R. Jerome and P. Lecomte, *Chem. Commun.*, 2005, 5334-5336.
- 31 K. Zhang, Y. Wang, W. P. Zhu, X. D. Li and Z. Q. Shen, *J. Polym. Sci.-Pol. Chem.*, 2012, **50**, 2045-2052.
- 32 J. Coudane, E. Laurent and M. Vert, *Macromol. Rapid Comm.*, 2004, **25**, 1865-1869.
- 33 S. Ponsart, J. Coudane, J. McGrath and M. Vert, *J. Bioact. Compat. Pol.*, 2002, **17**, 417-432.
- 34 A. Leroy, A. Al Samad, X. Garric, S. Hunger, D. Noel, J. Coudane and B. Nottelet, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 32017-32023.
- 35 X. Gao, F. J. Zheng, G. Guo, X. X. Liu, R. R. Fan, Z. Y. Qian, N. Huang and Y. Q. Wei, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 5778-5790.
- 36 L. Liu, L. Sun, Q. Wu, W. Guo, L. Li, Y. Chen, Y. Li, C. Y. Gong, Z. Qian and Y. Q. Wei, *Int. J. Pharm.*, 2013, **443**, 175-182.
- 37 H. Danafar, K. Rostamizadeh, S. Davaran and M. Hamidi, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 2014, **40**, 1411-1420.

- 38 Y. J. Wang, M. H. Pan, A. L. Cheng, L. I. Lin, Y. S. Ho, C. Y. Hsieh and J. K. Lin, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 1997, **15**, 1867-1876.
- 39 B. Nottelet, G. Tambutet, Y. Bakkour and J. Coudane, *Polym. Chem.*, 2012, **3**, 2956-2963.
- 40 S. Ponsart, J. Coudane and M. Vert, *Biomacromolecules*, 2000, **1**, 275-281.
- 41 V. Darcos, S. El Habnoui, B. Nottelet, A. El Ghzaoui and J. Coudane, *Polym. Chem.*, 2010, **1**, 280-282.
- 42 M. Bednarek, *React. Funct. Polym.*, 2013, **73**, 1130-1136.
- 43 T. Cai, M. Li, K. G. Neoh and E. T. Kang, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 16248-16258.
- 44 M. R. Molla and S. Ghosh, *Macromolecules*, 2012, **45**, 8561-8570.
- 45 C. Sardo, B. Nottelet, D. Triolo, G. Giammona, X. Garric, J. P. Lavigne, G. Cavallaro and J. Coudane, *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 4351-4362.
- 46 Z. H. Zhang, L. C. Yin, Y. X. Xu, R. Tong, Y. B. Lu, J. Ren and J. J. Cheng, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 3456-3462.
- 47 B. D. Fairbanks, E. A. Sims, K. S. Anseth and C. N. Bowman, *Macromolecules*, 2010, **43**, 4113-4119.
- 48 a) B. Xu, J. Yuan, T. Ding, Q. Gao, *Polym. Bull.*, 2010, **64**, 537-551 ; b) D. Attwooda, C. Booth, S. Yeates, C. Chaibundit, N. Ricardo, *Int. J. Pharm.*, 2007, **345**, 35-41.
- 49 L. S. Zhang, J. P. Lin and S. L. Lin, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 9209-9217.
- 50 Z. X. Du, J. T. Xu and Z. Q. Fan, *Macromol. Rapid Comm.*, 2008, **29**, 467-471.
- 51 T. Nicolai, O. Colombani and C. Chassenieux, *Soft Matter*, 2010, **6**, 3111-3118.
- 52 Z. M. Song, R. L. Feng, M. Sun, C. Y. Guo, Y. Gao, L. B. Li and G. X. Zhai, *J. Colloid Interf. Sci.*, 2011, **354**, 116-123.
- 53 R. L. Feng, Z. M. Song and G. X. Zhai, *Int. J. Nanomed.*, 2012, **7**, 4089-4098.



#### 4.7. Supplementary data

### From nanospheres to micelles: simple control of PCL-g-PEG copolymers amphiphilicity through thiol-yne photografting.

Assala Al Samad<sup>1,2</sup>, Youssef Bakkour<sup>2</sup>, Coumes Fanny<sup>1</sup>, Fawaz El Omar<sup>2</sup>, Jean Coudane<sup>1</sup>, Benjamin Nottelet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomolecules Max Mousseron (IBMM - CNRS UMR 5247), Department of Artificial Biopolymers - Université Montpellier I, Université Montpellier 2, ENSCM - France

<sup>2</sup>Laboratory of Applied Chemistry, Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Lebanon

\* [benjamin.nottelet@univ-montpl.fr](mailto:benjamin.nottelet@univ-montpl.fr)

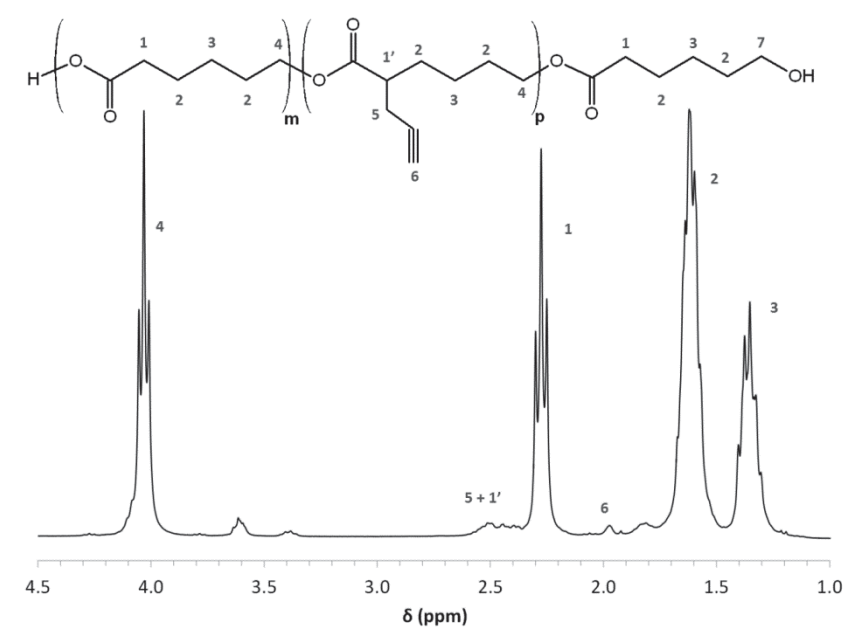


Figure II-4 S 1 : <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectrum of propargylated PCL (PCL-yne).



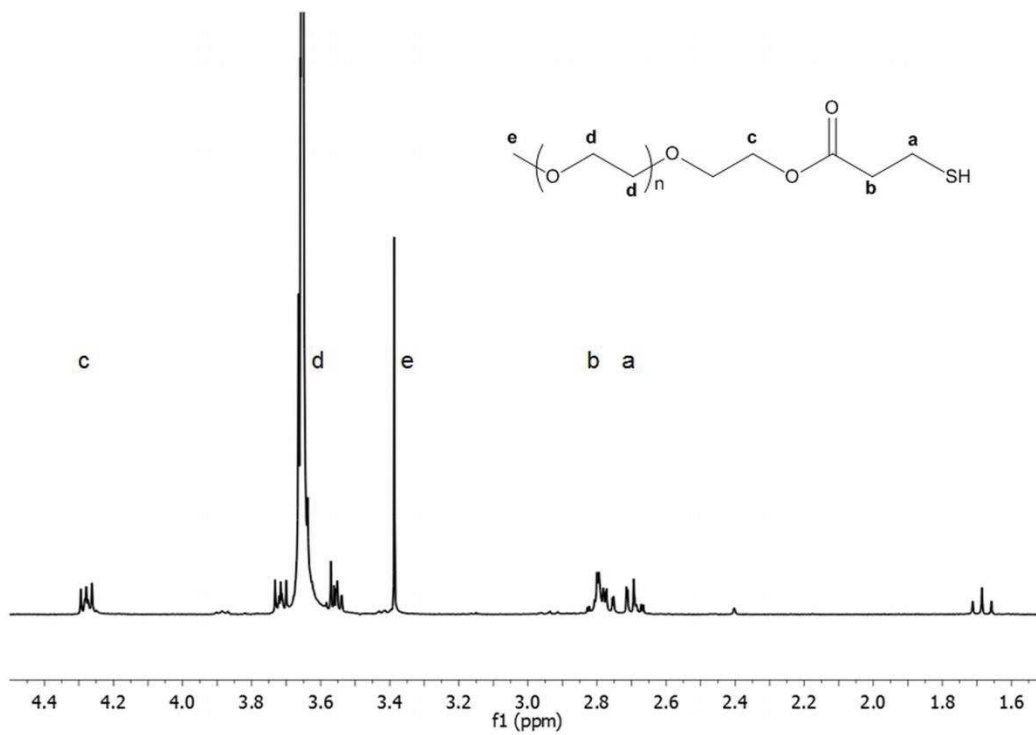


Figure II-4 S 2 : <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectrum of thiolated-PEG (PEG-SH).

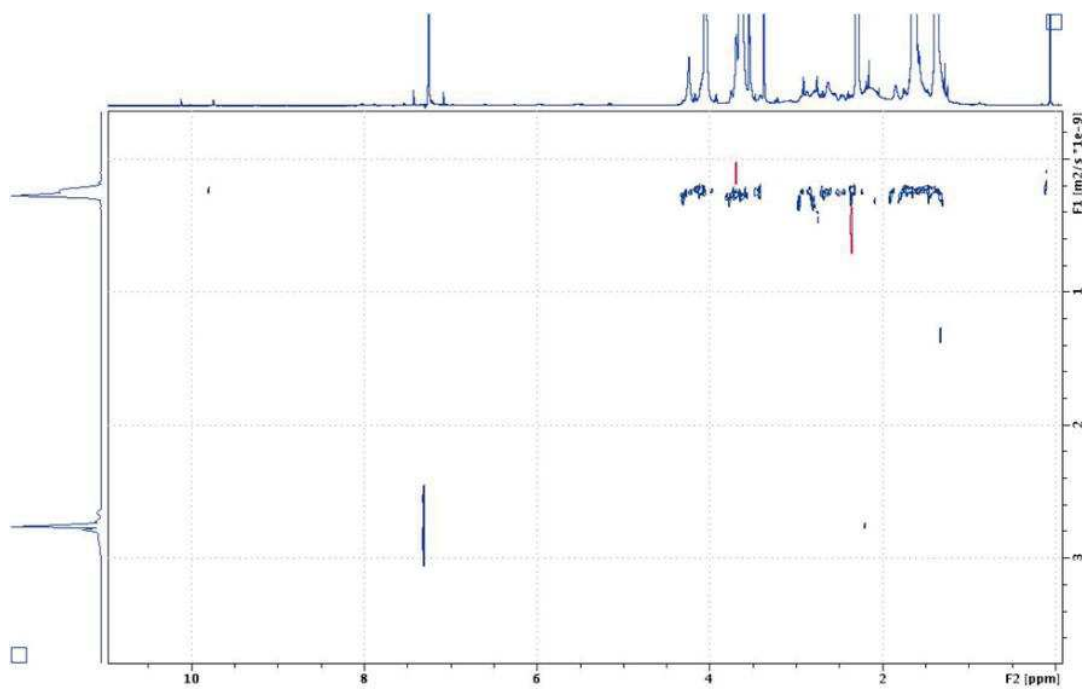
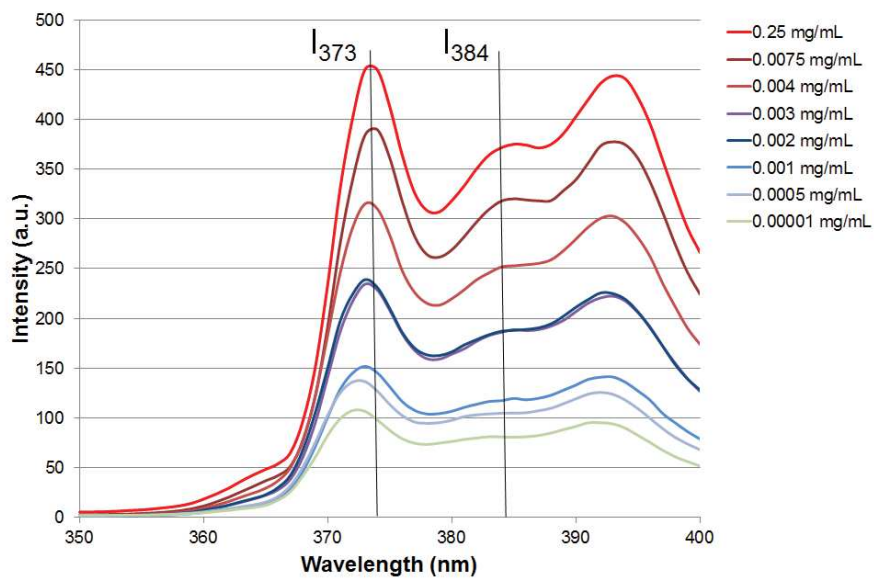
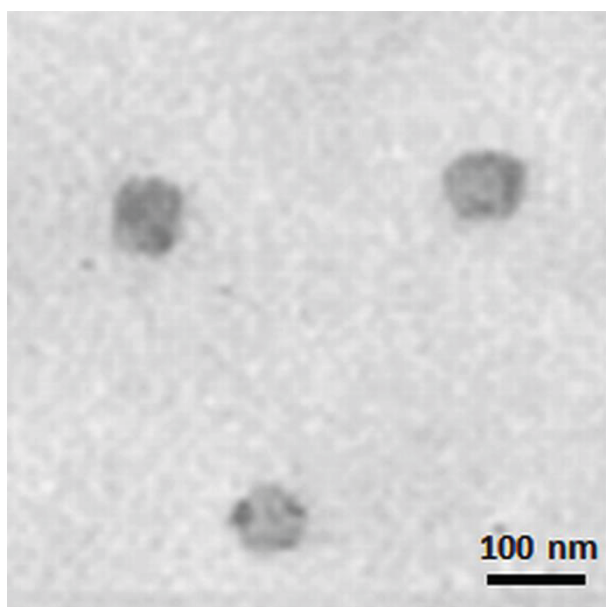


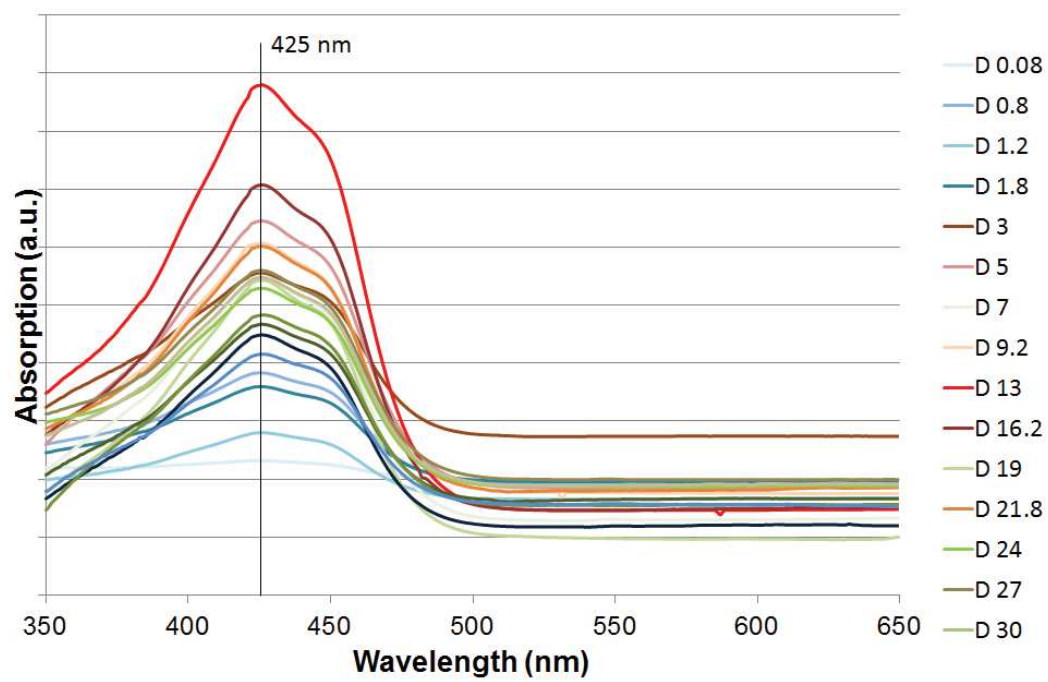
Figure II-4 S 3 : DOSY NMR spectrum of PCL-g-PEG<sub>1.15</sub> in DMSO-d<sub>6</sub>.



**Figure II-4 S 4 :** Emission spectra at  $\lambda_{ex} = 340$  nm of pyrene in aqueous solutions of various concentrations of PCL-g-PEG<sub>1.15</sub>.



**Figure II-4 S 5 :** TEM picture of curcumin loaded PCL-g-PEG<sub>1.15</sub> micelles.



**Figure II-4 S 6 :** Typical UV-visible spectra of curcumin in the release medium as a function of the time (D corresponds to days)

**Table II-4 S 1 :** Thiol-yne coupling of benzyl mercaptan on PCL-yne (7% alkyne groups) in THF, UV activation, 2h, RT, photoinitiator DMPA (0.5 eq).

Entry	Benzyl mercaptan	number of BM groups grafted per alkyne	Special conditions	Mn	(Đ)
1	20 eq.	1.5	/	18000	2.6
2	10 eq.	1.5	/	24000	3.5
3	5 eq.	1.3	/	29000	3.8
4	10 eq.	1.5	Quartz cuvette	19000	5.1
5	10 eq.	1.5	successive addition of DMPA & SH	15000	2.0
6	10 eq.	1.5	successive addition of PCL & DMPA	22000	2.8

**Table II-4 S 2 :** Comparison of encapsulation efficiencies and drug loadings for various PCL/PEG macromolecular architectures.

Entry	Type of copolymer	MW PCL (kg/mol)	MW PEG (kg/mol)	Curcumin/ polymer (wt:wt)	EE (wt%)	DL (wt%)	Ref
1	PCL- <i>g</i> -PEG <sub>1.15</sub>	22	0.75	1 : 7	92	12.1	this work
2	PCL- <i>b</i> -PEG <sub>1.3</sub> <sup>*</sup>	4.8	2.4	1 : 7	53	6.6	[1]
3	PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL <sub>1.2</sub>	5	6	1 : 7	77	9.6	[2]

<sup>\*</sup> PCL-*b*-PEG<sub>1.3</sub> with linolenic PEG chain-end moiety.

[1] Z. Song, W. Zhu, N. Liu, F. Yang, R. Feng, Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery, Int J Pharm, 471 (2014) 312–321

[2] R.L. Feng, Z.M. Song, G.X. Zhai, Preparation and in vivo pharmacokinetics of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticles, *Int J Nanomed*, 7 (2012) 4089-4098.

**CHAPITRE III**  
**COPOLYMERES PCL-g-PEG EN TANT QUE**  
**SYSTEMES DE LIBERATIONS DE PA : SYSTEMES**  
**PASSIFS, SYSTEMES ACTIFS OU SYSTEMES**  
**STIMULABLES**

---

Ce chapitre est divisé en trois parties. La première est présentée sous forme d'un projet d'article qui discute le développement de conditions de réaction photochimique thiol-yne afin de former des nanoobjets hydrophiles adaptés pour des applications biologiques dans le transport de PA.

La deuxième partie, sous forme d'article également, concerne la synthèse de systèmes de délivrance de médicaments de troisième génération : un copolymère amphiphile de ciblage (PCL-g-PEG-cRGD) et un copolymère amphiphile enzymo-répondant (PCL-g-MMPcp-PEG). Ces deux copolymères seront l'objet d'une étude biologique sur des cellules cancéreuses et non cancéreuses.

Pour clore ce chapitre, on présentera la modification anionique et photochimique de copolymères à structure étoile à huit branches sPEG-g-PCL<sub>8</sub>. Ces copolymères seront modifiés par des benzyl-mercaptans avec trois objectifs basés sur l'effet de  $\Pi$  stacking : i) renforcer la stabilité des micelles formées, ii) améliorer le taux d'incorporation de principes actifs porteurs de groupes aromatiques et iii) diminuer la vitesse de libération de ces PA.

## ***1. Introduction sur la modulation de l'amphiphilie des copolymères greffés PCL-g-PEG : Effets sur la formation de micelles, l'encapsulation de PA et la cytotoxicité cellulaire***

### **Introduction**

Après avoir détaillé dans l'article précédent la possibilité d'obtenir par voie thiol-yne des copolymères PCL-g-PEG avec des rapports EG/CL compris entre 0,1 et 1,2, nous nous intéressons ici à l'optimisation des paramètres d'activation photochimique de façon à augmenter l'hydrophilie des copolymères PCL-g-PEG. L'influence de l'hydrophilie sur le potentiel thérapeutique de ces systèmes de deuxième génération dans le cadre de traitements oncologiques est évaluée à travers des essais de cytotoxicité sur des lignées de cellules cancéreuses.

### **Synthèse et caractérisation de copolymères PCL-g-PEG à amphiphilie contrôlée**

L'activation photochimique thiol-yne a été faite en accord avec nos travaux précédents par couplage entre la PCL-Pg et le PEG<sub>2000</sub>-SH. L'augmentation de rapport EG/CL a été favorisée

par l'augmentation de i) la concentration de milieu réactionnel, ii) la Mw et la quantité de PEG, iii) la quantité de photoamorceur utilisée (DMPA). Les rapports EG/CL ainsi obtenus sont compris entre 1,9 et 5,4.

L'autoassemblage des copolymères en nanoobjets a été vérifié par analyse fluorométrique et leurs tailles sont mesurées par DLS. Comme attendu, les tailles augmentent avec l'augmentation de l'hydrophilie des systèmes mais restent toujours inférieurs à 75 nm. Concernant les CAC, elles ne sont pas seulement affectées par l'hydrophilie, mais aussi par la densité de greffage. En comparant les copolymères ayant la même longueur de chaînes PEG greffés (750 ou 2000) on trouve que la CAC augmente avec l'hydrophilie de système. Mais en comparant les deux copolymères PCL-g-PEG<sub>0,7K<sub>1,9</sub></sub> (CAC : 3,5 mg/L ; 21 chaînes PEG par PCL) et PCL-g-PEG<sub>2K<sub>2,3</sub></sub> (CAC : 2,6 mg/L ; 9,5 chaînes PEG par PCL), on trouve que la CAC est plus faible pour la PCL la moins substituée, malgré une hydrophilie légèrement plus importante. En comparant deux copolymères d'hydrophilies comparables, l'un à blocs (PCL-*b*-PEG<sub>2,6</sub>) et l'autre greffé (PCL-g-PEG<sub>2,3</sub>), on trouve que la CAC du copolymère greffé (2,6 mg/L) est beaucoup plus faible que celle du copolymère à blocs (17 mg/L), montrant ainsi une meilleure stabilité de copolymères greffés par rapport à leurs analogues linéaires.

La stabilité des nanoobjets a été évaluée dans le PBS à 37°C. Deux copolymères ont été étudiés le PCL-g-PEG<sub>1,2</sub> et le PCL-g-PEG<sub>5,4</sub> et ils ont montré une dégradation lente qui commence par libération des chaînes latérales PEG. Cette dégradation a débuté plus tôt pour le copolymère le plus hydrophile.

### **Encapsulation et libération de PA**

Pour évaluer l'efficacité de la gamme de polymères obtenus en tant que transporteurs de PA, plusieurs PA ont été encapsulés. Des taux d'encapsulation faibles ont été obtenus pour le paclitaxel, l'ABT-199, l'elacridar et le dexaméthasone. Les taux d'encapsulation de la clofazimine et de la curcumine sont plus élevés. Pour cette raison, la curcumine a été sélectionnée pour la suite de l'étude incluant les essais d'encapsulation, de libération et l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* sur cellules cancéreuses.

La gamme de copolymères testés pour encapsuler la curcumine a des rapports EG/CL variant entre 1,2 et 5,4. Comme attendu, le taux d'encapsulation diminue avec l'augmentation d'hydrophilie des copolymères. En particulier, les EE diminuent de 92% à 58% et les DL diminuent de 12,1% à 8,2% en passant de EO/CL = 1,2 à EO/CL = 5,4. Contrairement à la



CAC, l'architecture des copolymères (blocs ou greffés) d'hydrophilies similaires n'a pas montré d'influence sur l'EE et le DL.

Comme lors de nos travaux précédents, la libération de curcumine est testée dans le PBS à 37°C. On a choisi de comparer les rapports EG/CL 1,9 ; 2,6 et 5,4 pour les copolymères greffés. Puisque la libération se fait d'habitude par diffusion ou par désintégration micellaire, une libération plus rapide pour le copolymère le plus hydrophile est attendue et confirmée par les résultats. En outre, les copolymères linéaires ayant le rapport EG/CL = 2,6 ont présenté le même profil de libération que leurs analogues greffés.

### **Cytotoxicité des copolymères PCL-g-PEG chargés en curcumine**

Les copolymères ont été testés sur lignées cellulaires cancéreuses MCF-7. Les nanoobjets blancs ont montré une absence de toxicité après incubation avec les cellules pendant 24h et 48h. Les nanoobjets chargés en curcumine ont montré une toxicité dans les mêmes conditions. Outre la teneur en curcumine, la toxicité est influencée par l'architecture et la composition des PCL-g-PEG. A forte concentration de curcumine (18µg/mL) tous les systèmes sont toxiques. A faible concentration (0,18µg/mL), les nanosystèmes à base de PCL-g-PEG<sub>0,7k<sub>1,9</sub></sub> ayant de courtes chaînes PEG (20 chaînes PEG<sub>750</sub>) sont plus toxiques que ceux à base de longues chaînes PEG (PCL-g-PEG<sub>2K<sub>3,2</sub></sub>: 20 chaînes PEG). Les nanoobjets formés de copolymères PCL-g-PEG<sub>2k<sub>3,2</sub></sub> (10 chaînes PEG) et PCL-g-PEG<sub>2k<sub>5,4</sub></sub> (20 chaînes PEG) présentent la même toxicité. Dans ce cas le caractère amphiphile n'a pas affecté la toxicité. L'hypothèse avancée pour expliquer ces résultats est que le copolymère à courtes chaînes PEG s'internalise mieux grâce à sa structure plus rigide. La toxicité semble ainsi favorisée par les chaînes PEG les plus courtes et par le caractère hydrophobe.

### **Conclusion**

La synthèse d'une gamme de copolymères greffés PCL-g-PEG à caractère amphiphile modifiable a été facilement contrôlée par l'activation photochimique thiol-yne. Ces copolymères s'auto-assemblent pour former des objets de faibles CAC et de faibles tailles compatibles avec l'application en tant que vecteurs de PA. L'encapsulation de plusieurs PA a été réalisée avec une efficacité plus grande pour la curcumine. Finalement, la cytotoxicité des nanovecteurs chargés en curcumine a été évaluée *in vitro*. Dans ce cadre, la longueur des chaînes PEG et l'hydrophobie sont apparues comme les principaux paramètres expliquant la forte cytotoxicité des vecteurs à base de PCL-g-PEG<sub>0,7k<sub>1,9</sub></sub>.

## *2. PCL-PEG graft copolymers with tunable amphiphilicity as efficient drug delivery systems*

Assala Al Samad,<sup>a,b</sup> Audrey Bethry,<sup>a</sup> Eva Koziolová,<sup>c</sup> Miloš Netopilík,<sup>c</sup> Tomáš Etrych,<sup>c</sup> Youssef Bakkour,<sup>b</sup> Jean Coudane,<sup>a</sup> Fawaz El Omar,<sup>b</sup> Benjamin Nottelet<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247 CNRS-Université Montpellier-ENSCM, Faculté de Pharmacie, 15, avenue Charles Flahault BP14491, 34093 Montpellier cedex 5, France

E-mail: benjamin.nottelet@umontpellier.fr

<sup>b</sup> Laboratory of Applied Chemistry, Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Lebanon

<sup>c</sup> Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i., Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic

## ***2.1. Abstract***

The development of flexible drug delivery systems that can be tuned as a function of the drug to be delivered and of the target disease is crucial in modern medicine. For this aim, novel amphiphilic poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*g*-poly(ethylene glycol) (PCL-*g*-PEG) with well controlled design were synthesized by thiol-yne photochemistry. The grafting density and copolymer amphiphilicity were easily controlled via the reaction parameters: concentration, reaction time, PEG length and molar ratio between PCL and PEG or photoinitiator in the reaction mixture. The self-assembling behavior of the copolymers was studied and a correlation between the composition of PCL-*g*-PEG and the nanoaggregate diameter sizes (28 to 73 nm) and critical aggregation concentration (1.1 to 4.3 mg/L) was found. The influence of copolymer amphiphilicity on the drug loading was evaluated with various drugs including anticancer drugs (paclitaxel, ABT-199), drugs to overcome multidrug resistance in cancer cells (curcumin, Elacridar), anti-inflammatory drug (dexamethasone) and antibacterial drug (clofazimine). Finally, the influence of amphiphilicity on curcumin release and toxicity towards MCF-7 cancer cell lines was studied. The impact of grafting density, PEG length and overall EG/CL ratio are discussed in detail. Curcumin loaded PCL-*g*-PEG with lower EG/CL ratios and shorter PEG chains showed higher toxicity compared to their more hydrophilic counterparts.

**Keywords:** graft poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethyleneglycol) copolymers; micelles; nanoparticles; drug delivery; curcumin; amphiphilicity.

## ***2.2. Introduction***

Amphiphilic copolymers self-assembling into micelles or nanoparticles play a key role in modern drug formulation strategies as a result of their capacity to protect and deliver drugs to the target site, *e.g.* tumors, with suitable pharmacokinetics.<sup>1, 2</sup> Drug loaded self-assemblies provide many advantages compared to low-molecular-weight drugs as they can reduce drug toxicity towards healthy tissues and increase the drug stability and the efficacy of drugs by changing the pharmacokinetics to more favorable one. Among amphiphilic copolymers, aliphatic polyester-based copolymers, in particular PEG-*b*-PLA and PEG-*b*-PLGA diblock copolymers, have been widely studied due to their degradability and biocompatibility.<sup>3, 4</sup>

After many years of extensive research and development, some have finally been introduced to the market like the PEG-PLA-based Genexol<sup>®5</sup> which paves the way for future products and confirms the potential of polyester-based drug delivery systems.

Among the synthetic polyesters, poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) is well-known for its biocompatibility, its slower hydrolytic degradation compared to PLA or PLGA, its ability to load drugs and its mechanical properties similar to classical polyolefins. These properties make it a valuable candidate for tissue engineering and medical devices.<sup>6,7</sup> However, the use of PCL is not limited to macroscopic systems and many examples of micro- or nanosystems for drug delivery, *i.e.* micelles and particles, are described in literature.<sup>8</sup> All kinds of macromolecular architectures based on PCL and PEG have been proposed from classical diblock copolymers, to triblock copolymers, dendrimer-derived, star or miktoarm architectures.<sup>9-13</sup> The variety of macromolecular architectures and compositions has proved the potential of these polymer systems for cancer therapy and the impact of PCL-PEG copolymer amphiphilicity on the formation and shape of self-assemblies,<sup>14, 15</sup> drug loading, formulation stability<sup>12, 16</sup> and cellular internalization<sup>17-19</sup> have been studied. It was also demonstrated that PCL-PEG copolymers could act as modulators of drug efflux transporter P-glycoprotein *in vitro*, and therefore they could be of beneficial to the problematic treatment of multidrug resistance (MDR) cancer tumors.<sup>20</sup>

In this context, graft copolymers are of particular interest, since their architecture allows an easy variation of the number of PEG chains along the polymer backbone and consequently of the resulting amphiphilicity. Graft copolymers also exhibit lower critical aggregation concentrations (CAC) compared to their linear analogs and they assemble into micelles with higher stability in serum and during freeze-drying process.<sup>21, 22, 23, 24</sup> As a consequence various polyester-g-PEG have been synthesized to date following either the “grafting through” or “grafting to” strategies. However, most of them are lactide- or glycolide-based polyesters,<sup>25-28</sup> whereas only very little has been reported on PCL. For example, the group of Jérôme *et al.* synthesized PCL-g-PEG via the “grafting to” process by reacting azido-CL and alkynyl end-capped PEG, by a CuAAC click chemistry approach.<sup>29, 30</sup> A similar approach was utilized by Zhang *et al.*<sup>31</sup> or by Parrish *et al.* with an  $\alpha$ -propargyl- $\delta$ -valerolactone.<sup>32</sup> A grafting through approach using a CL end-capped PEG that was copolymerized with CL was also proposed by Rieger *et al.*<sup>33</sup> The main problem of these methods is the use of functional lactones whose

synthesis is limited in terms of amount and whose polymerization can be problematic when high molecular weights are targeted. As a consequence, Coudane *et al.* proposed an alternative “grafting to” approach by using anionic post-polymerization modification of the carbonyl of a commercial PCL to graft chlorocarbonate PEG at the PCL  $\alpha$ -position.<sup>34, 35</sup> This one pot method is rapid and versatile, and the graft copolymer was easily prepared on a multigram scale. However, the grafting density influencing the self-assembly behavior is not well-controlled. To overcome this limitation we recently synthesized PCL-g-PEG, thanks to the combination of a scale-up friendly anionic post-polymerization modification of PCL and a subsequent grafting of PEG side chains via the fast and metal free photoradical thiol-yne reaction, which allowed an easy control of the copolymer amphiphilicity. The prepared PCL-g-PEG polymers with EG/CL ratios ranging from 0.1 to 1.3 formed nanoparticles and frozen micelles of different hydrodynamic diameters.<sup>36</sup>

Hydrophilicity of the previously prepared systems was however quite low, resulting in pegylated nanoparticles with low PEG density rather than micelle-like nanoaggregates, which may limit the release properties. In addition, the impact of the copolymer hydrophilic/hydrophobic balance on the ability to deliver various drugs was not investigated. Here, a family of micelles-forming PCL-g-PEG with higher and controlled hydrophilicities (EG/CL ratios ranging from 2 to 5.5) is synthesized and characterized. The impact of amphiphilicity on the loading of various poorly soluble drugs, including anticancer drugs (paclitaxel, ABT-199), multidrug resistance targeting drugs (curcumin, Elacridar), anti-inflammatory drug (dexamethasone) or antibacterial drug (clofazimine) is evaluated. Finally, impact of amphiphilicity on the curcumin release, and on the toxicity towards MCF-7 cancer cells is discussed.

### **2.3. Materials and Methods**

- **Materials**

PCL ( $M_n \approx 45 \text{ kg mol}^{-1}$ ), propargyl bromide (80 wt% in toluene), lithium diisopropylamide (LDA, 2 M in THF/heptane/ethylbenzene), 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA, >99%), p-toluenesulfonic acid (>99%),  $\epsilon$ -caprolactone ( $\epsilon$ -CL, >99%), PBS 1x, clofazimin and curcumin were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). Paclitaxel was obtained from LC Laboratories (Woburn, United States). ABT-199, dexamethasone and

elacridar were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic).  $\alpha$ -Methoxy, $\omega$ -hydroxyl poly(ethylene glycol) with  $M_n = 2000$  and  $M_n = 5000$  g/mol (PEG2k, PEG5k) were obtained from Sigma (St-Quentin Fallavier, France).  $\alpha$ -Methoxy, $\omega$ -hydroxyl poly(ethylene glycol) with  $M_n = 750$  g/mol (PEG0.7k) was obtained from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France). Ascorbic acid (purissimum grade) was obtained from Riedel-de Haen.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (>99%) was purchased from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France), technical grade  $\text{MgSO}_4$  from Carlo Erba (Val de Reuil, France), and methanol ( $\geq 99.8\%$ ), dichloromethane (DCM,  $\geq 99.9\%$ ), dimethylformamide (DMF,  $\geq 99.8\%$ ), toluene (puriss) and anhydrous tetrahydrofuran (THF,  $\geq 99.9\%$ ) from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). THF was dried using a Pure Solv Micro Single Unit (Inert®) system. Toluene and  $\epsilon$ -CL were distilled over  $\text{CaH}_2$  prior to use. Spectra/Por® dialysis tubes (cut-off, 6–8 kDa or 3.5 kDa) were obtained from Spectrum Labs. Amicon ultra centrifugal filter units (Ultra-15, 10 kDa) were purchased from Sigma Aldrich (Noisy-le-Grand, France).

- **Characterizations**

*NMR spectroscopy.*  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded at room temperature using an AMX300 Bruker spectrometer operating at 300 MHz. Deuterated chloroform and deuterated dimethyl sulfoxide were used as solvents, chemical shifts were expressed in ppm with respect to tetramethylsilane (TMS). Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) experiments were performed on a Bruker Avance III spectrometer operating at 600 MHz, using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO) as solvent.

*Size exclusion chromatography (SEC)* was performed on a Viscotek GPC-Max VE 2001 equipment fitted with a 2x30 cm long 5  $\mu\text{m}$  mixed C PLgel columns and coupled with VE 3580 RI detector and VE 3210 UV/Vis detector. The mobile phase was THF at 1 mL/min flow rate at 30°C. Typically, polymer (10 mg) was dissolved in THF (2 mL) and the resulting solution was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filter before injection of 20  $\mu\text{L}$  of filtered solution. The number average molecular weight ( $M_n$ ) and the dispersity ( $D$ ) of the polymers were expressed according to calibration using polystyrene standards.

*Fluorescence measurements and CAC determination.* The CAC of the copolymers was determined by fluorescence spectroscopy using pyrene as a hydrophobic fluorescent probe. Measurements were carried out on an RF 5302 Shimadzu spectrofluorometer (Japan) equipped with a Xenon light source (UXL-150S, Ushio, Japan). Briefly, an aliquot of pyrene

solution ( $6 \times 10^{-6}$  M in acetone, 1 mL) was added to different vials, and the solvent was evaporated. Then, 10 mL of aqueous solutions of different concentrations were added to the vials. The final concentration of pyrene in each vial was  $6 \times 10^{-7}$  M. After overnight equilibration at room temperature, the fluorescence excitation spectra of the solutions were recorded from 350 to 400 nm at an emission wavelength of 371 nm. The emission and excitation slit widths were 5 nm and 3 nm, respectively. The excitation fluorescence values at 333.5 and 336.5 nm were used for subsequent calculations. The CAC was determined from the intersection of linear regression lines of the  $I_{336.5}/I_{333.5}$  ratio versus polymer concentration plots.

*Light scattering measurements.* Dynamic light scattering (DLS) was carried out with a Malvern Instrument Nano-ZS equipped with a He–Ne laser ( $\lambda = 632.8$  nm). Polymer solutions at  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  were filtered through a  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  PTFE microfilter before measurements. The correlation function was analyzed via the general purpose method (NNLS) to obtain the distribution of diffusion coefficients ( $D$ ) of the solutes. The apparent equivalent hydrodynamic diameter ( $D_H$ ) was determined from the cumulant method using the Stokes–Einstein equation. Mean radius values were obtained from triplicate runs. Standard deviations were evaluated from hydrodynamic radius distribution.

*UV-spectrometry* was performed on a Perkin-Elmer Precisely Lambda 35 spectrometer, with 1 cm optical path quartz cuvettes.

- **Synthesis of PCL-g-PEG**

The PCL-yne/PEG-SH reactions were performed according to our previous work.<sup>36</sup> In typical experiment, PCL-yne (100 mg; 8% alkyne groups with respect to CL units,  $\overline{Mn} = 21300$  g/mol ;  $\overline{D} = 2.4$ ); and PEG2k-SH (820 mg; 6 eq. with respect to the alkyne group) were dissolved in DMF (10 mL) in a Schlenk flask (Table III-2 1, entry 2). DMPA (9 mg; 0.5 eq.) was dissolved in DMF in another Schlenk flask covered by aluminium foil. The 2 flasks were purged with nitrogen for 10 min before closing with septums. The thiol-yne reaction medium was irradiated for 2 hours under UV light ( $100 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ) and DMPA was added by successive additions (4 times) with a syringe at fixed intervals over the reaction time. The mixture was then concentrated under vacuum and centrifuged in water by centrifugal filter units 10 kDa. Centrifugation was repeated until full removal of unreacted PEG chains. The solution was lyophilized and the product was analyzed by SEC to assure the absence of free PEG.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = PCL backbone 4.0 (2H, CH<sub>2</sub>-O), 2.3 (2H, C(O)CH<sub>2</sub>), 1.6 (4H, C(O)CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.3 (2H, C(O)CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O); PEG side chains 4.2 (2H, CH<sub>2</sub>COO), 3.5 (4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.3 (3H, OCH<sub>3</sub>), 2.8 (2H, CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>), 2.6 (2H, COOCH<sub>2</sub>).

- **Synthesis of PCL-*b*-PEG**

PCL-*b*-PEG was synthesized according to classical procedures. PEG5k was used a macroinitiator for the ring opening polymerization of CL in anhydrous toluene in the presence of SnOct<sub>2</sub> as a catalyst (0.3 eq. with respect to PEG). Amounts of reactant were determined to yield the expected copolymer with EG/CL = 2.6, corresponding to blocks of 5000 g/mol for PEG and for PCL. ROP was carried out for 48 hours at 100°C and was stopped by addition of few drops of HCL 1N. The mixture was then concentrated under vacuum prior to precipitation in diethylether. The resulting solid is further dissolved in water and centrifuged in water by centrifugal filter units 10 kDa. Centrifugation was repeated until full removal of unreacted PEG chains. The solution was lyophilized and the product was analyzed by SEC to assure the absence of free PEG.

- **Preparation of nanoaggregates**

Blank and drug loaded PCL-*g*-PEG nanoaggregates were prepared by the self-assembly method according to our previous article.<sup>36</sup> Typically, drug (5 mg) and PCL-*g*-PEG (35 mg) were dissolved in 2 mL acetone. Then 5 mL of PBS were added. The mixture was stirred one hour using an Ultra-Turrax stirrer (8000 rpm). The remaining acetone was evaporated under vacuum. The solution was then centrifuged for 10 min at 3600 rpm and 20°C before filtration through a 0.45 μm filter to eliminate the unloaded drug.

- **Determination of drug loading and encapsulation efficiency**

Drug loading (DL) and encapsulation efficiency (EE) were determined by UV/Vis spectrophotometry at 425 nm for curcumin, 468 nm for clofazimine and 410 nm for elacridar. Quantification of curcumin and clofazimine was performed with respect to a calibration curve in acetone / water (20:80). Quantification of elacridar was done using a calibration curve in acetone / water (80:20). Loading of dexamethasone and ABT-199 were determined by high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu LC-20AD, Japan) instrument



equipped with a column (Chromolith® Performance RP-18) and autosampler (SIL-20AC HT). Fluorescence and PDA detector (RF10AXL and SPD-M10AVP) were used for detection of the drugs. A gradient elution was applied to detect the dexamethasone and the ABT-199, a linear gradient from 100% of a mixture (5% ACN (0.1% TFA) + 95% H<sub>2</sub>O (0.1% TFA)) till 100% of a mixture (95% ACN (0.1% TFA) + 5% H<sub>2</sub>O (0.1% TFA)) was used. Flow rate was set at 1 mL/min, detection wavelength was 240 nm for dexamethasone and 314 nm for ABT-199.

Quantification of paclitaxel (PTX) was done by HPLC (Waters™ 717plus Autosampler), equipped with C<sub>18</sub> column and a water 2998 photodiode array detector ( $\lambda_{\text{max PTX}} = 227 \text{ nm}$ ). The gradient elution applied was ACN/water: 50/50 for 2 min, then ACN/water: 75/25 until the 15<sup>th</sup> min at 1 mL/min flow rate. PTX was extracted from copolymers before injection in HPLC as follows: 1 mL of PTX-loaded copolymer solution was added to 5 mL of water: DMF (50:50). After centrifugation in Spectra/por® dialysis tubes (cut-off, 6–8 kDa), the solvent was evaporated and the PTX was dried under vacuum. PTX was dissolved in a precise volume of ACN and quantified by HPLC.

The DL content and EE were calculated based on the following formulae:

$$\text{DL (\%)} = 100 \times (M_D) / (M_P + M_D)$$

$$\text{EE (\%)} = 100 \times (M_D) / (M_{Di})$$

with  $M_D$  = mass of drug in nanoaggregates,  $M_P$  = mass of copolymer and  $M_{Di}$  = mass of drug initially added to prepare nanoaggregates.

- **Drug release kinetics**

The release of curcumin from PCL-g-PEG nanoaggregates was assessed in phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) containing 0.1% w/v Tween 80 and 0.015% w/v ascorbic acid at 37 °C under constant orbital shaking (100 rpm ; Heidolph Unimax 1010). Tween is classically used to provide water-solubility to curcumin in such assays.<sup>37-39</sup> Ascorbic acid is a biomolecule naturally present in plasma, which is used to enhance the stability and avoid the degradation of the released curcumin.<sup>40</sup> In a typical release study, 2 mL of Curcumin/PCL-g-PEG micellar solution were poured in a dialysis bag (cut-off 3.5 kDa) that was immersed in 20 ml of buffer solution at 37°C. At specific time points, the entire release medium was removed and replaced with 20 mL fresh buffer solution. Collected samples were analyzed by UV–Vis spectrophotometry at 425 nm with reference to a calibration curve of curcumin in acetone:

water (20:80). The amount of released curcumin (Rc) was calculated based on the following formula:

$$Rc (\%) = 100 \times (M_{RC}) / (M_C)$$

with  $M_{RC}$  = mass of released curcumin and  $M_C$  = mass of curcumin in nanoaggregates.

- **Degradation of nanoaggregates**

7 mg of copolymers PCL-g-PEG0.7k<sub>1,2</sub> and PCL-g-PEG2k<sub>5,4</sub> were dissolved in 1 ml of acetone in a hemolysis tube, and then 5 ml of PBS were added. After evaporation of acetone, hemolysis tubes were put in an incubator at 37°C under stirring at 150 rpm. Tubes were removed after 1 week, 1 month, 3 months and 6 months. Samples were freeze-dried, the solid residue was dissolved in THF and the resulting solution was filtered before analysis by SEC. Degradation experiments were done in triplicates.

- **In vitro assay against MCF7 cells**

*Cell culture*

Human breast cancer cell lines MCF-7 were a gift of Dr. Garcia's lab (IBMM, Team "Glyco et Nanovecteurs pour le ciblage thérapeutique", Montpellier, France). Cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with Fetal Bovine Serum (10%, v/v) and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub>.

*Cell cytotoxicity assay*

Cytotoxicity of the nanoparticles was measured in MCF-7 cells using Prestoblu® Cell viability reagent (Invitrogen). For this assay, cells were plated into a 24-well plate in amount of  $1.5 \times 10^4$  cells per well and allowed to attach overnight. They were then treated with 0.18 and 18 µg/ml of free curcumin (dissolved in DMSO) or curcumin encapsulated (dissolved in PBS) for 24h and 48h. Appropriate equivalent amounts of nanoparticles without curcumin were run simultaneously. Medium containing equivalent amounts of DMSO or PBS or medium only were used as a control. Cell viability was measured using Prestoblu® Cell viability reagent according to manufacturer's instruction. Briefly, 10% of Prestoblu® was diluted into cell growth medium. When added to cells, the reagent is modified by the reducing environment of the viable cells and turns red, becoming highly fluorescent. After incubation time, supernatant was transferred to a 96-well plate and the fluorescence was measured at 560/590nm using a microplate reader (PerkinElmer, Victor3V).

## 2.4. Results And Discussion

### • Synthesis of graft copolymers with controlled amphiphilicity

A convenient thiol-yne photo-addition methodology was used to synthesize the PCL-g-PEG copolymers and to modulate their amphiphilicity. For sake of clarity, a schematic representation of the preparation and architecture of the PCL-g-PEG copolymers is provided (ESI, Scheme S1). Indeed, as shown in our previous work, it is possible to easily control the PEG grafting density by playing with the reaction parameters.<sup>36</sup> To evaluate the influence of PCL-g-PEG hydrophilicity on the copolymers potential as drug delivery systems, we targeted a broad range of hydrophilicity with molar ratios EG/CL in the range 1.9 to 5.4 (Table III-2 1).

**Table III-2 1** : Synthesis of PCL-g-PEG with controlled composition using PCL-yne and PEG-SH

Entry	Copolymer	PEG (eq.) <sup>a</sup>	DMPA (eq.) <sup>a</sup>	DMF (mL)	Time (h)	EG/CL <sup>b</sup>	Grafting efficiency (%) <sup>c</sup>	Mn <sup>d</sup> (g/mol)	Đ
1	PCL-g-PEG0.7k <sub>1,9</sub>	10	1	10	2	1.9	56	24700	2.0
2	PCL-g-PEG2k <sub>2,8</sub>	6	0.5	10	2	2.8	28	25800	2.7
3	PCL-g-PEG2k <sub>3,6</sub>	6	0.5	2	1	3.6	36	27000	1.8
4	PCL-g-PEG2k <sub>4,5</sub>	6	0.5	2	2	4.5	45	25900	1.6
5	PCL-g-PEG2k <sub>4,7</sub>	6	1	2	2	4.7	47	29000	1.8
6	PCL-g-PEG2k <sub>5,0</sub>	6	2	2	2	5.0	50	30000	2.1

a) equivalent with respect to alkyne groups; b) calculated from the peak integrations of <sup>1</sup>H-NMR; c) calculated by <sup>1</sup>H-NMR analysis based on the initial content of alkyne groups and the EG/CL ratio and considering diaddition on all alkyne groups as 100% grafting efficiency d) SEC analyses in THF, polystyrene standards.

The increased number of composition and higher hydrophilicity of the novel PCL-g-PEG compared to our previously presented copolymers was obtained thanks to the precise control of the reactant concentration, the reaction time, the PEG-SH molecular weight, the number of PEG equivalents, and the amount of photoinitiator. The ratio EG/CL in product was easily

increased from 1.9 to 2.8 by replacing PEG0.7K by PEG2K (entries 1 and 2), despite a lower number of PEG chains and DMPA equivalents. As expected and in accordance with our previous study with benzyl mercaptan,<sup>36</sup> higher grafting efficiency was obtained for the shorter PEG due to the limited steric hindrance and higher thiol-end group accessibility for PEG0.7K compared to PEG2K. The impact of the reactant concentration on the grafting density is significant as shown by the increase of EG/CL ratio from 2.8 to 4.5 for a 4 times lower solvent volume (entries 2 and 4). Moreover, reaction time played also significant role as EG/CL increased from 3.6 after 1 hour of reaction to 4.5 after 2 hours (entries 3 and 4). Finally, the equivalent number of DMPA has only a limited impact on EG/CL ratio: EG/CL varies from 4.5 to 5 despite a 4 folds increase of DMPA equivalents was used (entries 3-5). These results, in conjunction to the previously published, confirmed the simplicity of modulation offered by the photo thiol-yne approach to yield amphiphilic PCL-g-PEG copolymers that are easily turned from highly hydrophobic structures (EG/CL = 0.35, previous work) to more hydrophilic ones (EG/CL = 5).

Molecular weights, measured by SEC, were in the range 25000 g/mol to 30000 g/mol ( $\bar{M}_w = 1.6$  to 2.7) and did not varied significantly for various copolymer. Further discussion of the molecular weights of the copolymers with respect to PCL-yne ( $\bar{M}_n = 21200$  g/mol  $\bar{M}_w = 2.4$ ) or comparison between the copolymers is not provided as hydrodynamic behavior of the copolymers is known to be strongly impacted by their amphiphilicity and architectures. In particular, underestimation of molecular weight of graft copolymers was reported in literature and is believed to be due to the impact of grafting density on hydrodynamic radius, which gives more compact structures than their linear counterparts.<sup>26, 32</sup>

- **Characterization of PCL-g-PEG nanoaggregates**

*Critical aggregation concentrations (CAC) of PCL-g-PEGs*

Critical aggregation concentrations (CAC) of PCL-g-PEGs were calculated for all copolymers using the excitation spectra of pyrene. Typical excitation spectra of pyrene solutions are shown in Figure III-2 S1 (Electronic Supplementary Information (ESI)) as a function of the concentration of PCL-g-PEG2k<sub>3,2</sub>. The intensities of excitation peaks at  $\lambda_{ex} = 336.5$  and 333.5 nm, denoted  $I_{333.5}$  and  $I_{336.5}$  respectively, were chosen as the variation of the  $I_{336.5}/I_{333.5}$  intensity ratio is related to the self-association of amphiphilic PCL-g-PEGs and the partition of pyrene between the aqueous phase and the hydrophobic cores of micelles.<sup>41</sup> CACs were estimated based on the tangents method and are listed in Table III-2 2.

**Table III-2 2** : Grafting number, critical aggregation concentration (CAC) and size of blank nanoaggregates as a function of copolymer composition.

Entry	Copolymers	EG/CL	Grafting number <sup>a</sup>	CAC (mg/L)	Size <sup>d</sup> (nm)	PDI
1 <sup>[36]</sup>	PCL-g-PEG0.7k <sub>1,2</sub>	1.2	13	1.1 <sup>b</sup>	32	0.24
2	PCL-g-PEG0.7k <sub>1,9</sub>	1.9	21	3.5	42 ± 4	0.24 ± 0.01
3	PCL-g-PEG2k <sub>2,3</sub>	2.3	9.5	2.6	nd.	nd.
4	PCL-g-PEG2k <sub>3,2</sub>	3.2	13	2.6	28 ± 1	0.21 ± 0.01
5	PCL-g-PEG2k <sub>4,7</sub>	4.7	19	4.3	nd.	nd.
6	PCL-g-PEG2k <sub>5,4</sub>	5.4	22	4.3	73 ± 2	0.40 ± 0.004
7	PCL- <i>b</i> -PEG5k <sub>2,6</sub> <sup>c</sup>	2.6	1	17	59 ± 1	0.21 ± 0.01

<sup>a</sup> Number of PEG chains per PCL chain, calculated by 1H NMR analysis based on the molecular weight of PCL-yne and of PEG ; <sup>b</sup> CAC of PCL-g-PEG<sub>1,2</sub> was calculated in our previous work using the emission spectra of pyrene.<sup>36</sup> ; <sup>c</sup> block copolymer; <sup>d</sup> Mean size determined by DLS

CAC value was found to be strongly impacted by the composition (EG/CL) and grafting number (number of PEG chains per PCL backbone) of the copolymers. In more details, for entries 1 and 2, where PEG0.7K was used, CAC increased from 1.1 mg/L to 3.5 mg/L with the increase of hydrophilicity from EG/CL = 1.2 to EG/CL = 1.9, respectively. This is a classical result for amphiphilic self-assembling polymers. The same trend was obtained with PEG2K (Table III-2 2, entries 3 to 6) where CAC varied from 2.6 to 4.3 mg/L for PCL-g-PEG2k<sub>2,3</sub> to PCL-g-PEG2k<sub>5,4</sub>. However, one can note that EG/CL ratio alone cannot explain the self-assembling behavior of the graft copolymers. The grafting number has also a strong influence on the CAC. PCL-g-PEG with close architectures, *ie.* the same grafting number, presented similar CAC. This is clearly the case for PCL-g-PEG2k<sub>2,3</sub> and PCL-g-PEG2k<sub>3,2</sub> that have a similar CAC (2.6 mg/L), despite different EG/CL ratios due to the presence of *ca.* 10 PEG chains for both polymers. The same phenomenon is observed in PCL-g-PEG2k<sub>4,7</sub> and PCL-g-PEG2k<sub>5,4</sub> (*ca.* 20 PEG chains). At similar EG/CL ratios, the general trend is therefore to observe a lower CAC for lower grafting number. This is confirmed by the comparison between PCL-g-PEG0.7k<sub>1,9</sub> and PCL-g-PEG2k<sub>2,3</sub>. In this case, close EG/CL ratios are obtained but grafting numbers are very different with 21 PEG0.7k chains for PCL-g-PEG0.7k<sub>1,9</sub> against 9.5 PEG2k chains for PCL-g-PEG2k<sub>2,3</sub>. This leads to a lower CAC for the less substituted PCL-g-PEG2k<sub>2,3</sub> although it presents the higher EG/CL ratio. In summary, we have found that all graft PCL-g-PEG copolymers showed low CAC values below 5 mg/L, whatever the composition and substitution degree.

With aim to compare the graft copolymers with their linear block copolymers counterparts, a PCL5k-*b*-PEG5k diblock copolymer with EG/CL = 2.6 was synthesized. Despite similar EG/CL ratios, this linear copolymer had a much higher CAC (17 mg/L) than its counterpart PCL-*g*-PEG2k<sub>2,3</sub> (2.6 mg/L). This result is in agreement with the literature where the lower CAC of grafts copolymers is assigned both to their higher polydispersity and to their reduced mobility as a consequence of the steric hindrance induced by the side chains.<sup>23, 24</sup> Results obtained for CAC values of all PCL-*g*-PEG graft copolymers are highly promising, showing that the formed nanoaggregates should be useable as drug delivery systems in medicine as no dissociation upon the high dilution encountered with injection is expected.

#### *Size of PCL-g-PEGs nanoaggregates*

All nanoaggregates have hydrodynamic diameters below 100 nm (Table III-2 2) showing useable size for prolonged circulation in blood stream and subsequent accumulation and extravasation within the target place, *e.g.* solid tumor or place of inflammation. One should note that filtration prior to DLS analysis may have eliminated objects larger than 0.45  $\mu\text{m}$  if present. The size of nanoaggregates is increased with the hydrophilicity, *ie.* EG/CL ratio and substitution degree, as exemplified by the comparison between PCL-*g*-PEG0.7k<sub>1,2</sub> ( $D_H = 32$  nm) and PCL-*g*-PEG0.7k<sub>1,9</sub> ( $D_H = 42$  nm) based on PEG0.7K or between PCL-*g*-PEG2k<sub>3,2</sub> ( $D_H = 28$  nm) and PCL-*g*-PEG2k<sub>5,4</sub> ( $D_H = 73$  nm) based on PEG2K. This is due to the higher hydration of the more hydrophilic shell in conjunction with an extended conformation of the PEG chains with increasing surface density of PEG. For increasing EG/CL ratios this result can also be explained by the presence of PEG chains stuck inside the nanoaggregates, which might imply a more swollen state for the core of the nanoaggregates. Polydispersity of the nanoaggregates is between 0.21 and 0.40. These rather high values are believed to result from the architecture of the graft copolymers that may presents inhomogeneity of repartition of the grafted PEG chains along the PCL backbone due to the thiol-yne strategy used (Scheme III-2 S1, ESI). It also results from the less controlled assembly of graft copolymers compared to classical hydrophilic diblock copolymers.

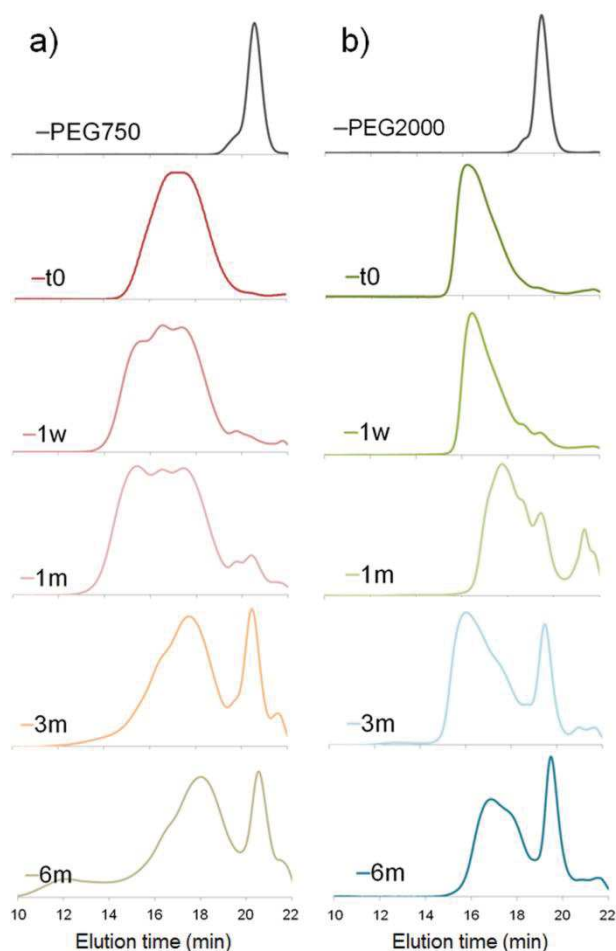
#### *Stability of self-assemblies*

Degradation kinetics of the self-assemblies was evaluated under standard hydrolytic conditions over a 6 months period. For this purpose the two most different copolymers, namely PCL-*g*-PEG0.7k<sub>1,2</sub> and PCL-*g*-PEG2k<sub>5,4</sub>, were selected to generate blank

nanoaggregates. At predetermined degradation times, buffer solutions of nanoaggregates (PBS, pH 7.4, 37°C) were analyzed by SEC (Figure III-2 1, ESI Table III-2 S1). Obviously, conditions were not intending to recreate *in vivo* degradation conditions where such systems are expected to be degraded faster as a consequence of the lower pH found in tumor tissues (cancer tissues pH 6.5-7.2) or specific cell components (endosomes 5.0-6.5, lysosomes 4.5-5.0)<sup>42</sup> and of the presence of enzymes (lipases).<sup>43</sup> We aimed to do a comparative study to evaluate the impact of copolymer amphiphilicity and architecture on the *in vitro* degradation rate.

For both copolymers, release of PEG chains was witnessed. It results from the hydrolysis of the ester bond between the terminal hydroxyl-PEG group and the propionic acid used to prepare the PEG-SH. The first appearance of a peak corresponding to free PEG chains was seen after 1 month in the more hydrophobic PCL-*g*-PEG0.7k<sub>1,2</sub> (Figure III-2 1a) and after only 1 week in the more hydrophilic PCL-*g*-PEG2k<sub>5,4</sub> (Figure III-2 1b). By comparison of the relative intensities of peaks after 3 and 6 months, it may be concluded that all PEG side chains were hydrolyzed after 3 months in PCL-*g*-PEG0.7k<sub>1,2</sub>, whereas PEG release continued between 3 and 6 months in the more substituted PCL-*g*-PEG2k<sub>5,4</sub>. In summary, degradation starts earlier for the more hydrophilic copolymer, but due to a higher grafting number, it lasts over a longer period compared to the more hydrophobic copolymer.



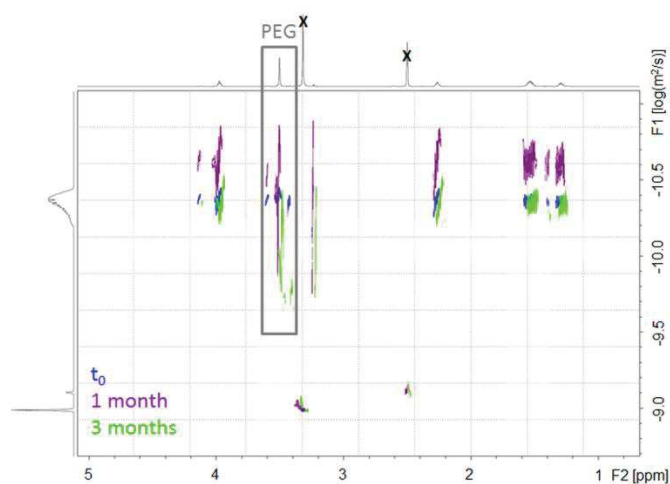


**Figure III-2 1 :** Degradation of PCL-g-PEG copolymers in PBS (pH 7.4, 37°C) with a) EG/CL = 1.2 and b) EG/CL = 5.4 (SEC analyses were run in THF)

An additional comment should be done on the initial degradation period of the most hydrophobic copolymer. A high molecular weight population is formed after 1 week, still present after 1 month, to finally disappear after 3 months (Figure III-2 1a, shoulder peak at ca. 15 minutes). This is confirmed by DOSY-NMR analyses that also show the release of free PEG after 1 month (Figure III-2 2). Different hypotheses can be done to explain this phenomenon. PCL-g-PEG<sub>0.7k<sub>1.2</sub></sub> is substituted in average by 13 PEG<sub>0.7K</sub> chains (Table III-2 2), whereas full substitution of the alkyne groups initially present on the PCL-yne would correspond to ca. 32 PEG<sub>0.7K</sub> chains. Some unreacted alkyne groups, and vinylsulfide groups (thiol-yne monoaddition) are therefore present in the copolymer. Rearrangements between these groups leading to cyclic compounds have been reported in literature.<sup>44</sup> In a same manner, if considering the free alkyne groups and thioether groups, intramolecular chalcogenation has been reported following radical activation that may occur in our case due to the long exposition of degradation medium to day light.<sup>45</sup> Finally, another photoactivated side reaction is the direct crosslinking of vinylsulfide under light during the degradation.



Taking into account these reactions, it is clear that some rearrangements leading to cross-linked structures may occur in the copolymer during its degradation and can explain the appearance of a population with higher molecular weight. For longer degradation times these cross-linked structures are also degraded and a clear decrease of molecular weight, as well as a lower dispersity, is again observed. A more detailed study on this aspect is however beyond the scope of the present work and is under way. However, one should note that all components of the PCL-g-PEG nanoaggregates will be excreted (released short PEG chains), and/or degraded (hydrolysis of PCL backbone), and thus unwanted accumulation of the carrier structure is not anticipated. Based on the presented results we can therefore conclude that the PCL-g-PEG copolymer nanoaggregates are suitable candidates as long circulating drug reservoirs for treatment of diseases, which need a long term exposure of the drug in the body.



**Figure III-2 2 :** DOSY-NMR spectra of PCL-g-PEG0.7k<sub>1,2</sub> as a function of the degradation time in PBS (pH = 7.4) at 37°C. (DMSO<sub>d6</sub>, 600 MHz, black crosses correspond to DMSO and water)

- **Encapsulation of drugs**

*Encapsulation of various API*

To evaluate the potential of the PCL-g-PEG copolymer family for drug delivery, various APIs have been loaded into the nanoaggregates. The selected drugs were diverse in nature and therapeutic targets: anticancer drugs (paclitaxel, ABT-199), candidate drugs to overcome the multidrug resistance in cancer cells (curcumin, elacridar), anti-inflammatory drug (dexamethasone) and antibacterial drug (clofazimine). These drugs have usually a low to very low solubility, in the range 0.3 g/L for clofazimine to less than 0.4 mg/L for ABT-199 (Table

III-2 S2, ESI), their body distribution after injection is non-selective, thus reaching also healthy cells and organ and finally, they show strong side-effect driven toxicity. Despite these drawbacks, they are very potent drugs with for example, activities below the nanomolar range for ABT-199.<sup>46</sup> It is therefore of interest to solubilize them, even at low dose, in drug delivery systems with the aim to highly increase their bioavailability, prolong their availability within the body while reducing significantly their side-effect toxicity. Changing of the pharmacokinetics is the key point to observe the better outcome of the treatment with selected drugs. For that purpose, two above described copolymers with different hydrophilicities (EG/CL = 1.2 or 3.2) and forming in the aqueous solution nanoaggregates have been chosen for preparation of loaded polymer-based drug nanoaggregates.

For all drugs, higher encapsulation efficiency and higher drug loading were obtained with the more hydrophobic copolymer, as expected (Table III-2 3). The EE was lowered by 22% (curcumin) to 55% (ABT-199, Dexamethasone) by changing PCL-g-PEG0.7k<sub>1,2</sub> to PCL-g-PEG2k<sub>3,2</sub>. Coming to more details, in the case of paclitaxel, the EE was considered too low (< 3 wt%) and DL was not calculated. Similarly, other polyester-based drug delivery systems have shown low efficiency in paclitaxel formulation when using self-assembly method and large quantities of polymer with respect to PTX (100:1) were therefore required.<sup>47</sup> On the opposite, very high EE (92 wt%) and DL (12.1 wt%) were obtained with curcumin. The same phenomenon was observed for clofazimine that was loaded at 11.7 wt% in the copolymer. Finally, ABT-199 and Elacridar loadings were found very low (1.3 wt% and 2.6 wt%). Nevertheless, these drugs are extremely potent and are still under deep pharmaceutical development and evaluation. We suppose that even quite low DLs might be enough to witness a therapeutic effect because of the highly improved pharmacokinetic profile and prolonged accessibility of the drug within the body.

**Table III-2 3 :** Encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) of various APIs.

Copolymer	Paclitaxel		ABT-199		Curcumin		Elacridar		Dexamethasone		Clofazimine	
	EE (wt%)	DL (wt%)	EE (wt%)	DL (wt%)	EE (wt%)	DL (wt%)	EE (wt%)	DL (wt%)	EE (wt%)	DL (wt%)	EE (wt%)	DL (wt%)
PCL-g-PEG0.7k <sub>1,2</sub>	2.9	nd.	6.8	1.3	92.0	12.1	16.4	2.6	27.2	4.4	48.5	11.7
PCL-g-PEG2k <sub>3,2</sub>	1.6	nd.	3.2	0.1	70.1	10.6	12.3	2	12.2	2.1	nd.	nd.

### *Encapsulation of curcumin*

Based on the high EE and DL values obtained with curcumin, further experiments were carried out using this drug. Curcumin is a naturally occurring drug that exhibits potent anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-bacteria, anti-virus, anti-tumor and antilipidemic activities.<sup>48</sup> However, it has a poor solubility and poor oral bioavailability. Therefore, a water-based formulation based on graft copolymers allowing a tunable and controlled release would be of interest. In order to evaluate if the modulation of curcumin loading and release can be achieved using PCL-*g*-PEG, copolymers with different amphiphilicities were tested. Lower EEs and DLs with high hydrophilic copolymer were confirmed, EE decreasing from 92 wt% to 58 wt% and DL decreasing from 12.1 wt% to 8.2 wt% in PCL-*g*-PEG0.7k<sub>1,2</sub> and PCL-*g*-PEG2k<sub>5,4</sub>, respectively (Table III-2 4, entries 1 and 7). Roughly, three ranges of amphiphilicity can be drawn out of these results with similar EE and DL for each range: EE  $\approx$  90 wt% and DL  $\approx$  12 wt% for EG/CL  $\leq$  2 (entries 1-3); EE  $\approx$  70 wt% and DL  $\approx$  10 wt% for  $2 \leq$  EG/CL  $\leq$  3.5-4 (entries 4-5); and EE  $\approx$  55 wt% and DL  $\approx$  8-9 wt% for EG/CL  $\geq$  4.5 (entries 6-7). This shows the importance of the EG/CL ratio that impacts the resulting conformation of nanoaggregates. As the amount of PEG is increased, higher amount of PEG chains are stuck into the structure of the nanoaggregates, resulting in a much less hydrophobic core, which does not represent a good environment to encapsulate hydrophobic drugs.

Coming to the comparison between linear and graft copolymers, no influence of the architecture was found for a same EG/CL ratio (EG/CL = 2.6, entries 1 and 8). Similar EE and DL were obtained for PCL-*g*-PEG2k<sub>2,6</sub> (PCL = 21300 g/mol ; PEG = 2000 g/mol) and PCL-*b*-PEG5k<sub>2,6</sub> (PCL = 5000 g/mol ; PEG = 5000 g/mol). For comparison lower molecular weights PCL-*b*-PEG copolymers with a same EG/CL = 2.6 ratio are reported in literature for the encapsulation of curcumin. Liu *et al.* synthesized PCL2k-*b*-PEG2k and prepared curcumin-loaded polymer micelles by solid dispersion method.<sup>38</sup> DL and EE were respectively  $14.8 \pm 0.1$  wt% and  $98.9 \pm 0.7$  wt%. Same results were reported by Song *et al.* (PEG2.4k-PCL2.4k)<sup>50</sup> and Gou *et al.* (PEG2k-PCL2k)<sup>51</sup> who used thin-film hydration or nanoprecipitation methods for micelles preparation, respectively. These values are higher than the ones obtained with PCL-*g*-PEG2k<sub>2,6</sub>. This can be explained by both the encapsulation method (thin film hydration or solid dispersion method *vs.* self-assembly method) and the lower molecular weight of the reported diblock copolymers (< 5000 g/mol *vs.* > 10000 g/mol).

**Table III-2 4 :** Curcumin encapsulation efficiency (EE), drug loading (DL) and sizes of nanoaggregates as a function of PCL-g-PEG copolymer amphiphilicity.

Entry	Copolymer	EE (wt%)	DL (wt%)	Size <sup>a</sup> (nm)	PDI
1	PCL-g-PEG0.7k <sub>1,2</sub>	92.0	12.1	40	0.28
2	PCL-g-PEG0.7k <sub>1,9</sub>	89.4 ± 7	11.6 ± 0.4	42 ± 6	0.29 ± 0.03
3	PCL-g-PEG2k <sub>2,3</sub>	90.8 ± 8.8	11.7 ± 0.6	23 ± 2	0.13 ± 0.01
4	PCL-g-PEG2k <sub>2,6</sub>	75.3 ± 5.5	10.0 ± 0.6	26 ± 4	0.30 ± 0.05
5	PCL-g-PEG2k <sub>3,2</sub>	70.1 ± 8	10.6	34 ± 1	0.24 ± 0.01
6	PCL-g-PEG2k <sub>4,9</sub>	56.0 ± 2.6	9.4 ± 0.7	51 ± 7	0.50 ± 0.10
7	PCL-g-PEG2k <sub>5,4</sub>	57.8 ± 5.4	8.2 ± 1.2	48 ± 4	0.43 ± 0.03
8	PCL- <i>b</i> -PEG5k <sub>2,6</sub>	80.3 ± 9.9	10.7 ± 0.9	56 ± 3	0.22 ± 0.04

a) Mean size determined by DLS

Size of curcumin loaded nanoaggregates was in the range 23 nm to 56 nm for all copolymers. Curcumin loaded samples were slightly larger than the blank nanoaggregates, except for the more hydrophilic copolymer PCL-g-PEG2k<sub>5,4</sub> whose average size decreased from 73 to 48 nm. It may be due to the fact that curcumin strongly interacts with PCL,<sup>51</sup> which may induce a more compacted structure of the initially looser and more swollen nanoaggregates obtained with the most hydrophilic copolymer. As for the blank nanoaggregates (Table III-2 2), and for the same reasons, the trend was that larger loaded nanoaggregates were obtained for the more hydrophilic copolymers. Polydispersity of drug loaded samples was large and not very different to the one of non-loaded samples showing that curcumin has low influence on the nanoaggregation behavior of the copolymers. This absence of influence is due to the less controlled self-aggregation of the graft copolymers and, for the lower EG/CL ratios, to the rapid folding of the hydrophobic core. One should note that for graft copolymers, a low extent of larger aggregates (< 30% in DLS intensity mode) is found with sizes between 100 and 200 nm depending on the copolymer. This was not observed with the well-defined linear PCL-*b*-PEG5k<sub>2,6</sub> giving of a more dynamic and homogenous system with better self-assembly compared to the uncontrolled self-aggregation of the graft copolymers. Noteworthy, PCL-g-PEG2k<sub>2,6</sub> (Mn ≈ 25000 g/mol) yielded nanoaggregates with  $D_H \approx 26$  nm, *ie.* of the same size as the micelles generated from low molecular weight PCL-*b*-PEG2k<sub>2,6</sub> (Mn ≈ 4000-5000 g/mol).<sup>50, 51</sup> For comparison, PCL-*b*-PEG5k<sub>2,6</sub> with Mn = 10000 g/mol yielded larger micelles

of  $D_H \approx 55$  nm. This is due to a strong folding of the high molecular weight PCL backbone in PCL-*g*-PEG2k<sub>2.6</sub>.

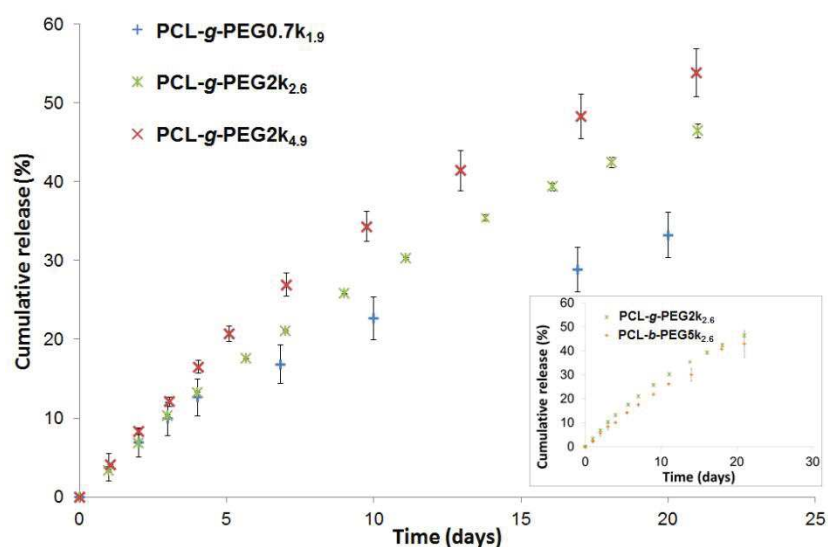
#### *Release of curcumin*

Depending on the stability of the micelles, drugs can be released following the disruption/desintegration of the micelles and/or by diffusion. In the case of stable polymeric micelles, diffusion may be slow if favorable interactions exist between the drug and the core of micelles. To evaluate the impact of the copolymer composition on the drug release, curcumin-loaded PCL-*g*-PEG nanoaggregates with EG/CL = 1.9, 2.6 and 5.4 were prepared. *In vitro* drug release was studied in PBS containing 0.1 wt% Tween 80 and 0.015 wt% ascorbic acid. Results are summarized in Figure III-2 3. No burst effect was observed and results showed similar kinetics profiles during the first 3 days with ca. 10% of the curcumin payload being released. Following this initial period, and as expected, the release was faster for nanoaggregates with higher hydrophilicity. 30% of curcumin payload was released in 20 days with PCL-*g*-PEG0.7k<sub>1.9</sub>, instead of 45% and 55% with PCL-*g*-PEG2k<sub>2.6</sub> and PCL-*g*-PEG2k<sub>4.9</sub>, respectively. Profiles were very similar for the two copolymers PCL-*g*-PEG2k<sub>2.6</sub> and PCL-*g*-PEG2k<sub>4.9</sub>. This was confirmed by the curves fits that were calculated using the CurveExpert 1.40 software (Microsoft Corporation 1993) to estimate the maximal release that could be reached with the copolymers (Figure III-2 S2a-d, ESI). Release is plateauing at ca. 40% after 40 days for PCL-*g*-PEG0.7k<sub>1.9</sub> but reaches 69% and 72% for PCL-*g*-PEG2k<sub>2.6</sub> and PCL-*g*-PEG2k<sub>4.9</sub>, respectively, after 60 days.

Similar release profiles were obtained with PCL-*g*-PEG2k<sub>2.6</sub> and PCL-*b*-PEG5k<sub>2.6</sub> copolymers (Figure III-2 3 inset). The two architectures showing the same drug loading and release capacities, their main difference is therefore the smaller size of the nanoaggregates in the graft copolymer ( $D_H \approx 26$  nm) compared to the ones obtained from the linear block copolymer ( $D_H \approx 55$  nm). This is not the case for the block copolymers with the same EG/CL = 2.6 ratios but with lower molecular weight. A 21% release was reported after 24h for PEG2k-PCL2k diblocks, and ca. 50% release after 7 to 9 days.<sup>38, 51</sup> For comparison, similar ratios were obtained after 5 days and ca. 20 days with the graft copolymer PCL-*g*-PEG2k<sub>2.6</sub>.

Based on the results obtained during our study, we can conclude that our nanoaggregates are able to release their payload in a controlled manner, which is depending on the hydrophilicity of the used PCL-*g*-PEG. It is worth to mention that although the reported release kinetics may appear slow, the situation in the body is slightly different. First, as nanoaggregates are

circulating in the body the released drug is immediately redistributed, thus the release kinetics will be the most probably significantly higher. Second, in the frame of cancer therapy such nanoaggregates are expected to rapidly accumulate in the tumor tissue due to the EPR effect, where their payload will be more rapidly released than *in vitro* due to the faster *in vivo* degradation of copolyesters under the more acidic tumor environment.

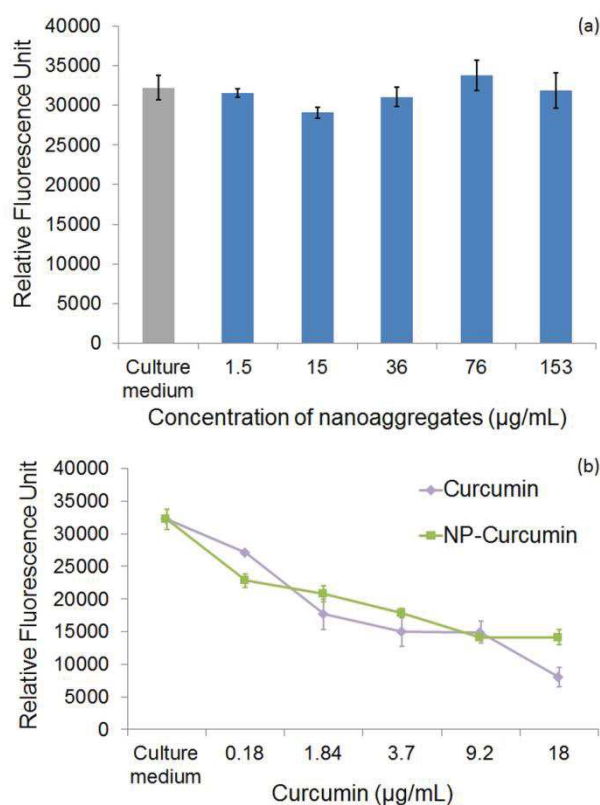


**Figure III-2 3 :** Cumulative release of curcumin from PCL-g-PEG nanoaggregates as a function of EG/CL ratio. Inset corresponds to the comparison between PCL-g-PEG2k<sub>2,6</sub> and PCL-b-PEG5k<sub>2,6</sub> copolymers. (Data are expressed as means  $\pm$  SD and correspond to measurements in triplicate)

- **Toxicity of curcumin loaded nanoaggregates**

Curcumin loaded PCL-g-PEG nanoaggregates were tested against breast cancer cell line MCF-7. All tests were performed with associated controls to check the non-toxicity of the various culture media used in cytotoxicity tests. In more details, the effect of a few percents of PBS in the culture medium has been assessed as the buffer is used to prepare the nanoaggregates suspensions prior to cell seeding. The same protocol was used with less than 0.1% of DMSO as cosolvent to ensure the solubility of the free curcumin in the culture medium in accordance with previous studies.<sup>52</sup> All media showed no toxicity (Figure III-2 S3, ESI). In a first assay, dose dependence viability of MCF-7 cells after 24h treatment was tested with the hydrophobic PCL-g-PEG0.7k<sub>1,2</sub> to confirm the non-toxicity of unloaded nanoaggregates, and to evaluate the toxicity of curcumin-loaded micelles with a range of curcumin concentration between 0.18 and 18  $\mu$ g/mL. These concentrations were selected from the literature.<sup>53</sup> Figure III-2 4a confirms the absence of cytotoxicity of the unloaded nanoaggregates. The pertinence of the range of drug concentration was also confirmed with

significant differences being obtained in terms of cells viability at low (0.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and high (18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) curcumin doses (Figure III-2 4b). In addition, equivalent cytotoxicities towards the MCF-7 cells were observed for the same dose of curcumin, free or entrapped in the nanoaggregates, which confirmed the activity of the drug released from the PCL-g-PEG nanoaggregates. In more details, calculated IC<sub>50</sub> values for free curcumin and curcumin-loaded nanoaggregates were very close with values of 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 5.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively.

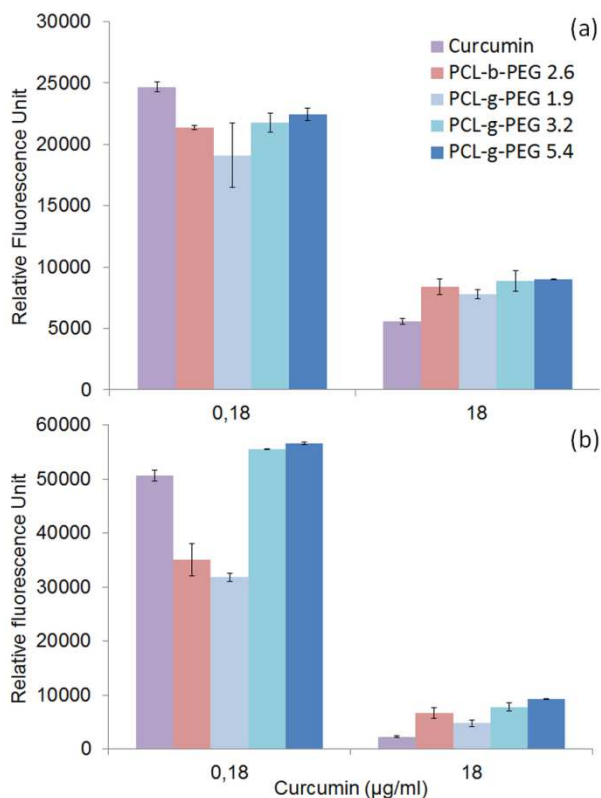


**Figure III-2 4 :** Dose dependence viability of MCF-7 cells after 24h treatment (a) with blank nanoaggregates (concentration of nanoaggregates corresponds to the quantity required to encapsulate the determined dose of curcumin in the range 0.18 to 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and (b) with free curcumin (squares) or curcumin loaded PCL-g-PEG0.7k<sub>1,2</sub> nanoaggregates (diamonds). (concentrations corresponds to  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of curcumin in the culture medium and data are expressed as means  $\pm$  SD and correspond to measurements in triplicate)

Based on these results, curcumin concentrations of 0.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (medium viability) and 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (low viability) were selected to evaluate the impact of the copolymer amphiphilicity on their cytotoxicity towards MCF-7 cells. Four copolymers with EG/CL ratios ranging from 1.9 to 5.4 were tested. The amount of loaded nanoaggregates added to the culture medium was adjusted based on the calculated drug loadings (Table III-2 4) to provide the selected concentrations of curcumin. Control experiments with blank nanoaggregates were run in parallel. After treatment with blank micelles for 24 h and 48 h, cells viability was above 90% through the whole range of concentrations examined during the treatment, which confirmed



the non-toxicity of the various copolymers for all EG/CL ratios (Figure III-2 S4, ESI). In other words, copolymers had no activity and effect on the cytotoxicity determination of curcumin loaded in nanoaggregates. MCF-7 cells viability was then evaluated in the presence of curcumin-loaded nanoaggregates as shown in Figure III-2 5.

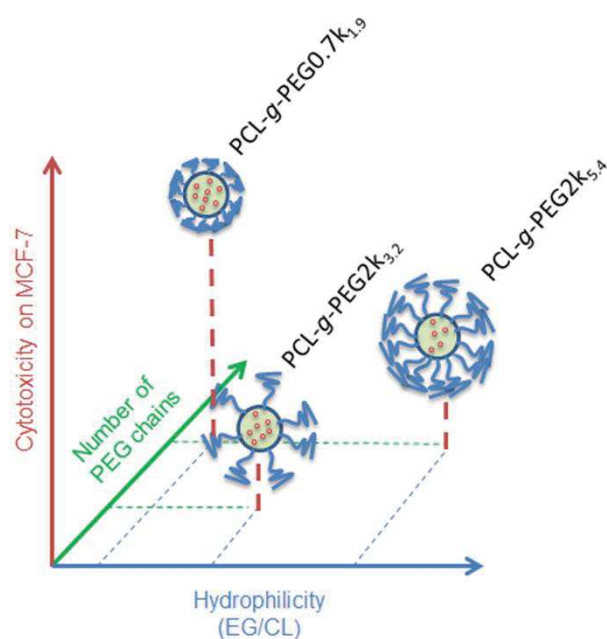


**Figure III-2 5 :** *In vitro* cell cytotoxicity of curcumin and curcumin-loaded nanoaggregates as a function of the PCL-g-PEG copolymer amphiphilicity after (a) 24 h and (b) 48 h. (Data are expressed as means  $\pm$  SD and correspond to measurements in triplicate)

After 24h cell viabilities were in the range 30 to 40% for all formulations, including free curcumin. However, at the lower dose of 0.18  $\mu\text{g/mL}$  the most hydrophobic copolymer PCL-g-PEG $_{0.7k_{1.9}}$  yielded the highest cytotoxicity. After 48h of treatment cells viability was only 60% for PCL-g-PEG $_{0.7k_{1.9}}$  whereas all other formulations were not cytotoxic. These results show a higher cytotoxicity towards MCF-7 cancer cells for the most hydrophobic copolymer. At low curcumin dose, a strong increase of activity is gained from the use of the PCL-g-PEG $_{0.7k_{1.9}}$  copolymer compared to free curcumin. Considering the drug release profiles (Figure III-2 3), the observed differences cannot be ascribed to higher curcumin content in the culture medium as all copolymers would release the same amount of their payload after 48h ( $\sim 7\%$ ). The difference of activity is therefore based on differences in the PCL-g-PEG composition, architecture, and consequently on different amphiphilicity of the various



nanoaggregates. Cellular uptake dependence over these factors is believed to be involved here. It was previously reported a higher cellular uptake for hydrophobic PEG2k- or PEG5k-PLA block and miktoarm copolymers with EG/LA > 2.5,<sup>17</sup> whereas some others reported the invert effect for PEG2k-PCL block copolymers with EG/CL < 2.5.<sup>19</sup> This discrepancy of interpretations demonstrates the difficulty to link the cytotoxic effect of drug loaded vectors with a single parameter. Beside pure release parameters, the resulting cytotoxicity depends on many factors that can influence the endocytosis pathways, such as particle size, morphology, surface charge, and of course the amphiphilicity of the copolymers.



**Scheme III-2 1** : Relative cytotoxicity of curcumin loaded nanoaggregates as a function of the EG/CL ratio, grafting number and PEG molecular weight.

In the present study, the higher efficiency of PCL-g-PEG0.7k<sub>1.9</sub> over its grafted counterparts is mainly related to the PEG chain length rather than the pure amphiphilic balance, the nanoaggregates sizes or the grafting number as supported by the following points. First, despite very different EG/CL ratios, all copolymers lead to loaded nanoaggregates of similar sizes (ca. 40 nm in diameter), which implies that size is not a critical factor. Second, considering the average grafting number, one should note that the grafting number of PCL-g-PEG0.7k<sub>1.9</sub> and PCL-g-PEG2k<sub>5.4</sub> is ~20 instead of 10 in PCL-g-PEG2k<sub>3.2</sub>. Despite these twice lower grafting number and lower hydrophilicity, curcumin-loaded PCL-g-PEG2k<sub>3.2</sub> nanoaggregates behave like PCL-g-PEG2k<sub>5.4</sub> in terms of cells cytotoxicity. In the studied

EG/CL range, nanoaggregates with shorter PEG chains allow improved cell membranes interactions which results in better cellular uptake; as illustrated in scheme III-2 1.

This is confirmed by the dissipative dynamics simulation study carried out by Zhang *et al.*<sup>18</sup> They investigate how nanoparticles coated with different amphiphilic copolymers penetrate the cells as a function of the entry force and penetration force needed to cross the cell membrane. Hydrophobicity, hydrophilic/hydrophobic blocks repartition but also rigidity of the polymer presented to the membrane had a strong impact. Rigid copolymers showed better capability and need less time to pass through the cell membrane. This is in total accordance with our findings where shorter, more rigid and less hydrophilic PEG0.7k segments are expected to require less energy to pass through the cell membrane compared to PEG2k ones. An in depth study based on fluorescence microscopy will be undertaken in a future work to elucidate this particular point.

Finally, the importance of the architecture is clearly visible when comparing block and graft copolymers. Based on the PEG molecular weight and EG/CL ratio, one might expect a lower efficiency for the PCL-*b*-PEG5k<sub>2,6</sub> diblock copolymer but it is comparable to the PCL-*g*-PEG0.7k<sub>1,9</sub> graft copolymer. The polymer rigidity might again be a critical factor here.

In summary, the modulation offered by our synthetic approach for PCL-*g*-PEG copolymers offers great opportunities and a high potential for efficient DDS with high cytotoxicity against selected MCF-7 cancer cell line.

Of course to prove the applicability of our nanoaggregates as DDS further investigation is needed and under way both in terms of formulation and freeze-drying of the DDS and in terms of *in vivo* applicability. However, considering the obtained results, it is our belief that the proposed PCL-PEG graft copolymers represent a good alternative to the classical diblock copolymers. Although the later might appear to date as more viable economically, PCL-PEG graft copolymers have various advantages compared to their linear counterparts. First, their CAC is about 10 times lower, which is of importance for formulation and economic reasons. Second, although minor populations of larger aggregates are obtained with the graft copolymers, they present more compact structures with twice lower hydrodynamic diameters compared to their linear counterparts, which may be of benefit for tissue penetration. Last but not least, the proposed PCL-PEG graft copolymers present the main advantage of being tunable, depending on the target application. When diblock copolymers can only be functionalized on their chain ends, graft copolymers obtained by thiol-yne approach, thanks to the presence of unreacted alkyne groups (cf. grafting efficiency), could be further modified

with higher substitution degrees or with multifunctionalities. This particular point should be the matter of future work.

### **Electronic Supplementary information (ESI)**

Scheme III-2 S1. Schematic representation of the preparation of the PCL-g-PEG copolymers by thiol-yne approach.

Figure III-2 S1. Excitation spectra of pyrene as a function of the concentration of PCL-g-PEG<sub>2k<sub>3,2</sub></sub>; Figure S2. Fit curves for the curcumin release from PCL-g-PEG copolymers; Figure III-2 S3. Viability of MCF-7 cells in different media; Figure S4. Viability of MCF-7 cells in the presence of non-loaded nanoaggregates; Table S1. SEC analysis of PCL-g-PEG during degradation; Table S2. Chemical structure and solubility parameters of tested APIs.

### **2.5. Conclusion**

In this work, the easy modulation offered by the photo thiol-yne approach to generate amphiphilic copolymers was shown. PCL-g-PEG copolymers whose amphiphilicity was easily tuned from hydrophobic (EG/CL = 1.9) to hydrophilic (EG/CL = 5.4) have been synthesized. Their CAC is low, in the range 1 to 5 mg/L, it increased with the increase of hydrophilicity. The grafting number was found to be critical for the CAC as PCL-g-PEG with the same grafting number present similar CAC values independently of the EG/CL ratio. Nanoaggregates were easily loaded with various drugs with DL being dependent on the APIs. Best results were obtained with curcumin that could be loaded at 12 wt%. The curcumin loaded nanoaggregates present sizes in the range 23 nm to 55 nm for all copolymers. All curcumin release curves present no burst effect although a faster release is obtained from the nanoaggregates with higher hydrophilicity. Finally, in terms of cytotoxicity against MCF-7 cells, PCL-g-PEG<sub>0.7k<sub>1,9</sub></sub> is a better DDS candidate due to a combination of higher hydrophobicity and shorter PEG chains that may lead to a better cellular uptake *in vitro*. Of course the selection of suitable candidates for treatment of selected diseases has to be based on *in vivo* evaluation and we believe that the results summarized in the present paper could be usable for the selection of polymer nanoaggregates for future preliminary *in vivo* experiments.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the Azm & Saade Association for Assala Al Samad's PhD fellowship, Prof. Rachid Makhloufi from the Institut Français Prague as well as Campus France for Eva Koziolová's internship (Prisme Project 185CZEB160040), Stéphane Dejean for <sup>1</sup>H NMR analyses and Aurélien Lebrun of the Laboratoire de mesures physiques (LMP)-University Montpellier 2 for DOSY NMR analyses. The work was also supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of CR within the National Sustainability Program I (NPU I), Project POLYMAT LO1507 and Grant Agency of the Czech Republic (grant 15-02986S).

## 2.6. References

1. Kwon, G. S.; Kataoka, K., Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2012**, 64, 237-245.
2. Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K., PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2012**, 64, 246-255.
3. Gaucher, G.; Marchessault, R. H.; Leroux, J. C., Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes. *J. Control. Release* **2010**, 143, (1), 2-12.
4. Nicolas, J.; Mura, S.; Brambilla, D.; Mackiewicz, N.; Couvreur, P., Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, (3), 1147-1235.
5. Weissig, V.; Pettinger, T. K.; Murdock, N., Nanopharmaceuticals (part I): products on the market. *Int. J. Nanomed.* **2014**, 9, 4357-4373.
6. Sisson, A. L.; Ekinici, D.; Lendlein, A., The contemporary role of epsilon-caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures. *Polymer* **2013**, 54, (17), 4333-4350.
7. Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W., The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35, (10), 1217-1256.
8. Dash, T. K.; Konkimalla, V. B., Poly-epsilon-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J. Control. Release* **2012**, 158, (1), 15-33.
9. Bahadori, F.; Dag, A.; Durmaz, H.; Cakir, N.; Onyuksel, H.; Tunca, U.; Topcu, G.; Hizal, G., Synthesis and Characterization of Biodegradable Amphiphilic Star and Y-Shaped Block Copolymers as Potential Carriers for Vinorelbine. *Polymers-Basel* **2014**, 6, (1), 214-242.
10. Gao, X.; Wang, B. L.; Wei, X. W.; Rao, W.; Ai, F.; Zhao, F.; Men, K.; Yang, B. W.; Liu, X. Y.; Huang, M. J.; Gou, M. L.; Qian, Z. Y.; Huang, N.; Wei, Y. Q., Preparation, characterization and application of star-shaped PCL/PEG micelles for the delivery of doxorubicin in the treatment of colon cancer. *Int. J. Nanomed.* **2013**, 8, 971-982.
11. Senevirathne, S. A.; Washington, K. E.; Biewer, M. C.; Stefan, M. C., PEG based anti-cancer drug conjugated prodrug micelles for the delivery of anti-cancer agents. *J. Mater. Chem. B* **2016**, 4, (3), 360-370.
12. Ukawala, M.; Rajyaguru, T.; Chaudhari, K.; Manjappa, A. S.; Pimple, S.; Babbar, A. K.; Mathur, R.; Mishra, A. K.; Murthy, R. S. R., Investigation on design of stable etoposide-

loaded PEG-PCL micelles: effect of molecular weight of PEG-PCL diblock copolymer on the in vitro and in vivo performance of micelles. *Drug Deliv.* **2012**, 19, (3), 155-167.

13. Yoon, K.; Kang, H. C.; Li, L.; Cho, H.; Park, M. K.; Lee, E.; Bae, Y. H.; Huh, K. M., Amphiphilic poly(ethylene glycol)-poly(epsilon-caprolactone) AB(2) miktoarm copolymers for self-assembled nanocarrier systems: synthesis, characterization, and effects of morphology on antitumor activity. *Polym. Chem.* **2015**, 6, (4), 531-542.

14. Du, Z. X.; Xu, J. T.; Fan, Z. Q., Regulation of micellar morphology of PCL-b-PEO block copolymers by crystallization temperature. *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, 29, (6), 467-471.

15. Simone, E. A.; Dziubla, T. D.; Colon-Gonzalez, F.; Discher, D. E.; Muzykantov, V. R., Effect of polymer amphiphilicity on loading of a therapeutic enzyme onto protective filamentous and spherical polymer nanocarriers. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (12), 3914-3921.

16. Lee, R. S.; Huang, Y. T., Tuning the hydrophilic-hydrophobic balance of block-graft copolymers by click strategy: synthesis and characterization of amphiphilic PCL-b-(P alpha N3CL-g-PBA) copolymers. *Polym. J.* **2010**, 42, (4), 304-312.

17. Garofalo, C.; Capuano, G.; Sottile, R.; Talerico, R.; Adami, R.; Reverchon, E.; Carbone, E.; Izzo, L.; Pappalardo, D., Different Insight into Amphiphilic PEG-PLA Copolymers: Influence of Macromolecular Architecture on the Micelle Formation and Cellular Uptake. *Biomacromolecules* **2014**, 15, (1), 403-415.

18. Zhang, L. Y.; Becton, M.; Wang, X. Q., Designing Nanoparticle Translocation through Cell Membranes by Varying Amphiphilic Polymer Coatings. *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119, (9), 3786-3794.

19. Zhang, Z.; Qu, Q. Q.; Li, J. R.; Zhou, S. B., The Effect of the Hydrophilic/Hydrophobic Ratio of Polymeric Micelles on their Endocytosis Pathways into Cells. *Macromol. Biosci.* **2013**, 13, (6), 789-798.

20. Elamanchili, P.; Mceachern, C.; Burt, H., Reversal of Multidrug Resistance by Methoxypolyethylene Glycol-block-Polycaprolactone Diblock Copolymers Through the Inhibition of P-Glycoprotein Function. *J. Pharm. Sci.-US* **2009**, 98, (3), 945-958.

21. Hoskins, C.; Thoo-Lin, P. K.; Cheng, W. P., A review on comb-shaped amphiphilic polymers for hydrophobic drug solubilization. *Ther. deliv.* **2012**, 3, (1), 59-79

22. Logie, J.; Owen, S. C.; McLaughlin, C. K.; Shoichet, M. S., PEG-Graft Density Controls Polymeric Nanoparticle Micelle Stability. *Chem. Mater.* **2014**, 26, (9), 2847-2855.

23. Gao, Z. S.; Eisenberg, A., A Model of Micellization for Block-Copolymers in Solutions. *Macromolecules* **1993**, 26, (26), 7353-7360.

24. Lo, C. L.; Huang, C. K.; Lin, K. M.; Hsiue, G. H., Mixed micelles formed from graft and diblock copolymers for application in intracellular drug delivery. *Biomaterials* **2007**, 28, (6), 1225-1235.

25. Coumes, F.; Darcos, V.; Domurado, D.; Li, S. M.; Coudane, J., Synthesis and ring-opening polymerisation of a new alkyne-functionalised glycolide towards biocompatible amphiphilic graft copolymers. *Polym. Chem.* **2013**, 4, (13), 3705-3713.

26. Jiang, X.; Vogel, E. B.; Smith, M. R.; Baker, G. L., "Clickable" polyglycolides: Tunable synthons for thermoresponsive, degradable polymers. *Macromolecules* **2008**, 41, (6), 1937-1944.

27. Jiang, X. W.; Smith, M. R.; Baker, G. L., Water-soluble thermoresponsive polylactides. *Macromolecules* **2008**, 41, (2), 318-324.

28. Onbulak, S.; Tempelaar, S.; Pounder, R. J.; Gok, O.; Sanyal, R.; Dove, A. P.; Sanyal, A., Synthesis and Functionalization of Thiol-Reactive Biodegradable Polymers. *Macromolecules* **2012**, 45, (3), 1715-1722.



29. Li, H. Y.; Riva, R.; Jerome, R.; Lecomte, P., Combination of ring-opening polymerization and "click" chemistry for the synthesis of an amphiphilic tadpole-shaped poly(epsilon-caprolactone) grafted by PEO. *Macromolecules* **2007**, 40, (4), 824-831.
30. Riva, R.; Schmeits, P.; Stoffelbach, F.; Jerome, C.; Jerome, R.; Lecomte, P., Combination of ring-opening polymerization and "click" chemistry towards functionalization of aliphatic polyesters. *Chem. Commun.* **2005**, (42), 5334-5336.
31. Zhang, K.; Wang, Y.; Zhu, W. P.; Li, X. D.; Shen, Z. Q., Synthesis, characterization, and micellization of PCL-g-PEG copolymers by combination of ROP and "Click" chemistry via "Graft onto" method. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2012**, 50, (10), 2045-2052.
32. Parrish, B.; Breitenkamp, R. B.; Emrick, T., PEG- and peptide-grafted aliphatic polyesters by click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, (20), 7404-7410.
33. Rieger, J.; Dubois, P.; Jerome, R.; Jerome, C., Controlled synthesis and interface properties of new amphiphilic PCL-g-PEO copolymers. *Langmuir* **2006**, 22, (18), 7471-7479.
34. Coudane, J.; Laurent, E.; Vert, M., Poly(epsilon-caprolactone)-based organogels and hydrogels with poly(ethylene glycol) cross-linkings. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, 25, (21), 1865-1869.
35. Ponsart, S.; Coudane, J.; McGrath, J.; Vert, M., Study of the grafting of bromoacetylated alpha-hydroxy-omega-methoxypoly(ethyleneglycol) onto anionically activated poly(epsilon-caprolactone). *J. Bioact. Compat. Pol.* **2002**, 17, (6), 417-432.
36. Al Samad, A.; Bakkour, Y.; Fanny, C.; El Omar, F.; Coudane, J.; Nottelet, B., From nanospheres to micelles: simple control of PCL-g-PEG copolymers' amphiphilicity through thiol-yne photografting. *Polym. Chem.* **2015**, 6, (28), 5093-5102.
37. Gao, X.; Zheng, F. J.; Guo, G.; Liu, X. X.; Fan, R. R.; Qian, Z. Y.; Huang, N.; Wei, Y. Q., Improving the anti-colon cancer activity of curcumin with biodegradable nano-micelles. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1, (42), 5778-5790.
38. Liu, L.; Sun, L.; Wu, Q.; Guo, W.; Li, L.; Chen, Y.; Li, Y.; Gong, C. Y.; Qian, Z.; Wei, Y. Q., Curcumin loaded polymeric micelles inhibit breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastasis. *Int. J. Pharm.* **2013**, 443, (1-2), 175-182.
39. Danafar, H.; Rostamizadeh, K.; Davaran, S.; Hamidi, M., PLA-PEG-PLA copolymer-based polymersomes as nanocarriers for delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs: preparation and evaluation with atorvastatin and lisinopril. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **2014**, 40, (10), 1411-1420.
40. Wang, Y. J.; Pan, M. H.; Cheng, A. L.; Lin, L. I.; Ho, Y. S.; Hsieh, C. Y.; Lin, J. K., Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharmaceut. Biomed.* **1997**, 15, (12), 1867-1876.
41. Wilhelm, M.; Zhao, C. L.; Wang, Y. C.; Xu, R. L.; Winnik, M. A.; Mura, J. L.; Riess, G.; Croucher, M. D., Polymer Micelle Formation .3. Poly(Styrene-Ethylene Oxide) Block Copolymer Micelle Formation in Water - a Fluorescence Probe Study. *Macromolecules* **1991**, 24, (5), 1033-1040.
42. Cao, Y.; Zhao, J. Q.; Zhang, Y. M.; Liu, J. F.; Liu, J. J.; Dong, A. J.; Deng, L. D., pH/redox dual-sensitive nanoparticles based on the PCL/PEG triblock copolymer for enhanced intracellular doxorubicin release. *RSC Adv.* **2015**, 5, (36), 28060-28069.
43. Wei, X. W.; Gong, C. Y.; Gou, M. Y.; Fu, S. Z.; Guo, Q. F.; Shi, S.; Luo, F.; Guo, G.; Qiu, L. Y.; Qian, Z. Y., Biodegradable poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *Int. J. Pharm.* **2009**, 381, (1), 1-18.
44. Schuijl, P. J. W.; Bos, H. J. T.; Brandsma, L., Rearrangements of Substituted Propargyl Vinyl Sulfides - Formation of Allenic Dithioesters and Their Conversion into Derivatives of 2h-Thiopyran and Thiopene. *Recl. Trav. Chim. Pay-B* **1969**, 88, (6), 597-&.

45. Lachia, M.; Denes, F.; Beaufiles, F.; Renaud, P., Highly diastereoselective formation of spirocyclic compounds via 1,5-hydrogen transfer: A total synthesis of (-)-erythrodiene. *Org. Lett.* **2005**, *7*, (19), 4103-4106.
46. Choo, E. F.; Boggs, J.; Zhu, C. Q.; Lubach, J. W.; Catron, N. D.; Jenkins, G.; Souers, A. J.; Voorman, R., The Role of Lymphatic Transport on the Systemic Bioavailability of the Bcl-2 Protein Family Inhibitors Navitoclax (ABT-263) and ABT-199. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, (2), 207-212.
47. Danhier, F.; Lecouturier, N.; Vroman, B.; Jerome, C.; Marchand-Brynaert, J.; Feron, O.; Preat, V., Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *J. Control. Release* **2009**, *133*, (1), 11-17.
48. Maheshwari, R. K.; Singh, A. K.; Gaddipati, J.; Srimal, R. C., Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sci.* **2006**, *78*, (18), 2081-2087.
49. Yallapu, M. M.; Jaggi, M.; Chauhan, S. C., Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, (1-2), 71-80.
50. Song, Z. M.; Zhu, W. X.; Liu, N.; Yang, F. Y.; Feng, R. L., Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery. *Int. J. Pharm.* **2014**, *471*, (1-2), 312-321.
51. Gou, M. L.; Men, K.; Shi, H. S.; Xiang, M. L.; Zhang, J. A.; Song, J.; Long, J. L.; Wan, Y.; Luo, F.; Zhao, X.; Qian, Z. Y., Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo. *Nanoscale* **2011**, *3*, (4), 1558-1567.
52. Zhao, L. Y.; Du, J. C.; Duan, Y. W.; Zang, Y. N.; Zhang, H. S.; Yang, C. F.; Cao, F. L.; Zhai, G. X., Curcumin loaded mixed micelles composed of Pluronic P123 and F68: Preparation, optimization and in vitro characterization. *Colloid. Surface B* **2012**, *97*, 101-108.
53. Lopez-Lazaro, M., Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, S103-S127.

## *2.7. Supplementary data*

### **PCL-PEG graft copolymers with tunable amphiphilicity: A study of their micelle formation, drug loading and cellular cytotoxicity**

Assala Al Samad, <sup>a,b</sup> Audrey Bethry, <sup>a</sup> Eva Koziolová, <sup>c</sup> Miloš Netopilík, <sup>c</sup> Tomáš Etrych, <sup>c</sup> Youssef Bakkour, <sup>b</sup> Jean Coudane, <sup>a</sup> Fawaz El Omar, <sup>b</sup> Benjamin Nottelet <sup>a\*</sup>

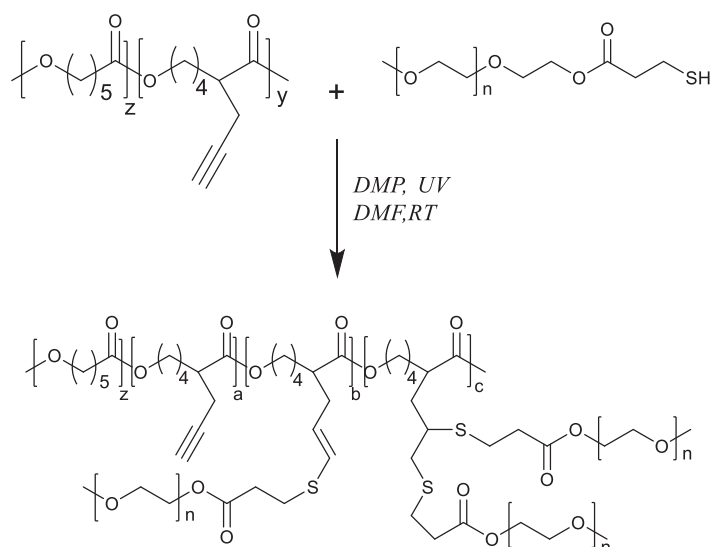
a Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247 CNRS-Université Montpellier-ENSCM, Faculté de Pharmacie, 15, avenue Charles Flahault BP14491, 34093 Montpellier cedex 5, France

E-mail: benjamin.nottelet@umontpellier.fr

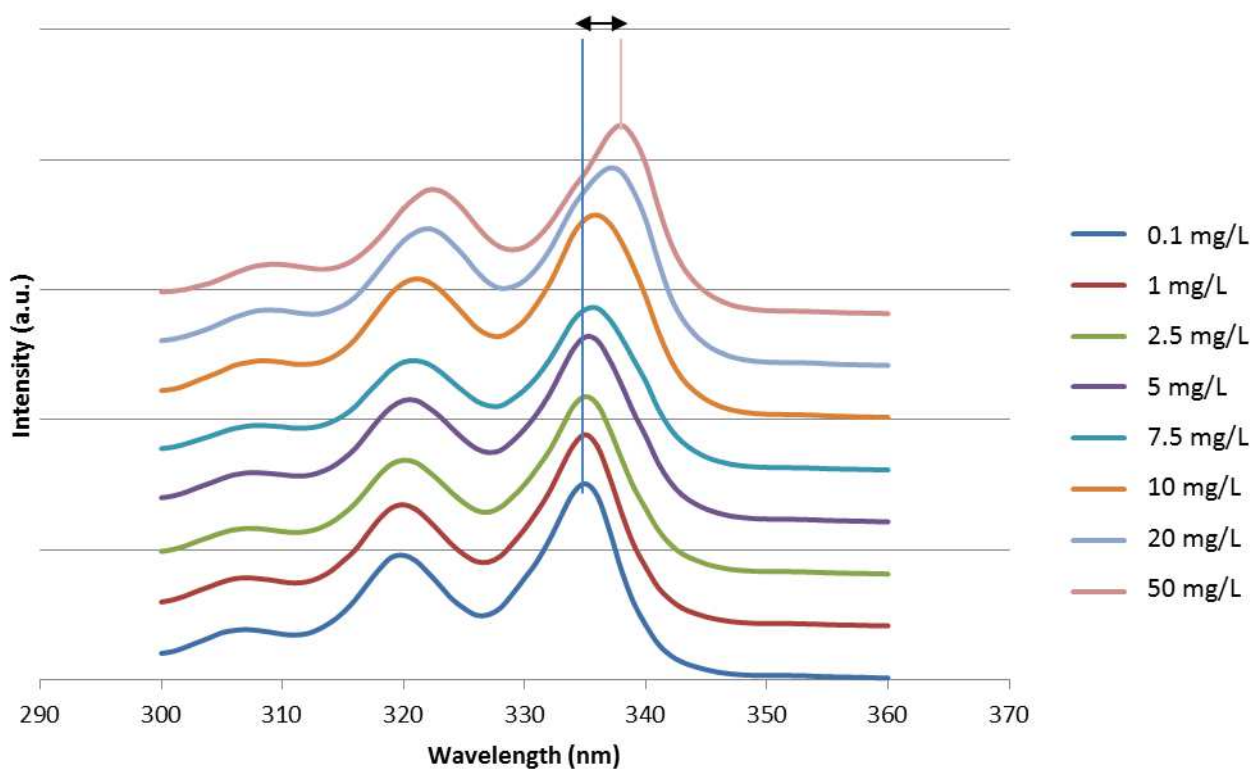
b Laboratory of Applied Chemistry, Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Lebanon

c Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i., Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic





**Scheme III-2 S1.** Schematic representation of the preparation of the PCL-g-PEG copolymers by thiol-yne approach.



**Figure III-2 S 1 :** Excitation spectra of pyrene ( $\lambda_{em} = 371 \text{ nm}$ ) as a function of the concentration of PCL-g-PEG<sub>2k3.2</sub>.

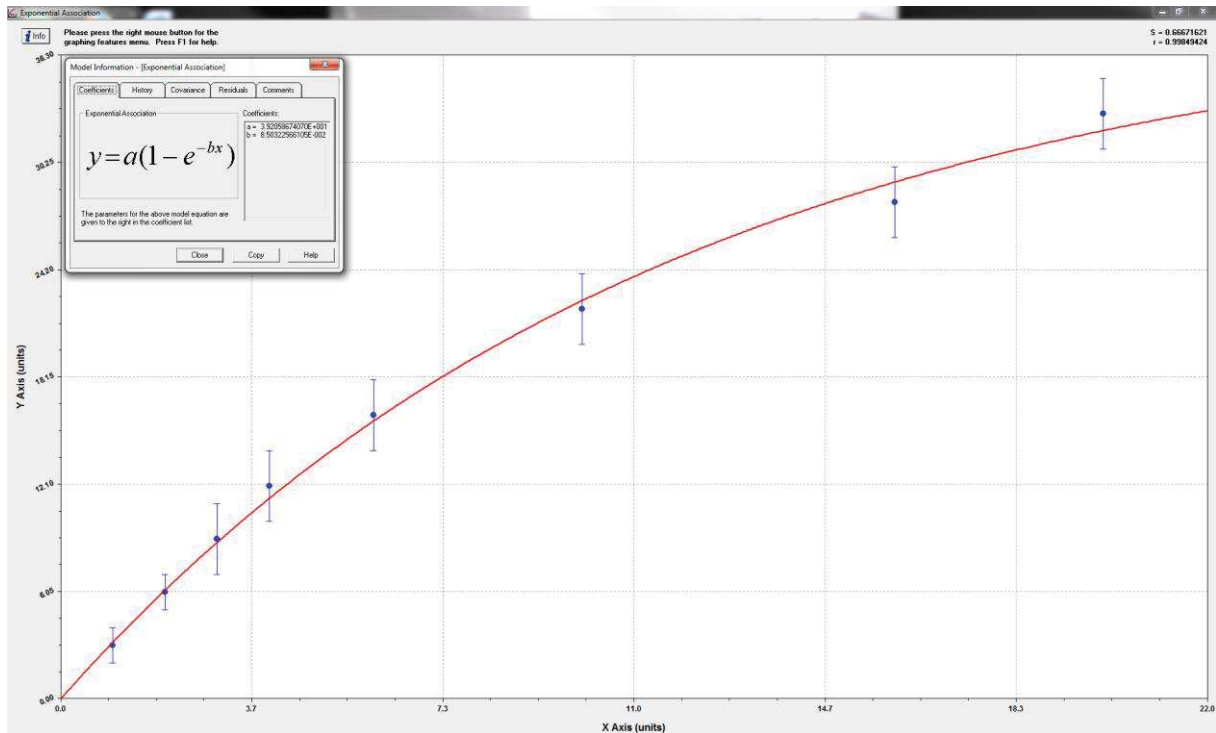


Figure III-2 S 2 a: Fit curve for the curcumin release from PCL-g-PEG0.7k<sub>1,9</sub> (software Curve Expert1.4)

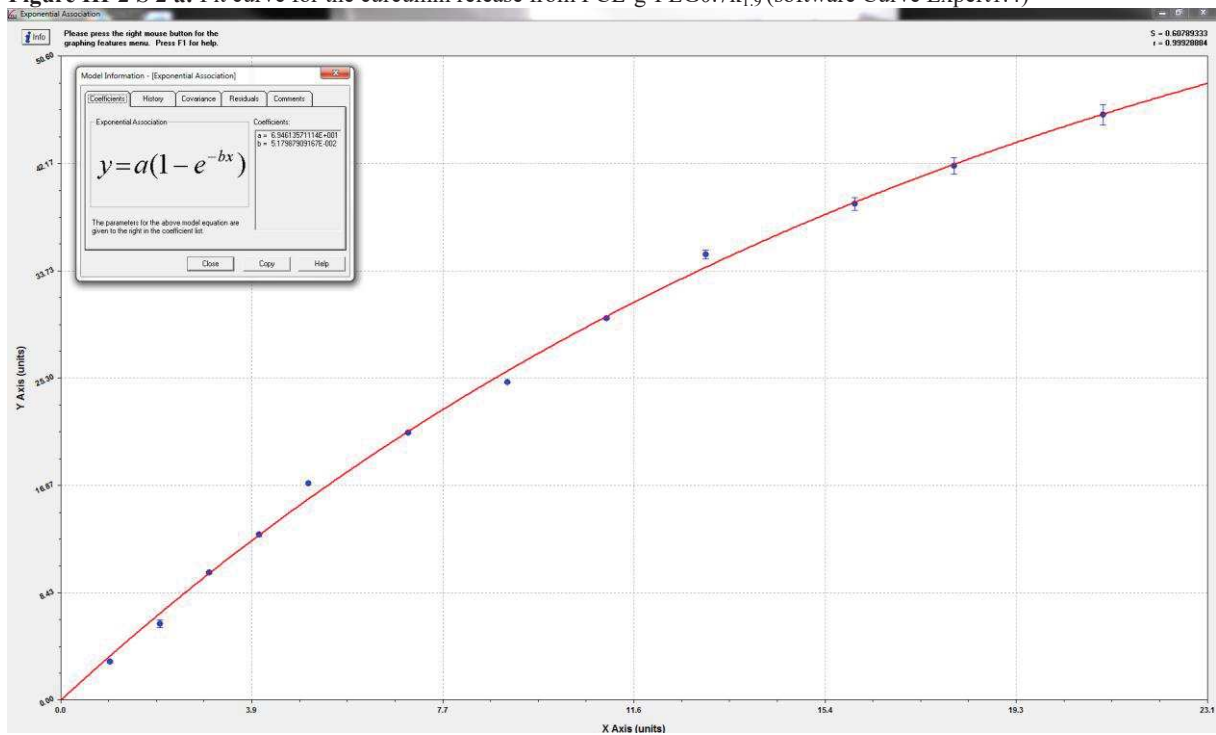


Figure III-2 S 2 b: Fit curve for the curcumin release from PCL-g-PEG2k<sub>2,6</sub> (software Curve Expert1.4)

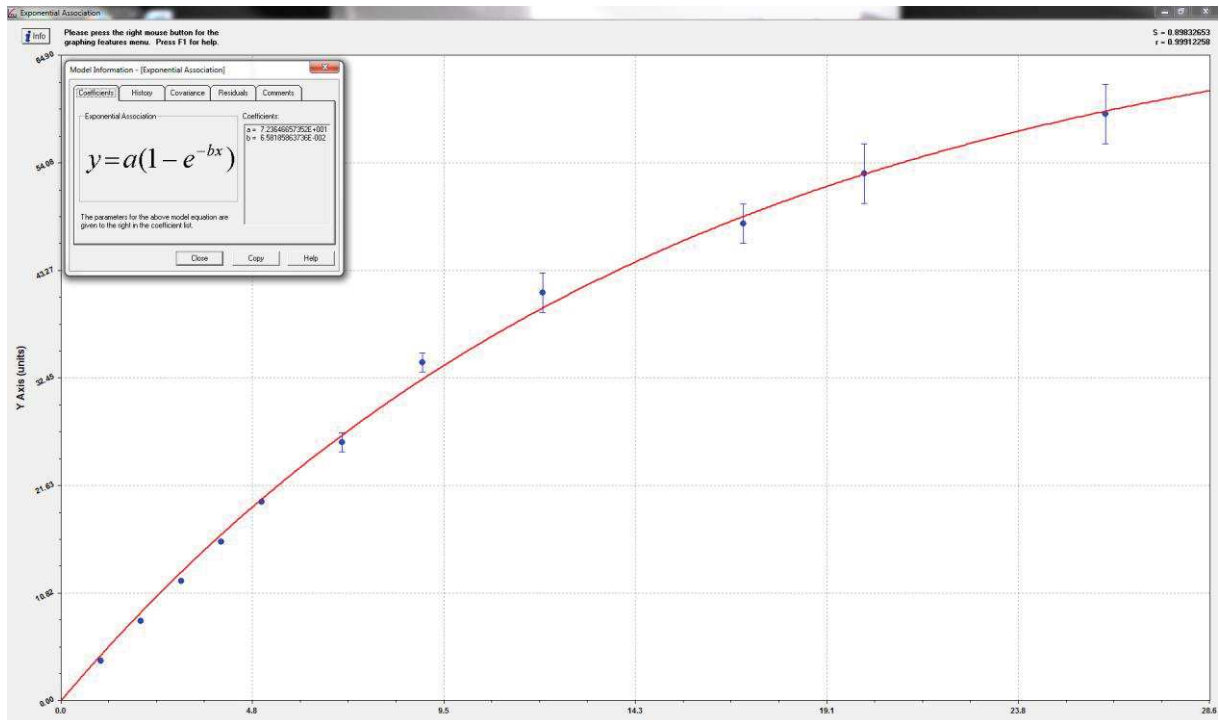


Figure III-2 S 2 c: Fit curve for the curcumin release from PCL-g-PEG2k<sub>4,9</sub> (software Curve Expert 1.4)

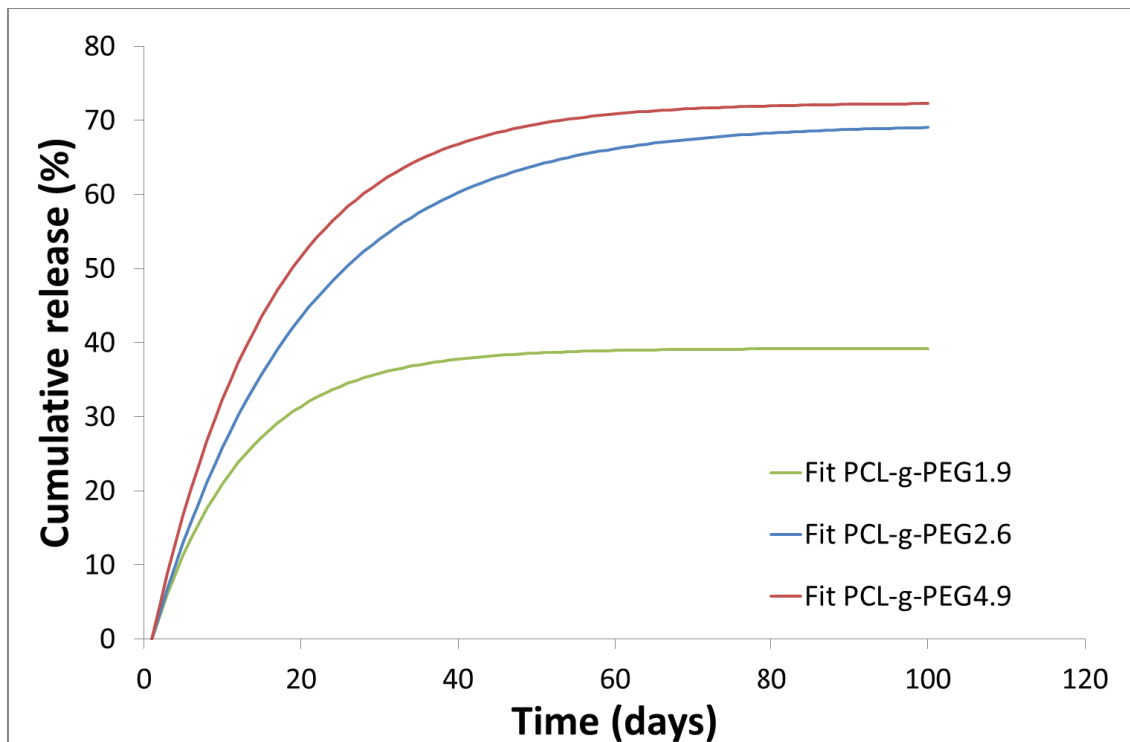
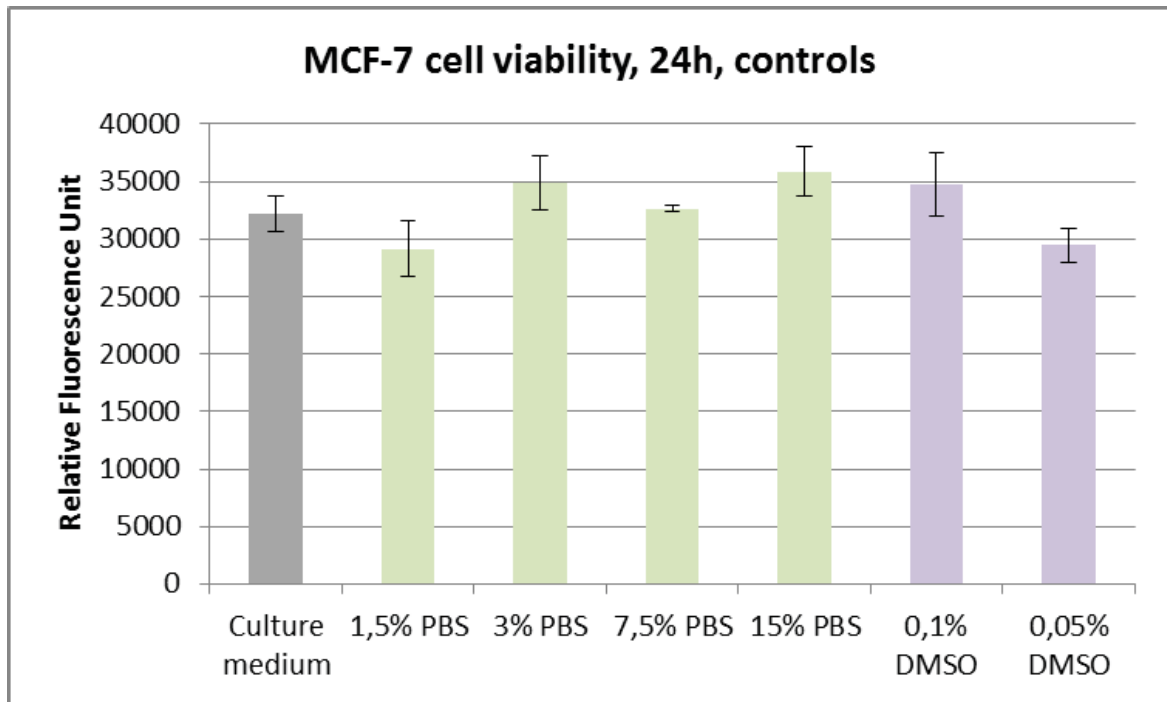
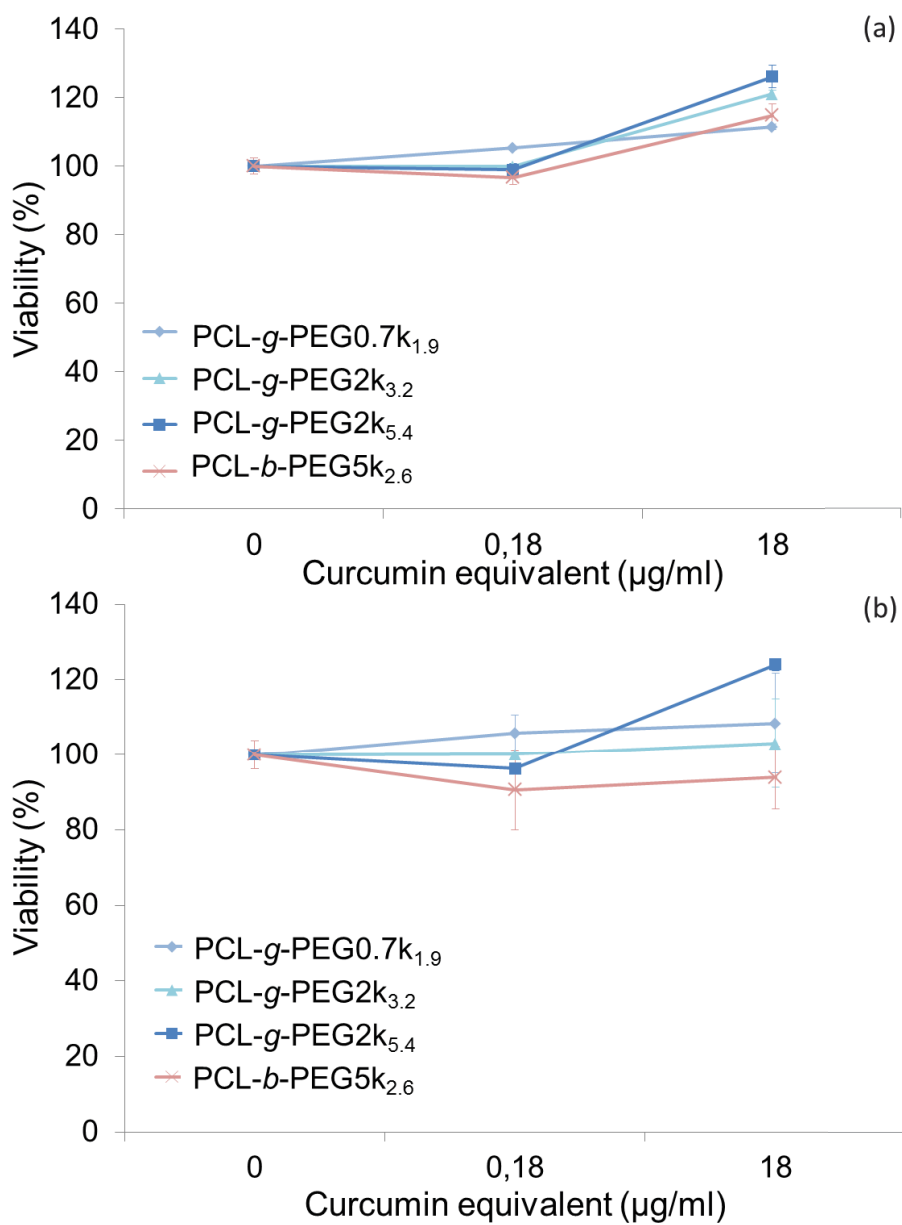


Figure III-2 S 2. Extrapolation of fit curves over 100 days for the release curcumin from PCL-g-PEG



**Figure III-2 S 3.** Viability of MCF-7 cells in different media. The grey bar represent the control in culture medium, green bars represent the culture medium supplemented with PBS (1.5% to 15%) and purple bars represent the culture medium supplemented with DMSO (0.05% and 0.1%)

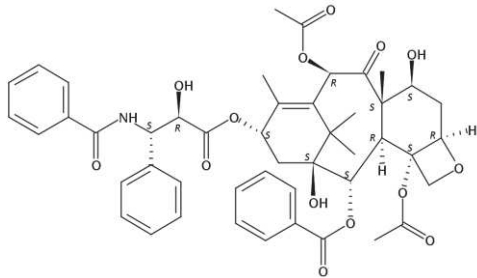
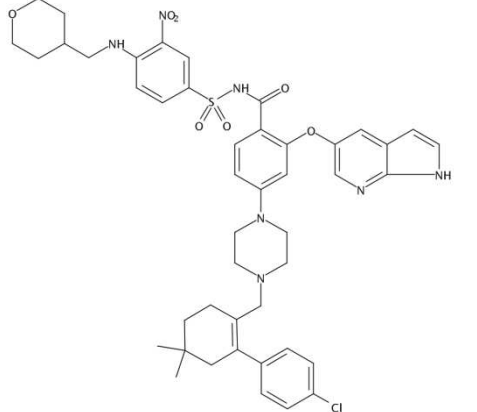
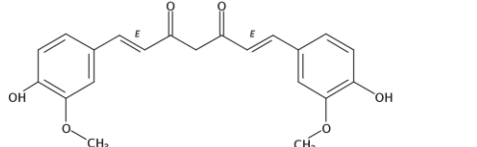
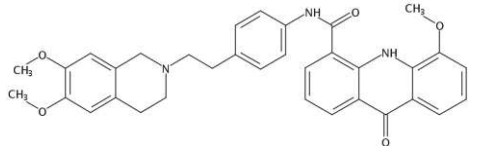
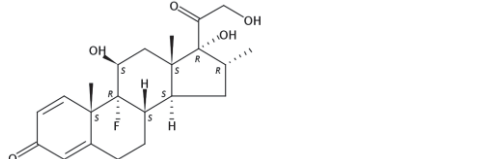
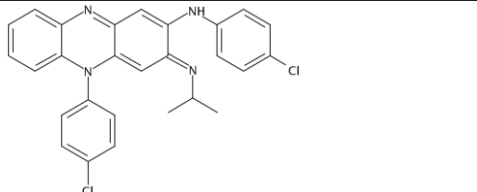


**Figure III-2 S 4.** Viability of MCF-7 cells in the presence of non-loaded nanoaggregates. The concentration of blank nanoaggregates used in this assay was equal to the concentration of loaded nanoaggregates used to reach curcumin concentrations of 0.18 and 18 µg/L. (Data are expressed as means ± SD and correspond to measurements in triplicate)

**Table III-2 S 1.** SEC analysis of PCL-g-PEG during degradation at 37°C in PBS. (Mn values expressed as means ± SD and correspond to measurements in triplicate).

Copolymer / Time	PCL-g-PEG0.7k <sub>1,2</sub>		PCL-g-PEG2k <sub>5,4</sub>	
	Mn (g/mol)	Đ	Mn (g/mol)	Đ
<b>T<sub>0</sub></b>	19400 ± 1400	2,1 ± 0,2	27000 ± 3700	1,6 ± 0,2
<b>1 W</b>	27000 ± 1150	2,6 ± 0,2	20000 ± 7200	1,5 ± 0,1
	1700 ± 100	1,2 ± 0,2		
<b>1 M</b>	27500 ± 1800	2,8 ± 0,1	17400 ± 5500	1,2 ± 0,1
	1200	1,2	2900 ± 100	1,0 ± 0,1
<b>3 M</b>	16400 ± 500	1,9 ± 0,1	37100 ± 2300	1,4 ± 0,1
	960 ± 60	1,1	2600 ± 100	1,0 ± 0,1
<b>6 M</b>	12800 ± 400	1,6 ± 0,1	26000 ± 4900	1,4
	900 ± 50	1,1	2500 ± 100	1,1

**Table III-2 S 2.** Chemical structure and solubility parameters of tested APIs

Drug	Chemical structure	Solubility	logP*
Paclitaxel		1 mg/L Zhang JA. <i>et al. Eur J Pharm Biopharm</i> <b>2005</b> , 59, 177.	3.95
ABT-199 (Venetoclax)		< 0.4 mg/L 3. Choo E.F. <i>et al. Drug Metab Dispos</i> <b>2014</b> , 42, 207.	8.05
Curcumin		0.6 mg/L B.T. Kurien <i>et al. Assay Drug Dev Technol</i> , <b>2007</b> , 5, 567.	3.07
Elacridar		120 µg/L Sane R. <i>et al. J Pharm Sci</i> <b>2013</b> , 102, 1343.	4.43
Dexamethasone		0.1 g/L Dilova V. <i>et al. Boll Chim Farm</i> <b>2004</b> , 143, 20.	2.03
Clofazimine		0.3 g/L Peters K. <i>et al. J. Antimicrob. Chemother.</i> <b>2000</b> , 45, 77.	7.46

\*From Scifinder, calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02

### ***3. Introduction sur les copolymères PCL-PEG comme plateforme unique de synthèse de vecteurs clivables ou de ciblage***

#### **Introduction**

Les nanosystèmes à base de PCL-g-PEG de deuxième génération encapsulant la curcumine ont montré une toxicité *in vitro* sur les cellules MCF-7. L'idée ici est de synthétiser des nanovecteurs de troisième génération afin de favoriser leur accumulation et leur internalisation cellulaire et par suite augmenter l'effet de l'anticancéreux. Pour cela, on a choisi de garder notre stratégie thiol-yne pour greffer de ligands de ciblage cellulaire actif et passif.

#### **Synthèse de PCL-g-PEG décorés par un peptide de ciblage (cRGD) ou par un peptide clivable enzymatiquement (MMPcp)**

D'une part, on a greffé des nanovecteurs décorés par le cRGD pour cibler les intégrines. La synthèse a été faite en 4 étapes à partir de la PCL-Pg (Fig. 1). Elle a commencé par le greffage des chaînes cRGD-PEG<sub>3000</sub>-SH sur la PCL-Pg par voie thiol-yne, suivi par des chaînes PEG<sub>2000</sub>-SH pour augmenter l'hydrophilie. Ensuite, la FITC est greffée sur la PCL via l'amine d'une cystéamine qui est greffée sur la PCL par voie thiol-yne. Plusieurs copolymères aux hydrophilies différentes (EO/CL entre 1,4 et 3,1) et présentant des nombres différents d'unités cRGD (0,4 et 1,7 chaînes cRGD par PCL) ont été préparés. A des fins de comparaison, un copolymère PCL-g-PEG<sub>3,2</sub> sans cRGD est synthétisé de la même manière.

D'autre part, on a synthétisé un système de ciblage passif noté PCL-g-(MMPcp-PEG<sub>750</sub>). Ces copolymères possèdent des chaînes peptidiques (GPQGLAGQ, notées MMPcp) clivables enzymatiquement par les métalloprotéases MMP-2 et MMP-9. La synthèse se fait de manière similaire aux copolymères précédents, mais cette fois-ci l'immobilisation de cystéamine, puis FITC a été faite avant le greffage de MMPcp-PEG<sub>750</sub>. Une gamme de copolymères de faibles hydrophilies et ayant des nombres différents de MMPcp a été obtenue: PCL-g-(PEG<sub>1,6</sub>-MMPcp<sub>2,7</sub>); PCL-g-(PEG<sub>1,6</sub>-MMPcp<sub>2,7</sub>); PCL-g-(PEG<sub>1,9</sub>-MMPcp<sub>4,7</sub>). Les copolymères formés étant peu hydrodispersibles dans le PBS, des nanoobjets ont été formulés par mélange à 50% en masse de ces copolymères enzyme-répondant avec un copolymère hydrophile PCL-g-PEG<sub>4,2</sub>.



### **Internalisation cellulaire de PCL-g-PEG-RGD**

L'internalisation des nanoobjets formés par les copolymères PCL-g-PEG-cRGD a été étudiée par analyse FACS sur 3 types de cellules cancéreuses qui expriment plus ou moins les intégrines (PC-3, MCF-7 et LNCaP). L'internalisation avec les cellules présentant les intégrines (PC-3) est plus importante pour les copolymères qui ont le nombre le plus élevé de peptides de ciblage cRGD. Par contre, l'augmentation du nombre de ligands cRGD n'a pas influencé l'internalisation avec les LNCaP.

### **Cytotoxicité de PCL-g-(MMPcp-PEG) chargés en curcumine**

La cytotoxicité des nanoagrégats des copolymères PCL-g-(MMPcp-PEG<sub>750</sub>) chargés en curcumine a été évaluée sur cellules HEK  $\beta$ 3 qui sécrètent les enzymes MMP-2 et MMP-9. Les résultats montrent un effet toxique plus important pour les systèmes ayant un nombre élevé de chaînes MMPcp indiquant une coupure de chaînes PEG et une meilleure internalisation des objets plus hydrophobes.

### **Conclusion**

En conclusion, la plateforme PCL-yne donne accès à des nanovecteurs de ciblage et des nanovecteurs clivables par le biais d'une unique stratégie « thiol-yne ». Cette approche est efficace pour moduler les propriétés des systèmes de libération de PA. Cette approche permet en particulier d'améliorer l'internalisation cellulaire *in vitro* des copolymères présentant des fonctions peptidiques par rapport à leurs analogues classiques PCL-g-PEG. Ces résultats montrent que ces systèmes sont prometteurs pour des approches *in vivo*.

#### ***4. Single PCL-PEG copolymers platform for flexible drug delivery strategies: targeting or MMP-sheddable vectors though simple photochemistry***

*Assala Al Samad,<sup>a,b</sup> Audrey Bethry,<sup>a</sup> Olga Janouskova,<sup>c</sup> Jérémie Ciccione,<sup>a</sup> Christiane Wenk,<sup>d</sup> Gilles Subra,<sup>a</sup> Tomas Etrych,<sup>c</sup> Fawaz El Omar,<sup>b</sup> Jean Coudane,<sup>a</sup> Youssef Bakkour,<sup>b</sup> Benjamin Nottelet<sup>a\*</sup>*

a Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247 CNRS-Université Montpellier-ENSCM, Faculté de Pharmacie, 15, avenue Charles Flahault BP14491, 34093 Montpellier cedex 5, France

E-mail: benjamin.nottelet@univ-montpl.fr

b Laboratory of Applied Chemistry, Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Lebanon

c Acad Sci Czech Republic, Inst Macromol Chem, CR-16206 Prague 6, Czech Republic

d INSERM, U823, Inst Albert Bonniot, Grenoble, France and Univ Grenoble 1, Grenoble, France

#### ***4.1. Abstract***

Enhanced permeation and retention (EPR) effect is well known for improving the accumulation of nanocarriers at tumor sites, but its efficiency remains low. To overcome this limitation, integrin and matrix metalloprotease (MMP) that are overexpressed in a variety of human cancer cells are exploited for enhanced anticancer drug delivery strategies. In this study, the ease of modulation provided by a common functional poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) platform is exploited to generate efficient tunable amphiphilic vectors for targeting through a dual approach. Families of targeting graft copolymers PCL-*g*-(PEG-cRGD) or sheddable graft copolymers PCL-*g*-(MMPcp-PEG) (MMPcp = MMP cleavable peptide) copolymers were easily synthesized by thiol-yne photografting. The copolymers were self-assembled into nanoaggregates loaded or not with curcumin to efficiently deliver the drug into target cells. The influence of the cRGD content on the uptake and the influence of MMPcp content on the cytotoxicity were assessed. Results confirmed the higher uptake of PCL-*g*-(PEG-cRGD) with higher RGD content on integrin positive PC-3 compared to the integrin negative MCF-7 and LNCaP cell lines. Cytotoxicity studies showed a higher toxicity of PCL-*g*-(MMPcp-PEG) vs. PCL-*g*-PEG nanoaggregates loaded with curcumin on MMPs expressing HEK  $\beta$ 3 cells. Therefore, the versatility offered by the strategy used to generate PCL-*g*-(PEG-cRGD) and PCL-*g*-(MMPcp-PEG) appears as an efficient approach to finely design multifunctional drug delivery systems for cancer therapy.

**Keywords:** functional polyester; drug delivery; integrin; targeting; stimuli responsive polymer; matrix metalloproteinase; enzyme responsive.

#### ***4.2. Introduction***

Cancer is a disease causing high mortality in the 21<sup>st</sup> century. Current treatments include radiations, surgical interventions, and use of chemotherapeutic drugs. These treatments still encounter critical concerns in terms of results and in terms of side effects to the patient. One major limitation of direct injection of chemotherapeutic agents is for example their non-specific distribution to tumors, their short half-life and the final low concentration accumulated in tumor tissues. For this reason, for many years drug delivery systems (DDS) for cancer targeting have been developed. DDS include liposomes [1], hydrogels [2], inorganic nanoparticles [3], hybrid nanoparticles [4], polymeric vesicles [5] and micelles [6].

A good DDS should have long circulation time in blood, good accumulation in tumor and sufficient internalization into cancer cells. To fulfill these requirements, polyethylene glycol (PEG) has been extensively used as a hydrophilic block to generate PEGylated nanoparticles or polymeric micelles having PEG shells. Such DDS have demonstrated longer circulation time, and higher passive accumulation in the tumor thanks to the EPR effect if their sizes are below 50 nm [7]. In this frame amphiphilic copolymers based on aliphatic polyesters, mainly PEG-*b*-PLA and PEG-*b*-PLGA diblock copolymers, have been largely studied due to their degradability and biocompatibility.<sup>3, 4</sup> After many years, tremendous amounts of research and intensive development, some have finally found their way to the market like the PEG-PLA-based Genexol®,<sup>5</sup> which paves the way to future products and confirms the potential of polyester-based drug delivery systems. However, other candidates including PCL-PEG copolymers showed promising results for in vitro treatment of various cancer cells lines. [8], [9]. We recently exemplified this trend with PCL-*g*-PEG copolymers whose hydrophilic/hydrophobic balance (ratio of EG/CL units) was finely controlled in the range 1.9 to 5.4. The copolymers were able to form nanoaggregates with small diameters ( $D_h \leq 50$  nm) loaded with various drugs ranging from anticancer, to anti-inflammatory or antibacterial drugs. Cytotoxicity towards cancer cells MCF-7 was obtained with low dose of curcumin loaded in the DDS and a dependence of the activity with respect to the hydrophilic/hydrophobic balance and PEG molecular weight was observed.[10] However, this DDS was only designed to be passively accumulated in tumor tissues by EPR effect. In order to further improve the efficiency of DDS, two classic strategies have been followed and reported in literature.

The first strategy relies on the coupling of ligands to the polymer structure to interact with specific receptors that are overexpressed on the tumor cells. Targeting ligands can therefore increase cellular uptake of DDS in tumor cells. [11] Folic acid [12] and the tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD) sequence have been extensively studied as targeting ligands and were therefore coupled to many amphiphilic copolymers DDS. Cyclic-RGD (cRGD), one of the well-known peptide targeting moieties, shows high binding affinity to some kind of tumor cells using the specific affinity RGD-integrin  $\alpha_v\beta_3$ . [13]  $\alpha_v\beta_3$  are overexpressed in many tumors, including prostate, skin, ovary, lung, kidney and breast cancers.[14], [15] In order to take advantage of the overexpression of integrins, some groups reported on cRGD-functional PCL-*b*-PEG that showed a better internalization in tumor endothelial cells through receptor-

mediated endocytosis in comparison to non-functionalized micelles.[16] The second strategy uses stimuli-responsive polymers. Two objectives are targeted with this approach. First aim is to generate a fast drug release from the polymer cargo by a physiologic trigger, generally a change of pH or of redox potential. The second aim is to modify the physico-chemical parameters of the polymer cargo to help cellular uptake. This is the case of the so-called sheddable or unveiling DDS whose architecture is modified by a physiologic trigger. The stimuli-responsive polymers used contain degradable bonds that are cleaved when reaching the modified physiologic environment of cancer cells compared to normal cells. For examples, tumor cells are known for higher acidity [17] and to overexpress some matrix metalloproteinase (MMP) [18]. A recent study on MMP-9 responsive PEG cleavable nanovesicles demonstrated the *in vitro* cleavage of hydrophilic coronas of the nanoobjets leading to an improved release of drug. [19] Another example showed that the insertion of gelatinase cleavable peptide (PVGLIG) between mPEG and PCL blocks yielded copolymers (mPEG-PVGLIG-PCL) showing enhanced cellular uptake in high gelatinase expressing cell lines. [20]

Our aim in the present work is to take advantage of the flexible PCL-g-PEG platform, where the PCL backbone contains alkyne groups, to synthesize targeting or MMP-responsive amphiphilic graft copolymers. In more details, we synthesize PCL-g-(PEG-cRGD) and PCL-g-(MMPcp-PEG) (MMPcp stands for MMP-cleavable peptide) with various cRGD and MMPcp contents thanks to a thiol-yne photoaddition. The uptake of FITC labeled copolymers as a function of the RGD content is then quantified by flow cytometry on three cancer cell lines expressing various levels of integrins. We then evaluate various curcumin formulations based on the stimuli-responsive PCL-g-(MMPcp-PEG) copolymers on HEK293-β3 cells that express high levels of MMP-9 and MMP-2. The impact of composition on the formulations cytotoxicity is discussed as a function of the number of MMP-cleavable peptides and of the overall hydrophilic/hydrophobic balance.

### ***4.3. Materials And Methods***

- **Materials**

PCL ( $M_n \approx 45 \text{ kg mol}^{-1}$ ), propargyl bromide (80 wt% in toluene), lithium diisopropylamide (2M in THF/heptane/ethylbenzene), MeO-PEG-OH (2000 g/mol, noted PEG2k), 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA, >99%), mercaptopropionic acid (MPA, >99%)

cysteamine hydrochlorid (Cys, >98%), dicyclohexylcarbodiimide (DCC, >99%), dimethylaminopyridine (DMAP, >99%), fluorescein 5-isothiocyanate (FITC, > 90%), CaSO<sub>4</sub>, PBS 1X and curcumin from *Curcuma longa* (Cur, > 65%) were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). N-N-diisopropylethylamine (DIPEA >99.5%) was obtained from Acros. NH<sub>4</sub>Cl (>99%) was purchased from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France), technical grade MgSO<sub>4</sub> from Carlo Erba (Val de Reuil, France), CaCl<sub>2</sub> from Prolabo, and methanol (≥99.8%), dichloromethane (DCM, ≥99.9%), dimethylformamide (DMF, ≥99.8%), ethanol, diethyl ether (Et<sub>2</sub>O, ≥99.8%), acetone (≥99.5%), amicon ultra centrifugal filter units (Ultra-15, 10 kDa) were purchased from Sigma Aldrich. Spectra/Por® dialysis tubes (cut-off, 6000–8000 Da or 100-500 Da) were obtained from Spectrum Labs.

- **Characterizations**

*NMR spectroscopy analyses* were conducted at room temperature using an AMX300 Bruker spectrometer operating at 300 MHz. Deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) and deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*<sub>6</sub>) were used as solvents, chemical shifts were expressed in ppm with respect to tetramethylsilane (TMS). Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) experiments were performed on a Bruker Avance III spectrometer operating at 600 MHz, using DMSO-*d*<sub>6</sub> as solvent.

*Size exclusion chromatography (SEC)* was performed on a Waters equipment fitted with a 60 cm long 5 μm mixed C PLgel column and a Waters 410 refractometric detector. The mobile phase was chloroform at 1 mL/min flow rate at 30°C. Typically, polymer (10 mg) was dissolved in chloroform (2 mL) and the resulting solution was filtered through a 0.45 μm Millipore filter before injection of 20 μL of filtered solution. The number average molecular weight (*M<sub>n</sub>*) and the dispersity (*D*) of the polymers were expressed according to calibration using polystyrene standards.

*Light scattering measurements.* Dynamic light scattering (DLS) was carried out with a Malvern Instrument Nano-ZS equipped with a He–Ne laser ( $\lambda = 632.8$  nm). Polymer solutions at 1.0 mg.mL<sup>-1</sup> were filtered through a 0.45 μm PTFE microfilter before measurements. The correlation function was analyzed via the general purpose method (NNLS) to obtain the distribution of diffusion coefficients (*D*) of the solutes. The apparent equivalent hydrodynamic diameter (*D<sub>H</sub>*) was determined from the cumulant method using the

Stokes–Einstein equation. Mean radius values were obtained from triplicate runs. Standard deviations were evaluated from hydrodynamic radius distribution.

*UV-spectrometry* was performed on a Perkin-Elmer Precisely Lambda 35 spectrometer, with 1 cm optical path quartz cuvettes.

- **Synthesis of FITC-labeled PCL-*g*-(PEG-*c*RGD)**

*Synthesis of cRGD-PEG-SH*

cRGD-PEG-NH<sub>2</sub> was kindly provided by Pr. Gilles Subra and Jérémy Ciccione. cRGD-PEG-NH<sub>2</sub> (PEG Mn = 3000 g/mol) was prepared following standard solid phase peptide synthesis on the SYN BIO3 platform. PEG immobilized solid support was used thus allowing the preparation of peptide derivatized PEG with no trace of free PEG chains. cRGD-PEG-NH<sub>2</sub> (60 mg, 16,6 μmol) was then dissolved in 1.5 ml of anhydrous DCM. MPA (3 μl, 33 μmol), DCC (3.4 mg, 18,2 μmol), DMAP (6.1 mg, 5 μmol) in 0.5 ml DCM were added to the reaction mixture. After 18 hours of stirring under nitrogen the product was precipitated in 20 ml of Et<sub>2</sub>O cooled by liquid nitrogen. It was then centrifuged and washed with cold Et<sub>2</sub>O two times. The product was further purified by dialysis against methanol using dialysis membrane (MW cutoff 500 Da). The solvent was evaporated under reduced pressure and the product was dried under vacuum.

*Grafting of cRGD-PEG-SH*

PCL functionalized on the backbone with propargyl groups (PCL-yne, 8% alkyne groups with respect to CL units,  $\overline{Mn} = 21300$  g/mol;  $\overline{D} = 2.4$ ) was prepared according to a previous work.[21] Grafting of RGD-PEG-SH on PCL-yne was done by thiol-yne photochemistry. Typically, PCL-yne (100 mg; 68 μmol of alkyne groups) and RGD-PEG-SH (51 mg; 13.6 μmol) were dissolved in 2 ml DMF in a Schlenk flask (A) (Table III-4 1, entry 1). In parallel, DMPA (35 mg; 136 μmol) was dissolved in DMF in another Schlenk flask (B) covered by aluminum foil. The 2 flasks were closed by septums after purging with argon for 10 min. Following the addition of DMPA (25% of total amount) to (A) under nitrogen, the reaction medium was irradiated with UV light. Reaction was carried out for 2 hours under constant stirring and constant UV light irradiation (100 mW.cm<sup>-2</sup>) and DMPA was added by successive additions (4 times) at fixed intervals over the reaction time. The reaction mixture was purified using a mixture of water/DMF (50:50) by a centrifugal filter unit (MW cutoff 10 000 Da).



The solvent was evaporated under reduced pressure and the copolymer was dried under vacuum.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = PCL backbone 4.0 (2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2.3 (2H,  $\text{C(O)CH}_2$ ), 1.6 (4H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 1.3 (2H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ); PEG side chains 3.6 (4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ).

#### *Synthesis of PCL-g-(PEG-cRGD)*

Following the functionalization with cRGD-PEG chains, in order to further hydrophilize the graft copolymers, PEG-SH (PEG Mw = 2000 g/mol) was synthesized and grafted on propargylated PCL-g-PEG-RGD according to the conditions used in our previous work.[10]

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = PCL backbone 4.0 (2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2.3 (2H,  $\text{C(O)CH}_2$ ), 1.6 (4H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 1.3 (2H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ); PEG side chains 4.2 (2H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 3.6 (4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.3 (3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.8 (2H,  $\text{CH}_2\text{SCH}_2$ ), 2.6 (2H,  $\text{COOCH}_2$ ).

#### *FITC-labeled PCL-g-(PEG-cRGD)*

In a typical experiment, PCL-g-(PEG-cRGD) copolymer (50 mg, initially 34  $\mu\text{mol}$  alkyne groups on PCL-yne) and Cys (116 mg, 1 mmol) were dissolved in 2 ml DMF in a Schlenk flask. In parallel, DMPA (25 mg, 102  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in DMF in another Schlenk flask covered by aluminum foil. The 2 flasks were closed by septums after purging with argon for 10 min. The thiol-yne reaction was run as described above. The reaction mixture was purified by dialysis against water using dialysis membrane (MW cutoff 10000 Da). The cysteamine-functional copolymer was isolated after freeze-drying.

Cysteamine-functional copolymer (74 mg) was then dissolved in 7 ml of anhydrous ethanol and N,N-diisopropylethylamine (DIPEA) (28  $\mu\text{l}$ ) was added. FITC (42 mg, 11 mmol) was dissolved in 4 ml of dry acetone and added to the copolymer solution. The mixture was covered by aluminum foil and stirred during the night at room temperature. After evaporation of acetone, the FITC-labeled copolymer was purified by dialysis against water by using a centrifugal filter unit (MW cutoff 10 000 Da). FITC-labeled PCL-g-(PEG-cRGD) was isolated after freeze-drying. FITC content was assessed by UV/vis spectrometry at 497 nm. Quantification was performed with respect to a calibration curve of FITC in acetone.



- **Synthesis of FITC-labeled PCL-g-(MMPcp-PEG)**

*FITC-labeled PCL*

PCL-yne (800 mg; 0.55 mmol alkyne groups) was dissolved with Cys (31 mg; 0.27 mmol) in 3 ml DMF in a Schlenk flask. Similarly, DMPA (140 mg, 0.546 mmol) was dissolved in 1 ml DMF in a Schlenk flask covered by aluminum foil. The 2 flasks were closed by septums after purging with argon for 10 min. The thiol-yne reaction medium was irradiated for 2 hours with UV light ( $100 \text{ mW.cm}^{-2}$ ) and DMPA was added by successive additions (4 times) at fixed intervals over the reaction time. The solution was concentrated under vacuum and precipitated in cold methanol before drying of the copolymer under vacuum.

The copolymer was then dissolved with DIPEA (139  $\mu\text{l}$ ; 0.82 mmol) in 6 ml of anhydrous DMF. In parallel, FITC (159 mg; 0.41 mmol) was dissolved in 2 ml of anhydrous DMF and added to copolymer solution. The mixture was covered by aluminum foil and stirred for 3 hours at room temperature. The solution was purified by dialysis against DMF using a dialysis membrane (MW cutoff 3 500 Da). The solvent was evaporated under reduced pressure and the copolymer was dried under vacuum.

*Synthesis of FITC-labeled PCL-g-(MMPcp-PEG)*

PEG-MMPcp-SH was kindly provided by Pr. Gilles Subra and Jérémy Ciccione. PEG-MMPcp-SH (PEG Mn = 750 g/mol ; MMP cleavable peptide = GPQGLAGQC) was prepared following standard solid phase peptide synthesis on the SYN BIO3 platform. FITC-labeled PCL-g-(MMPcp-PEG) was obtained by thiol-yne reaction of FITC-labeled PCL and PEG-MMPcp-SH. Typically, FITC-labeled PCL (20 mg) and PEG-MMPcp-SH (140 mg; 6 eq with respect to alkyne groups) were dissolved in 1.5 ml DMF in a Schlenk flask. Similarly, DMPA (10 mg, 4 eq. with respect to alkyne groups) was dissolved in 0.5 ml DMF in a Schlenk flask covered by aluminum foil. The 2 flasks were closed by septums after purging with argon for 10 min. The thiol-yne reaction medium was done as described above. The reaction mixture was purified by dialysis against water by a dialysis membrane (MW cutoff 10 000 Da). The copolymer was finally freeze-dried.

**Copolymer notations**

For sake of clarity, the following notations were used to identify the various copolymers:

PCL-g-PEG<sub>X</sub>; PCL-g-(PEG<sub>X</sub>-cRGD<sub>Y</sub>); PCL-g-(MMPcp<sub>Y</sub>-PEG<sub>X</sub>) with X the value of the EG/CL ratio representing the hydrophilic/hydrophobic balance of the copolymer and Y the number of cRGD or MMPcp moieties per copolymer.

- **Preparation of nanoaggregates**

*Preparation of targeting nanoaggregates*

Nanoaggregates were prepared by the self-assembly method according to our previous work.[10] In brief, PCL-g-(PEG-cRGD) (10 mg) was dissolved in 2 mL of acetone, and then poured into 10 mL of PBS. Nanoaggregates spontaneously formed following the slow evaporation of acetone under atmospheric pressure.

*Preparation of MMP sensitive nanoaggregates*

In brief, for blank nanoaggregates PCL-g-(MMPcp-PEG) (5 mg) and PCL-g-PEG (5 mg) were dissolved in 2 mL of acetone, and then poured into 10 mL of PBS. The slow evaporation of acetone under atmospheric pressure allows the formation of nanoobjects.

Curcumin loaded nanoaggregates were also prepared by the self-assembly method. Typically, curcumin (5 mg), PCL-g-(MMPcp-PEG) (17.5 mg) and PCL-g-PEG (17.5 mg) were dissolved in 2 mL acetone. Then 5 mL of PBS were added. The mixture was stirred one hour using an Ultra-Turrax stirrer (8000 rpm). The remaining acetone was evaporated under vacuum. The solution was then centrifuged for 10 min at 3600 rpm and 20°C before filtration through a 0.45 µm filter to eliminate the unloaded drug.

*Determination of drug loading and encapsulation efficiency*

Drug loading (DL) and encapsulation efficiency (EE) were determined by UV/Vis spectrophotometry at 425 nm. Quantification was performed with respect to a calibration curve of curcumin in acetone/water (20:80). The DL content and EE were calculated based on the following formulae:

$$DL (\%) = 100 \times (M_C) / (M_P + M_C)$$

$$EE (\%) = 100 \times (M_C) / (M_{Ci})$$

With  $M_C$  = mass of curcumin in micelles,  $M_P$  = mass of copolymer and  $M_{Ci}$  = mass of curcumin initially added to prepare micelles.

- **Quantification of fluorescently labeled blank micelles uptake to the cells by flow cytometry**

PC-3 (human prostate adenocarcinoma cell line, (ATCC)), LNCaP (human prostate adenocarcinoma cell line, (ATCC)), or MCF-7 (human mammary gland adenocarcinoma cell line, (ATCC)), cells were seeded at  $5 \times 10^4$  per well into a 24-well plate one day before incubation with blank micelles labeled with FITC. Micelles at four different concentrations (1, 10, 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) were incubated with the cells for 0,5 or 2 h in a 5 %  $\text{CO}_2$  atmosphere at 37 °C. Then the cells were detached from the well by incubation in detaching solution (0.5 % BSA, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4), centrifuged and resuspended in 0.5 ml of PBS-0.5 % BSA with 5  $\mu\text{g/ml}$  of Hoechst 333258. Hoechst 333258 was used to label death cells. The median of FITC fluorescence intensity of live cells were evaluated depending on the incubation in different concentration of micelles. For the comparison of binding efficacy the intensity of the signal was recalculated per 1% of FITC on the micelles. The samples were measured and analyzed by FACS Verse (Becton Dickinson) and FlowJo software. The binding efficacy of micelles was evaluated at two incubation times in duplicates. As a negative control the cells without incubation with micelles were used.

- **Cytotoxicity**

HEK293- $\beta 3$  cells were procured from Jean-Luc COLL's lab, Albert Bonniot Institute, Grenoble. HEK293- $\beta 3$  cells overexpressed integrin  $\beta 3$  chain lead to an increased level of MMP-2 and MMP-9 expression [13]. Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin / streptomycin at 37°C in a humidified incubator containing 5%  $\text{CO}_2$ .

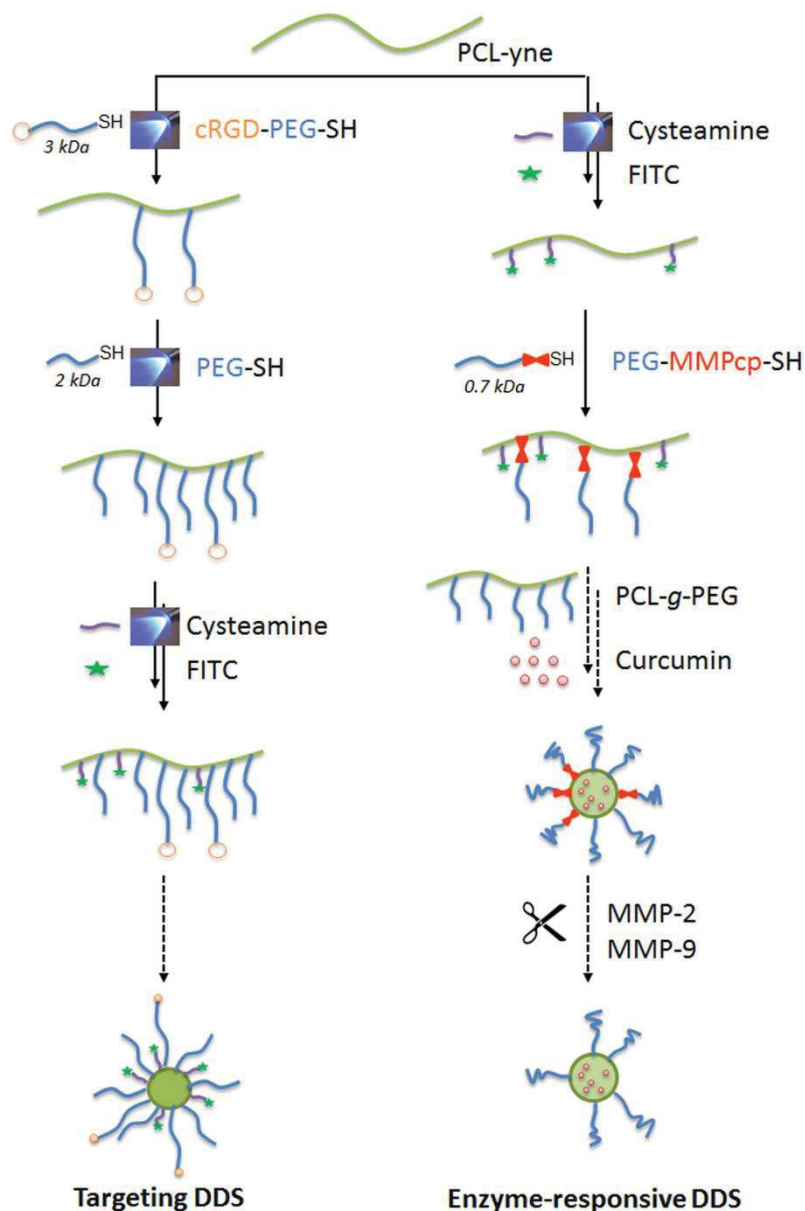
The cytotoxicity of the nanoparticles was performed using Prestoblu<sup>®</sup> Cell viability reagent (Invitrogen). For this assay, cells were seeded at  $4 \cdot 10^4$  cells per well into a 24-well plate and allowed to attach overnight. They were then treated with 7 and 15  $\mu\text{g/ml}$  of free curcumin (dissolved in DMSO) or curcumin encapsulated in the nanoaggregates (dissolved in PBS) for 24h and 48h. Appropriate equivalent amounts of nanoparticles without curcumin were run simultaneously. Also medium containing equivalent amounts of DMSO or PBS or medium only were used as a control. Cell viability was measured using Prestoblu<sup>®</sup> Cell viability reagent according to manufacturer's instruction. Briefly, 10% of Prestoblu<sup>®</sup> was diluted into cell growth medium. When added to cells, the reagent is modified by the reducing

environment of the viable cells and turns red in color, becoming highly fluorescent. After incubation time, supernatant was transferred to a 96-well plate and the fluorescence was measured at 560/590nm using a microplate reader (PerkinElmer, Victor3V).

#### ***4.4. Discussion***

##### **Synthesis of PCL-g-PEG targeting or sheddable DDS**

We recently reported on a family of PCL-g-PEG with tunable hydrophilicity that can self-assemble in small and stable nanoaggregates (< 50 nm). They were exploited for the loading and release of various hydrophobic drugs and showed high efficiencies in curcumin formulation. It was also found that the nature of the PEG shell (length and rigidity) add a strong impact on the toxicity towards cancer cells.[10] In order to further develop this macromolecular platform as DDS we aim to take advantage of the difference existing between tumor and normal cells (including overexpression of MMP and integrin). We are therefore interested in this work on shifting from passive EPR-relying DDS to targeting or sheddable DDS. To synthesize such vectors, thiol-yne photografting has been selected as the method of choice as it allows a mild multifunctionalization of the PCL-yne backbone by an iterative strategy. In addition, the versatility of the thiol-yne photoreaction offers modularity to yield the desired multifunctional vectors: each addition step can be done independently, in the order that is dictated by the design requirements and that can change for each copolymer structure. This is illustrated by the syntheses of the aimed copolymers, namely the targeting PCL-g-(PEG-cRGD) and the sheddable PCL-g-(MMPcp-PEG) (Scheme III-4 1).



**Scheme III-4 1** : Use of a single PCL-yne platform for the preparation of targeting or enzyme-responsive DDS via thiol-yne iterative approach.

#### *Synthesis of PCL-g-(PEG-cRGD): targeting copolymers*

PCL-g-(PEG-cRGD) was synthesized in 3 steps consisting in successive thiol-yne photoreactions: i) grafting of cRGD-PEG for targeting, ii) grafting of PEG to tune the hydrophilicity and iii) FITC labeling of the copolymer via cysteamine attachment. The order of addition was chosen to favor control and allow the most sterically hindered molecules to react first on the PCL-yne backbone. It is to note cRGD was selected over its linear counterpart because linear RGD have demonstrated limited efficiency in clinical studies [22] as a result of their sensitivity to proteolytic degradation, which is not the case of cyclic

RGDs.[23] In particular, the cyclopentapeptide-RGD has proved to be efficient in tumor detection and vectorization of therapeutic agents. [24]

cRGD-PEG-NH<sub>2</sub> was first reacted with mercaptopropionic acid in the presence of DCC/DMAP to yield a thiol chain end able to react with the alkynated PCL by photografting thiol-yne. Resulting cRGD-PEG-SH (Supplementary data, Scheme III-2 S1) was grafted on the PCL-yne by thiol-yne photoaddition. Two different degrees of substitution were targeted to evaluate the influence of cRGD grafting density on the cellular binding. This was easily done by changing the number of equivalents of cRGD-PEG-SH. By using the conditions listed in Table III-2 1, two copolymers with 0.43 or 1.7 cRGD cycles per PCL chain were prepared. The grafting density was obtained from the NMR analyses by comparison of the peaks at 2.3 ppm and 1.3 ppm of the PCL backbone with the peak at 3.6 ppm of the EG of the cRGD-PEG-SH chains. The number of side chains was kept low as expected with the low number of cRGD-PEG-SH equivalent used in the reaction and our previous results on PEG grafting.[10] Considering the molecular weight of PEG equal to 3000 g/mol, ratios EG/CL of 0.2 and 0.7 were calculated thanks to the NMR spectra using the same NMR peaks. These EG/CL values are low and would lead to the formation of pegylated nanoparticles rather than nanoaggregates with a core-shell structure. [25]. For this reason, in a second step the hydrophilic character was increased thanks to the additional grafting of PEG-SH. A shorter PEG (Mn = 2000 g/mol) was chosen to make sure that cRGD would be exposed at the outer surface of the PEG layer on the final vectors.

**Table III-4 1** : Conditions for the synthesis of PCL-g-(PEG-cRGD) by thiol-yne photoaddition

Copolymer	cRGD / alkyne (eq.)	DMPA / alkyne (eq.)	Number of cRGD / PCL	EG/CL
PCL-g-(PEG-RGD <sub>0.4</sub> )	0,2	2	0,43	0.2
PCL-g-(PEG-RGD <sub>1.7</sub> )	1	3	1,70	0.7

Copolymers were submitted to a second thiol-yne photoaddition under defined conditions to yield hydrophilized PCL-g-(PEG-RGD). The grafting conditions were done according to our previous work and are listed in Table III-4 2. For clarity, the copolymers were named PCL-g-(PEG<sub>x</sub>-cRGD<sub>y</sub>) where x corresponds to the value of the EG/CL ratio and y corresponds to the number of cRGD moieties per copolymer. A series of copolymers with 0.43 cRGD groups per copolymer and increasing EG/CL ratios equal to 1.4, 2.3 and 3.1 were first synthesized (Table

III-4 2, entries 1 to 3). In parallel, PCL-*g*-(PEG-RGD<sub>1.7</sub>) was used to synthesize PCL-*g*-(PEG<sub>2.4</sub>-cRGD<sub>1.7</sub>), which can be compared to PCL-*g*-cRGD<sub>0.43</sub>PEG<sub>2.3</sub> in the biological studies (Table III-4 2, entry 4). A copolymer without cRGD and EG/CL ratio equal to 3.2 was also synthesized to be compared with PCL-*g*-cRGD<sub>0.43</sub>PEG<sub>3.1</sub> (Table III-4 1, entry 5).

Finally, with aim to allow *in vitro* visualization, copolymers were labeled with FITC in two steps. For this purpose, copolymers were submitted to a third and final thiol-yne photoaddition in the presence of cysteamine followed by reaction between the free amine and FITC under standard conditions. This labeling was made possible thanks to the presence of remaining alkyne groups and or vinylsulfide as mentioned in our previous works.[25][10] This step being the last modification step, a large excess of cysteamine was used to ensure a more efficient labeling during this final step. The success of FITC labeling was confirmed by UV/visible spectroscopy. As shown in Table III-4 2, between 2.5 % and 9 % of FITC molecules were found with respect to CL units.

*Self-assembly of PCL-g-(PEG-cRGD): targeting nanoaggregates*

PCL-*g*-(PEG-cRGD) copolymers self-assembled to yield nanoaggregates of small sizes having hydrodynamic diameters of ca. 30 nm (Table III-4 2). For the two copolymers having EG/CL = 2.3-2.4, larger aggregates were also observed beside this first population with hydrodynamic diameters in the range 130-150 nm. For comparison, PCL-*g*-PEG<sub>3.2</sub>

**Table III-4 2 :** Characterization of PCL-*g*-(PEG-cRGD) copolymers and their nanoaggregates

Entry	Copolymers	FITC (mol%)	Mn <sup>a</sup> (g/mol)	Đ	Size (D <sub>H</sub> , nm)	PDI
1	PCL- <i>g</i> -(PEG <sub>1.4</sub> -cRGD <sub>0.4</sub> )	4	nd.	nd.	nd.	nd.
2	PCL- <i>g</i> -(PEG <sub>2.3</sub> -cRGD <sub>0.4</sub> )	2.5	23 800	1.8	26 ± 4 (127 ± 5) <sup>a</sup>	0.3
3	PCL- <i>g</i> -(PEG <sub>3.1</sub> -cRGD <sub>0.4</sub> )	3	23 500	1.6	36 ± 1	0.2
4	PCL- <i>g</i> -(PEG <sub>2.4</sub> -cRGD <sub>1.7</sub> )	9	19 400	1.7	28 ± 2 (152 ± 2) <sup>a</sup>	0.2
5	PCL- <i>g</i> -PEG <sub>3.2</sub>	3	25 300	2.2	33 ± 1	0.3

<sup>a</sup> second population of aggregates

*Synthesis of PCL-g-(MMPcp-PEG): sheddable copolymers*

Sheathing DDS with hydrophilic coronas of poly(ethylene glycol) is known to yield longer circulation times. However, when DDS reach the tumor environment, better interaction is promoted by removing of PEG layer from the surface of particles. [26] Therefore, nanoparticles designed with sheddable PEG shells are sought after. To demonstrate the



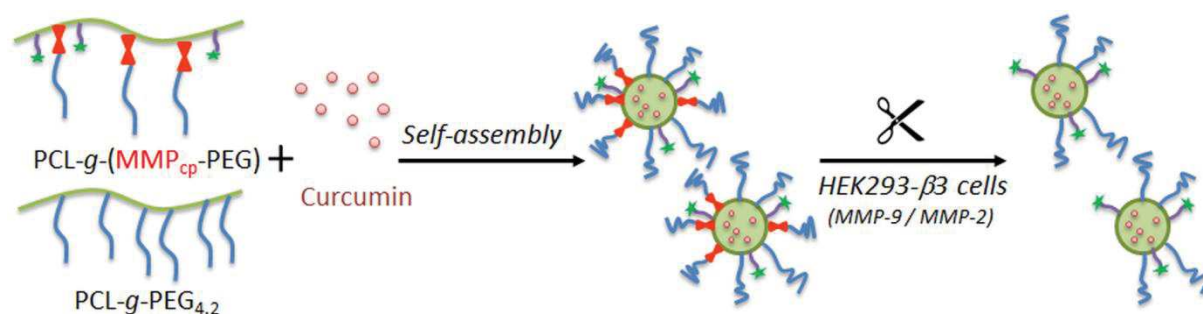
versatility of our approach, and similarly to PCL-g-(PEG-cRGD), sheddable PCL-g-(MMPcp-PEG) copolymers were synthesized in 2 steps using successive thiol-yne photoreactions: i) FITC labeling of the copolymer via cysteamine attachment and ii) grafting of MMPcp-PEG as sheddable side chains. In this case, the order of addition was inverted compared to the synthetic pathway of PCL-g-(PEG-cRGD) for two reasons. First, it was a more straightforward route as only FITC-labeling of the PCL backbone was required to generate all the labeled copolymers. Second, no further hydrophilization by the sterically hindered PEG-SH chains was aimed. In the first step, the amount of cysteamine to be grafted on PCL-yne was however intentionally kept low (0.5 eq. with respect to alkyne) to ensure the availability of non-reacted sites to further modification. PCL-g-(MMPcp-PEG) with various contents of cleavable PEG side chains were then obtained by controlling the initial ratio MMPcp-PEG/ DMPA/ PCL in the thiol-yne photoreactions (Table III-4 3). Hydrophobic copolymers with low EG/CL ratios equal to 0.4, 0.6 and 0.7 were obtained. These values were calculated from the <sup>1</sup>H NMR spectra as discussed for PCL-g-(PEG-cRGD). This corresponds to 2.7, 4.0 and 4.7 grafted MMPcp-PEG chains per PCL backbone. This rather limited grafting efficiency was unexpected considering the high level of control and grafting that was obtained with PEG in our previous work. Two factors may explain this result. First, the octapeptide GPQGLAGQ bearing the reacting thiol is sterically hindered compared to flexible PEG chains. The approach of thiol to the alkyne group is therefore partly impeded. Second, the pre-functionalization with FITC, although kept low by the conditions, surely further decreases the accessibility of the thiol groups to the alkyne. This last hypothesis is confirmed by the low grafting density in PCL-g-PEG<sub>0.9</sub> (Table III-4 3). Only 2.25 PEG chains have been grafted on the FITC-labeled PCL against ~10 PEG chains normally grafted under similar conditions on the none-labeled PCL.[10]

**Table III-4 3** : Conditions for the synthesis of PCL-g-(MMPcp-PEG) by thiol-yne photoaddition

Entry	Copolymer	MMPcp / alkyne (eq.)	DMPA / alkyne (eq.)	Number of MMPcp / PCL	EG/CL
1	PCL-g-( MMPcp <sub>2.7</sub> -PEG <sub>0.4</sub> )	3	4	2.7	0.4
2	PCL-g-( MMPcp <sub>4.0</sub> -PEG <sub>0.6</sub> )	6	4	4.0	0.6
3	PCL-g-(MMPcp <sub>4.7</sub> -PEG <sub>0.7</sub> )	12	8	4.7	0.7
4	PCL-g-PEG <sub>0.9</sub>	6 eq PEG	2	-	0.9



Owing to the hydrophobicity of obtained copolymers, it was not possible to self-assemble them in water to yield stable nanoaggregates. For this reason they were co-formulated with a more hydrophilic graft copolymer (PCL-g-PEG<sub>2k4,2</sub>, EG/CL = 4.2)[10] at a 50 wt% ratio (Scheme III-4 2).



**Scheme III-4 2** : Schematic illustration for the preparation of curcumin-loaded sheddable nanoaggregates.

Higher hydrophilicities were obtained with EG/CL values increasing from 0.4, 0.6 and 0.7 to 1.6, 1.8 and 1.9, respectively (Table III-4 4). It was therefore possible to yield blank nanoaggregates whose hydrodynamic diameters were in the range 60 to 82 nm as measured by DLS. In a similar way, curcumin-loaded nanoaggregates were prepared with DL ranging from 8 to 12wt% in agreement with our previous work.[10] An increase of nanoaggregate sizes was witnessed upon drug loading, with hydrodynamic diameters in the range 85 and 110 nm. Similar sizes of ca. 130 nm were obtained for mPEG-PVGLIG-PCL block copolymers having EG/CL ratio 1.7. loaded with docetaxel[20]

**Table III-4 4** : Characterization of PCL-g-(MMPcp-PEG) blank and curcumin-loaded nanoaggregates

Entry	Copolymer	Blank		Curcumin-loaded			
		Size (nm)	PDI	EE (%)	DL (%)	Size (nm)	PDI
1	PCL-g-(MMPcp <sub>2.7</sub> -PEG <sub>1.6</sub> )	n.d.	n.d.	48.3	8	109 ± 4	0.5
2	PCL-g-(MMPcp <sub>4.0</sub> -PEG <sub>1.8</sub> )	61 ± 0.2	0.3	57.3	12	85 ± 1	0.3
3	PCL-g-(MMPcp <sub>4.7</sub> -PEG <sub>1.9</sub> )	82 ± 0.3	0.3	50.9	12	98 ± 3	0.3
4	PCL-g-PEG <sub>2.0</sub>	60 ± 0.4	0.2	42.8	12	109 ± 4	0.3

### Cellular uptake of PCL-g-(PEG-RGD)

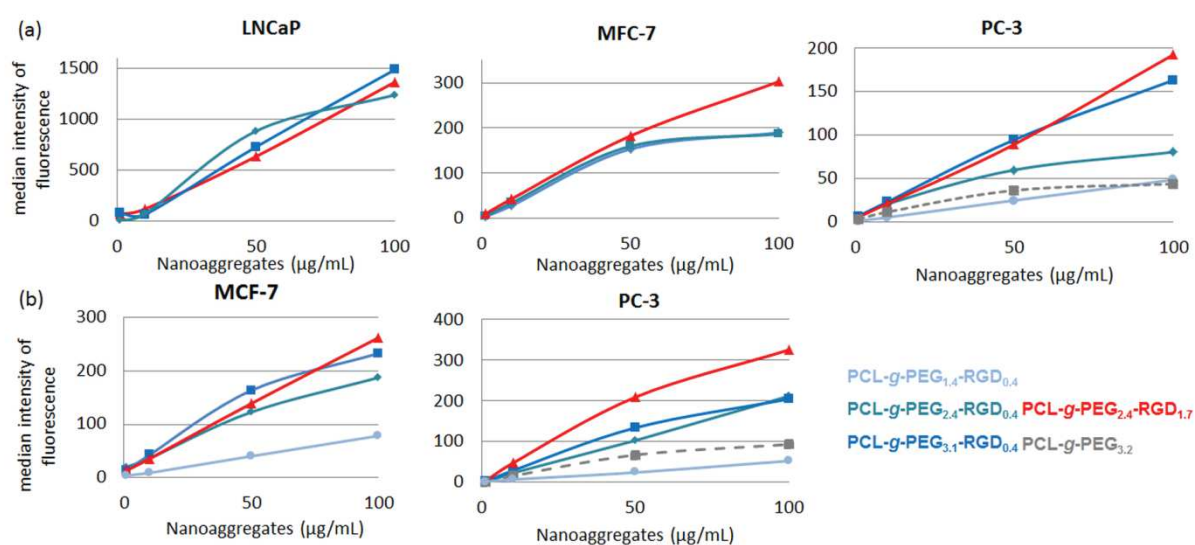
We first evaluated the impact of the immobilized cRGD on the cellular uptake of PCL-g-(PEG-cRGD) nanoaggregates. FITC-labeled PCL-g-(PEG-cRGD) were incubated with three cancer cell lines. PC-3 were selected as integrine positive cell lines, and compared to the two integrine negative cell lines LNCap and MCF-7.[27][28] It is to note that both PC-3 and

LNCap are human prostate adenocarcinoma cell lines, whereas MCF-7 are human mammary gland adenocarcinoma cell line.

Beside the impact of cRGD, the influence of the hydrophilic/hydrophobic balance on the uptake of nanoaggregates was also assessed. Two incubation times (0.5 and 2 hours), and four concentrations of nanoaggregates (1, 10, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were tested. Uptake was evaluated by FACS analysis. Results are expressed as median intensity of fluorescence (MIF) normalized with respect to FITC content in order to compare the copolymers having different FITC labeling (Table III-4 2). According to Figure III-4 1a, for same cRGD content of 0.4 and after 2h of incubation, the hydrophilic/hydrophobic balance had no significant influence on integrin negative MCF-7 and LNCaP for EG/CL = 2.4 or 3.1. This was not the case for integrin positive PC-3 or for the MCF-7 at shorter incubation time (0.5 h) as MIF decreased with the hydrophilicity (Figure III-4 1b). In particular, a marked decrease of MIF was noticed for the most hydrophobic copolymer (EG/CL = 1.4). This result may be surprising considering our previous study, where higher cytotoxicity towards MCF-7 cells was encountered with hydrophobic copolymers.[10] This toxicity was believed to be related to the lower energy required to cross the cell membranes for the more hydrophobic and/or rigid PEG shells.[29] Two hypothesis can be drawn to explain this difference. First, in the studied EG/CL range, cRGD presentation at the surface of the nanoaggregates might be improved in the case of more swollen, more hydrophilic, nanostructures, thus explaining the higher uptake of hydrophilic copolymers by PC-3. In addition, the presence of a second population of larger aggregates ( $D_H > 125 \text{ nm}$ , Table III-4 2) for more hydrophobic copolymers may explain the lower cellular uptake observed for both MCF-7 and PC-3 cell lines. In the frame of this work, it was however not possible to further investigate this particular point.

We focused instead on the evaluation of the uptake as a function of cRGD content in the copolymers having a same EG/CL ratio. At the longest incubation time of 2h (Figure III-4 1a), no significant difference of MIF was observed on the LNCaP cells for the copolymers with 0.4 or 1.7 cRGD. For integrin negative MCF-7 cells, uptake was mainly dependent on the concentration of nanoaggregates. In more details, for both incubation times, no significant difference of MIF was obtained for concentrations below 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . However, PCL-g-(PEG<sub>2.4</sub>-cRGD<sub>1.7</sub>) showed  $\sim 1.5$  higher MIF compared to PCL-g-(PEG<sub>2.4</sub>-cRGD<sub>0.4</sub>) at a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration, indicating more uptake. This result can however not be linked to higher cRGD mediated binding and classical endocytic pathways, like pure macropinocytosis, are probably involved.

In opposition, for integrin positive PC-3 cells, PCL-g-(PEG<sub>2.4</sub>-cRGD<sub>1.7</sub>) showed higher MIF compared to PCL-g-(PEG<sub>2.4</sub>-cRGD<sub>0.4</sub>) for all concentrations of nanoaggregates with MIF values 1.6 to 2 times higher for the copolymer enriched in cRGD after only 30 min incubation (Figure III-4 1b). After 2 hours of incubation, the same trend was observed. Interestingly, the same result was obtained with PCL-g-(PEG<sub>3.1</sub>-cRGD<sub>0.4</sub>) in comparison to its counterpart without cRGD PCL-g-PEG<sub>3.2</sub> for short 0.5h incubation time. The difference between the MIF values of the two copolymers tended to increase with time as shown by up to 3.8 higher MIF for PCL-g-(PEG<sub>3.1</sub>-cRGD<sub>0.4</sub>) compared to PCL-g-PEG<sub>3.2</sub> (Figure III-4 1a).



**Figure III-4 1 :** Uptake of PCL-g-(PEG-cRGD) copolymers in three cell-lines as a function of the cRGD amount and of the EG/CL ratio (a) after 2 hours of incubation and (b) after 0.5 hour of incubation. (Data are expressed as mean values and correspond to measurements in duplicate)

In conclusion, we demonstrated that the uptake of the nanoaggregates increases with increasing content of cRGD for integrin positive PC-3 cells, even at low cRGD (0.4 / copolymer chain) and independent from the concentration. This was not the case for the integrin negative cell lines where no influence was found (LNCaP), or only in relation with high nanoaggregates concentration (MCF-7). This set of results confirms the potential of our approach to efficiently modify copolymers by a simple iterative thiol-yne strategy, that allows one to easily prepare targeting vectors with enhanced biological outcome.

#### **Cytotoxicity of curcumin loaded PCL-g-(MMPcp-PEG):**

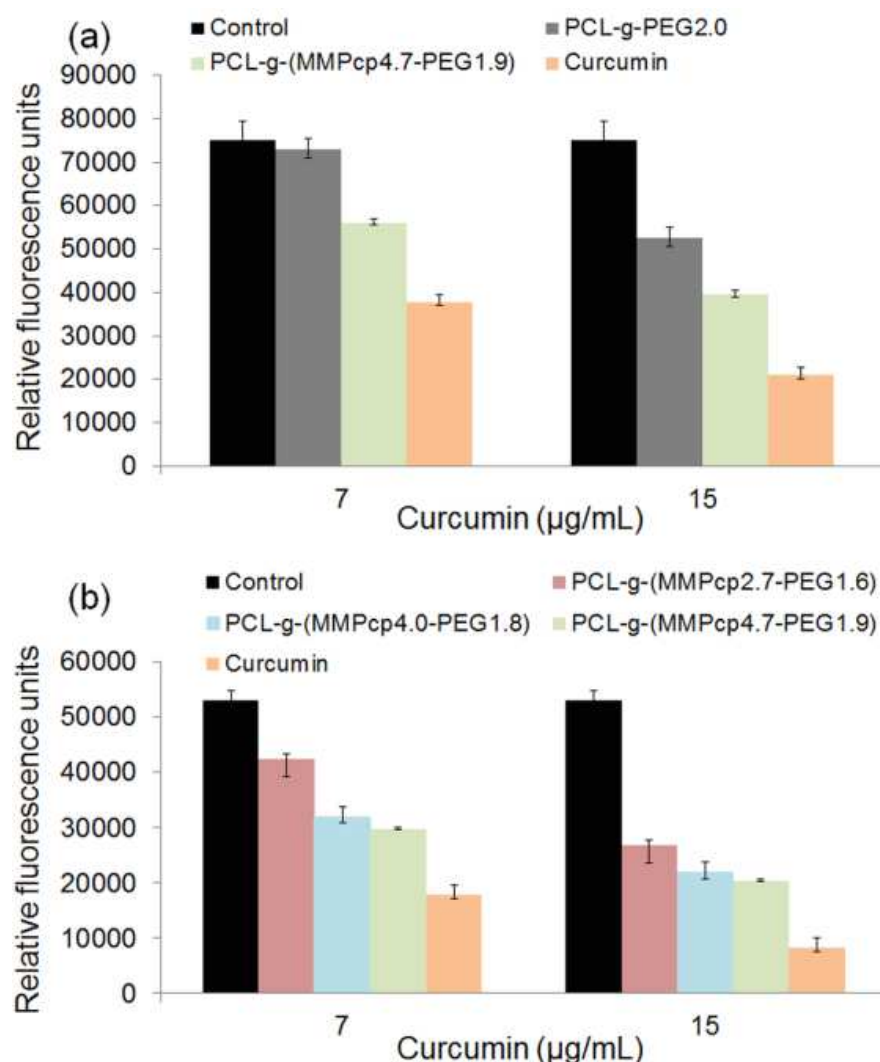
In a second approach to confirm the potential of the herein proposed approach to yield tunable DDS, we aimed for the preparation of MMP-responsive copolymers. In fact, recent drug

delivery strategies involve the use of matrix metalloproteinase cleavable peptides as a link between PEG blocks and hydrophobic blocks PCL for an improved cellular uptake thanks to the increased hydrophobicity resulting from the elimination of PEG corona in the tumor environment. For example, Li et al. observed an increase of cellular uptake for mPEG-*PVGLIG*-PCL nanoparticles in correlation with gelatinase expression levels in different cell lines. [20] In order to take advantages of this approach and of the flexibility offered by the thiol-yne photochemistry, we synthesized the PCL-g-(MMPcp-PEG). Our hypothesis was that, in absence of targeting moiety, an increased cytotoxicity would be obtained from nanoaggregates having more sheddable PEG shells (Scheme III-4 2). The cytotoxicity of curcumin-loaded nanoaggregates formulations containing cleavable and non-cleavable PEG chains was assessed with HEK293- $\beta$ 3 cells that are known to express high levels of MMP-2 and MMP-9.[13]

Three copolymers with different amount of MMPcp-PEG chains were compared. The cells were treated with NPs loaded curcumin for 24 and 48 hours. At 24 hours, limited difference in cytotoxicity was observed between PCL-g-(MMPcp<sub>4.7</sub>-PEG<sub>1.9</sub>), PCL-g-PEG<sub>2.0</sub> (Supplementary data, Fig. III-4 S1a). In addition, a parallel experiment showed no difference for copolymers with different content of MMPcp-PEG as they all showed a low toxicity towards cells (Supplementary data, Fig. III-4 S1b). This absence of effect of MMPcp on toxicity, *ie.* on internalization, was ascribed to a limited cleavage of MMPcp-PEG chains after 24h .

This was confirmed by the toxicity observed at 48 h where higher toxicity was measured for copolymers with higher MMPcp moieties at all curcumin doses. For example PCL-g-(MMPcp<sub>4.7</sub>-PEG<sub>1.9</sub>) led to 75% viability against 97% for PCL-g-PEG<sub>2.0</sub> (Figure III-4 2a) at the low dose of 7  $\mu$ g/mL of curcumin, indicating better internalization for the former one. Of course, the toxicity increased with the concentration of curcumin but the difference between the MMP-sensitive and non-sensitive nanoaggregates was less marked. This higher toxicity is an indirect proof of the improved cellular uptake that is favored by the cleavage of PEG chains leading to more hydrophobic nanoaggregates. In theory, if all MMPcp-PEG are cleaved in PCL-g-(MMPcp<sub>4.7</sub>-PEG<sub>1.9</sub>), the final copolymer would be PCL-g-PEG<sub>1.4</sub>, with EG/CL equal to 1.4, which makes it more hydrophobic than PCL-g-PEG<sub>2.0</sub>, more easily internalized and therefore more toxic, in accordance with our previous study.[10] It should be noted that higher toxicity of free curcumin in comparison to encapsulated curcumin was obtained but at the cost of its cosolubilization by DMSO.

Coming to the influence of the MMPcp-PEG content in the nanoaggregates, Figure III-4 2b shows a clear influence, with the overall toxicity increasing with the number of MMPcp moieties. At 7  $\mu\text{g/mL}$  of curcumin, the difference of viability was high between copolymers having 2.7 (80% viability) and 4.0 (60%) cleavable PEG chains. It was however only limited when passing from 4.0 (60%) to 4.7 (56%) cleavable PEG chains. This is explained by the fact that for these two copolymers, the loss of PEG chains leads to close EG/CL ratios of 1.3 and 1.4, respectively so that only limited impact on the internalization and subsequent toxicity are observed. The same trends were obtained at the higher dose of 15  $\mu\text{g/mL}$  of curcumin, but with less pronounced differences between the various copolymers as shown by the 51, 41 and 39% cells viability measured for the PCL-g-(MMPcp-PEG) having 2.7, 4.0 and 4.7 MMPcp moieties, respectively.

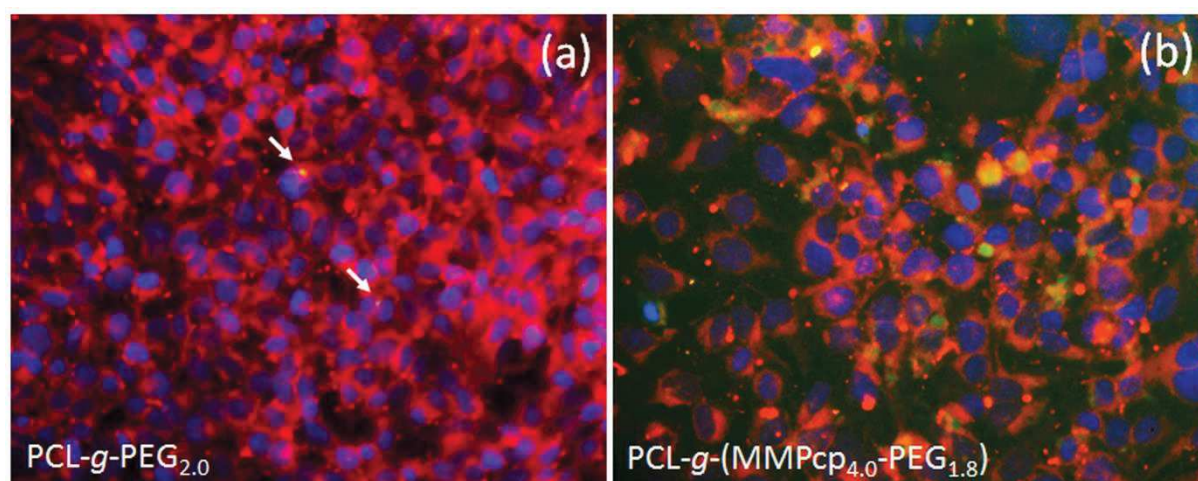


**Figure III-4 2 :** *In vitro* HEK293- $\beta$ 3 cells cytotoxicity of curcumin-loaded nanoaggregates as a function of the curcumin concentration after 48 h with (a) comparison between copolymers with same initial hydrophilicity with or without MMPcp moieties, and (b) influence of the number of MMPcp moieties in the copolymer. (Data are expressed as means  $\pm$  SD and correspond to measurements in triplicate)



Finally, in an attempt to link the measured cytotoxicity and the cellular uptake ability of the copolymers, internalization was assessed by fluorescence microscopy. Two blank nanoaggregates prepared from non-sheddable PCL-g-PEG<sub>2.0</sub> or sheddable PCL-g-(MMPcp<sub>4.0</sub>-PEG<sub>1.8</sub>) were incubated for 48h with HEK293-β3 cells. As expected, Figure III-4 3 shows very little fluorescence in the cells for PCL-g-PEG<sub>2.0</sub>. On the opposite, large areas of green fluorescence, corresponding to the internalized nanoaggregates, are visible when the sheddable PCL-g-(MMPcp<sub>4.0</sub>-PEG<sub>1.8</sub>) was used, which confirms the importance of PEG chain cleavage for an improved cellular uptake and subsequent cellular toxicity.

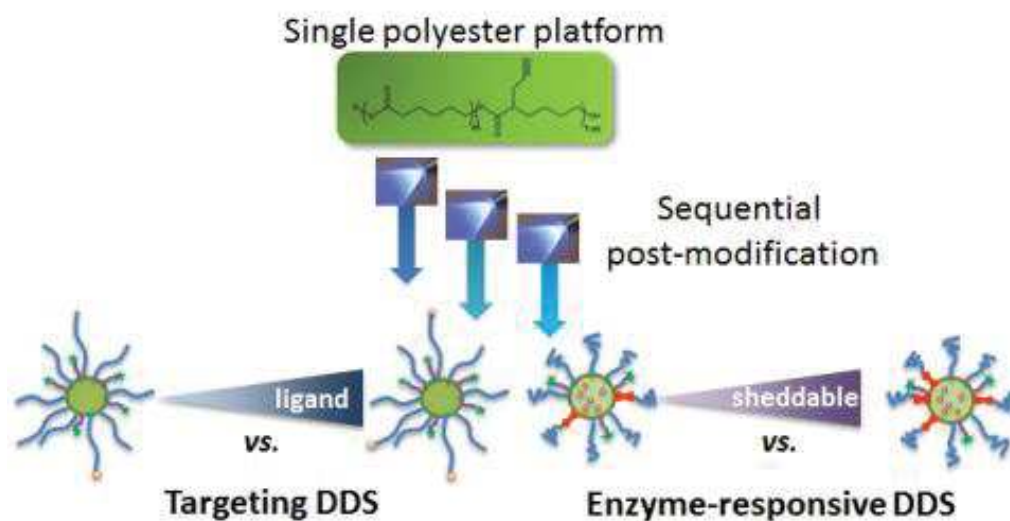
In conclusion, the presence of MMPcp in PCL-g-(MMPcp-PEG) increases the biological effect of drug at low concentration in comparison to classical amphiphilic copolymer PCL-g-PEG. This further confirms the necessity of so-called smart DDS.



**Figure III-4 3 :** *In vitro* HEK293-β3 cellular uptake of blank nanoaggregates after 48 h with (a) non-sheddable copolymer PCL-g-PEG<sub>2.0</sub> and (b) sheddable copolymer PCL-g-(MMPcp<sub>4.0</sub>-PEG<sub>1.8</sub>)

#### 4.5. Conclusion

In this work, multifunctional DDS were obtained from a single PCL platform. Advantage was taken from successive thiol-yne photoaddition to yield targeting or sheddable DDS. The improved biological outcome of these DDS was demonstrated. Targeting PCL-g-(PEG-cRGD) showed improved uptake towards integrin positive PC-3 cell lines, whereas sheddable PCL-g-(MMPcp-PEG) demonstrated higher internalization with higher content of cleavable MMPcp-PEG side chains. Our simple iterative approach opens therefore new routes towards tunable smart DDS.



#### 4.6. References

- [1] S.L. Huang, Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1167–1176. doi:10.1016/j.addr.2008.03.003.
- [2] W.T. Truong, Y. Su, J.T. Meijer, P. Thordarson, F. Braet, Self-assembled gels for biomedical applications, *Chem. - An Asian J.* 6 (2011) 30–42. doi:10.1002/asia.201000592.
- [3] J. Lee, D.K. Chatterjee, M.H. Leeb, S. Krishnana, Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls, *Cancer Lett.* 347 (2014) 46–53. doi:10.1016/j.canlet.2014.02.006.Gold.
- [4] P. Bilalis, L.-A. Tziveleka, S. Varlas, H. Iatrou, pH-Sensitive nanogates based on poly(L-histidine) for controlled drug release from mesoporous silica nanoparticles, *Polym. Chem.* 7 (2016) 1475–1485. doi:10.1039/C5PY01841B.
- [5] F. Ahmed, D.E. Discher, Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: Hydrolysis-triggered controlled release vesicles, *J. Control. Release.* 96 (2004) 37–53. doi:10.1016/j.jconrel.2003.12.021.
- [6] G.S. Kwon, T. Okano, Polymeric micelles as new drug carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 21 (1996) 107–116. doi:10.1016/S0169-409X(96)00401-2.
- [7] L. Tang, X. Yang, Q. Yin, K. Cai, H. Wang, I. Chaudhury, C. Yao, Q. Zhou, M. Kwon, J. a. Hartman, I.T. Dobrucki, L.W. Dobrucki, L.B. Borst, S. Lezmi, W.G. Helderich, a. L. Ferguson, T.M. Fan, J. Cheng, Investigating the optimal size of anticancer nanomedicine, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 15344–15349. doi:10.1073/pnas.1411499111.
- [8] A. Eatemadi, M. Darabi, L. Afraidooni, N. Zarghami, H. Daraee, L. Eskandari, H. Mellatyar, A. Akbarzadeh, Comparison, synthesis and evaluation of anticancer drug-loaded polymeric nanoparticles on breast cancer cell lines, *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* (2015) 1–10. doi:10.3109/21691401.2015.1008510.
- [9] L. Liu, L. Sun, Q. Wu, W. Guo, L. Li, Y. Chen, Y. Li, C. Gong, Z. Qian, Y. Wei, Curcumin loaded polymeric micelles inhibit breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastasis., *Int. J. Pharm.* 443 (2013) 175–82. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.12.032.

- [10] B. Al Samad, A., Bethry, A., Koziolová, E., Netopilík, M., Etrych, T., Bakkour, Y., Coudane, J., El Omar, F., Nottelet, PCL-PEG graft copolymers with tunable amphiphilicity: A study of their micelle formation, drug loading and cellular cytotoxicity, (n.d.).
- [11] P.-C. Chang, B.-Y. Liu, C.-M. Liu, H.-H. Chou, M.-H. Ho, H.-C. Liu, D.-M. Wang, L.-T. Hou, Bone tissue engineering with novel rhBMP2-PLLA composite scaffolds., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 81 (2007) 771–780. doi:10.1002/jbm.a.
- [12] A. Ahmed, H. Yu, D. Han, J. Rao, Y. Ding, Y. Hu, Spatiotemporally programmable surface engineered nanoparticles for effective anticancer drug delivery, *Macromol. Biosci.* 14 (2014) 1652–1662. doi:10.1002/mabi.201400228.
- [13] C.H.F. Wenk, V. Josseland, P. Dumy, J.-L. Coll, D. Boturyn, Integrin and matrix metalloprotease dual-targeting with an MMP substrate-RGD conjugate., *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 448–52. doi:10.1039/c2ob26926k.
- [14] K. Mulgrew, K. Kinneer, X.-T. Yao, B.K. Ward, M.M. Damschroder, B. Walsh, S.-Y. Mao, C. Gao, P. a Kiener, S. Coats, M.S. Kinch, D. a Tice, Direct targeting of alphavbeta3 integrin on tumor cells with a monoclonal antibody, Abegrin., *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 3122–3129. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0356.
- [15] A. Taherian, X. Li, Y. Liu, T. a Haas, Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells., *BMC Cancer.* 11 (2011) 293. doi:10.1186/1471-2407-11-293.
- [16] Y. Zhang, P.J. Sun, Z.H. Gan, Biodegradable amphiphilic block copolymers containing functionalized PEO blocks: Controlled synthesis and biomedical potentials, *Sci. China Chem.* 53 (2010) 519–527. doi:10.1007/s11426-010-0095-y.
- [17] Z. Ge, S. Liu, Functional block copolymer assemblies responsive to tumor and intracellular microenvironments for site-specific drug delivery and enhanced imaging performance., *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 7289–325. doi:10.1039/c3cs60048c.
- [18] A. Merdad, S. Karim, H.-J. Schulten, A. Dallol, A. Buhmeida, F. Al-Thubaity, M.A. Gari, A.G.A. Chaudhary, A.M. Abuzenadah, M.H. Al-Qahtani, Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Primary Human Breast Cancer: MMP-9 as a Potential Biomarker for Cancer Invasion and Metastasis, *Anticancer Res.* 34 (2014) 1355–1366.
- [19] P.S. Kulkarni, M.K. Haldar, R.R. Nahire, P. Katti, A.H. Ambre, W.W. Muhonen, J.B. Shabb, S.K.R. Padi, R.K. Singh, P.P. Borowicz, D.K. Shrivastava, K.S. Katti, K. Reindl, B. Guo, S. Mallik, MMP-9 responsive PEG cleavable nanovesicles for efficient delivery of chemotherapeutics to pancreatic cancer, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 2390–2399. doi:10.1021/mp500108p.
- [20] R. Li, W. Wu, Q. Liu, P. Wu, L. Xie, Z. Zhu, M. Yang, X. Qian, Y. Ding, L. Yu, X. Jiang, W. Guan, B. Liu, Intelligently Targeted Drug Delivery and Enhanced Antitumor Effect by Gelatinase-Responsive Nanoparticles, *PLoS One.* 8 (2013) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0069643.
- [21] A. Leroy, A. Al Samad, X. Garric, S. Hunger, D. Noël, J. Coudane, B. Nottelet, Biodegradable networks for soft tissue engineering by thiol–yne photo cross-linking of multifunctional polyesters, *RSC Adv.* 4 (2014) 32017. doi:10.1039/C4RA03665D.
- [22] J.L. Sutcliffe-Goulden, M.J. O’Doherty, P.K. Marsden, I.R. Hart, J.F. Marshall, S.S. Bansal, Rapid solid phase synthesis and biodistribution of <sup>18</sup>F-labelled linear peptides, *Eur. J. Nucl. Med.* 29 (2002) 754–759. doi:10.1007/s00259-001-0756-3.
- [23] D. Arosio, L. Manzoni, E.M. V Araldi, C. Scolastico, Cyclic RGD Functionalized Gold Nanoparticles for Tumor Targeting, *Bioconjugate Chem.* (2011) 664–672.
- [24] E. Garanger, D. Boturyn, P. Dumy, Tumor targeting with RGD peptide ligands-design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers., *Anticancer. Agents*



- Med. Chem. 7 (2007) 552–558.
- [25] A. Al Samad, Y. Bakkour, C. Fanny, F. El Omar, J. Coudane, B. Nottelet, From nanospheres to micelles: simple control of PCL-g-PEG copolymers' amphiphilicity through thiol-yne photografting, *Polym. Chem.* 6 (2015) 5093–5102. <Go to ISI>://WOS:000357609600014.
- [26] S.D. Li, L. Huang, Stealth nanoparticles: High density but sheddable PEG is a key for tumor targeting, *J. Control. Release.* 145 (2010) 178–181. doi:10.1016/j.jconrel.2010.03.016.
- [27] W. Hossein Rashidi, L., Homayoni, H., Zou, X., Liu, Li., Chen, Investigation of the strategies for targeting of the afterglow nanoparticles to tumor cells, *Photodiagn. Photodyn.* 13 (2016) 244–254.
- [28] A. V. Taubenberger, L.J. Bray, B. Haller, A. Shaposhnykov, M. Binner, U. Freudenberg, J. Guck, C. Werner, 3D extracellular matrix interactions modulate tumour cell growth, invasion and angiogenesis in engineered tumour microenvironments, *Acta Biomater.* 36 (2016) 73–85. doi:10.1016/j.actbio.2016.03.017.
- [29] L.Y. Zhang, M. Becton, X.Q. Wang, Designing Nanoparticle Trans location through Cell Membranes by Varying Amphiphilic Polymer Coatings, *J. Phys. Chem. B.* 119 (2015) 3786–3794. <Go to ISI>://WOS:000350840600019.

#### ***4.7. Supplementary data***

##### ***Single PCL-PEG copolymers platform for a dual drug delivery approach: targeting or MMP-sheddable vectors though simple photochemistry***

*Assala Al Samad,<sup>a,b</sup> Audrey Bethry,<sup>a</sup> Olga Janouskova,<sup>c</sup> Jérémie Ciccione,<sup>a</sup> Christiane Wenk,<sup>d</sup> Gilles Subra,<sup>a</sup> Tomas Etrych,<sup>c</sup> Fawaz El Omar,<sup>b</sup> Jean Coudane,<sup>a</sup> Youssef Bakkour,<sup>b</sup> Benjamin Nottelet<sup>a\*</sup>*

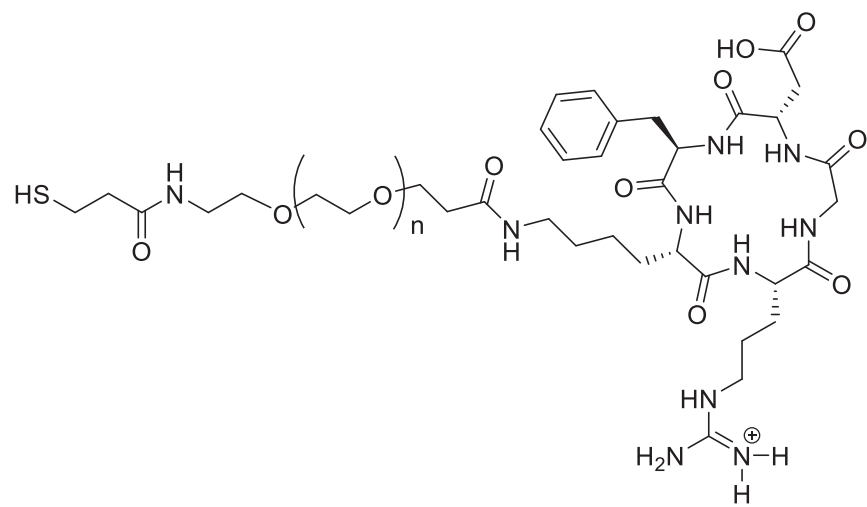
a Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247 CNRS-Université Montpellier-ENSCM, Faculté de Pharmacie, 15, avenue Charles Flahault BP14491, 34093 Montpellier cedex 5, France

E-mail: benjamin.nottelet@univ-montpl.fr

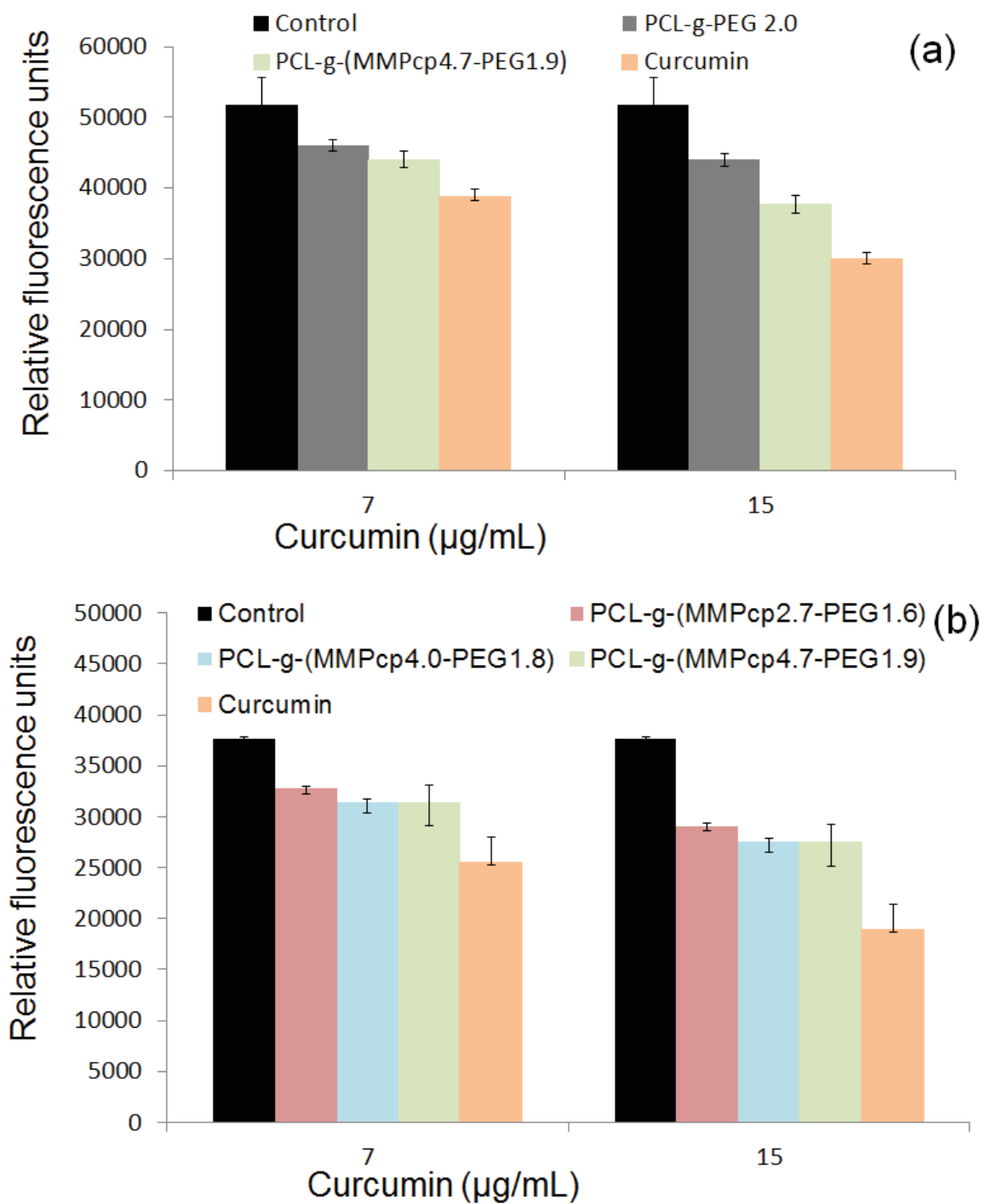
b Laboratory of Applied Chemistry, Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Lebanon

c Acad Sci Czech Republic, Inst Macromol Chem, CR-16206 Prague 6, Czech Republic

d INSERM, U823, Inst Albert Bonniot, Grenoble, France and Univ Grenoble 1, Grenoble, France



Scheme III-4 S 1 : Structure of cRGD-PEG-SH



**Figure III-4 S 1 :** *In vitro* HEK293-β3 cells cytotoxicity of curcumin-loaded nanoaggregates as a function of the curcumin concentration after 24 h with (a) comparison between copolymers with same initial hydrophilicity with or without MMPcp moieties, and (b) influence of the number of MMPcp moieties in the copolymer. (Data are expressed as means ± SD and correspond to measurements in triplicate)

## 5. MODIFICATION ANIONIQUE DES *s*PEG-(NHCO)-PCL<sub>8</sub> ET ACTIVATION PHOTOCHEMIQUE THIOL-YNE

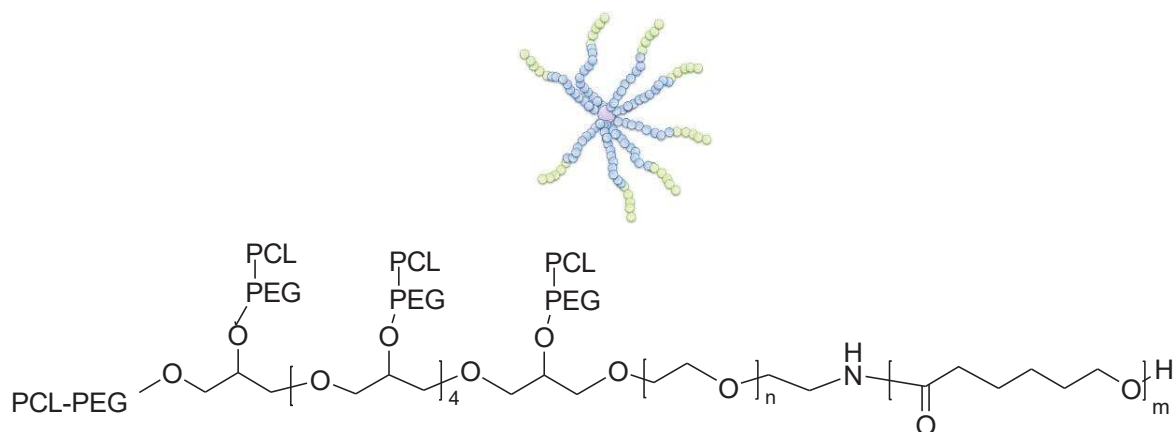
### 5.1.Introduction

La modification anionique de la PCL suivie par une fonctionnalisation par des groupes benzyles mercaptan via une réaction thiol-yne a été un succès avec un taux de substitution de 75% des groupes propargyles. Dans ce qui suit, on se propose d'utiliser ces conditions afin de fonctionnaliser non plus un polymère hydrophobe, mais des copolymères amphiphiles en étoile *s*PEG-(NHCO)-PCL<sub>8</sub> par des groupes propargyle. Ces copolymères ont été fournis par le Dr. Sytze Buwalda. Cette fonctionnalisation des copolymères étoiles *s*PEG-(NHCO)-PCL<sub>8</sub> a pour but de greffer des groupes fonctionnels, ici des groupes aromatiques, pour des applications dans le transport des PA.

### 5.2.Synthèse de *s*PEG-(NHCO)-PCL<sub>8</sub> propargylé et modification par le benzyl-mercaptan

#### 5.2.1. Propargylation des copolymères étoiles *s*PEG-(NHCO)-PCL<sub>8</sub>

Les copolymères amphiphiles *s*PEG-(NHCO)-PCL<sub>8</sub> (Fig. III-5 1) sont constitués d'un cœur de PEG en étoile formant 8 branches de PEG pour une masse molaire totale de 20 000 g/mol. Les chaînes PCL forment les parties extérieures des bras. Afin d'introduire des groupes fonctionnels le long des chaînes PCL, on a choisi de faire une propargylation suivi par une addition radicalaire thiol-yne de benzyl mercaptan. Deux copolymères ont été sélectionnés avec des longueurs différentes des chaînes PCL, PEG<sub>20000</sub>-PCL<sub>16000</sub> : (PEG-(NHCO)-(PCL<sub>17</sub>)<sub>8</sub>) et PEG<sub>20000</sub>-PCL<sub>8000</sub> : (PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub>). Les résultats obtenus sont discutés ci-dessous.



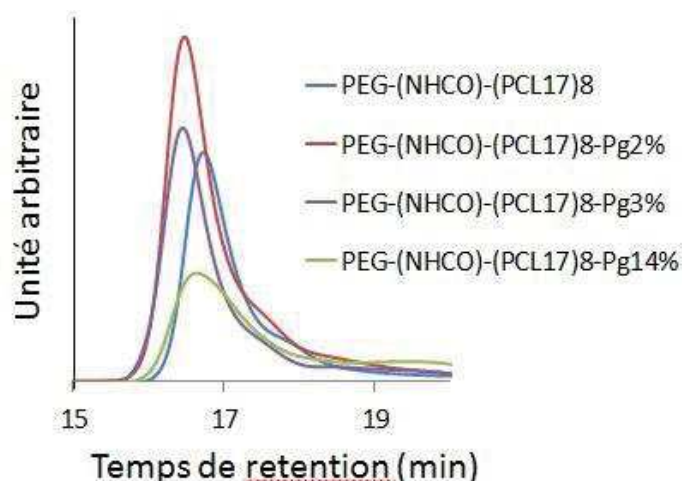
Le premier essai dans le tableau III-5 1 a été fait selon nos travaux précédents de propargylation de la PCL <sup>247</sup>. Dans ces conditions, sur la PCL seule, le taux de propargylation obtenu était de 8%. Ce n'est pas le cas ici où on obtient un taux de 2% avec le copolymère PEG-(NHCO)-(PCL<sub>17</sub>)<sub>8</sub> (tableau III-5 1, ligne 1). Cela est dû à la présence de PEG dans les copolymères étoiles et au changement de conformation des copolymères dans le solvant de réaction qui est le THF. L'augmentation du nombre d'équivalents de PgBr en diminuant la concentration (essai 2) n'a pas amélioré le taux de propargylation. On est passé à un milieu plus concentré dans l'essai 3 en gardant 1 eq. de PgBr. Dans ce cas un taux de propargylation satisfaisant est obtenu (14%).

**Tableau III-5 1** : Propargylation de PEG-(NHCO)-(PCL<sub>17</sub>)<sub>8</sub> dans le THF

Essai	Mw	Masse (g)	THF (mL)	LDA (eq.)	PgBr (eq.)	Pg %	Mn <sup>a</sup> (g/mol)	Đ	
<b>0</b>	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>17</sub> ) <sub>8</sub>	Copolymère étoile non modifié						24 300	1,6
<b>1</b>	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>17</sub> ) <sub>8</sub>	1	50	0,5	0,5	2 %	22 900	1,6	
<b>2</b>	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>17</sub> ) <sub>8</sub>	0.5	50	0,5	1	3 %	18 300	2,0	
<b>3</b>	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>17</sub> ) <sub>8</sub>	0.5	25	0,5	1	14 %	25 800	1,3	

<sup>a)</sup> Analyse SEC dans le THF, des étalons de polystyrène.

Pour vérifier que le copolymère n'a pas subi de dégradation pendant la propargylation, des analyses SEC ont été réalisées. Les chromatogrammes obtenus et les Mn confirment l'absence de dégradation des PEG-(NHCO)-(PCL<sub>17</sub>)<sub>8</sub> suite à leur fonctionnalisation (Fig. III-5 2). Le temps d'éluion diminue dans le cas des copolymères propargylés en passant de 17 à 16 min. Par contre l'aspect reste inchangé. On peut supposer que la propargylation a un impact sur l'arrangement des chaînes de PCL et donc sur le rayon hydrodynamique des étoiles. Mais aucune population de faible masse ou élargissement de la distribution ne sont pas observés, sauf dans le deuxième essai où la dispersité augmente un peu. L'analyse des spectres RMN a montré les résultats suivants : en comparant les intensités des pics de PEG et PCL ((CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O) de PEG à 3,6 ppm et (C(O)CH<sub>2</sub>) de la PCL à 2,3 ppm) avant et après propargylation, on constate que le copolymère 1 a subi une faible dégradation des chaînes PCL puisque leurs masses molaires dans le copolymère sont diminuées de 16 000 g/mol à 14 100 g/mol. Par contre, le copolymère 2 est resté intact. Le copolymère 3 est le plus dégradé, puisque la masse molaire des chaînes PCL a diminué à 10 000 g/mol.



**Figure III-5 2 :** Analyses SEC de PEG-(NHCO)-(PCL<sub>17</sub>)<sub>8</sub> et PEG-(NHCO)-(PCL<sub>17</sub>)<sub>8</sub>-Pg<sub>x</sub>

Le copolymère étoile utilisé PEG-(NHCO)-(PCL<sub>17</sub>)<sub>8</sub> étant insoluble dans l'eau, il n'est pas le copolymère de choix pour l'application visée de transport et libération de principe actif. Pour cela, on est passé à la propargylation d'un copolymère plus hydrophile, le PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub>. Les mêmes conditions ont été appliquées.

**Tableau III-5 2 :** Propargylation de PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub> et de PEG<sub>5000</sub>-b-PCL<sub>2000</sub> dans le THF

Essai	Mw	Masse (g)	THF(mL)	LDA (eq.)	PgBr (eq.)	Pg %
1	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub>	0.5	25	0,5	1	0 %
2	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub>	0.5	25	0,5 eq.	2	0 %
3	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub>	0.5	25	1,5 eq.	3	0 %
4	PEG <sub>5000</sub> -b-PCL <sub>2000</sub>	0.5	25	0,5 eq.	1	0 %

Le tableau III-5 2 montre l'échec de la propargylation de PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub> malgré les nombres élevés d'équivalents de LDA et de PgBr utilisés. Il est à noter que les conditions des expériences n'ont pas dégradé les copolymères selon l'analyse SEC. Pour essayer d'expliquer cette absence de propargylation deux hypothèses peuvent être avancées : soit l'hydrophilie élevée empêche la réaction de se produire, soit c'est la conformation étoile couplée à cette hydrophilie qui rend le THF inadapte comme solvant de réaction. Afin de répondre à cette question, nous sommes passés à la forme linéaire PEG<sub>5000</sub>-b-PCL<sub>2000</sub> ayant le même rapport EG/CL que le PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub> (EG/CL =6.4)

Dans ces conditions, le taux de propargylation obtenu dans le cas du copolymère linéaire est aussi de 0% (Tableau III-5 2, ligne 4). On peut donc en conclure que la cause de l'absence de propargylation est l'augmentation du rapport EG/CL par rapport au premier copolymère PEG-

(NHCO)-(PCL<sub>17</sub>)<sub>8</sub>. On a déduit que la conformation du copolymère très hydrophile dans le THF est la cause de cette absence de réactivité.

Il a donc été décidé d'utiliser de substituer le THF par le toluène qui est un bon solvant pour les réactions anioniques (Tableau III-5 3). L'activation anionique par LDA dans le toluène sur des polymères n'est pas citée dans la bibliographie à notre connaissance, mais c'est un bon solvant pour les deux parties PCL et PEG des copolymères.

Il est intéressant de noter que le THF participe à la stabilisation des intermédiaires réactionnels (Figure III-5 3) ce qui n'est pas le cas du toluène (presque apolaire). Le changement de solvant est donc principalement motivé par le changement de conformation attendu.

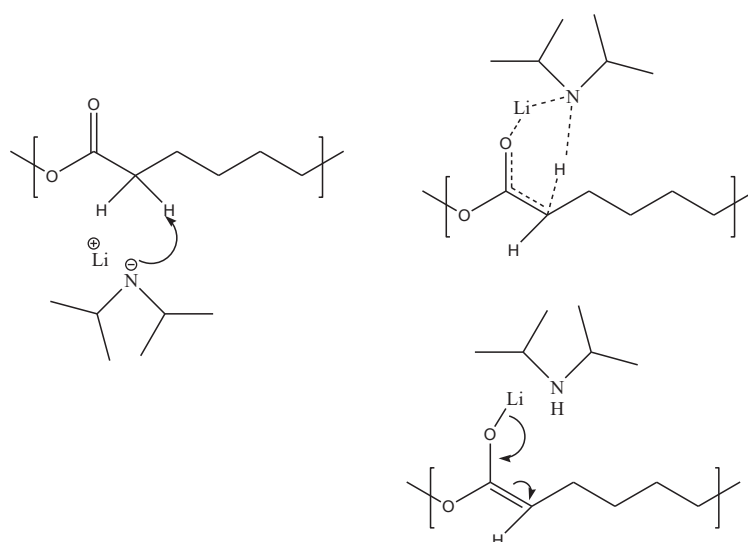


Figure III-5 3 : Quelques intermédiaires formées durant l'activation anionique par le LDA

Les nouvelles conditions ont été testées en premier lieu sur le copolymère à blocs. Le tableau III-5 4 montre un taux de propargylation élevé (13 %) des unités CL pour le PEG<sub>5000</sub>-*b*-PCL<sub>2000</sub> dans le toluène, ce qui confirme l'hypothèse suggérée sur l'effet de solvant. Suite à ce résultat concluant sur le copolymère à blocs, les nouvelles conditions ont été appliquées au copolymère étoile PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub> avec le même rapport EG/CL.

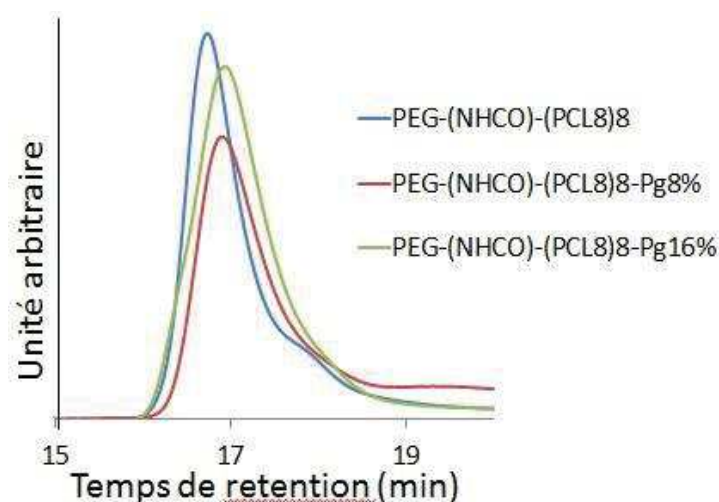


**Tableau III-5 3** : Propargylation de PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub> et de PEG<sub>5000</sub>-b-PCL<sub>2000</sub> dans le toluène

Essai	Mw	Masse (g)	Toluène (mL)	LDA (eq.)	PgBr (eq.)	Pg %	Mn <sup>a</sup> (g/mol)	Đ
1	PEG <sub>5000</sub> -b-PCL <sub>2000</sub>	0,5 g	25 ml	0,5 eq.	1 eq.	13 %	8 900	1,4
2	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub>	Copolymère étoile non modifié					22 600	1,4
3	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub>	0,5 g	25 ml	0,5 eq.	1 eq.	3 %	ND	ND
4	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub>	0,5 g	25 ml	0,75 eq.	1,3 eq.	8 %	23 300	1,3
5	PEG-(NHCO)-(PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub>	0,5 g	25 ml	1 eq.	2 eq.	16 %	21 800	1,3

a) Analyse SEC dans le THF, des étalons de polystyrène.

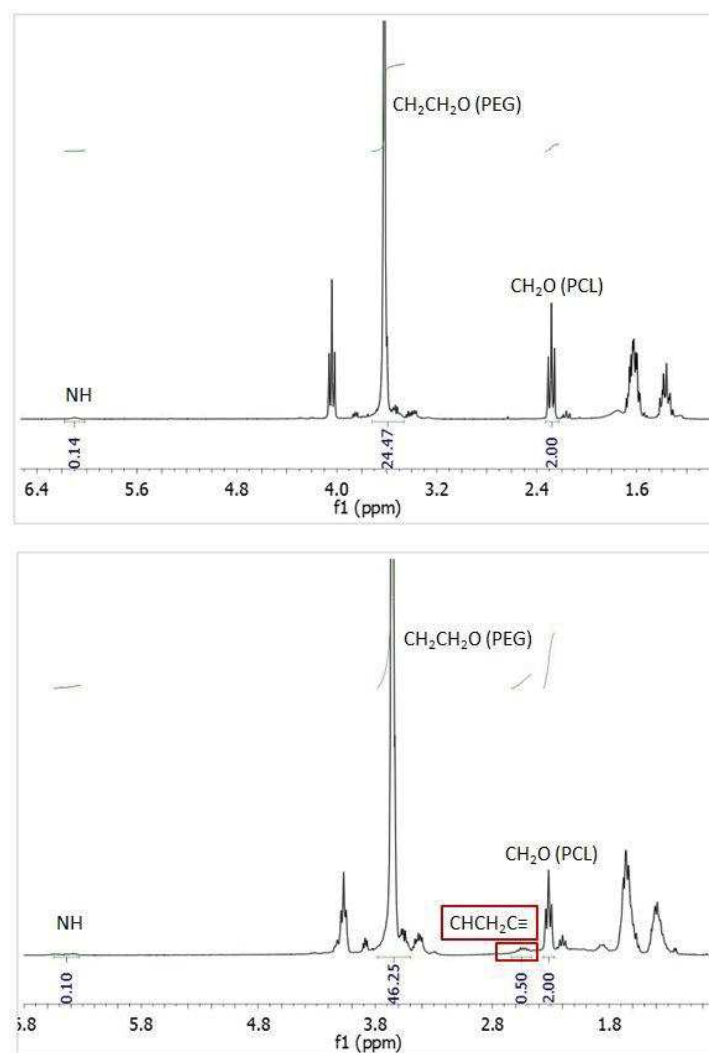
L'essai 3 dans le tableau III-5 3 a montré une faible propargylation de copolymère étoile (3%), contre 13% pour le copolymère linéaire. On a donc augmenté le nombre d'équivalents de LDA et PgBr, ce qui a entraîné une augmentation du taux de propargylation. Finalement, on a obtenu une bonne propargylation du copolymère étoile PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub> en utilisant 1,5 eq. de LDA et 3 eq. de PgBr. L'analyse SEC (Fig. III-5 4) ne montre pas de dégradation des copolymères mais les sommets des pics des copolymères propargylés ont été décalés un peu vers les Mn faibles.



**Figure III-5 4** : Analyse SEC PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub>, PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub>-Pg<sub>8</sub>% et PEG-(NHCO)-(PCL<sub>17</sub>)<sub>8</sub>-Pg<sub>16</sub>% (Tableau III-5 3 ; copolymères 2, 4 et 5)

Cependant, les spectres RMN (Fig. III-5 4) des copolymères de départ et de l'essai 5 montrent une légère dégradation après propargylation. On ne présente ici que les résultats des copolymères 4 et 5 dans le tableau III-5 3 qui possèdent les attributs recherchés dans l'application : solubilité dans l'eau avec une modification suffisante en groupes propargyle. Ces deux copolymères, avant propargylation, avaient une masse molaire de 8000 g/mol pour

les bras PCL. D'après l'analyse RMN, on constate que le copolymère 4 a 8% de propargylation et une faible dégradation de la PCL puisque la masse molaire est passée à 6400 g/mol pour les 8 bras de la PCL. Le copolymère 5 est quant à lui plus dégradé, puisque la masse molaire des chaînes PCL est diminuée à 4500 g/mol. Il y a donc, comme souvent dans le cas de l'activation anionique de la PCL un compromis entre masse molaire et taux de propargylation.



**Figure III-5 5 :** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) de PEG-(NHCO)-(PCL)<sub>8</sub> et PEG-(NHCO)-(PCL)<sub>8</sub>-Pg<sub>16%</sub> (Tableau III-5 3 ; copolymères 2 et 5)

Pour conclure, la propargylation du copolymère PEG-(NHCO)-(PCL)<sub>8</sub> a donné des résultats satisfaisants avec un taux de propargylation permettant d'envisager une réaction de type thiol-ylène (ou autre) avec des groupes fonctionnels d'intérêt. D'un autre côté, la faible dégradation de la PCL diminue l'hydrophobie du copolymère, mais ce problème pourrait être

contrebalancé lors de l'étape de synthèse initiale des étoiles par un contrôle de la longueur des bras PCL tenant compte de la dégradation subie en post-modification.

### ***5.2.2. Couplage entre sPEG-(NHCO)-PCL<sub>8</sub>-Pg et benzyl mercaptan***

L'idée est de pouvoir bénéficier d'une part d'un effet de stacking entre un principe actif et le copolymère étoile en vue d'une stabilité accrue du système de libération, et d'autre part d'un effet stacking entre les copolymères permettant ainsi de réduire la taille et la CMC des nanoobjets formés. Dans le but d'avoir des groupes aromatiques le long de la PCL, on a choisi de coupler du benzyl-mercaptan sur les PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub> propargylés par voie thiol-yne. Les réactions de couplage ont été faites pendant 2 h et on a gardé la même condition d'ajouts successifs de DMPA (4 x) au cours de ces 2h que celle utilisée pour les copolymères PCL-g-PEG. Le pic à 7,2 ppm (RMN, Fig. III-5 5) est attribué au benzyl et utilisé pour calculer le taux de substitution. L'essai 1 a été fait sur le copolymère étoile le plus hydrophobe PEG-(NHCO)-(PCL<sub>17</sub>)<sub>8</sub> substitué à 14% par des propargyl en utilisant 20 eq. de benzyl mercaptan. Dans ce cas 60% des groupes propargyles ont subi une diaddition conduisant ainsi à 16.8% de motifs benzyl par rapport aux unités CL (Tableau III-5 4). Mais comme évoqué précédemment, pour les applications visées la modification du copolymère le plus hydrophile, PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub> était recherchée. Deux essais ont été réalisés sur 2 copolymères avec des pourcentages de propargylation différents. Dans l'essai 2, seulement 30% des groupes propargyl ont subi une diaddition. Puisque le taux de groupes propargyles ayant subi une diaddition n'était pas suffisant dans le THF, ce solvant a été remplacé par le DMF dans l'essai 3. Malgré une augmentation du nombre d'équivalents de benzyle mercaptan, le taux de groupes propargyl ayant réagi avec le benzyle mercaptan est resté faible (22%).

Tableau III-5 4 : Couplage de PEG-(NHCO)-(PCL<sub>x</sub>)<sub>8</sub>-Pg et de benzyl-mercaptan

Essai	1	2	3
Copolymère	PEG-(NHCO)- (PCL <sub>17</sub> ) <sub>8</sub> -Pg <sub>14%</sub>	PEG-(NHCO)- (PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> -Pg <sub>16%</sub>	PEG-(NHCO)- (PCL <sub>8</sub> ) <sub>8</sub> -Pg <sub>8%</sub>
Pg %	14	16	8
Solvant	THF	THF	DMF
Benzyl mercaptan (eq.)	20	20	30
DMPA (eq.)	1	1	2
% benzyl /100 CL	16,8	6,1	2,1
% Pg ayant subi une diaddition	60	30	22
Mn (g/mol)	31 700	25 700	24 000
Đ	1,2	1,2	1,2

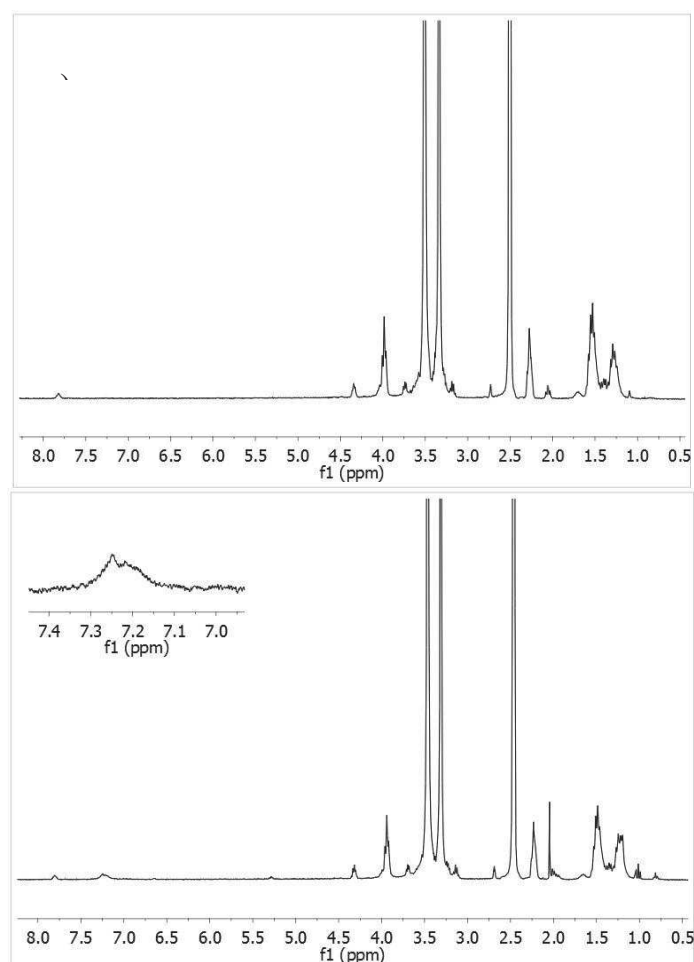
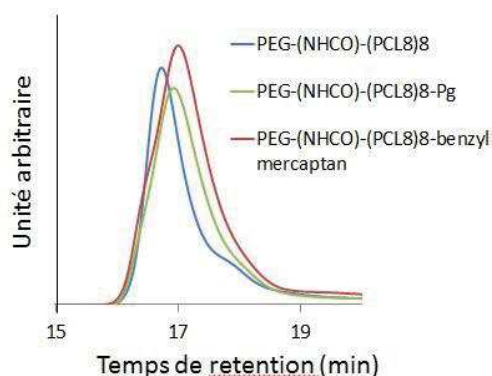


Figure III-5 6 : RMN 1H (DMSO) de a) PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub>-Pg<sub>16%</sub> (Tableau III-5 3 ; copolymère 5) et b) PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub>-benzyl mercaptan<sub>30%</sub> (Tableau III-5 4 ; copolymère 2)

Les résultats des analyses SEC du copolymère PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub> non propargylé, propargylé et couplé avec le benzyl mercaptan montrent une légère dégradation représentée

par un faible décalage vers les masses les plus faibles (Fig. III-5 7). Cette diminution de la masse molaire se produit au cours de la propargylation, et non de l'addition thiol-yne comme cela a été discuté plus haut.



**Figure III-5 7 :** Chromatogrammes de sPEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub>, sPEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub>-Pg<sub>16%</sub> (Tableau III-5 5 ; copolymère 3) et sPEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub>-benzyl mercaptan (Tableau III-5 6 ; copolymère 2)

### 5.3. Conclusion

En conclusion, la propargylation des copolymères étoilés PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub> et 17)<sub>8</sub> a donné des résultats satisfaisants, mais le couplage thiol-yne propargyl/benzyl mercaptan est resté limité dans les conditions utilisées et une amélioration des conditions est nécessaire. La faible réactivité des groupes propargyle vis-à-vis des thiols est sans doute liée à l'encombrement stérique des copolymères en étoile. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous n'avons pas pu optimiser d'avantage ces conditions. Ce travail devra être entrepris dans le futur si l'on souhaite augmenter l'efficacité du couplage thiol-yne sur les copolymères en étoile.

### 5.4. Partie expérimentale

#### *Propargylation des copolymères étoilés mPEG-(NHCO)-PCL<sub>x</sub>*

Plusieurs essais ont été effectués pour propargyler des copolymères étoilés PEG-(NHCO)-PCL<sub>x</sub> en changeant plusieurs paramètres. Les conditions suivantes sont celles utilisées pour l'essai 5 dans le tableau III-5 3. Le copolymère PEG-(NHCO)-(PCL<sub>8</sub>)<sub>8</sub> (1,78 mmol ; 0,5 g) est dissous dans 25 ml de diéthyler anhydre dans un tricol mis sous argon. Après refroidissement à -50°C, une solution de LDA (1 eq. par unité CL ; 571 μL) est injectée à travers un septum dans le tricol sous agitation. Après 15 min d'agitation à -50°C, une solution de bromure de propargyl (2 eq. par unité CL ; 203 μL) est ajoutée. La réaction est arrêtée

après 15 min (à une température  $-40^{\circ}\text{C}$ ) par addition d'une solution de HCl 1 M jusqu'à neutralisation de pH.

Traitement : Le copolymère est dialysé contre un mélange eau/acétone : 50/50 dans une membrane de seuil de coupure 3500 g/mol, puis l'acétone est évaporée et l'eau éliminée par lyophilisation.

Caractérisation : Le copolymère est analysé par SEC et par RMN  $^1\text{H}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz ;  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = PCL : 4,0 (2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,4-2,6 (1H,  $\text{C(O)CH}(\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH})$ ) et 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}\equiv\text{CH}$ ), 2,3 (2H,  $\text{C(O)CH}_2$ ), 1,6 (4H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 1,3 (2H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ) ; PEG : 3,6 (4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ) ; 2,2 (2H,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ ) ; 6,3-6,5 ( $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ).

### ***Couplage entre PEG-(NHCO)-PCL<sub>x</sub>-Pg et benzyl mercaptan***

Mode opératoire : Le copolymère 1 (100 mg) dans le tableau III-5 4 est solubilisé dans 2.5 ml THF dans un Schlenk. Une quantité de benzyl mercaptan (106  $\mu\text{L}$  ; 20 eq) est ajoutée. Le DMPA (12 mg ; 1 eq.) est solubilisé dans 1.5 ml THF dans un pilulier couvert par un papier aluminium. Les 2 solutions sont purgées à l'argon (une partie de THF s'évapore). Le Schlenk est irradié 2h sous agitation et le DMPA est ajouté en 4 fois à des intervalles de temps égaux.

Traitement et purification : La solution a été dialysée dans l'acétone dans une membrane de seuil de coupure 3500 g/mol, puis l'acétone est évaporée et le copolymère est séché sous vide.

Caractérisation : Le copolymère est analysé par SEC et par RMN  $^1\text{H}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz ; DMSO) :  $\delta$  (ppm) = PCL : 4,0 (2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,3 (2H,  $\text{C(O)CH}_2$ ), 1,5 (4H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 1,2 (2H,  $\text{C(O)CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ) ; PEG : 3,5 (4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ) ; 7,2-7,4 (5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ) ; 7,8 (NHCO).

**CHAPITRE IV**  
**MODIFICATION EN SURFACE**

---

Ayant développé une méthode de modification des chaînes de PCL, nous nous sommes ensuite intéressés à la possibilité d'étendre cette approche à la modification de surface de polyesters aliphatiques. Le PLA a été choisi en raison de sa prépondérance dans le domaine des dispositifs médicaux temporaires et des échafaudages pour applications en ingénierie tissulaire. De manière plus précise, nous nous sommes intéressés à des fibres de PLLA (ou PLA<sub>100</sub> noté PLA dans la suite du texte) dont la fonctionnalisation a pour but de réaliser l'immobilisation covalente d'espèce inorganiques pour créer des hybrides organiques/inorganiques pour l'ingénierie tissulaire. L'objectif principal de la modification des fibres PLA est le greffage de nanoparticules d'oxyde de fer pour des applications en ingénierie tissulaire des neurones. Ce projet est réalisé en collaboration entre 3 laboratoires comme indiqué dans la figure IV 1, et notre tâche consistait à i) activer les nano- et micro-fibres de PLA sans dégradation, et ii) réaliser le couplage entre les fibres de PLA activées et les nanoparticules super paramagnétiques Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> communément appelées SPIONs dans la littérature pour Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles.

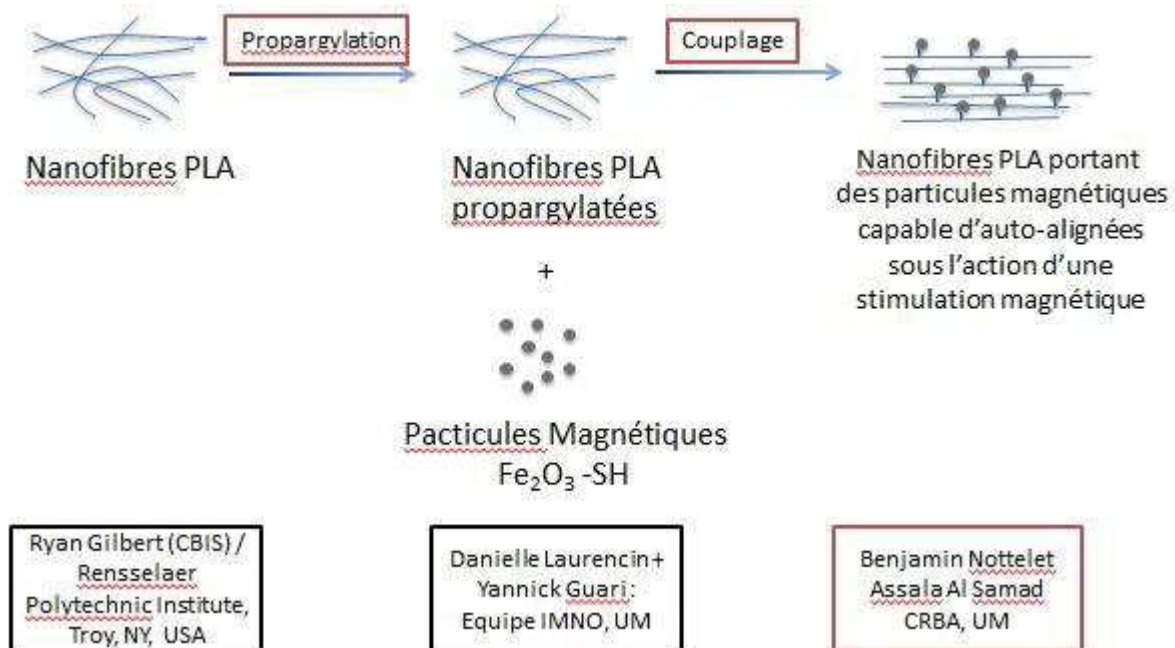


Figure IV 1 : Fonctionnalisation des fibres PLA

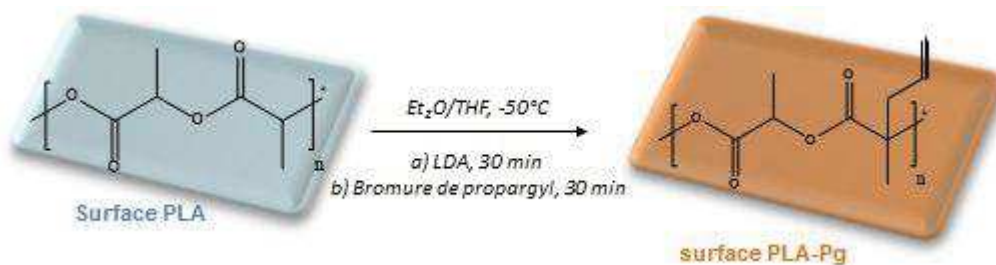
### 1. Modification anionique du PLA

En accord avec la méthodologie développée dans les chapitres précédents, la modification des fibres repose ici sur une propargylation initiale afin d'introduire des groupes réactifs le long



des chaînes de PLA se trouvant en surface du matériau. Nous nous sommes donc attachés à réaliser cette propargylation sans dégrader les fibres. Toutefois, avant de présenter ces essais, et afin de placer cette étude en perspective avec les travaux antérieurs menés sur ce sujet au laboratoire, le paragraphe qui suit donne une courte description des modifications anioniques de PLA réalisées en surface avant ce projet de thèse.

Cette dernière a fait l'objet d'une thèse menée au sein de notre groupe par Sarah El Habnoui. La propargylation de plaques de PLA a été réalisée avec succès dans un mélange de solvants (THF solvant classique de ce type de réaction et Et<sub>2</sub>O pour éviter la solubilisation de PLA)<sup>248</sup> (Fig. IV 2). Ce premier succès a en particulier conduit à la préparation de surfaces antibactériennes par immobilisation de divers polymères antibactériens par chimie click de type CuAAC<sup>164</sup> ou photo thiol-yne<sup>165</sup>.



**Figure IV 2 :** Modification de surface de PLA

Ces modifications de surfaces ont été effectuées sur des matériaux massifs, *ie.* des plaques de PLA. La question était donc de savoir si en se basant sur ces conditions, la modification de nano- et micro-objets de type nanofibres de PLA serait possible sans dégradation.

## ***2. Modification des fibres de PLA par des SPIONS***

### ***2.1. Propargylation des fibres de PLA***

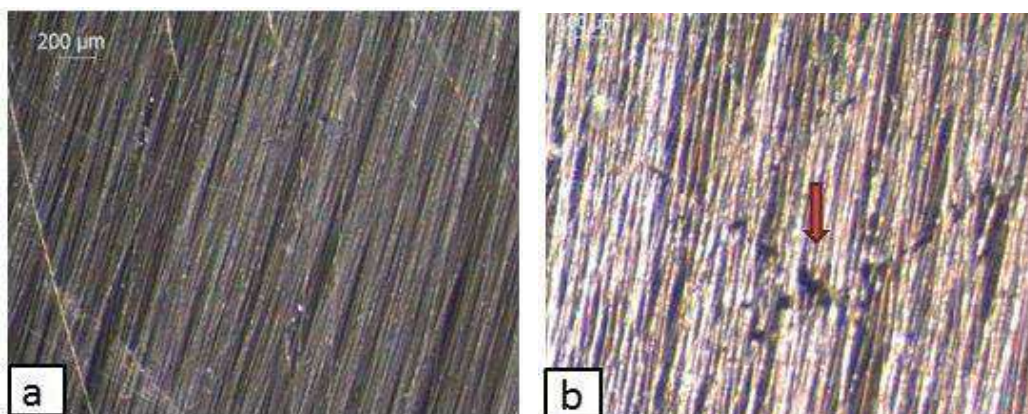
Des réseaux de fibres alignées de PLA<sub>100</sub> (Mn = 100 000 g/mol; diamètre moyen = 1,5 ± 0,5 μm) ont été électrospinnées sur des plaques de verre et fournies par l'équipe du Pr. Ryan Gilbert. Une première étape a consisté à tester les conditions de l'activation anionique et de la substitution afin de garantir une conservation de la morphologie des fibres de PLA. Le Tableau IV 2 résume ces essais.

**Tableau IV 1** : Conditions de propargylation des fibres PLA

Essai	Solvant	Ajout d'une plaque support des nanofibres	LDA/temps	PgBr/temps	Aspect des fibres
1	140 ml Et <sub>2</sub> O/ 40 ml THF	Ajout de la plaque à T ambiante	1 ml/ 30 min	1 ml/1 h	Coupure
2	60 ml Et <sub>2</sub> O/ 20 ml THF	Ajout de la plaque à -50°C	0,125 ml/ 30 min	0,125 ml/ 1 h	Coupure
3	60 ml Et <sub>2</sub> O/ 20 ml THF	Ajout de la plaque à -50°C	0,062 ml/ 30 min	0,062 ml/ 1 h	Coupure

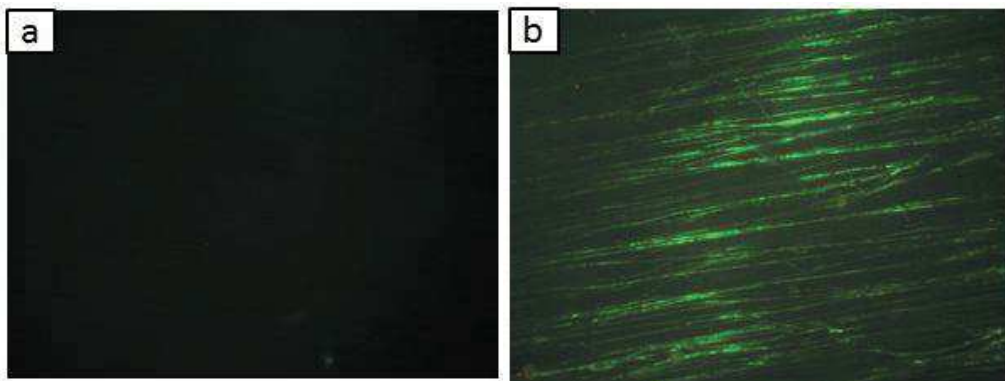
Des coupures des fibres ont été observées dans les conditions utilisées. La diminution de la quantité de THF en diminuant la quantité globale du mélange de solvant, la diminution du nombre d'équivalents de LDA et de PgBr (tableau IV 1, lignes 2 et 3) n'ont pas permis d'éviter les coupures de fibres. Pour cette raison on a choisi de diminuer au maximum la proportion de THF dans le mélange de solvant en passant de ~25% (v:v) à 5%.

Afin de tester uniquement l'influence du mélange de solvant, des clichés des fibres ont été réalisés en microscopie optique (Fig. IV 4, a), puis elles ont été plongées pendant 1h dans un mélange 95 ml Et<sub>2</sub>O/ 5 ml THF refroidit à -50°C. Des fissures sur une partie des fibres ont été observées (Figure non montrée). Elles étaient cependant peu nombreuses et il a été décidé de lancer une propargylation dans ce mélange de solvant. La réaction a été réalisée comme suit : les fibres ont été plongées dans le mélange de solvant refroidi à -50°C ; l'étape d'activation a consisté en l'ajout de 0,7 ml de LDA et 30 minutes de réaction à -50°C ; enfin l'étape de substitution a consisté en l'ajout de 0,4 ml de PgBr et 1 h de réaction à -40°C. Les clichés pris après réaction montrent plusieurs coupures des fibres (Fig. IV 3, b).



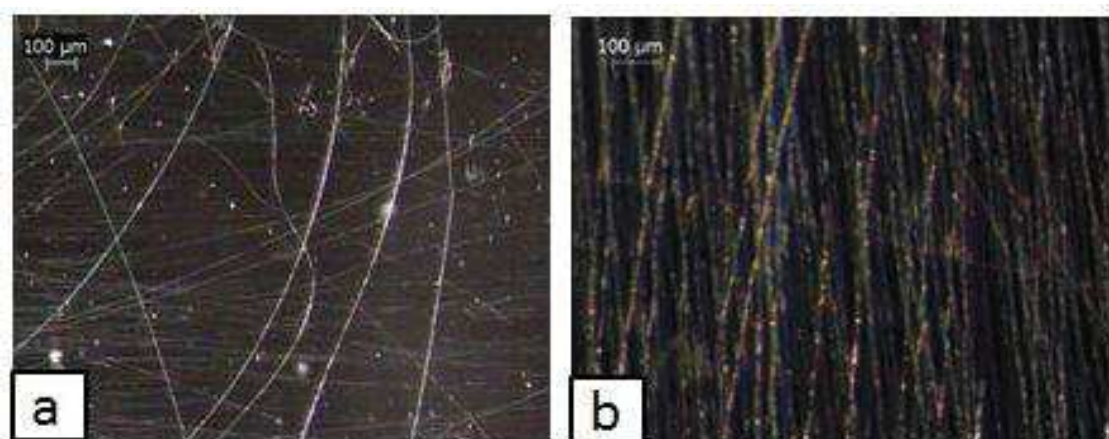
**Figure IV 3** : Fibres non modifiées (a) et fibres propargylées (b) dans un mélange Et<sub>2</sub>O/THF : 95/5  
Etant donné l'impossibilité de vérifier la substitution par RMN, tant qualitativement que quantitativement, et afin de prouver que la propargylation des fibres était effective, un

marquage fluorescent des fibres propargylées a ensuite été réalisé. Un dérivé azidé de FITC (FITC-N<sub>3</sub>) a été greffé par réaction de chimie click de type CuAAC. Des fibres non propargylées ont été utilisées en parallèle comme contrôle afin de s'assurer de l'absence d'adsorption du fluorophore. Après traitement des fibres propargylées et non propargylées des clichés ont été pris par microscopie optique de fluorescence. On constate sur la Figure IV 4 que les fibres non propargylées ne sont pas fluorescentes au contraire des fibres propargylées qui présentent une fluorescence non homogène. Ce résultat montre la présence de liaisons covalentes entre la FITC et les fibres, et de manière indirecte la présence initiale de groupes propargyles qui restent accessibles et réactifs en surface des fibres de PLA. Cette première optimisation a permis d'atteindre l'objectif premier d'immobilisation de groupes propargyle en surface de fibres de PLA. Cependant, quelques coupures de fibres étaient encore présentes.



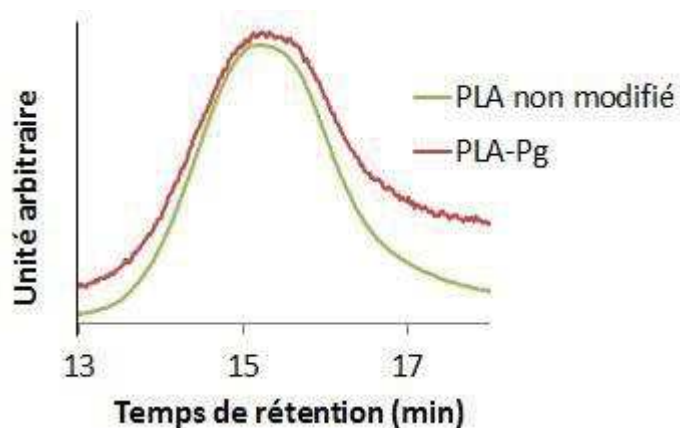
**Figure IV 4 :** Fibres ( a) Non propargylées ; b) propargylées dans un mélange Et<sub>2</sub>O/THF : 95/5) puis couplées avec des FITC-N<sub>3</sub> par CuAAC

Dans le but d'éliminer totalement les coupures, et au risque de diminuer la réactivité des chaînes de PLA vis-à-vis de l'activation anionique et de la substitution, il a été choisi de supprimer totalement le THF pour réaliser la modification en milieu Et<sub>2</sub>O pur (voir partie expérimentale). Les photos prises par microscope optique avant et après propargylation montrent que les fibres ne sont pas altérées dans ces conditions (figure IV 5).



**Figure IV 5 :** a) Fibres non modifiées et b) fibres propargylées dans Et<sub>2</sub>O

En plus, les analyses GPC des fibres (Fig. IV 6) avant et après propargylation montrent des pics monomodaux avec des Mn aux alentours de 100 000 g/mol.



**Figure IV 6 :** Chromatogrammes de PLA non modifié et PLA propargylé dans Et<sub>2</sub>O

Afin d'affirmer la propargylation on a réalisé un couplage avec le FITC-N<sub>3</sub>. La figure IV 7 montre qu'il n'y a pas de coupure des fibres et qu'il y a une fluorescence quasi homogène confirmant la propargylation. En conclusion, on a réussi à faire la propargylation en surface des fibres PLA dans Et<sub>2</sub>O dans un temps court (30 min) et en évitant la dégradation. Il faut cependant noter que les quantités utilisées de LDA et PgBr sont importantes par rapport à la quantité de PLA (voir partie expérimentale). En raison du succès de la fonctionnalisation, ces conditions ont été conservées dans la suite de ce travail mais une optimisation des quantités de ces deux réactifs devra sans doute être menée par la suite.

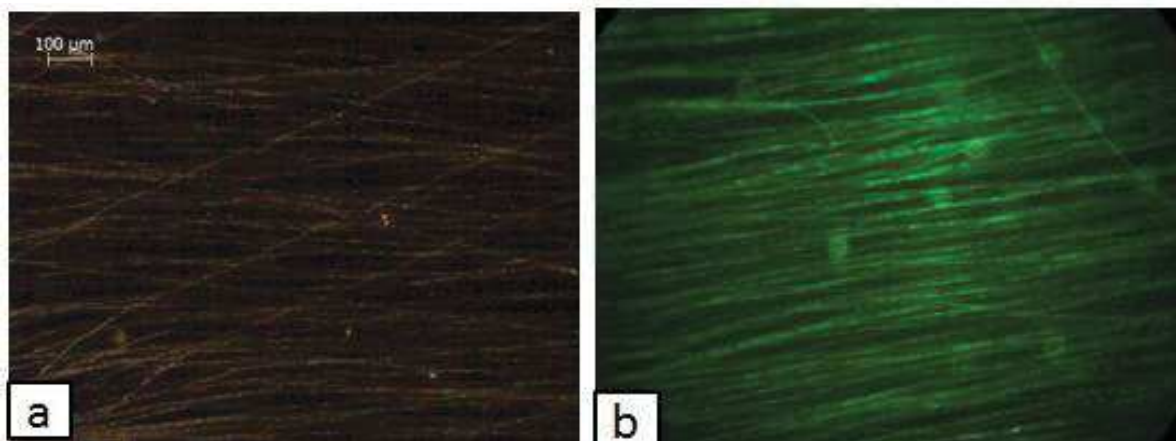


Figure IV 7 : Fibres propargylées dans Et<sub>2</sub>O puis couplées avec des FITC-N<sub>3</sub> par CuAAC (a) image microscope optique ; b) image par microscope optique de fluorescence)

## 2.2. Greffage de nanoparticules Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sur la surface des fibres de PLA

Après avoir propargylé les fibres de PLA sans les endommager, nous sommes passés à l'étape clé de ce projet : le greffage des nanoparticules de type SPIONs par voie thiol-yne. La question principale est de savoir si ces SPIONs (diamètre moyen de 18 nm) pourraient être immobilisés malgré leur dimension, comme cela a été le cas avec la FITC qui est une molécule organique ne présentant a priori pas (ou peu) de problème d'un point de vue de l'approche de la surface des fibres. Un deuxième aspect est que l'on souhaitait s'affranchir de l'utilisation de cuivre pour le greffage et passer par un greffage photochimique de type thiol-yne comme celui étudié dans la première partie de cette thèse.

Pour cela, des SPIONs fonctionnalisés par une couronne de ligands porteurs d'une fonction thiol libre (HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-PO<sub>3</sub>H) ont été synthétisés dans le laboratoire IMNO (ICGM) par les Dr. Yannick Guari et Danielle Laurencin assistés de M. Xavier Dumail. La Figure IV 8 montre un cliché MEB de ces SPIONs et le tableau 2 leur caractérisation élémentaire en P et Fe. La densité de groupes thiol en surface des SPIONs pour un greffage dense est considérée entre 5 et 10 molécules/nm<sup>2</sup>. Pour préparer les SPIONs, la taille de nanoparticules est précisée (vue en TEM ou calculée à partir d'une concentration massique précise), puis les ligands sont ajoutés pour avoir une monocouche dense de 5 à 10 molécules/nm<sup>2</sup>. Pour une monocouche dense de 5 molécules/nm<sup>2</sup>, la concentration en ligands thiols s'élève à 62,5 nmol/mL. Les liens entre les ligands et les SPIONs sont des liaisons de coordination de type P-O-Fe ou P-(OH)-Fe, et assurés par la fonction phosphonique.



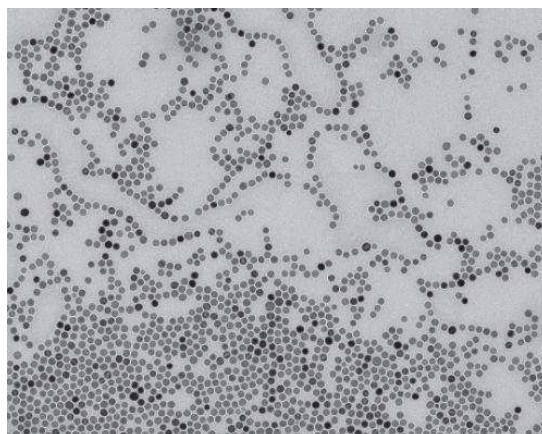


Figure IV 8 : Image électronique de SPIONs

Tableau IV 2 : Analyse élémentaire de SPIONs

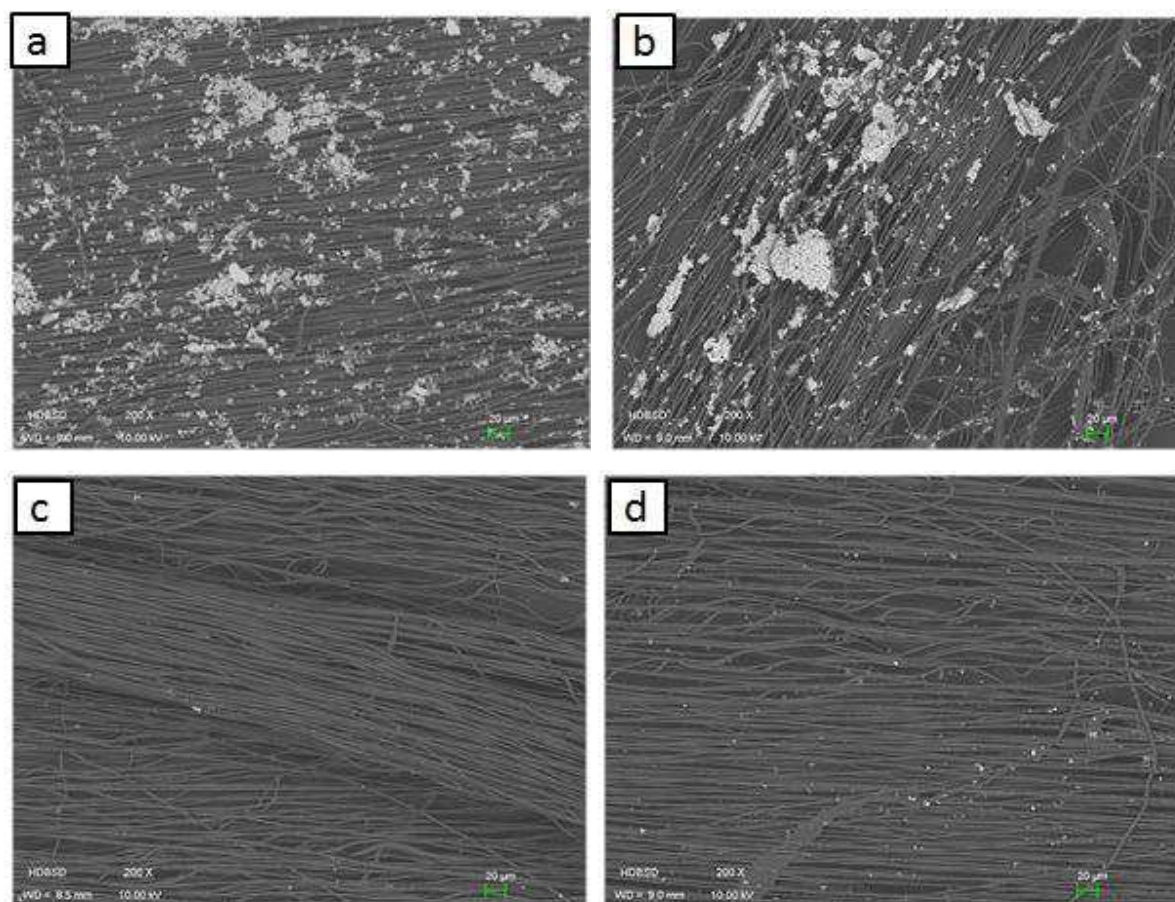
Elément (% massique)	Spectre 1	Spectre 2	Spectre 3	Spectre 4	Moyen	Ecart- type
<b>P</b>	6,87	7,13	6,87	5,66	6,63	0,66
<b>Fe</b>	93,13	92,87	93,13	94,34	93,37	0,66
<b>Total</b>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	

Dans ce qui suit, la méthodologie de couplage thiol-yne a été appliquée à ces SPIONs fonctionnels. Les réactions ont été réalisées avec 3 lots différents de particules de concentrations différentes. Le choix du solvant de réaction s'est porté sur le mélange cyclohexane/acétone (3:1) qui avait été utilisée avec succès dans un travail précédent de notre groupe pour des réactions thiol-yne sur PLA<sup>165</sup> et qui présente l'avantage de garantir un maintien de la morphologie des fibres, tout en permettant une bonne suspension des SPIONs fonctionnels.

Dans les premiers essais on a utilisé des particules qui avaient été préparées 2 mois auparavant (lot 1). La quantité de DMPA a été fixée à 1 équivalent par rapport au thiol en tenant compte du caractère hétérogène de la réaction solide-solide à réaliser. Enfin, les temps d'irradiation ont été fixés à 5 ou 10 min. Des plaques non propargylées ayant subi les mêmes traitements ont été utilisées comme contrôles.

**Tableau IV 3 :** Couplage thiol-yne entre des fibres PLA-Pg et des SPIONs (lot 1)

Essai	Quantité de ligands thiolés (nmol)	Temps d'irradiation (min)	Présence d'agrégats de SPIONs	Fe détectés sur les fibres (hors agrégats)
1	62,5	5	+++	+
2	62,5	10	+++	+
3 (contrôle)	62,5	5	+	Traces
4 (contrôle)	62,5	10	+	Traces



**Figure IV 9 :** Fibres propargylées et couplées avec des SPIONs (lot 1) a) 5 min ; b) 10 min ; fibres contrôles non propargylées ayant subi le même traitement c) 5 min ; d) 10 min

Les analyses MEB montrent que les fibres restent intactes dans toutes les manipulations (Figure IV 9). Par contre toutes les plaques montrent la présence d'agrégats de dimensions bien supérieures à celles des SPIONs. L'analyse EDX de ces agrégats a montré qu'ils contiennent les éléments Fe, S, P, et O présentes dans les SPIONs ce qui confirme que ces objets résultent d'une agrégation des SPIONs fonctionnels utilisés. Un zoom sur les fibres a mis en évidence la présence de Fe sur les fibres propargylées. Le fer est aussi présent à l'état

de traces sur les fibres non propargylées, probablement à cause d'un lavage imparfait. En raison de la nature des fibres et de l'extrême petitesse des SPIONs, il n'a pas été possible de montrer les SPIONs isolés sur les fibres de PLA par MEB car ces dernières ont tendances à fondre sous le faisceau localisé d'électrons au cours de l'acquisition. La présence d'une quantité de Fe plus importante sur les fibres propargylées confirme cependant la réussite du couplage.

Le problème reste cependant l'agrégation pouvant être liée au vieillissement des particules qui ont une tendance naturelle à l'agrégation renforcée ici par la possibilité d'oxydation des thiols libres pour former des ponts disulfures entre SPIONs. Pour cette raison, deux nouveaux lots des particules ont été synthétisés et fraîchement utilisés dans des réactions de couplage thiol-yne. Le lot 2 a été préparé à une concentration de 0,75 mg/ml et a été utilisé dans les essais 1 à 4 présentés dans le tableau IV 4. Pour les essais 5 et 6 le lot 3 a été préparé à une concentration de 1,5 mg/ml.

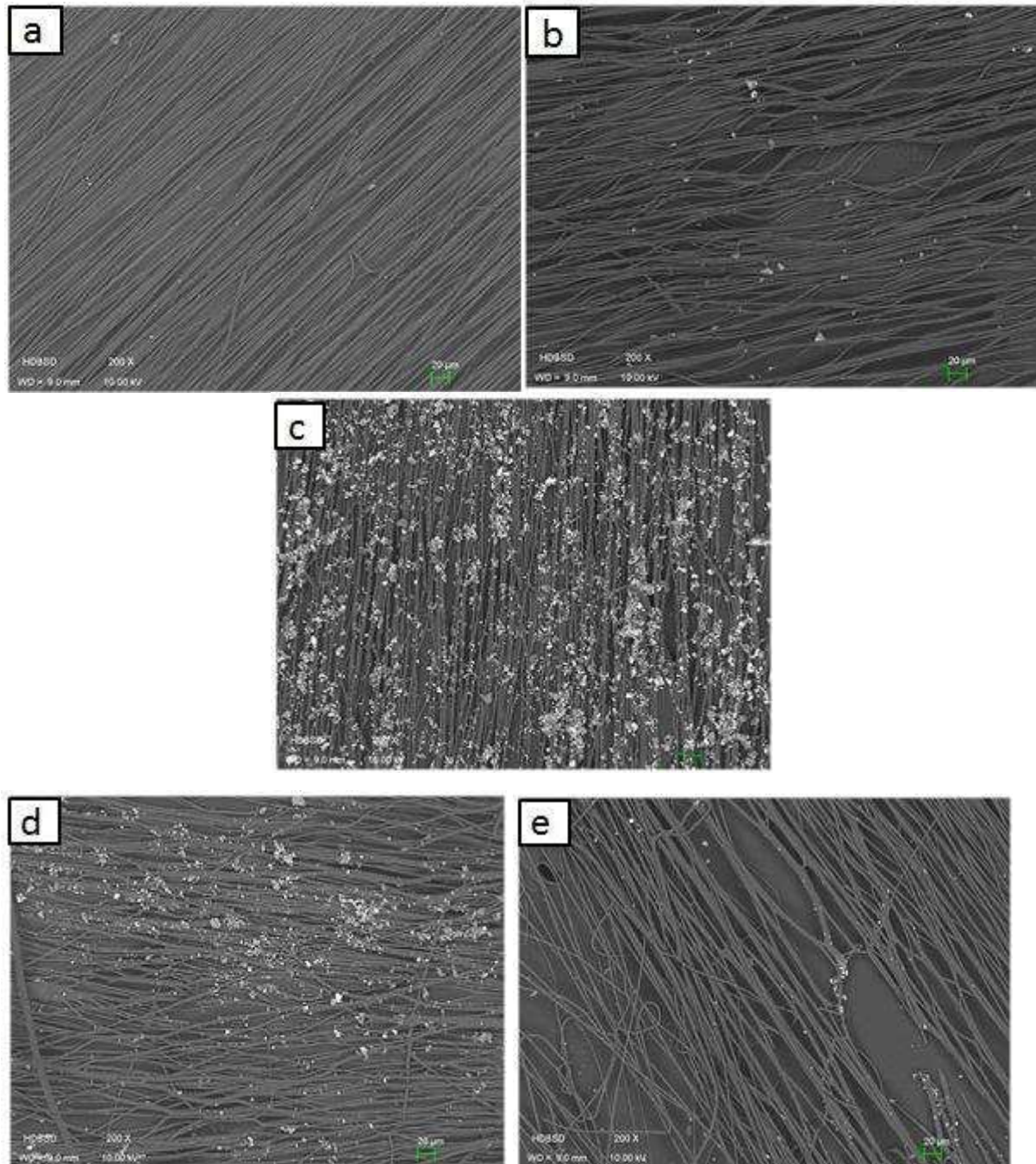
**Tableau IV 4 :** Couplage thiol-yne entre des fibres PLA-Pg et des SPIONs (essais 1, 2, 3, 4 : lot 2 ; essais 5, 6 : lot 3)

<b>Essai</b>	<b>Quantité de ligands thiolés (nmol)</b>	<b>Temps (min)</b>	<b>Présence d'agrégats de SPIONs</b>	<b>Eléments détectés sur les fibres loin des agrégats</b>
<b>1</b>	62,5	5	Rares	Pas de Fe
<b>2</b>	62,5	10	+	P et S
<b>3</b>	134	10	+++	Peu de Fe, présence de S et P sans Fe
<b>4 (+TCEP)</b>	134	10	++	Peu de Fe, présence de S et P sans Fe
<b>5</b>	268	10	+++	Pas Fe, présence de P et S
<b>6 (contrôle)</b>	268	10	rare	Pas de Fe

Les analyses MEB de 3 premiers essais ont montré que les fibres restent intactes dans tous les cas avec toutefois une présence d'agrégats plus importante dans l'essai 3. A nouveau ces agrégats contiennent les éléments Fe, O, P et S. Concernant l'essai 1, il n'a pas été détecté de Fe ni de S sur les fibres sans agrégats. Le temps court d'irradiation UV (5 min) peut expliquer ce résultat. Plus surprenant, l'essai 2 montre l'absence de Fe sur les fibres de PLA, mais la présence des éléments S et P ce qui tend à démontrer que les ligands sont sous forme libre sans particules mais qu'ils ont réagi avec les groupes propargyle avant ou après désorption des particules. Le couplage en présence d'une quantité plus importante de SPIONs thiolés (essai 3) a permis de coupler une faible quantité des NPs non agrégées (détection de Fe) avec le propargyl, en plus des ligands thiolés libres déjà cités. Enfin, comme montré sur les clichés



MEB (figure IV 10, a, b, c), l'utilisation d'une solution de SPIONs fraîchement préparés a permis de diminuer la taille des agrégats mais sans s'en affranchir totalement.



**Figure IV 10** : Fibres propargylées et couplées avec des SPIONs, conditions dans le tableau 2 ; lot 2 : a) essai 1, b) essai 2, c) essai 3 ; (lot 3) : d) essai 4; e) essai 5

Les analyses MEB (Fig. IV 13, a) et EDX (Fig. IV 12-14, a et tableau IV 6, b) de quelques zones de l'essai 3 (lot 2 de particules) montrent la présence de Fe sur les fibres propargylées loin des agrégats (spectre 47) ce qui prouve le succès du couplage.

Afin de favoriser le couplage de NP, un essai a été réalisé avec le troisième lot en augmentant la concentration initiale en SPIONs (tableau IV 4, essai 5) à 1.5 mg/ml (268 nmol de ligands thiolés). Un contrôle non propargylé a été utilisé en parallèle (tableau IV 4, essai 6).

Les analyses MEB (Fig. IV 10, d, e) et EDX des essais du lot 3 montrent de nouveau l'absence de Fe loin d'agrégats pour l'essai 1. Par contre, le P et le S sont présents dans ces zones. Ce qui prouve le succès de couplage mais avec les ligands thiolés libres indiquant la présence d'un excès de ces derniers. Les fibres contrôles ne présentent qu'une très faible quantité d'agrégats (physisorbés) et une absence totale de Fe sur les fibres loin des agrégats.

Les conclusions qu'on peut déduire à partir de ces essais sont :

- La propargylation suivi par l'activation thiol-yne n'endommage pas les fibres PLA.
- Le couplage avec les SPIONs fonctionnalisés thiol est possible dans les conditions suivantes : thiol à 26,8 nmol/ml, 1 eq. de DMPA par thiol, temps d'irradiation UV 10 min, mélange de solvant c-hexane/acétone (3:1).

Finalement dans une dernière tentative pour diminuer l'agrégation des SPIONs, liée à la présence de thiols libres et la formation de ponts disulfure, un réducteur, le TCEP, a été ajouté à la solution de nanoparticules avant l'activation UV. Un essai (essai 4, tableau IV 4) a été effectué dans les conditions de l'essai 3 dans le tableau IV 4 en ajoutant 1 équivalent de TCEP par rapport aux thiols libres. En comparant les figures avec et sans TCEP (Figure IV 11), on remarque une meilleure dispersion sur la surface de fibres en présence de TCEP. La présence du réducteur, bien qu'elle ne permette pas d'éliminer tous les agrégats, permet d'améliorer la dispersion des nanoparticules et leur répartition de manière homogène sur les fibres.

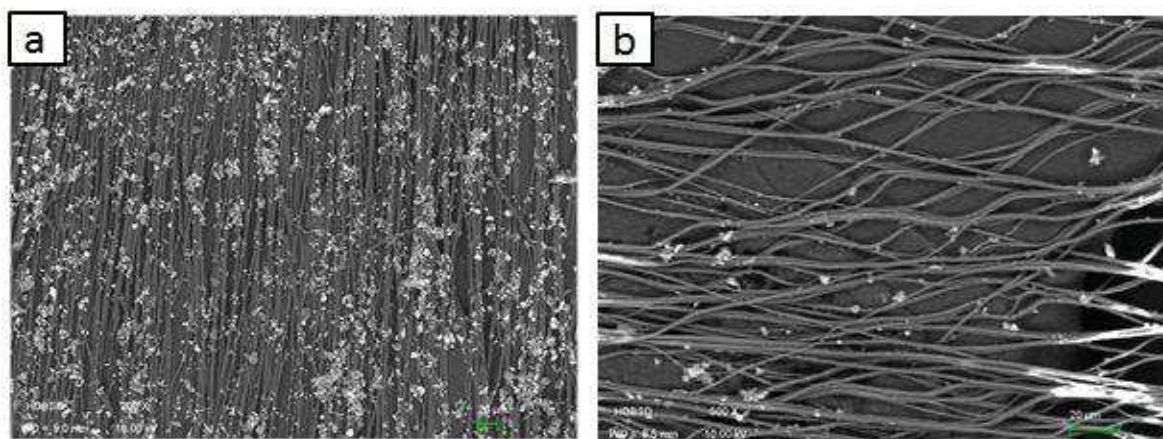
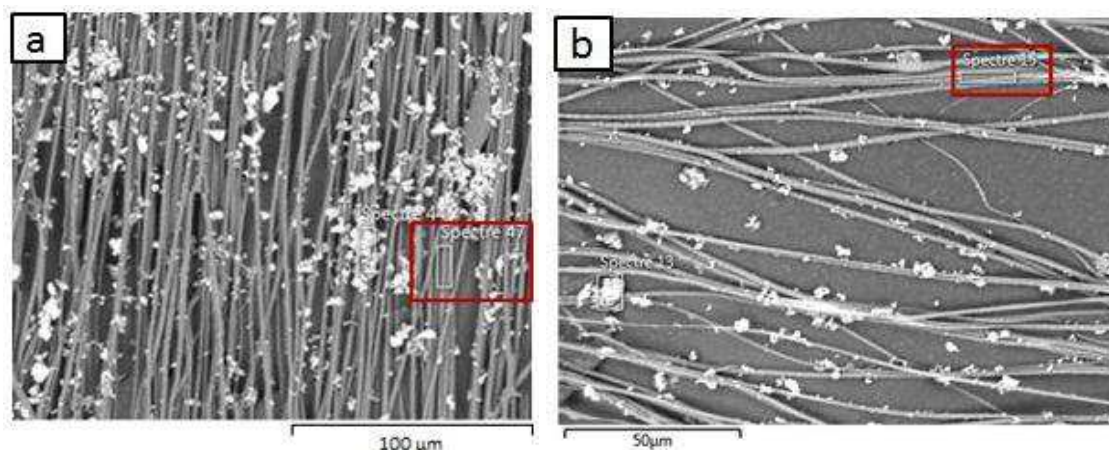


Figure IV 11 : Fibres propargylées et couplées avec des NPs thiolées, conditions dans le tableau 2, a) sans TCEP : essai 3 ; b) avec TCEP : essai 4

Les analyses MEB et EDX (Fig. IV 12, 13 et tableau 5) de l'essai 4 (tableau IV 4) en présence de TCEP montrent le succès de couplage par la présence des éléments Fe, S et P (% massique : 0,59%, 0,36% et 0,36%) sur les fibres loin des agrégats.

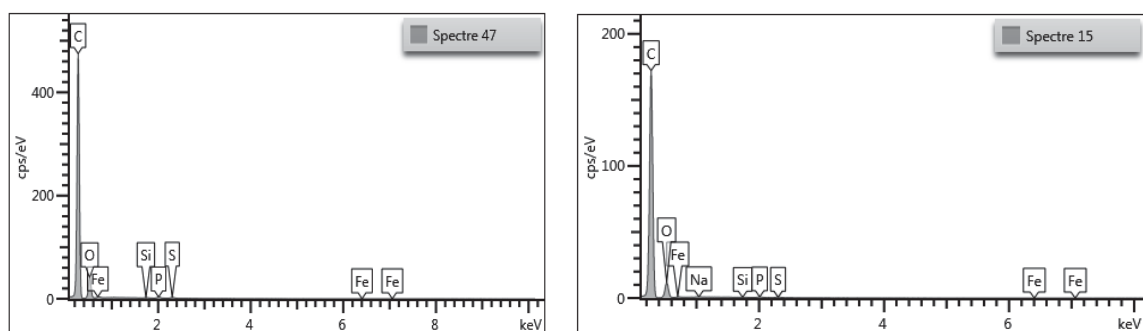
Dans les expériences précédentes, on a constaté la présence des éléments P et S sans Fe sur les fibres ce qui nous a conduit à affirmer qu'il y a couplage de ligands libres. Afin d'évaluer le rapport de greffage entre les ligands liés aux particules et les ligands libres, on peut se servir de l'analyse élémentaire des SPIONs. On s'attend à obtenir après couplage un pourcentage massique entre les éléments P et Fe (P/Fe) de 7% si tous les ligands greffés sont liés aux nanoparticules. Les rapports P/Fe des expériences faites en présence ou absence de TCEP (Tableau IV 2, essais 3 et 4) sont largement supérieurs à cette valeur et atteignent 61% dans les deux cas, ce qui confirme que les ligands libres et couplés avec les nanoparticules ont réagi de la même manière en présence et en absence de TCEP.

En comparant la quantité de Fe sur les fibres modifiées en absence et en présence de TCEP (tableau IV 4 ; essai 3 et 4), on trouve que la quantité de Fe sur la zone analysée est plus importante en absence de TCEP (0,89% sans TCEP contre 0,59% avec TCEP). On ne peut cependant pas conclure que le couplage est plus efficace en absence de TCEP car la zone analysée n'est qu'une zone limitée de fibres présentes sur la plaque et il serait nécessaire de comparer plusieurs zones pour évaluer l'efficacité du couplage et réaliser des essais multiples pour avoir des données statistiquement fiables. Il est à noter aussi que quelques traces d'impuretés (Na et Si) ont été détectées sur les fibres.



**Figure IV 12 :** Fibres propargylées et couplées avec des NPs thiolés a) essai 3, lot 2, spectre 47 ; b) essai 4 ; lot 2 en présence de TCEP), zone avec un cadre rouge : analysée par EDX





**Figure IV 13 :** Analyse élémentaire de surface réalisée par EDX a) Spectre 47 ; essai 3 ; lot 2 ; b) Spectre 15 ; essai 4 ; lot 2 en présence de TCEP

**Tableau IV 5 :** Analyse élémentaire de surface réalisée par EDX : SPIONs ; Couplage PLA-Pg et SPION : essai sans TCEP (Spectre 47, essai 3, lot 2), essai avec TCEP ( Spectre 15, essai 4, lot 2)

Élément	SPIONs	Sans TCEP		Avec TCEP	
	% Masse	% Masse	% atomique	% Masse	% atomique
<b>C</b>	N.D.	84.41	88.61	85.75	89.49
<b>O</b>	N.D.	13.67	10.78	12.77	10.01
<b>Na</b>	-	-	-	0.11	0.06
<b>Si</b>	-	-	-	0.06	0.03
<b>P</b>	6,63	0.55	0.22	0.36	0.14
<b>S</b>	N.D.	0.47	0.19	0.36	0.14
<b>Fe</b>	93,37	0.89	0.20	0.59	0.13
<b>Total:</b>	100,00	100.00	100.00	100.00	100.00

### 3. Conclusions

Les résultats obtenus en suivant la stratégie de greffage de particules thiolées sur les fibres de PLA propargylées a conduit à des résultats encourageants. Cependant une optimisation des conditions est nécessaire pour obtenir des nanoparticules magnétiques isolées attachées aux fibres PLA d'une façon uniforme.

Une proposition serait de tester la stratégie inverse à celle testée initialement. Pour cela, le ligand bifonctionnel thiol-acide phosphonique serait couplé par thiol-yne aux fibres, avant de réaliser un échange de ligands à la surface de particules permettant l'ancrage des SPIONs. Cette seconde stratégie présenterait l'avantage de s'affranchir de l'agrégation en limitant le temps de résidence en solution des fonctions thiol libres et donc la formation de ponts disulfures entre SPIONs. Malheureusement, pour des raisons de temps, et malgré un essai préliminaire concluant, cette approche n'a pu être suffisamment développée pour figurer dans ce manuscrit.

## 4. Partie expérimentale

### Synthèse de FITC-N<sub>3</sub>

La synthèse de FITC-N<sub>3</sub> a été réalisée en utilisant un protocole déjà décrit précédemment<sup>249</sup>.

Mode opératoire : La FITC (50 mg ; 0,128 mmol) a été dissoute dans 10 ml de DMF anhydre, puis l'azidopropylamine (13 µL ; 0,128 mmol) est ajoutée suivie par l'ajout de triéthylamine (100 µL ; 0,74 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant la nuit.

Traitement : Le DMF a été évaporé sous pression réduite et le produit a été séché sous vide.

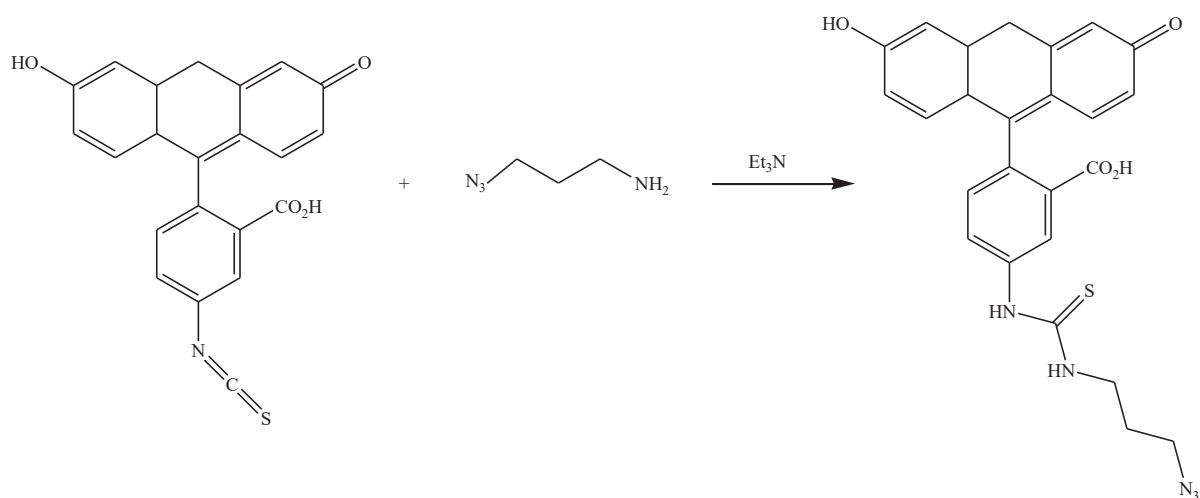


Figure IV 14 : Synthèse de FITC-N<sub>3</sub>

### Propargylation des fibres PLA

Mode opératoire : La propargylation des fibres de PLA a été faite en utilisant la procédure suivante. Typiquement, 6 plaques couvertes par des microfibrilles de PLA<sub>100</sub> ont été plongées dans 100 ml de diéther refroidi à -20°C et mis sous atmosphère d'argon. Après refroidissement de la solution à -50°C, 0,5 ml d'une solution de diisopropyl amidure de lithium (2M) ont été ajoutés. Après 15 minutes d'activation anionique, 0,5 ml d'une solution de bromure de propargyle ont été ajoutés et le milieu est laissé sous agitation et à -50°C pendant 15 min.

Traitement : Les plaques ont été lavées 2 fois en les plongeant dans une solution de diéther refroidi par l'azote liquide.

### Greffage de FITC-N<sub>3</sub> sur les fibres de PLA propargylées par voie CuAAC

Mode opératoire : Une plaque de PLA est immergée dans 12 ml d'eau distillée contenant une faible quantité de FITC-azidopropylamine. Le Cu<sup>I</sup> est généré *in situ* par l'addition d'une

solution aqueuse de sulfate de cuivre (1M ; 300  $\mu$ L) et une solution aqueuse d'ascorbate de sodium (1M ; 600  $\mu$ L). La réaction est laissée sous agitation et à température ambiante pendant 48h.

Traitement : La plaque a été lavée dans l'eau distillée froide pendant 48h, avec 3 changements des eaux de lavage, puis séchée sous vide.

### ***Greffage des SPIONs sur les fibres PLA par voie thiol-yne***

Mode opératoire : Concernant les quantités de SPIONs à ajouter, et considérant que l'on ne connaît pas exactement la masse des fibres par plaque (en moyenne 2 à 3 mg) ni le pourcentage de groupes propargyle présents, nous avons utilisé une concentration minimale de nanoparticules de 1,75 mg dans 5 ml de milieu réactionnel. Cette quantité contient approximativement 62,5 nmol de ligands thiolés. La solution de nanoparticules est mise dans un bain sous ultrasons pendant 15 min. Pour préparer une solution de 5 ml contenant  $62,5 \times 10^{-9}$  mol de fonctions thiol à partir d'une solution à 1,75 mg/ml des nanoparticules, un volume de 1 ml est prélevé et ajouté à 4 ml d'une solution acétone/c-hexane (1:3). Par la suite 1 eq. de DMPA (160  $\mu$ L) est ajouté à partir d'une solution à 1 mg/ml dans le c-hexane suivi par la plaque des fibres de PLA. La solution est purgée 5 min à l'argon puis irradiée par une lampe UV pendant 5 ou 10 min sous agitation constante.

Concernant la manipulation faite en présence de TCEP, le même mode opératoire a été suivi, à l'exception de l'ajout d'un eq. De TCEP à la solution de SPIONs une heure avant le couplage UV.

Traitement : La plaque est placée dans une solution acétone/c-hexane (1:3) à 4°C pendant 2 à 3 jours durant lesquels la solution de lavage est changée 3 fois. La plaque est ensuite séchée sous vide et à température ambiante.

### ***Caractérisations***

- Microscope optique

L'observation des fibres propargylées a été effectuée sur un microscope optique Leika MZ6.

- Microscope optique de fluorescence

L'observation de fibres après marquage fluorescent a été effectuée sur un microscope de fluorescence Nikon 150231.

- MEB

Les études de MEB ont été réalisées sur un microscope électronique à balayage Hitachi S4500, doté d'un détecteur EDX de Thermofisher. Avant analyse, les fibres ont été métallisées au carbone.

### ***Références***

1. El Habnoui, S. *et al.* Mild methodology for the versatile chemical modification of polylactide surfaces: Original combination of anionic and click chemistry for biomedical applications. *Adv. Funct. Mater.* **21**, 3321–3330 (2011).
2. El Habnoui, S. *et al.* Toward potent antibiofilm degradable medical devices: A generic method for the antibacterial surface modification of polylactide. *Acta Biomater.* **9**, 7709–7718 (2013).
3. Sardo, C. *et al.* When functionalization of PLA surfaces meets thiol-yne photochemistry: Case study with antibacterial polyaspartamide derivatives. *Biomacromolecules* **15**, 4351–4362 (2014).
4. Taldone, T. *et al.* Synthesis of purine-scaffold fluorescent probes for heat shock protein 90 with use in flow cytometry and fluorescence microscopy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 5347–52 (2011).





## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

---

La modification de polyesters biodégradables a connu un fort développement dans les dernières décennies en raison de leur utilisation accrue dans le domaine biomédical. Différentes méthodes de modification ont été développées donnant accès à une diversité de copolymères adaptés pour des applications précises.

Dans le cadre de ce travail, après avoir mis au point la fonctionnalisation par voie anionique d'une PCL par des fonctions alcynes, on s'est intéressé à son utilisation pour la synthèse par voie photochimique thiol-yne (en solution) de copolymères PCL-g-PEG à caractères modifiables et utilisables pour le transport de principes actifs. En particulier on a pu montrer que la modulation du caractère amphiphile pouvait avoir un impact sur le type d'objets obtenus, mais aussi sur leur capacité à encapsuler et libérer un actif. Les résultats ont montré une bonne libération à long terme de la curcumine et une efficacité *in vitro* sur les cellules cancéreuses MCF-7.

On s'est ensuite appuyé sur la possibilité qu'offre l'approche thiol-yne de générer des copolymères à fonctionnalités diverses pour préparer à partir d'une unique plateforme macromoléculaire des systèmes de libérations de principes actifs variés. On s'est basé sur les différences existantes entre les tissus tumoraux et les tissus sains. Dans un premier temps, on a synthétisé des copolymères amphiphiles à propriétés de ciblage en focalisant sur les intégrines surexprimées au niveau de certaines cellules tumorales. On a donc synthétisé une famille de copolymères décorés par le tripeptide cRGD présentant une hydrophilie et des taux de cRGD contrôlés. Ces copolymères PCL-g-PEG-cRGD ont été testés sur des cellules qui expriment ou non les intégrines d'intérêt et ont démontré une absorption cellulaire plus rapide, favorisée par les interactions cRGD-intégrines. Dans un deuxième temps, on a profité de l'expression des métalloprotéases matricielles (MMP) au niveau des cellules tumorales pour proposer un système enzymo-répondant. La même approche chimique a été utilisée pour préparer des copolymères PCL-g-(MMPcp-PEG) portant un nombre variable de motifs peptidiques MMPcp clivables en présence de MMP. Ces objets ont été testés sur cellules non tumorales HEK-293- $\beta$ 3 surexprimant les MMP-2 et MMP-9. La toxicité de la curcumine encapsulée dans les nanoobjets formés est accrue par la présence et l'augmentation du taux de MMPcp dans le copolymère confirmant ainsi le potentiel de cette approche enzymatique pour des systèmes passifs. L'ensemble de ces résultats permet d'envisager l'emploi d'une unique stratégie chimique pour la multifonctionnalisation de polymères d'intérêt thérapeutique.

La combinaison des approches anionique et photochimique thiol-yne a aussi été utilisée pour modifier des copolymères amphiphiles étoiles sPEG-*b*-(PCL)<sub>8</sub> par des groupes benzyl-mercaptan afin de bénéficier d'une part, d'un effet de  $\Pi$ -stacking entre un principe actif et le copolymère étoile en vue d'une stabilité accrue du système de libération, et d'autre part d'un effet de  $\Pi$ -stacking entre les chaînes copolymères permettant ainsi de réduire la taille et la CMC des nanoobjets formés. Dans le cadre de ce travail, seule la synthèse a pu être menée et il sera intéressant de réaliser des essais visant à comparer le taux d'encapsulation et de libération des copolymères obtenus avec leurs analogues non modifiés dans un futur proche.

Le dernier défi de nos travaux était la modification en surface de PLA par des nanoparticules super paramagnétiques d'oxyde de fer (SPIONs, Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles) afin de générer des fibres adaptées pour l'utilisation en ingénierie tissulaire. Il s'agissait donc de passer de la solution à la surface en utilisant les approches anionique et photochimique thiol-yne. Les résultats ont montré une bonne propargylation des fibres de PLA sans dégradation des fibres permettant dans une seconde étape le greffage de SPIONs en surface. La limitation à ce jour réside dans la présence de SPIONs agrégés. De futurs développements seront indispensables pour uniformiser cette modification par exemple en limitant l'oxydation des dérivés thiolés par l'emploi de réducteurs in situ (exemple de la TCEP), ou en inversant l'approche c'est-à-dire en modifiant les fibres par les ligands thiolés avant de faire la coordination des SPIONs.

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail de thèse démontrent le potentiel important des approches de modification post-polymérisation des polyesters ainsi que l'intérêt qui existe à combiner les stratégies chimiques simples pour générer une diversité moléculaire importante et fonctionnelle.

## **Résumé**

Depuis plusieurs décennies, les polyesters aliphatiques (polycaprolactone (PCL), polylactide (PLA), polyglycolide (PGA)) et leurs copolymères ont été retenus pour des applications médicales grâce à leur biodégradabilité et leur biocompatibilité. Parmi leurs applications médicales, on s'intéresse ici à la délivrance des médicaments par des copolymères amphiphiles et à l'ingénierie tissulaire. Les polyesters aliphatiques souffrent cependant d'une hydrophobie importante et de l'absence de groupes fonctionnels. Pour pallier ces problèmes, plusieurs stratégies de modifications chimiques ont été proposées dans la littérature parmi lesquelles on cite : l'hydrolyse, la modification par plasma, la post-polymérisation alcyne azoture et la modification photochimique thiol-yne. Ces modifications servent à introduire des polymères hydrophiles (ex. le polyéthylène glycol) ou des groupes fonctionnels qui peuvent améliorer la biocompatibilité de polyesters. Dans ce manuscrit, on s'intéresse à la modification de la PCL et du PLA par voie photochimique thiol-yne qui présente l'avantage d'être rapide, versatile, applicable en solution comme en surface et de ne pas nécessiter l'utilisation d'un catalyseur métallique qui peut être nocif pour les applications médicales. Dans une première partie, la modification de la PCL a été faite en solution et des copolymères amphiphiles PCL-g-PEG ont été synthétisés. La stratégie de greffage « grafting to » en deux étapes a été choisie en partant de polymères commerciaux. Une optimisation des conditions de modification par voie anionique de PCL, suivi d'une photoaddition thiol-yne, nous a permis d'obtenir des copolymères avec des balances hydrophiles/hydrophobes contrôlées. L'impact de l'hydrophilie des copolymères sur la formation de nanoobjets, leurs concentrations d'aggrégation critique et leurs tailles a été étudié. L'encapsulation de curcumine comme agent anticancéreux et la cytotoxicité des nanovecteurs envers des cellules cancéreuses ont été vérifiées. Dans un second temps, ces copolymères ont été décorés par un peptide de ciblage et un peptide clivable enzymatiquement en vue de leur utilisation dans des traitements anticancéreux. L'effet biologique de ces copolymères encapsulant des principes actifs est vérifié *in vitro* sur des cellules cibles exprimant plus ou moins d'intégrines ou de métalloprotéases. Dans une seconde partie, des fibres PLA ont été modifiées en surface par des nanoparticules inorganiques afin de générer des hybrides covalents d'intérêts pour des applications en ingénierie tissulaire. De manière analogue aux modifications en solution, ces hybrides ont été obtenus en deux étapes par modification par voie anionique de nanofibres de

PLA, suivi par un greffage covalent de nanoparticules d'oxyde de fer en suivant une stratégie photochimique thiol-yne.

Mots-clés : polyesters fonctionnels, polycaprolactone, polylactide, copolymères amphiphiles, modification thiol-yne en surface et solution, délivrance de médicaments, ingénierie tissulaire, photochimie.

## **Summary**

For decades, aliphatic polyesters (polycaprolactone (PCL), polylactide (PLA), polyglycolide (PGA)) and their copolymers have been selected for medical applications because of their biodegradability and their biocompatibility. Among their medical applications, we are interested in drug delivery system based on amphiphilic copolymers and tissue engineering. However, aliphatic polyesters suffer from significant hydrophobicity and the absence of functional groups. To overcome these drawbacks, several strategies of chemical modifications have been reported in literature among which we present: hydrolysis, plasma modification, post polymerization modification by copper catalyzed azide alkyne cycloaddition and thiol-yne post polymerization modification. These modifications have been used to introduce hydrophilic polymers (eg. polyethylene glycol) or functional groups on the polyester chains that can enhance the biodegradability of polyesters. In this manuscript, we are interested in modifying PCL and PLA chains by thiol-yne photochemical route. This method is rapid, versatile, applicable in solution as well as on surface and it does not require the use of a metallic catalyst which can be harmful for medical applications. First, PCL modification was done in solution and amphiphilic copolymers PCL-g-PEG were synthesized. The strategy “grafting to” in two steps has been selected starting from commercial polymers. Conditions optimization of anionic activation, followed by thiol-yne photoaddition, allowed us to obtain copolymers with controlled ratios hydrophilic/hydrophobic. The impact of copolymers hydrophilicity on nanoobjets formulation, critical micelle concentration and sizes was studied. Curcumin encapsulation as an anticancer agent and nanocarriers cytotoxicity towards cancer cells were verified. In addition, these copolymers were then decorated with a targeting peptide and an enzymatically cleavable peptide in the aim of using them in cancer treatment. The biological effect of anticancer loaded copolymer was verified *in vitro* on target cells

expressing more or less integrins or metalloproteases. Second, PLA fibers were modified with inorganic nanoparticles and generate covalent hybrids for purposes in tissue engineering of neuronal cells. Analogously to the solution modification, these hybrids were obtained in two steps by anionic activation of PLA fibers, followed by covalent grafting of iron oxide nanoparticles according to a thiol-yne photochemical strategy.

Keywords: functional polyesters, polycaprolactone, polylactide, amphiphilic copolymers, thiol-yne modification in surface and solution, drug delivery, tissue engineering, photochemistry.