



**HAL**  
open science

# Modulation de la thermosensibilité de systèmes micellaires via une approche formulatoire – étude de l’impact de la nature et de l’architecture des blocs hydrophiles : développement d’une technique de caractérisation directe par FRET

Alice Gontier

## ► To cite this version:

Alice Gontier. Modulation de la thermosensibilité de systèmes micellaires via une approche formulatoire – étude de l’impact de la nature et de l’architecture des blocs hydrophiles : développement d’une technique de caractérisation directe par FRET. Chimie organique. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMIR21 . tel-03248075

**HAL Id: tel-03248075**

**<https://theses.hal.science/tel-03248075>**

Submitted on 3 Jun 2021

**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.



Normandie Université

## THESE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité Chimie Macromoléculaire**

**Préparée au sein de l'INSA Rouen Normandie**

**Modulation de la thermosensibilité de systèmes micellaires *via* une approche formulatoire – Etude de l'impact de la nature et de l'architecture des blocs hydrophiles. Développement d'une technique de caractérisation directe par FRET**

**Présentée et soutenue par  
Alice GONTIER**

**Thèse soutenue publiquement le 03 décembre 2020  
devant le jury composé de**

M Luc PICTON	Professeur des Universités, Université de Rouen, PBS	Président
Mme Christelle DELAITE	Professeur des Universités, Université de Haute-Alsace, LPIM	Rapporteur
M Vincent LAPINTE	Maître de Conférences, Université de Montpellier, ICGM	Rapporteur
M Olivier COLOMBANI	Maître de Conférences, Université du Maine, IMMM	Examineur
M Fabrice BUREL	Professeur des Universités, INSA Rouen Normandie, PBS	Directeur de thèse
Mme Gaëlle MORANDI	Maître de Conférences, INSA Rouen Normandie, PBS	Co-encadrante de thèse

**Thèse dirigée par Fabrice BUREL, laboratoire PBS**

**INSA** | INSTITUT NATIONAL  
DES SCIENCES  
APPLIQUÉES  
ROUEN NORMANDIE

 508  
NC  
Normande de Chimie

 PBS | Polymères  
Biopolymères  
Surfaces | UMR 6270



## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire Polymères, Biopolymères et Surfaces (UMR 6270) dans l'équipe Matériaux Macromoléculaires de l'Insa Rouen Normandie.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Luc Picton, Mme Christelle Delaite, Mr Vincent Lapinte et Mr Olivier Colombani pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et évaluer mon travail dans ces conditions de soutenance un peu particulières (et en présence d'une petite invitée surprise).

Je voudrais aussi remercier Fabrice Burel, mon directeur de thèse, pour ses conseils avisés et ses remarques et questionnements scientifiques toujours très enrichissants.

Un grand merci à Gaëlle, mon encadrante de thèse, pour avoir été toujours présente à mes côtés malgré les nombreuses obligations que tu as eues en cours de route du côté de l'enseignement. Tu as toujours su me remonter le moral et me booster dans les moments de creux, alors merci pour ta gentillesse et ta joie de vivre.

Merci aux permanents du laboratoire COBRA, Pierre-Yves Renard et Alexandre Haefelé pour leurs conseils sur le FRET, et plus particulièrement Ludovic Jean pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir appris toutes ces choses que je ne connaissais pas en chimie organique.

J'ai également une pensée pour les doctorants du laboratoire COBRA, en particulier Mégane, Pierrick et Anissa avec qui j'ai partagé le bureau pendant quelques mois et qui ont pu me suivre à la trace grâce à cette magnifique couleur jaune fluo persistante partout où je passais.

Je remercie également Christophe Chassenieux pour m'avoir accueillie au Mans quelques jours et m'avoir initiée à la diffusion de lumière.

Merci à Frédéric Renou pour avoir rejoint et participé au projet sur la fin et encore merci à Olivier Colombani pour avoir donné autant de ton temps à continuer à me former sur la diffusion de lumière. Les journées au Mans étaient intenses mais je suis très reconnaissante de toute l'aide que tu m'as apportée et de toutes ces connaissances que j'ai acquises.

Merci à Fatima et Axelle pour m'avoir aidée et dépannée lorsque j'en avais besoin, mais également merci à Giovanna et Murielle pour m'avoir épaulée (parfois très en urgence), toujours avec le sourire et une très grande gentillesse, sur l'administratif.

## Remerciements

Je voudrais remercier Gérard, Fabien, Laura et Sarah pour leur aide et leur bonne humeur pendant les TP, ainsi que Isabelle pour ton organisation sans faille en enseignement.

Je remercie aussi Catherine et Jérémy pour m'avoir facilité la vie au labo et appris à gérer les caprices de certains appareils d'analyse.

Merci aux permanents de l'équipe MM, Laurence, Nico, Nas, Daniela, Boulos pour leur aide et leurs conseils.

Je n'oublie pas non plus l'équipe SCC, Virginie, Didier, Luc, Christophe, ... et les doctorants Hung, Ahdi et Mathieu pour m'avoir toujours bien accueillie, m'avoir permis d'utiliser tout leur équipement et m'avoir conseillée toujours avec le sourire.

Un immense merci à tous les doctorants, les désormais docteurs Ghislain, Cyrielle et Pierre pour cette super ambiance qui m'a permis de m'intégrer facilement, et tous ces jeux de mots avec mon nom que vous avez pu faire qui m'ont bien fait rigoler pendant ces années. Mais je n'oublie pas non plus Valentin et Geoffrey qui ont rejoint l'équipe un peu plus tard mais qui ont aussi contribué à rendre la vie de labo encore plus agréable.

Et merci à Bo pour ta gentillesse et Jérémy (alias Muche) pour ta bonne humeur.

Je tiens particulièrement à remercier Assala pour ton aide dans ce projet, ta bienveillance, ton expérience et tous les petits conseils que tu as pu m'apporter, je suis très contente d'avoir travaillé avec toi.

Xuelian, Yuzhen, vous avez été à mes côtés pendant ces 3 ans. J'ai été ravie de vous connaître, de partager votre bureau et ces petits moments qu'on a pu avoir ensemble.

Evidemment je n'oublie pas les petits derniers, Vincent et Gonnot, vous m'avez permis de passer une super dernière année de thèse. Je ne vais pas détailler ici tous les bons moments qu'on a passé ensemble parce que ce serait trop long, mais je vous dis un très grand merci pour tout ! Et merci aussi à Klara, on ne se connaît pas depuis très longtemps mais j'ai été très contente de te rencontrer, et je te lègue le flambeau pour supporter les deux garçons.

Un merci spécial à Loïc pour cette année, encore plus agréable grâce à toi, faite notamment de bons petits plats et de films de Noël.

Enfin, je remercie vraiment ma famille pour m'avoir toujours soutenue, encouragée, et permis d'arriver là où j'en suis aujourd'hui.

## Abréviations

ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
cmc	Concentration micellaire critique
CROP	Polymérisation cationique par ouverture de cycle (« Cationic Ring Opening Polymerization »)
Cryo-TEM	Cryo-microscopie électronique à transmission
DLS	Diffusion de lumière
DMPA	2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone
DPD	Dynamique des Particules Dissipatives
EGBMA	Ethylène glycol dithioacétate
EPR	Electronic Paramagnetic Resonance
ESR	Electron Spin Resonance/Résonance de spin électronique
FRET	Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster (ou Transfert d'Énergie entre Molécules Fluorescentes)
HLB	Balance Hydrophile-Lipophile
HMTETA	1,1,4,7,10,10-héxaméthyltriéthylènetétramine
$k_B$	Constante de Boltzmann
LCST	Lower Critical Solution Temperature
LMS	Lipoamorceur mésylé
LPETox	Lipide- <i>b</i> -Poly(2-ethyl-2-oxazoline)
LPiPrOx	Lipide- <i>b</i> -Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)
LPOEGMA	Lipide- <i>b</i> -Poly(Oligo(ethylene glycol)methyl methacrylate)
LTs	Lipoamorceur tosylé
$M_{app}$	Masse molaire en masse apparente
MMC	7-mercapto-4-méthylcoumarin
$\overline{M}_n$	Masse molaire moyenne en nombre
$\overline{M}_w$	Masse molaire moyenne en masse
$N_{ag}$	Nombre d'agrégation
NMP	Nitroxide-Mediated Polymerization
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDMAEMA	Poly(N,N'-dimethylamino ethyl methacrylate)

## Abréviations

PEO	Poly(oxyde d'éthylène)
PEtOx	Poly(2-ethyl-2-oxazoline)
PiPrOx	Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)
PNIPAAm	Poly(N-isopropylacrylamide)
POEGMA	Poly(Oligo(ethylene glycol)methyl methacrylate)
RAFT	Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer
RET	Transfert d'énergie par résonance
R <sub>h</sub>	Rayon hydrodynamique
R <sub>g</sub>	Rayon de gyration
RI	Indice de réfraction
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROP	Ring-Opening Polymerization
SAXS	Diffusion des rayons X aux petits angles
SEC	«Size-Exclusion Chromatography » (Chromatographie d'exclusion stérique)
T	Température
TEM	Microscopie Electronique en Transmission
T <sub>g</sub>	Température de transition vitreuse
T <sub>m</sub>	Température critique de micellisation
T <sub>PT</sub>	Température de point de trouble
UCST	Upper Critical Solution Temperature
$\overline{X}_n$	Degré de polymérisation

<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
------------------------------------	----------

Chapitre I – Etude bibliographique
------------------------------------

<b>Introduction .....</b>	<b>3</b>
---------------------------	----------

<b>I. Auto-organisation et désorganisation des copolymères amphiphiles en milieux aqueux .</b>	<b>5</b>
--	----------

I.1. Généralités sur l'auto-assemblage de molécules amphiphiles .....	5
I.1.1. Auto-organisation des tensioactifs « classiques » .....	5
I.1.2. Auto-organisation des copolymères amphiphiles .....	6
I.2. Introduction aux copolymères amphiphiles « stimulables ».....	10
I.2.1. Généralités sur la température comme stimulus .....	12
I.2.1.1. <i>Les comportements à UCST/LCST.....</i>	<i>12</i>
I.2.1.2. <i>Paramètres structuraux influant sur la température de point de trouble..</i>	<i>15</i>
I.2.2. Auto-organisation des copolymères amphiphiles thermosensibles.....	20
I.2.2.1. <i>Copolymères amphiphiles possédant un seul bloc thermo-sensible.....</i>	<i>20</i>
I.2.2.2. <i>Copolymères à blocs amphiphiles comportant deux thermosensibilités....</i>	<i>21</i>
I.3. Conclusion.....	24

<b>II. Modulation du comportement de systèmes micellaires par une approche formulatoire .....</b>	<b>24</b>
---	-----------

II.1. Optimisation des caractéristiques structurelles du système mixte .....	25
II.2. Impact du mélange physique sur la température de point de trouble .....	34
II.3. Conclusion.....	38

<b>III. Le Transfert d'Énergie entre molécules fluorescentes (FRET), une technique applicable à la caractérisation de systèmes micellaires mixtes ? .....</b>	<b>39</b>
---	-----------

III.1. Généralités sur la fluorescence.....	39
III.2. Le FRET : Principe et applications aux systèmes polymériques.....	43
III.2.1. Principe et conditions d'utilisation.....	43
III.2.2. Exemples d'applications du FRET .....	46
III.2.3. Utilisation du FRET pour montrer la mixité de systèmes micellaires.....	53
III.3. Conclusion.....	55

<b>Conclusion .....</b>	<b>57</b>
-------------------------	-----------

<b>Références .....</b>	<b>58</b>
-------------------------	-----------

Chapitre II – Caractérisation des copolymères lipide-*b*-poly(2-alkyl-2-oxazoline) et de leurs mélanges physiques

<b>Introduction .....</b>	<b>71</b>
<b>I. Caractérisations physico-chimiques des copolymères LPiPrOx et LPEtOx.....</b>	<b>71</b>
I.1. Présentation des polymères étudiés.....	71
I.2. Comportement des copolymères avec la température.....	74
I.2.1. Mesure en turbidimétrie de la température de point de trouble .....	74
I.3. Caractérisation des objets micellaires en solution par diffusion de la lumière.....	77
I.3.1. Détermination du dn/dc des polymères .....	77
I.3.2. Mesures de la taille et du nombre d'agrégation.....	78
<b>II. Mélanges physiques LPiPrOx/LPEtOx .....</b>	<b>82</b>
II.1. Etude des propriétés macroscopiques en spectrophotométrie UV-visible.....	83
II.2. Etude en diffusion de la lumière .....	87
II.3. Etude en micro-DSC .....	90
II.4. Etude de la deuxième transition par réticulation du cœur des micelles.....	95
<b>Conclusion .....</b>	<b>100</b>
<b>Références.....</b>	<b>102</b>

Chapitre III – Etude de mélanges de copolymères de nature et/ou architecture différentes

<b>Introduction .....</b>	<b>103</b>
<b>I. Etude de mélanges physiques des copolymères LP(iPrOx)<sub>n</sub> et C<sub>18</sub>-<i>b</i>-PEO .....</b>	<b>104</b>
I.1. Description des copolymères commerciaux Brij® .....	104
I.2. Mélanges physiques de copolymères linéaires LP(iPrOx) <sub>28</sub> /C <sub>18</sub> - <i>b</i> -PEO <sub>19</sub> .....	106
I.2.1. Comportement macroscopique du mélange .....	106
I.2.2. Etude de la variation du point de trouble au niveau moléculaire .....	107
I.3. Influence de la longueur du bloc PEO .....	111
<b>II. Etude de mélanges physiques des copolymères LP(iPrOx)<sub>28</sub> et lipide-<i>b</i>-poly(oligo(éthylène glycol)méthacrylate de méthyle) .....</b>	<b>115</b>
II.1. Synthèse du lipide- <i>b</i> -poly(oligo(éthylène glycol)méthacrylate de méthyle).....	115

## Table des matières

II.1.1. Généralités sur la polymérisation par ATRP.....	115
II.1.2. Synthèse du lipoamorceur .....	116
II.1.3. Synthèse par ATRP du lipide- <i>b</i> -poly(oligo(éthylène glycol)méthacrylate de méthyle).....	117
II.2. Caractérisations physico-chimiques des copolymères LPOEGMA.....	120
II.2.1. Détermination de la concentration micellaire critique.....	120
II.2.2. Détermination de la température de point de trouble.....	121
II.2.3. Caractérisation des objets formés en diffusion de la lumière .....	121
II.2.3.1. <i>Auto-organisation en solution aqueuse à température ambiante</i> .....	121
II.2.3.2. <i>Comportement en température du LPOEGMA en solution aqueuse</i> .....	125
II.3. Etude de mélanges physiques LPIPrOx/LPOEGMA .....	126
II.3.1. Evolution de la température de point de trouble .....	126
II.3.2. Mesures en diffusion de lumière.....	127
II.3.3. Conclusion .....	129
<b>Conclusion</b> .....	<b>131</b>
<b>Références</b> .....	<b>133</b>

Chapitre IV – Elaboration d’une technique de caractérisation directe des micelles mixtes par FRET
---

<b>Introduction</b> .....	<b>134</b>
<b>I. Synthèse et caractérisations des fluorophores</b> .....	<b>135</b>
I.1. Synthèse des fluorophores .....	135
I.1.1. Synthèse du Naphtyle.....	136
I.1.2. Synthèse de la Coumarine .....	139
I.2. Caractérisations et complémentarité des couples de fluorophores .....	141
I.2.1. Couple Coumarine/Naphtyle.....	141
I.2.2. Couple Coumarine/BODIPY .....	143
I.2.3. Coumarine commerciale/Coumarine synthétisée .....	146
I.3. Conclusion .....	148

<b>II. Greffage des fluorophores sur les copolymères amphiphiles par réaction thiol-ène .</b>	<b>149</b>
II.1. Réaction thiol-ène par voie photochimique .....	150
II.2. Réaction thiol-ène radicalaire en thermique sur le lipoamorceur de CROP .....	156
II.3. Réaction thiol-ène de type « Thiol-Michael » sur le lipoamorceur de CROP .....	159
II.4. Conclusion .....	162
<b>Conclusion .....</b>	<b>163</b>
<b>Références.....</b>	<b>165</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>168</b>
Partie expérimentale .....	175
Annexes .....	199

# Introduction générale



Depuis plusieurs décennies, le développement de copolymères amphiphiles permettant d'obtenir des systèmes auto-organisés en solution aqueuse fait l'objet de nombreuses études scientifiques. Les propriétés de ces systèmes polymériques ont l'avantage d'être modulables en fonction de l'application visée, en particulier lorsqu'ils sont « intelligents », c'est-à-dire qu'ils présentent une sensibilité à un (ou plusieurs) stimuli (pH, température, lumière, ...) qui modifie(nt) leur comportement en solution.

Afin d'ajuster les propriétés finales de ces systèmes auto-associés, tels que des micelles, la stratégie classique consiste à ajuster la microstructure de chaque chaîne de copolymère. Cette approche nécessite de synthétiser des copolymères statistiques, diblocs ou triblocs adoptant un comportement intermédiaire à ceux de chacun des polymères incorporés. L'inconvénient majeur de cette voie est qu'elle nécessite la mise au point d'une nouvelle synthèse pour chaque nouvelle application visée, et elle est donc très coûteuse en terme de temps.

Une stratégie alternative est développée dans notre équipe depuis une dizaine d'année pour pallier à cette problématique. Celle-ci repose sur une approche formulatoire et consiste à mélanger physiquement deux copolymères amphiphiles aux propriétés différentes afin d'obtenir des micelles mixtes dont les propriétés finales peuvent être facilement ajustées par modification des proportions relatives en l'un et l'autre des copolymères.

Les copolymères synthétisés au laboratoire par polymérisation contrôlée (CROP, ATRP) et utilisés dans cette étude sont issus de l'huile de lin modifiée, dont les chaînes lipidiques constituent le cœur hydrophobe des micelles. Ces chaînes grasses ont l'avantage de ne pas gêner la dynamique d'échange des micelles, et sont de plus constituées de deux insaturations par chaîne en moyenne qui pourront leur permettre d'être utilisées pour stabiliser les micelles par réticulation du cœur, mais également pour greffer des molécules par réaction thiol-ène.

Ce travail de thèse s'est appuyé sur les résultats obtenus lors des deux thèses précédentes, pendant lesquelles ont été développés des systèmes micellaires mixtes pH-sensibles et/ou thermosensibles à partir de lipide-*b*-poly(acide acrylique) (LPAA), de lipide-*b*-poly(*N,N'*-diméthylaminoéthylméthacrylate) (LPDMAEMA), lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) (LPiPrOx) et de lipide-*b*-poly(2-éthyl-2-oxazoline) (LPEtOx).

Les objectifs principaux de ce travail de thèse sont d'une part d'améliorer la compréhension du comportement des micelles mixtes composés de deux copolymères thermosensibles et

d'autre part d'étendre cette approche formulatoire à des copolymères de nature et de structure différentes afin d'en repousser les limites.

Par ailleurs, la mise en évidence de la formation de micelles mixtes est parfois délicate car elle passe par une étude du comportement intrinsèque du système final. Nous nous sommes donc également intéressés au développement d'une technique de caractérisation par fluorescence pour démontrer de manière directe la mixité des micelles.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre établira un état de l'art sur l'auto-organisation et le comportement de copolymères amphiphiles thermosensibles en solution aqueuse, sur les systèmes mixtes rapportés dans la littérature, ainsi que sur le principe et les applications du FRET.

Le deuxième chapitre étudiera de façon approfondie les caractéristiques physico-chimiques des copolymères LPiPrOx et LPEtOx et de leurs mélanges en proportion variable en fonction de la température.

Le troisième chapitre portera sur l'étude de mélanges entre le copolymère LPiPrOx et des copolymères linéaires de nature chimique différente  $C_{18-b}$ -PEO<sub>n</sub> puis avec un copolymère de nature et d'architecture différentes, le lipide-*b*-poly(oligo(éthylène glycol) méthacrylate de méthyle) (LPOEGMA), afin d'étudier les limites des systèmes mixtes.

Enfin, le dernier chapitre portera sur le développement de la technique directe de caractérisation par Transfert d'Energie par Résonance de type Förster (FRET) avec la synthèse des fluorophores, leurs caractérisations et l'étude de leur greffage sur les insaturations de la chaîne lipidique des copolymères.

## Chapitre I :

### Etude bibliographique



## Introduction

Une micelle est une organisation structurée de molécules amphiphiles dont la queue hydrophobe constitue le cœur, et la tête hydrophile forme la couronne en solution aqueuse. Le concept global de micellisation est d'abord largement connu dans le cas de petites molécules amphiphiles, les tensioactifs. En milieu aqueux et au-dessus d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (cmc), ces tensioactifs s'auto-assemblent spontanément et forment des micelles pour minimiser le contact de la queue hydrophobe du tensioactif avec l'eau.

Au fil des ans, la recherche a mené au développement de nombreux copolymères amphiphiles étant capables, au même titre que les tensioactifs classiques, de s'auto-organiser en milieu aqueux sous différentes formes (micelles, « polymersomes »,...), conduisant à l'apparition de systèmes de taille nanométrique. Les copolymères amphiphiles sont donc aujourd'hui largement étudiés dans de nombreux domaines, et particulièrement en tant que systèmes de vectorisation de principes actifs dans le domaine biomédical, parce qu'ils présentent une cmc plus faible que les tensioactifs classiques, ce qui les rend plus stables face à la dilution.

Afin de renforcer la stabilité et d'optimiser les propriétés de ces systèmes, de nouveaux polymères dits « intelligents » ou « stimulables » ont été développés dans les dernières décennies. Pour de tels systèmes, l'action d'un stimulus interne ou externe (pH, température, redox, lumière,...) déclenche la libération progressive et contrôlée du principe actif en temps et lieu souhaités par modification de la structure micellaire.

Par ailleurs, la combinaison au sein d'un même système de plusieurs stimuli est un atout majeur pour affiner ses propriétés de relargage. Dans la majorité des cas, les différents stimuli sont associés par la synthèse de copolymères di- ou triblocs. Cependant, pour pallier aux difficultés et temps importants de synthèse, nous avons choisi de mélanger physiquement des copolymères présentant deux stimuli de même nature (deux températures critiques différentes) ou de natures différentes (pH et température par exemple).

La mixité de ces mélanges physiques reste pour autant difficile à prouver de manière directe. C'est pourquoi la mise en place d'une technique mettant en jeu la fluorescence, le Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster (FRET), permettrait d'apporter une réponse innovante et originale à cette question.

Cette étude bibliographique se découpera donc en trois parties. En premier lieu, une étude sera consacrée à l'auto-organisation des copolymères amphiphiles en milieu aqueux, et leur désorganisation grâce à la température. Puis, les approches de synthèse et mixité permettant la combinaison des caractéristiques intrinsèques aux copolymères, et en particulier leur thermo-sensibilité, seront discutées. Enfin, la troisième partie portera sur l'explication du principe du FRET, ainsi que ses utilisations.

## I. Auto-organisation et désorganisation des copolymères amphiphiles en milieux aqueux

### I.1. Généralités sur l'auto-assemblage de molécules amphiphiles

#### I.1.1. Auto-organisation des tensioactifs « classiques »

Une molécule amphiphile est une molécule synthétique ou naturelle composée de deux parties distinctes, une tête hydrophile et une queue hydrophobe, généralement liées de façon covalente, et présentant donc des affinités contraires vis-à-vis d'un solvant. En milieu aqueux, les molécules amphiphiles, ou tensioactifs, ont tendance à s'auto-assembler au-dessus de leur concentration micellaire critique (cmc) sous forme de structures très organisées afin de diminuer l'énergie libre globale du système. Ceci est possible en minimisant les interactions des queues hydrophobes avec l'eau, celles-ci étant confinées dans le cœur d'objets auto-organisés de caractéristiques variables. Ces objets sont stabilisés par l'apparition de forces de Van der Waals entre les unités hydrophobes et de liaisons hydrogène entre les têtes hydrophiles et l'eau. Ces objets peuvent être sphériques ou cylindriques et mesurent généralement de 5 à 100 nm. Leur forme et leur taille dépendent de la structure chimique des tensioactifs, mais peuvent également varier en fonction de leur environnement, par exemple la température, le pH, et la force ionique si les tensioactifs sont chargés (anioniques, cationiques ou zwitterioniques) <sup>1,2</sup>. La nature des objets formés peut être prédite grâce à la théorie d'Israelachvili qui met en jeu le « paramètre d'empilement » (Critical Packing Parameter  $C_{pp}$ ).

Le paramètre d'empilement est défini comme :

$$C_{pp} = \frac{V_0}{A_0 \cdot l_c}$$

où  $V_0$  est le volume effectif occupé par les queues hydrophobes dans le cœur,  $l_c$  est la longueur effective du tensioactif et  $A_0$  est l'aire occupée par la tête hydrophile à l'interface agrégat-eau (Figure 1).

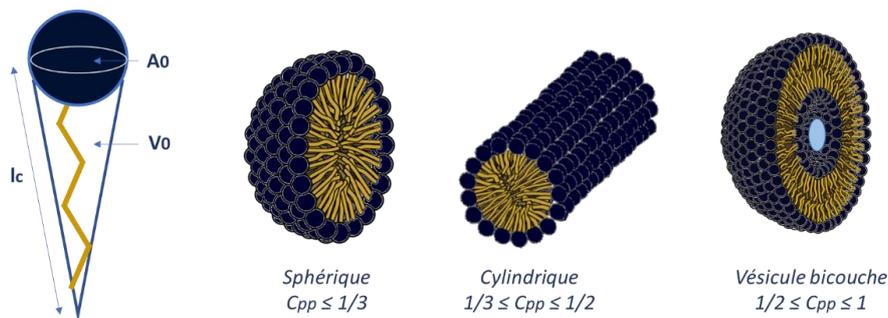


Figure 1: Auto-assemblage des tensioactifs en fonction du paramètre d'empilement

Quelle que soit leur nature, les auto-organisations de surfactants classiques ne sont cependant pas figées mais sont dans un état d'équilibre thermodynamique, il y a constamment des échanges entre les molécules de tensioactifs (ou unimères) présents dans la solution et dans les objets. Le temps de vie d'un unimère dans un objet est d'ailleurs très court ( $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  s)<sup>3</sup>.

### 1.1.2. Auto-organisation des copolymères amphiphiles

Les copolymères amphiphiles sont constitués de deux blocs polymères, l'un hydrophile et l'autre hydrophobe, liés de façon covalente. Ils sont obtenus soit par la polymérisation de monomères, soit par l'incorporation de blocs naturels de type lipide ou glucide,... Ils sont largement étudiés car il est possible d'obtenir des structures très variées, composées de copolymères de masse molaire parfaitement contrôlée et de dispersité faible.

Selon l'architecture et la composition du copolymère amphiphile (linéaire, réticulé, greffé), les nanoparticules formées en phase aqueuse se déclinent sous différentes formes comme les nanosphères, « polymersomes », dendrimères et micelles (Figure 2).

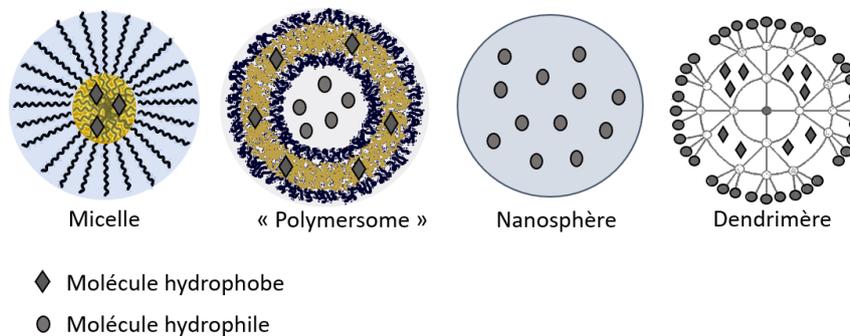


Figure 2: Différentes structures d'auto-assemblage de copolymères amphiphiles en milieu aqueux et localisation de potentielles molécules encapsulées<sup>1</sup>

La longueur de chacune des chaînes de polymère a également son importance. On parle de balance hydrophile/hydrophobe (HLB) pour définir l'équilibre entre le(s) bloc(s) hydrophile(s) et hydrophobe(s) des tensioactifs ou des copolymères amphiphiles étudiés. Lorsque la longueur de la chaîne hydrophile prédomine sur celle de la chaîne hydrophobe, le copolymère est facilement dispersé dans l'eau et va former préférentiellement des micelles sphériques. Lorsque la proportion de la chaîne hydrophobe augmente par rapport à la chaîne hydrophile, la structure devient cylindrique, puis vésiculaire ou lamellaire<sup>4</sup>.

En accord avec le projet de recherche qui sera développé dans la suite de ce manuscrit, cette étude sera uniquement consacrée aux micelles.

De même que pour les petites molécules tensioactives, les copolymères amphiphiles sont donc capables, si leur paramètre d'empilement le permet, de s'assembler sous forme de micelles selon une structure « coeur-couronne » afin de minimiser l'énergie libre du système. Cependant, l'énergie libre interfaciale des structures micellaires formées étant plus élevées que pour un tensioactif « classique », ils présentent généralement une cmc plus faible (de l'ordre de  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  mol/L au lieu de  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  mol/L pour les tensioactifs de faible masse molaire <sup>5</sup>) qui les rend plus stables lors d'une dilution <sup>4</sup>.

En fonction de la structure du copolymère étudié, les micelles peuvent adopter différentes conformations. De nombreuses études se sont intéressées aux copolymères diblocs A-B, ainsi que triblocs A-B-A ou A-B-C (avec A et C des blocs hydrophiles et B un bloc hydrophobe) afin de combiner les propriétés de chacun des blocs (Figure 3) <sup>2</sup>.

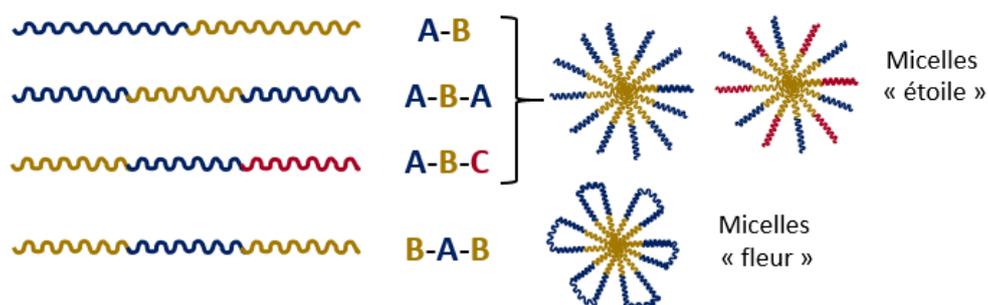


Figure 3: Différentes conformations des micelles de copolymères amphiphiles diblocs et triblocs en phase aqueuse (A,C : polymères hydrophiles, B : polymère hydrophobe)

Les systèmes micellaires polymériques sont attractifs pour de multiples applications, par exemple de stabilisation colloïdale, microréacteurs, nanoélectroniques, capteurs, ainsi que dans le domaine biomédical avec des membranes biologiques et des systèmes de relargage de principes actifs <sup>6,7</sup>.

Quelle que soit l'application visée, les copolymères doivent répondre à un certain nombre de critères afin de contrôler la préservation ou la dissociation des micelles formées lors de

modifications de leur environnement. Cela est possible par le contrôle des stabilités thermodynamique et cinétique des micelles.

La stabilité thermodynamique est régie par le besoin du système de minimiser son énergie, le poussant à adopter des conformations de type micelles pour atteindre l'équilibre thermodynamique.

La stabilité cinétique décrit le comportement du système avec le temps, et dépend essentiellement de l'énergie nécessaire à la transition entre l'état initial et l'état final adopté par le système.

➤ Paramètres influençant la stabilité thermodynamique :

La cmc est l'un des paramètres essentiels reflétant la stabilité thermodynamique. On peut exprimer l'énergie libre standard de micellisation comme :

$$\Delta G^{\circ}_{\text{mic}} = RT \cdot \ln(\text{cmc})$$

Avec R la constante des gaz parfaits ( $= 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ) et T la température.

Plus la valeur de la cmc est faible, plus le système est stable thermodynamiquement.

Les différents critères augmentant la stabilité thermodynamique des micelles sont détaillés ci-dessous.

- Plus la longueur du bloc hydrophobe est grande, plus la cohésion dans le cœur augmente, donc plus la cmc diminue. L'incorporation d'une molécule hydrophobe dans le cœur peut également contribuer à renforcer les interactions hydrophobes et donc à augmenter la stabilité thermodynamique des micelles.

- Les interactions entre les chaînes hydrophiles elles-mêmes et entre les chaînes hydrophiles et l'eau permettent la stabilisation des micelles. En augmentant la longueur des chaînes hydrophiles et leur densité en surface des micelles, les polymères sont alors forcés d'adopter des structures plus rigides et étendues. Au contraire, des chaînes plus courtes et moins nombreuses en surface des micelles augmentent l'exposition du cœur hydrophobe à la phase aqueuse, ce qui diminue la stabilité de la micelle.

- La nature du milieu aqueux (pH, salinité, température,...) peut également avoir

un impact important sur la micellisation et la stabilité des micelles. Il est donc essentiel de prendre en compte tous les paramètres structurels et de préparation des solutions micellaires pour avoir un contrôle optimal sur leur comportement en phase aqueuse <sup>8</sup>.

➤ Paramètres influençant la stabilité cinétique :

Après le phénomène de micellisation, lorsque la nature des copolymères le permet, il se produit constamment des échanges de chaînes de polymères (unimères) entre les micelles et la solution.

Contrairement aux petites molécules de tensioactifs qui ont une dynamique d'échange particulièrement rapide, les échanges se produisant en solution sont beaucoup plus lents (quelques heures ou plus <sup>9</sup>) voire inexistantes en présence de micelles de copolymères à blocs. On parle alors de systèmes dynamiques si des échanges ont lieu entre les micelles, et de systèmes gelés sinon <sup>10</sup>.

Il existe trois types de mécanismes pour expliquer les échanges dynamiques se produisant en solution : « insertion/expulsion » de chaînes, « fusion/scission » de micelles, et « chevauchement » de micelles (Figure 4).

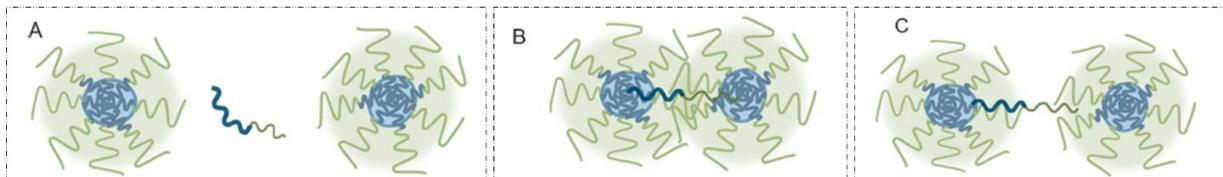


Figure 4 : Mécanismes d'échanges de chaînes polymères entre micelles : A = "Insertion/Expulsion" de chaînes, B = « Fusion/Scission » de micelles, C = "Chevauchement" de micelles <sup>8</sup>

Dans le cas de « l'insertion/expulsion » de chaînes, une chaîne de polymère est éjectée de la micelle pour se retrouver un court instant en solution, puis est réinsérée dans une autre micelle.

Pour le phénomène de « fusion/scission », deux micelles fusionnent temporairement et permettent à leur cœur hydrophobe respectif de se rencontrer, facilitant alors le transfert d'une chaîne d'une micelle à l'autre.

Enfin, il peut arriver que deux micelles se chevauchent et que l'une des chaînes d'une des micelles soit suffisamment étirée pour créer un lien entre les deux micelles. Contrairement à

la « fusion/scission », les micelles sont plus éloignées, mais l'une des chaînes peut alors quitter sa micelle pour contribuer à la formation de la seconde.

De nombreux paramètres sont aussi à prendre en compte pour évaluer la stabilité cinétique du système, tels que les caractéristiques intrinsèques au système (cmc, température de transition vitreuse  $T_g$  du cœur hydrophobe, interactions hydrophobes,...), ainsi que les conditions extérieures aux micelles (Température, pH, salinité,...).

Les caractéristiques internes aux micelles sont particulièrement influentes sur la mobilité du cœur hydrophobe, et caractérisent la capacité du système à évoluer dans le temps<sup>8</sup>. Ainsi, plus la  $T_g$  est haute, plus la chaîne est rigide, donc plus la micelle est figée. L'échange de chaînes entre micelles prend également en compte la barrière d'énergie à franchir pour extraire une chaîne de copolymère de la micelle, qui doit être suffisamment basse pour permettre l'échange moléculaire, et qui est fonction de l'hydrophobie et de la longueur du bloc constituant le cœur<sup>11</sup>.

La sensibilité à l'environnement extérieur de certains polymères, ainsi que la volonté constante d'améliorer le contrôle que l'on a de ces systèmes, conduisent de plus en plus d'études à envisager l'incorporation de polymères répondant à des stimuli.

### 1.2. Introduction aux copolymères amphiphiles « stimulables »

L'un des objectifs des polymères synthétiques étudiés aujourd'hui est de mimer le comportement des biopolymères (Protéines, polysaccharides, acides nucléiques) existants dans les systèmes vivants, et répondant, par le biais d'interactions coopératives, à des stimuli extérieurs.

Ces polymères synthétiques peuvent être utilisés dans la formation d'hydrogels, de micelles ou encore fixés sur des surfaces, et trouvent un intérêt dans de nombreux domaines, comme par exemple le relargage de substances actives, les biotechnologies ou encore la chromatographie<sup>12</sup>.

Les polymères stimulables, aussi appelés polymères intelligents ou polymères stimuli-sensibles, sont sujets à des changements radicaux de leurs propriétés physiques et/ou chimiques en réponse à une modification de leur environnement<sup>13</sup>.

L'unité stimuli-sensible peut être introduite à différents endroits dans le copolymère (Figure 5). Elle peut être partie intégrante de la chaîne principale si l'un des blocs présente une sensibilité ou si un agent de liaison stimuli-sensible est rajouté entre deux blocs. La sensibilité peut également être apportée par des groupements pendants sur une des chaînes polymères ou par un agent de réticulation présent entre deux chaînes de copolymères distinctes.

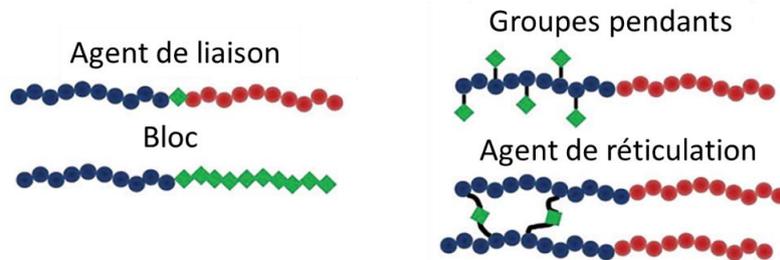


Figure 5: Représentation schématique des différentes architectures de copolymères stimuli-sensibles avec l'unité stimuable représentée en vert <sup>14</sup>

Toutes ces architectures sont accessibles grâce au développement des techniques de polymérisation contrôlées permettant l'obtention de copolymères de structure, composition et taille parfaitement définies, telles que l'ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization), la RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer), la ROP (Ring Opening Polymerization) ou encore la NMP (Nitroxide-Mediated Polymerization).

Le copolymère stimuable peut être obtenu par polymérisation de monomères stimulables (ou conduisant à des polymères stimulables), par l'incorporation de groupements de fin de chaîne (via l'utilisation d'agents de transfert ou d'amorceurs portant l'unité stimuli-sensible), ou encore par réaction chimique post-polymérisation sur les extrémités de chaîne <sup>14</sup>.

Il existe un certain nombre de stimuli auxquels peut répondre un copolymère. Ils peuvent être classés en deux grandes catégories comprenant :

- Les stimuli chimiques (pH, agents chimiques type redox, force ionique) et biochimiques (glucose, enzymes, antigènes et autres agents biochimiques), susceptibles de modifier voire dégrader la structure des copolymères et donc d'altérer leur organisation.
- Les stimuli physiques (température, lumière, champ magnétique ou électrique, contrainte mécanique, ultrasons) générés manuellement par l'homme pour modifier l'environnement du système et donc son équilibre <sup>13</sup>.

En fonction du stimulus appliqué et de la nature du copolymère étudié, différents modes de réponses sont possibles. La perte partielle ou totale de son hydrophilie, ou la rupture d'une liaison au sein de sa structure <sup>15</sup> peuvent entraîner un changement de forme et de taille de la micelle. Elle peut dans certains cas gonfler ou au contraire s'effondrer sur elle-même.

Le sujet de recherche développé dans ce manuscrit étant centré sur des polymères thermosensibles, la suite de cette étude bibliographique va s'intéresser plus précisément au stimulus température.

### *1.2.1. Généralités sur la température comme stimulus*

#### *1.2.1.1. Les comportements à UCST/LCST*

Les polymères thermosensibles sont très largement étudiés dans la littérature, notamment pour la possibilité de modifier facilement leurs propriétés physico-chimiques via un stimulus externe. L'utilisation de ces systèmes est définie par leur comportement thermosensible, qui est utile pour de nombreuses applications de catalyse, capteurs, dispositifs optiques ou encore systèmes de vectorisation ou bio-ingénierie <sup>16</sup>.

Les polymères thermosensibles présentent une température de solution critique, température à laquelle il se produit une transition de phase conduisant à un changement de leur conformation et de leur solvatation en phase aqueuse. Cette transition de phase est issue de la compétition entre l'enthalpie de mélange  $\Delta H$  qui est directement reliée aux interactions polymère-polymère, polymère-solvant et solvant-solvant, et l'entropie du mélange  $\Delta S$ , caractérisant l'organisation plus ou moins ordonnée des molécules d'eau entre elles <sup>17</sup>.

Ces deux grandeurs thermodynamiques contribuent à faire varier l'énergie libre de Gibbs  $\Delta G$ , telle que :

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

où T est la température du mélange.

D'un point de vue thermodynamique, la solubilisation du polymère dans l'eau n'est faisable qu'à condition que  $\Delta G$  soit négative.

Les polymères qui ont une température de solution critique basse, dits à LCST (« Lower Critical Solution Temperature »), sont parfaitement solubles dans l'eau à une température inférieure à la LCST et deviennent insolubles au-dessus de celle-ci. Cela s'explique par le renforcement

des interactions hydrophobes entre polymères hydrophiles au détriment des interactions hydrogène entre les polymères et l'eau. Ceci a pour conséquence un effondrement des chaînes polymères et une agrégation inter-moléculaire, et enfin une séparation de phase <sup>18</sup>. Cette transition de phase soluble/insoluble ne signifie pas que les chaînes de polymères sont complètement désolvatées à la température critique, mais elles sont dans un état très hydraté à basse température et sont progressivement déshydratées avec l'augmentation de la température <sup>19</sup> (Figure 6).

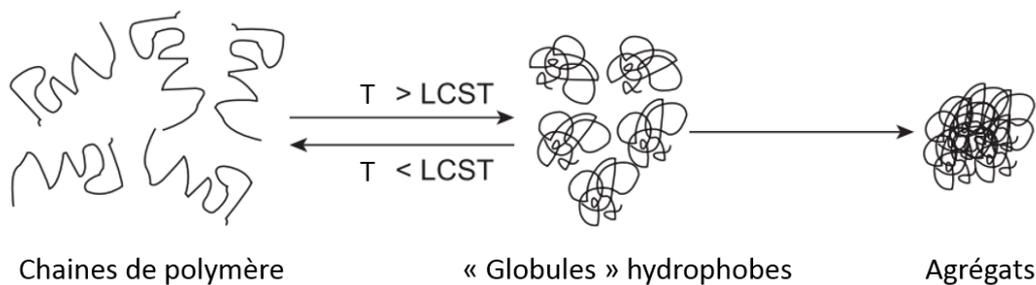


Figure 6: Transitions de phase de polymères thermosensibles - Schéma d'une transition "pelotes-à-globules-à-agrégats" typique du poly(N-isopropylacrylamide) PNIPAAm <sup>18</sup>

Lorsque l'eau est un bon solvant pour le polymère, les molécules d'eau s'organisent autour de la partie hydrophile sous forme d'une fine couche, des liaisons hydrogène sont alors créées entre les chaînes hydrophiles et l'eau, ce qui donne une valeur négative à l'enthalpie  $\Delta H$ . Si le polymère comporte en plus des régions non polaires, les molécules d'eau ne sont pas capables de créer des liaisons hydrogène avec elle, et se réorientent donc autour d'elles pour former une structure en cage, c'est l'effet hydrophobe. La structure très organisée des molécules d'eau a pour conséquence de diminuer le terme entropique (négatif). Dans ce cas, le terme enthalpique prédomine et permet la solubilisation du polymère.

Lorsque l'on dépasse la température critique, l'eau devient progressivement un mauvais solvant pour le polymère en raison de l'augmentation de l'agitation thermique des molécules d'eau, ce qui a pour conséquence la rupture de la couche d'hydratation formée autour des fonctions hydrophiles, et l'expulsion des molécules d'eau hors de la structure du polymère. Le terme entropique devient alors prédominant par rapport au terme enthalpique, entraînant la précipitation du polymère <sup>20</sup>.

Ce phénomène de transition de phase est réversible lorsque la température diminue en dessous de la LCST, mais la vitesse de re-solubilisation des chaînes est souvent plus lente car

leur réhydratation peut être plus difficile. Elle se produit donc à une température inférieure à celle de la précipitation, donnant lieu à ce qui est appelé une « hystérèse »<sup>21</sup>.

De manière contraire, les polymères qui ont une température de solution critique haute, dits à UCST (« Upper Critical Solution Temperature »), sont solubles au-dessus de leur température critique et perdent leur solubilité en-dessous. Thermodynamiquement, ils ont des termes enthalpique et entropique tous les deux positifs, donc  $\Delta G$  devient négatif quand la température augmente, ce qui leur confère un comportement opposé aux polymères à LCST<sup>18</sup>.

Ces deux comportements peuvent être représentés sur des diagrammes de phase (Figure 7).

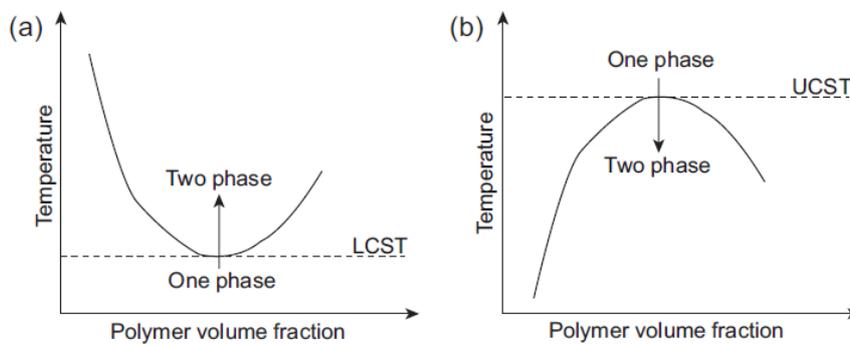


Figure 7: Courbes de transition de phase de polymères thermo-sensibles en solution. (a) Polymères à LCST, (b) Polymères à UCST<sup>18</sup>

Sur ces diagrammes, la LCST et la UCST sont respectivement le minimum et le maximum de la courbe, et sont donc définies pour une fraction volumique bien précise. La température de transition de phase correspondant à tout autre point de cette courbe est appelée « Température de point de trouble  $T_{PT}$  ». Cette appellation plus généraliste sera privilégiée dans toute la suite du manuscrit.

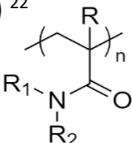
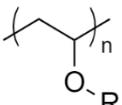
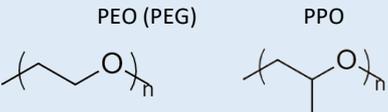
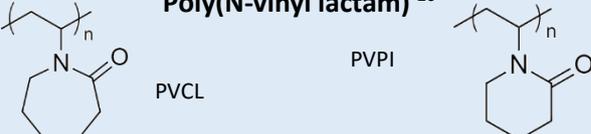
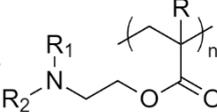
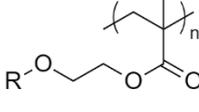
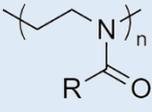
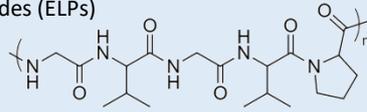
Le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) est l'un des polymères thermosensibles les plus utilisés car il possède une  $T_{PT}$  à 32°C, intéressante pour sa proximité avec la température corporelle humaine de 37°C, ce qui fait de lui un excellent candidat pour de nombreuses applications biomédicales telles que le relargage de principes actifs, la régénération de tissus ou encore l'encapsulation de cellules.

Le poly(éthylène glycol) (PEG) est également très utilisé en particulier pour ses propriétés de furtivité vis-à-vis du système immunitaire. Il est également considéré comme un polymère

thermosensible, mais sa  $T_{PT}$  étant estimée supérieure à 100 °C dans l'eau, il est souvent combiné à d'autres polymères pour améliorer leur biocompatibilité et éventuellement modifier la température critique globale du système <sup>14</sup>.

Les principales grandes familles de polymères thermosensibles évoquées dans la littérature <sup>21</sup>, ainsi que quelques exemples précis de ces polymères, sont répertoriés ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Exemples de familles de polymères thermosensibles.

<p><b>Poly(N-alkyl(alkyl)acrylamide)</b> <sup>22</sup></p> <p>PNIPAAm : R=R<sub>1</sub>=H ; R<sub>2</sub>=-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>                      PNEAM : R=R<sub>1</sub>=H ; R<sub>2</sub>=-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></p> 	<p><b>Poly(vinyl ether)</b> <sup>23,24</sup></p> <p>PMVE : R=CH<sub>3</sub>                      PEOVE : R=-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></p> 
<p><b>Polyethers</b> <sup>25</sup></p> <p>PEO (PEG)      PPO</p> 	<p><b>Poly(N-vinyl lactam)</b> <sup>26</sup></p> <p>PVCL      PVPI</p> 
<p><b>Poly(N,N'-dialkylaminoethyl(alkyl)acrylate)</b> <sup>24</sup></p> <p>PDMAEMA : R=R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>                      PDEAEMA : R=CH<sub>3</sub> ; R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></p> 	<p><b>Poly(oligo(ethyleneglycol)methacrylate)</b> <sup>27</sup></p> <p>POEGMA : R=-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>                      PMEO<sub>2</sub>MA : R=-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub></p> 
<p><b>Poly(2-alkyl-2-oxazoline)</b> <sup>25</sup></p> <p>PiPrOx : R=-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>                      PEtOx : R=-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (DP &lt;100)                      PBuOx : R=-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub></p> 	<p><b>Poly(peptide)s</b> <sup>18,28</sup></p> <p>Elastin-like polypeptides (ELPs)</p>  <p>Poly(Glycine-Valine-Glycine-Valine-Proline)</p>

PNIPAAm : Poly(N-isopropylacrylamide); PNEAM: Poly(N-ethylacrylamide); PMVE : Poly(methyl vinyl ether); PEOVE : Poly(2-ethoxyethyl vinyl ether); PEO : Poly(ethylene oxide) ; PPO : Poly(Propylene oxide) ; PVCL : Poly(N-Vinyl caprolactam) ; PVPI : Poly(N-vinyl piperidone) ; PDMAEMA : Poly(N,N'-dimethylaminoethylmethacrylate) ; PDEAEMA : Poly(N,N'-diethylaminoethylmethacrylate) ; POEGMA : Poly(Oligo(ethylene glycol)methylmethacrylate) ; PMEO<sub>2</sub>MA : Poly(2-(2-methoxyethoxy)ethylmethacrylate) ; PiPrOx : Poly(2-isopropyl-2-oxazoline) ; PEtOx : Poly(2-ethyl-2-oxazoline) ; PBuOx : Poly(2-butyl-2-oxazoline).

#### I.2.1.2. Paramètres structuraux influant sur la température de point de trouble

La valeur de la  $T_{PT}$  de polymères thermosensibles appartenant à la même famille peut être très dépendante de paramètres structuraux influant sur leur composition (degré de polymérisation, nature des groupements latéraux et/ou d'extrémité de chaîne).

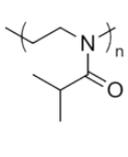
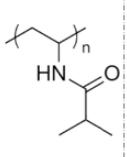
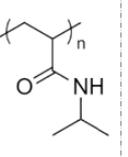
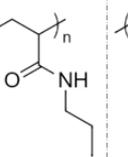
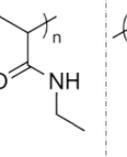
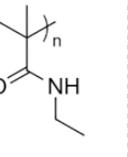
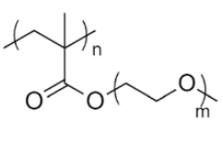
➤ Degré de polymérisation

Il est difficile de donner précisément l'influence du degré de polymérisation ou de la masse molaire du polymère sur sa température de point de trouble. En effet, les articles à ce sujet se contredisent, certains affirmant que, pour une même famille de polymères, la  $T_{PT}$  augmente avec la masse molaire, d'autres qu'elle diminue avec la masse molaire, ou encore qu'elle n'a aucun effet <sup>29</sup>. En réalité, la voie de synthèse du polymère a une grande influence sur sa  $T_{PT}$  car elle peut en modifier la nature de ses extrémités, sa tacticité ou encore sa dispersité, et tous ces facteurs ne font pas varier la  $T_{PT}$  de la même façon si le polymère est de petite ou grande masse molaire. García-Peñas *et al.* <sup>30</sup> ont étudié l'influence du degré de polymérisation d'homopolymères PNIPAAm sur sa température de point de trouble. Ils montrent que la  $T_{PT}$  diminue en augmentant la masse molaire, et justifient cela grâce à la théorie de Flory-Huggins avec une augmentation des interactions polymère-solvant entraînant une  $T_{PT}$  plus élevée pour les polymères de plus faible masse molaire.

➤ Nature du groupement latéral (motif de répétition)

La nature du groupement pendant du motif de répétition a également un impact non négligeable sur le comportement en température du polymère. Ce groupe pendant peut être de nature diverse : un hydrogène, une chaîne alkyle plus ou moins longue, linéaire ou branchée, avec la présence éventuelle d'hétéroatome(s). La nature chimique de ce groupement a un impact sur la balance hydrophile/hydrophobe ainsi que sur la mobilité de la chaîne de polymère. Plus il est capable de créer des liaisons hydrogène avec l'eau, meilleure est la solubilité du polymère, donc plus sa  $T_{PT}$  augmente <sup>21</sup>. Le Tableau 2 illustre cela avec quelques exemples d'isomères structuraux du PNIPAAm, et montre l'influence de la nature et de la longueur du groupement latéral sur la  $T_{PT}$ . Ce tableau ne donne d'ailleurs pas de valeurs précises de températures de point de trouble (mais une plage de valeurs), d'une part car celle-ci peut dépendre de la taille du polymère, de la nature de ses extrémités et parfois de sa concentration en solution, et d'autre part car les articles sélectionnés ne mentionnent pas toujours le degré de polymérisation du polymère étudié.

Tableau 2 : Comparaison des températures de point de trouble de quelques polymères en fonction de leur composition (isomères de structures, nature groupements, longueurs groupements).

						
PiPrOx <sup>(a)*</sup> 36-63 °C	PViBAm <sup>(a)*</sup> 35-39 °C	PNIPAAm <sup>(a)*</sup> 27-33 °C	PnPAAm <sup>(a)*</sup> 23-25 °C	PNEAm <sup>(b)</sup> ~ 82 °C 50-60 kg/mol (1 wt%)	PNEMAAM <sup>(a)*</sup> 67-71 °C	PEGMA <sup>(c,d)</sup> m = 2 : ~ 26 °C (17 kg/mol; 0,2 wt%) m = 3 : ~ 52 °C (16 kg/mol; 0,2 wt%) m = 4 : ~ 68 °C (18 kg/mol; 0,2 wt%) m = 9 : ~ 84 °C (70 kg/mol; 1 wt%)

(a) Müller et Borisov <sup>21</sup>, (b) Liu et Zhu <sup>31</sup>, (c) Ishizone et al. <sup>32</sup>, (d) Mertoglu et al. <sup>33</sup>.

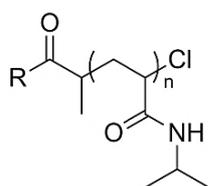
\* Les  $T_{PT}$  dépendent de la masse molaire du polymère et de sa concentration en solution aqueuse.

PViBAm : Poly(*N*-vinylisobutyramide) ; PnPAAm : Poly(*N*-*n*-propylacrylamide) ; PNEMAAM : Poly(*N*-éthylméthacrylamide) ; PEGMA : Poly(oligo(éthylène glycol)méthyl ether méthacrylate).

### ➤ Nature d'extrémité de chaîne

Stöver et al. <sup>34,35</sup> ont étudié l'influence de la nature de fin de chaîne sur la variation de la température de transition de phase.

Différentes fonctions terminales ont été incorporées à des PNIPAAm de masse molaire variable, par l'utilisation d'amorceurs spécifiques lors de la polymérisation. Cinq structures ont donc été obtenues comme suit, les groupements d'extrémité de chaîne étant cités du plus hydrophile au plus hydrophobe (Figure 8).



CP (2-chloropropionamide) : R = —NH<sub>2</sub>

iPrCP (N-isopropyl-2-chloropropionamide) : R = —N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

MCP (Methyl-2-chloropropionate) : R = —O—CH<sub>3</sub>

ECP (Ethyl-2-chloropropionate) : R = —O—C<sup>H<sub>2</sub></sup>—CH<sub>3</sub>

PhCP (N-phenyl-2-chloropropionamide) : R = —N—C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

Figure 8: Représentation schématique des structures de PNIPAAm étudiées

La température de point de trouble de chacun des polymères synthétisés a été déterminée par turbidimétrie.

Les résultats obtenus permettent de conclure que les groupements de fin de chaînes hydrophiles contribuent à augmenter la température de transition de phase, alors que les groupements hydrophobes tendent à la diminuer.

Notons que l'influence des bouts de chaînes est bien plus importante pour les courtes chaînes de polymères ( $\overline{M}_n \approx 3\,000$  g/mol) avec une différence d'environ 8 °C entre les groupements amide et phénylamide, que pour les polymères plus longs ( $M_n = 16\,000 - 18\,000$  g/mol) avec une différence inférieure à 2 °C.

Cette différence est principalement liée à la présence d'un plus grand nombre d'interactions entre les groupements d'extrémité de chaîne et les chaînes de polymères lorsque la masse molaire est plus faible <sup>16</sup>. Par conséquent, comme les polymères de fortes masses molaires sont très peu dépendants de la nature de ce groupement fonctionnel, leur  $T_{PT}$  se rapproche d'une unique valeur commune (Figure 9).

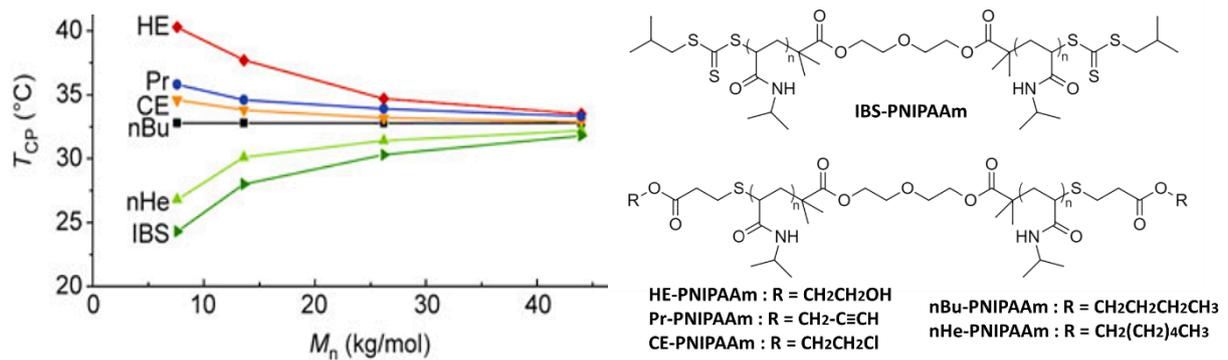


Figure 9 : Evolution de la température de point de trouble avec la masse molaire de PNIPAAm contenant différents groupements fonctionnels d'extrémité de chaîne <sup>29</sup>.

➤ Caractère hydrophile/hydrophobe des monomères (copolymères statistiques)

Enfin, de nombreuses études choisissent de synthétiser des copolymères statistiques afin de faire varier la température de point de trouble de leur système.

En effet, la copolymérisation d'un monomère thermosensible avec un ou des monomère(s) hydrophobe(s) ou hydrophile(s), thermosensibles ou non, entraîne un changement de la mobilité de la chaîne de polymère, ce qui génère une diminution de la  $T_{PT}$  dans le cas d'un monomère hydrophobe, tandis qu'un monomère hydrophile la fait augmenter.

Par exemple, la copolymérisation du NIPAAm avec un monomère acrylamide augmente la  $T_{PT}$  de 32 à 45 °C, alors que l'incorporation d'un monomère N-tert butylacrylamide la fait baisser de 10 °C<sup>18,36</sup>.

De plus, que les copolymères statistiques soient composés d'un polymère thermosensible et d'un polymère non thermosensible, ou qu'ils contiennent deux polymères thermosensibles<sup>37,38</sup>, ils sont chimiquement plus homogènes que les copolymères à blocs, donc ne laissent apparaître qu'une seule transition de phase<sup>39</sup>. Il est tout à fait possible de prédire la température de point de trouble du copolymère statistique grâce à la formule de type Gordon-Taylor suivante<sup>22</sup>:

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

Où  $\mu_1$  et  $\mu_2$  sont les fractions molaires des monomères 1 et 2,  $T_1$  et  $T_2$  sont les températures de point de trouble des homopolymères associés et  $K$  un paramètre directement relié à la relation entre la composition du copolymère et  $T_{PT}$ .

Soga *et al.*<sup>40</sup> ont synthétisé des copolymères statistiques à base de poly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide) (HPMAM) avec les monomères HPMAM-monolactate et HPMAM-dilactate, dont les homopolymères à masse équivalente présentent des  $T_{PT}$  respectives de 65 °C et 13 °C. Ils ont notamment montré l'évolution linéaire de la  $T_{PT}$  (de 10°C à 65°C) du copolymère P(HPMAM-monolactate-*co*-HPMAM-dilactate) en fonction du pourcentage molaire du polymère le plus hydrophile, le HPMAM-monolactate.

Cette approche a été appliquée à de nombreuses familles de polymères thermosensibles, par exemple les poly(N-vinylactame)s<sup>41</sup>, poly(acrylamide)s (PNIPAAm)<sup>42,43</sup>, poly(méthacrylate)s (POEGMA, PDMAEMA)<sup>27,38,44</sup> ou encore les poly(oxazoline)s<sup>37</sup>.

Il est donc possible de moduler fortement la  $T_{PT}$  de thermosensibles. Ceux-ci peuvent ensuite être incorporés dans des copolymères amphiphiles afin de développer des systèmes micellaires thermosensibles.

1.2.2. *Auto-organisation des copolymères amphiphiles thermosensibles*

1.2.2.1. Copolymères amphiphiles possédant un seul bloc thermo-sensible

Le comportement des copolymères diblocs contenant un seul bloc thermosensible diffère en fonction de la nature du second bloc introduit, et permet la formation de micelles dont soit la couronne, soit le cœur est thermosensible (Figure 10).

Si le copolymère est constitué d'un bloc hydrophile thermosensible et d'un bloc hydrophobe classique, il y a formation, en dessous de la température de point de trouble du bloc hydrophile, de micelles possédant une couronne thermosensible. Lorsque la  $T_{PT}$  est atteinte puis dépassée, le polymère dans la couronne perd sa solubilité et se replie sur lui-même, provoquant l'agrégation du système <sup>12</sup>, comme décrit précédemment (cf. 1.2.1.1.). Il existe un grand nombre de possibilités quant à la nature des blocs, la couronne hydrophile pouvant être composée de tout polymère thermosensible, les plus courants décrits dans ce cas étant les poly(acrylamide)s <sup>45-48</sup> et poly(méthacrylate)s <sup>49,50</sup>.

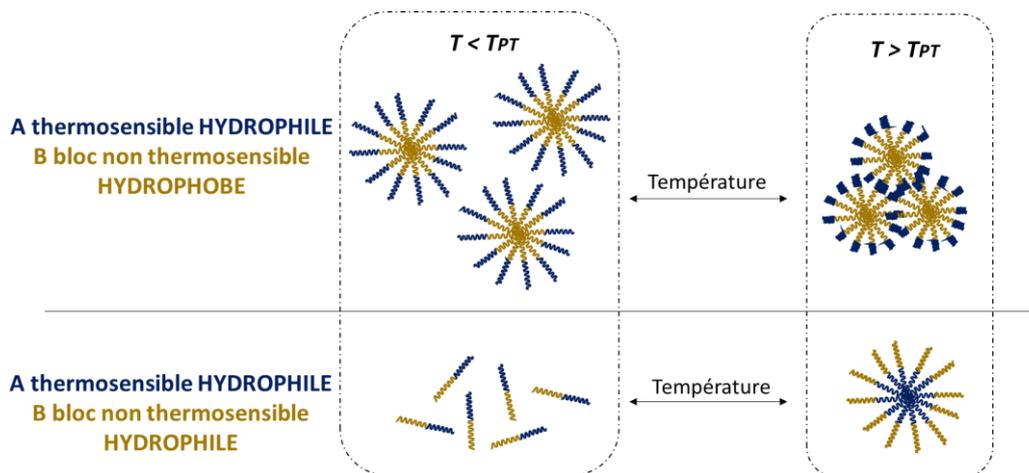


Figure 10 : Deux types de comportement de copolymères à blocs thermosensibles avec la température en fonction de la composition du copolymère.

Si le copolymère contient initialement un bloc hydrophile thermosensible et un bloc hydrophile classique, le copolymère est alors entièrement hydrophile et reste sous forme d'unimères en solution aqueuse sous sa  $T_{PT}$ , et ce n'est qu'une fois que la  $T_{PT}$  est atteinte qu'il devient amphiphile et forme des micelles contenant cette fois-ci le polymère thermosensible dans leur cœur <sup>12</sup>. Cela a par exemple été démontré sur des structures PEG-*b*-PNIPAAm où le PNIPAAm forme le cœur des micelles au-dessus de sa  $T_{PT}$  et le PEG constitue la couronne <sup>51</sup>.

Il est tout à fait possible d'observer le même comportement en présence de copolymères triblocs contenant deux blocs hydrophiles externes afin d'obtenir des structures micellaires similaires en étoile (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO<sup>52</sup>).

Ainsi, le développement de copolymères diblocs ou triblocs par l'incorporation d'un second polymère non thermosensible, permet la formation de systèmes micellaires sensibles à la température. Il est à noter que l'incorporation du bloc non thermosensible peut également faire varier la  $T_{PT}$  du polymère thermosensible.

### 1.2.2.2. Copolymères à blocs amphiphiles comportant deux thermosensibilités

Il est tout à fait possible de créer des copolymères amphiphiles composés de plusieurs polymères thermosensibles.

Généralement, les deux blocs constitutifs du copolymère s'agrègent à la température de point de trouble de leur homopolymère respectif.

De nombreuses études mettent en évidence la présence de deux transitions de phase distinctes, et parlent notamment de transition hydrophile-amphiphile-hydrophobe.

Jochum *et al.*<sup>53</sup> ont étudié le dibloc POEGMA-*b*-PNIPMAM et ont montré par différentes techniques (RMN, DSC, turbidimétrie) l'apparition avec la température de deux points de trouble correspondant à ceux des homopolymères seuls. Sous la  $T_{PT}$  des deux blocs (< 40 °C), le copolymère est hydrophile et parfaitement soluble dans l'eau. Lorsque la  $T_{PT}$  du PNIPMAM est atteinte (43,5 °C en DSC), celui-ci s'agrège et permet la formation de micelles avec le PNIPMAM dans son cœur et le POEGMA dans sa couronne, ce qui résulte du caractère amphiphile du copolymère à cette température. Les mesures en diffusion de lumière permettent d'ailleurs de corroborer la nature des objets obtenus. Le système est alors stable jusqu'à la  $T_{PT}$  du POEGMA (59,5 °C), à laquelle le copolymère devient totalement hydrophobe et précipite.

Weiss *et al.*<sup>54</sup> ont obtenu le même constat avec un copolymère poly(N-n-propylacrylamide)-*b*-poly(N-ethylacrylamide) (PNPAM-*b*-PNEAM) où les deux blocs sont de la même famille. Trois copolymères ont été synthétisés avec ces deux homopolymères de  $T_{PT}$  respectives autour de 20 °C et de 70 °C. Quelle que soit la proportion relative de chacun des deux blocs (PNPAM<sub>137-</sub>

*b*-PNEAM<sub>67</sub>, PNPAM<sub>133</sub>-*b*-PNEAM<sub>133</sub>, PNPAM<sub>34</sub>-*b*-PNEAM<sub>94</sub>), deux transitions de phase sont visibles lors de la chauffe, correspondant à l'agrégation de chacun des blocs individuels.

De manière similaire, il est aussi possible de synthétiser des copolymères diblocs dont les deux blocs sont soit un homopolymère et un copolymère statistique<sup>55</sup>, soit deux copolymères statistiques [Poly((N-vinylcaprolactame)-*stat*-(3-méthyl-N-vinylcaprolactame))-*b*-Poly((N-vinylpyrrolidone)-*stat*-(N-vinylcaprolactame))] = P(VC-*stat*-MVC)-*b*-(P(VP-*stat*-VC)) représenté en Figure 11<sup>56</sup>.

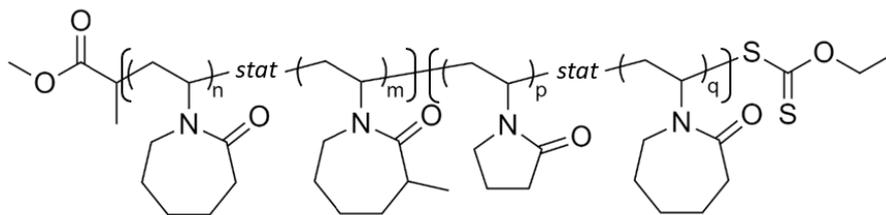


Figure 11 : Représentation du copolymère P(VC-*stat*-MVC)-*b*-P(VP-*stat*-VC)<sup>56</sup>

Le premier bloc est obtenu en copolymérisant MVC et VC, et ce afin d'augmenter l'hydrophobie et de diminuer la  $T_{PT}$  du bloc hydrophobe sous les 30 °C, permettant la micellisation à température ambiante.

Le deuxième bloc est obtenu en copolymérisant VC et VP pour augmenter l'hydrophilie et augmenter la  $T_{PT}$  du bloc hydrophile.

Ce double copolymère statistique a le même comportement que les copolymères à blocs détaillés ci-dessus, puisqu'il est également soumis à deux transitions de phase, mais il a l'avantage d'avoir une température de point de trouble bien plus modulable, simplement par le contrôle des proportions en chacun des polymères le constituant (Figure 12).

Le même type d'étude conduisant à des résultats similaires a également été réalisé sur des triblocs ABA avec deux blocs hydrophiles A de même nature et un bloc B hydrophobe soit non thermosensible<sup>47</sup>, soit hydrophile et thermosensible de plus faible  $T_{PT}$  que A<sup>57</sup>.

Il peut aussi exister des triblocs plus complexes de type ABC où deux<sup>58</sup> voire trois blocs<sup>59</sup> sont thermosensibles (Figure 12).

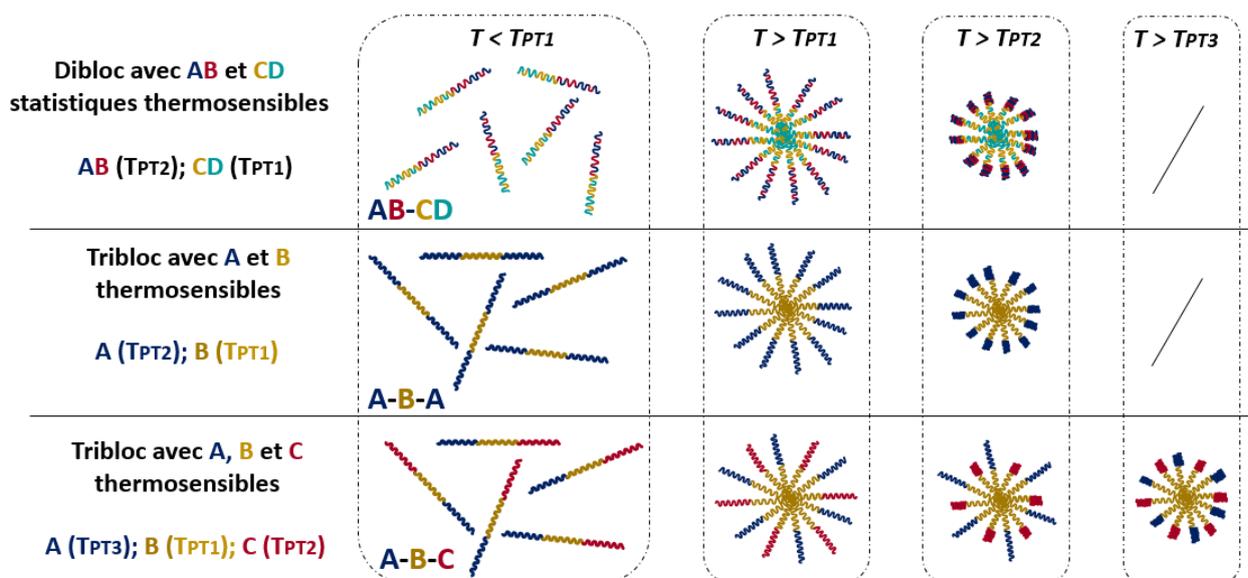


Figure 12 : Représentation schématique de diblocs dont les deux blocs sont des copolymères statistiques thermosensibles et de triblocs ABA et ABC avec trois blocs thermosensibles.

Cao *et al.*<sup>59</sup> ont montré la possibilité de combiner trois polymères thermosensibles différents au sein d'un copolymère tribloc (PnPAAM<sub>124</sub>-*b*-PNIPAAm<sub>80</sub>-*b*-PNEMAAM<sub>44</sub>). De manière similaire aux diblocs présentés dans les études précédentes, les analyses en température permettent de voir trois transitions de phase correspondant à l'agrégation successive des trois homopolymères, mais avec des  $T_{PT}$  décalées en raison de l'influence du caractère hydrophile/hydrophobe de chacun des blocs.

Dans cette partie n'ont été évoquées que des combinaisons de polymères à LCST afin de rester centré sur le projet de recherche de cette thèse. Nous souhaitons cependant préciser qu'il est également possible d'exploiter les propriétés de polymères à UCST, afin d'obtenir des systèmes UCST-UCST ou bien UCST-LCST<sup>19,24</sup>.

De plus, même si la température est un stimulus très étudié car il permet d'avoir un bon contrôle sur le comportement des systèmes, il est aussi intéressant de travailler sur des systèmes combinant des stimuli de natures différentes (pH, lumière, gaz, T,...) pour apporter un levier supplémentaire<sup>60,61</sup>. L'utilisation de certains stimuli (champ magnétique, lumière) peut en plus permettre la création de chaleur bénéfique aux systèmes présentant une thermo-sensibilité<sup>14,62</sup>.

### I.3. Conclusion

La synthèse de copolymères amphiphiles permet d'obtenir des systèmes organisés qui miment le comportement des molécules de tensioactifs classiques, mais avec de meilleures propriétés de stabilité.

La structure des copolymères à blocs doit être maîtrisée pour obtenir des objets nanométriques aux caractéristiques (taille, fonctionnalités) spécifiques de l'application visée. Généralement, les auteurs cherchant à moduler les propriétés de leurs systèmes micellaires choisissent de synthétiser des copolymères triblocs adoptant un comportement intermédiaire à ceux des homopolymères constitutifs de chacun des blocs.

Cependant, l'obtention de nouvelles propriétés requiert systématiquement de nouveaux copolymères, et donc de nouvelles synthèses pour y parvenir, avec parfois une déviation entre la composition visée et celle obtenue, nécessitant donc une adaptation de la synthèse pour chaque copolymère.

Ainsi, afin de contourner la voie classique de synthèse et donc de se soustraire à toutes les contraintes qu'elle implique (temps, difficultés de synthèse), une voie plus récente consiste à mélanger physiquement deux copolymères de nature, architecture, composition et/ou fonctionnalités différentes dans le but de combiner leurs caractéristiques respectives <sup>63</sup>.

## II. Modulation du comportement de systèmes micellaires par une approche formulatoire

L'approche formulatoire consiste à mélanger physiquement des copolymères amphiphiles, soit à l'état solide, soit déjà en solution, l'objectif de ces mélanges étant alors d'obtenir des micelles mixtes (Figure 13).

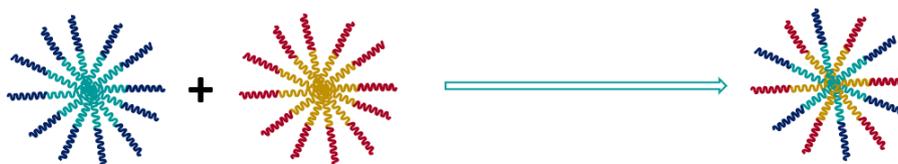


Figure 13 : Représentation schématique du mélange physique de deux copolymères amphiphiles différents.

## II.1. Optimisation des caractéristiques structurelles du système mixte

Lorsque la compatibilité des différents blocs le permet, en particulier lorsque le mélange est énergétiquement favorable, différents copolymères amphiphiles peuvent s'auto-assembler dans une unique structure micellaire mixte <sup>64</sup>. Il existe plusieurs combinaisons envisageables de copolymères amphiphiles dans la préparation de micelles mixtes (AB+CB <sup>65</sup>, AB+AC <sup>66</sup>, AB+CD <sup>67</sup>), où les différents blocs peuvent coexister dans la couronne ou le cœur uniquement, ou bien dans les deux à la fois.

Il existe cependant une contrainte à respecter pour que cette stratégie de mélange soit intéressante. Le système doit être dynamique pour être capable d'atteindre son équilibre thermodynamique afin de mimer le comportement des copolymères à blocs (constitué d'un ou plusieurs copolymère(s) statistique(s)) de même composition globale <sup>11</sup>.

Une fois le mélange à l'équilibre, la cmc théorique des micelles mixtes peut être exprimée comme :

$$\frac{1}{cmc} = \frac{x_1}{cmc_1} + \frac{x_2}{cmc_2}$$

où x est la fraction molaire des copolymères constituant la micelle. Cette expression théorique ne prend pas en compte les éventuelles interactions pouvant exister entre micelles, et peut donc, dans certains cas, s'écarter un peu de la réalité expérimentale <sup>68,69</sup>.

Les caractéristiques des micelles mixtes formées ( $R_h$ ,  $N_{ag}$ , capacité d'encapsulation) sont largement dépendantes d'un certain nombre de paramètres, tels que la concentration relative des copolymères en solution <sup>70</sup>, la masse molaire des copolymères, et la proportion relative ou longueur des blocs hydrophiles et hydrophobes <sup>71</sup>.

Quelques études ont choisi de modéliser le comportement théorique de mélanges physiques de deux copolymères en fonction de leurs caractéristiques intrinsèques (taille, composition). Les études théoriques de Sens *et al.* <sup>72</sup> ainsi que de Borovinskii et Khokhlov <sup>73</sup> ont modélisé le comportement de copolymères amphiphiles de nature identique mais de longueurs différentes, mélangés en solutions. En fonction de la concentration de chacune des chaînes

en solution, les micelles mixtes peuvent se former de deux façons. Soit les deux copolymères co-micellent directement lorsque la concentration totale en copolymère dans la solution augmente, soit la co-micellisation se fait en deux étapes. Dans ce cas, les longues chaînes commencent à micelliser et forment des objets constitués d'une seule nature de chaînes. Puis, lorsque la concentration de copolymères dans la solution augmente, les plus courtes chaînes peuvent alors micelliser à leur tour, ces chaînes étant progressivement incorporées dans les micelles déjà formées, conduisant à la formation de micelles mixtes <sup>72</sup>. Si la proportion en courtes chaînes dans le mélange est bien plus élevée, l'excès de chaînes ne pouvant pas co-micelliser forme des micelles pures <sup>73,74</sup>.

L'apparition de ce deuxième processus est généralement liée à une différence de cmc entre les copolymères. Il y a alors coexistence de micelles de 1 et d'unimères de 2 avant d'avoir formation de micelles mixtes 1+2.

La proportion de micelles mixtes est généralement liée aux différences de composition existant entre deux copolymères et en particulier à leur taille. Dans ces études théoriques, les auteurs caractérisent l'asymétrie des deux copolymères en comparant les masses molaires des blocs insolubles constituant le cœur, ainsi que la différence de longueurs des chaînes de la couronne. Si les différences entraînent une asymétrie faible, les petites chaînes de copolymères sont incorporées continûment dans les micelles formées par les grandes chaînes, et sont principalement localisées près de l'interface cœur-couronne <sup>72,74-76</sup> (Figure 14).

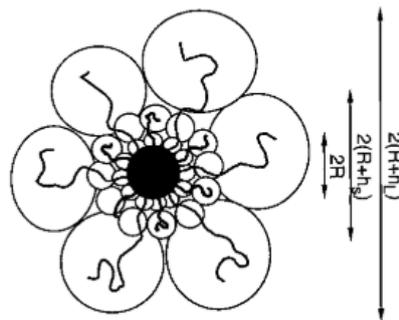


Figure 14: Schéma d'une micelle mixte contenant un mélange de deux copolymères.  
 R : Rayon du cœur,  $h_L$  : longueur du copolymère long,  $h_S$  : longueur du copolymère court <sup>72</sup>

Dans ce cas, la distribution de taille des micelles correspond à un unique pic de type Gaussienne relativement étroit <sup>72,76</sup>. Si les différences de composition entraînent une asymétrie plus importante, la courbure spontanée des deux copolymères est très différente

et les micelles mixtes contiennent une proportion de petites chaînes plus faible, voire inexistante <sup>72</sup>.

Mélanger physiquement des courtes chaînes plus hydrophobes avec de longues chaînes plus hydrophiles peut augmenter la capacité d'encapsulation, mais peut également être néfaste en générant une hétérogénéité trop importante dans la taille et la morphologie des micelles <sup>75</sup>.

Prhashanna et Dormidontova ont quant à eux étudié, toujours par modélisation, l'impact de l'architecture des copolymères en choisissant de mélanger un copolymère linéaire avec un copolymère partiellement cyclique de même nature, la partie cyclique étant dans le cœur <sup>77</sup> ou dans la couronne <sup>78</sup>, et l'autre bloc étant commun aux deux copolymères (Figure 15).

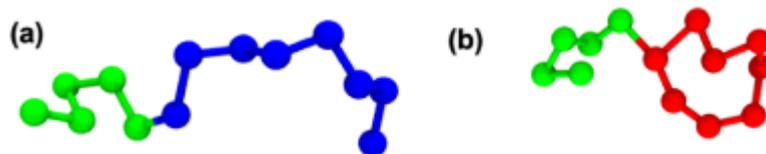


Figure 15: Représentation schématique des copolymères amphiphiles étudiés. (a) Copolymère avec deux blocs linéaires, (b) Copolymère avec un bloc linéaire et un bloc cyclique (cœur ou couronne).

Que la partie cyclique se trouve dans le cœur ou dans la couronne de la micelle, les micelles pures formées par ce copolymère auraient une taille et un nombre d'agrégation plus faible que le copolymère linéaire correspondant, ainsi qu'une cinétique d'échange plus rapide. Ces propriétés ont été attribuées à la localisation dans la micelle du bloc cyclique plus près de l'interface cœur-couronne que son équivalent linéaire.

Lorsque ces copolymères de structure partiellement cyclique co-micellisent avec leur homologue linéaire, il se formerait des micelles mixtes de taille et nombre d'agrégation intermédiaires aux deux constituants, mais très proches des valeurs obtenues pour le copolymère linéaire (Figure 16).

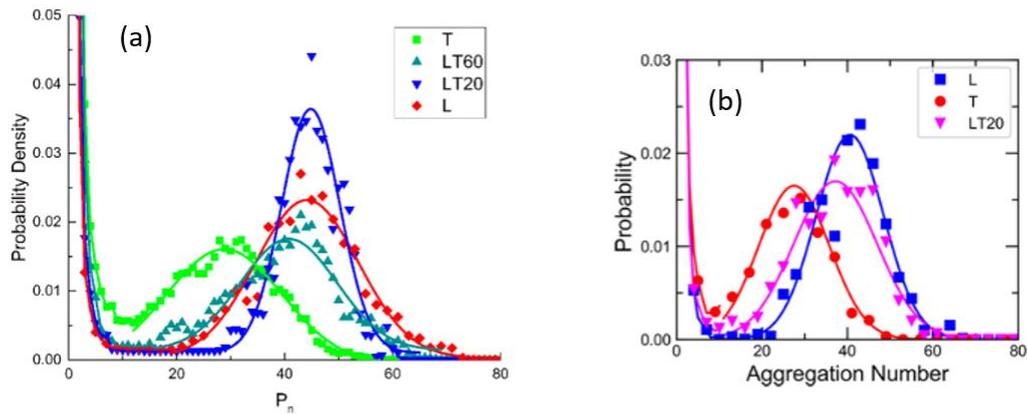


Figure 16: Distribution du nombre d'agrégation de micelles pures de copolymère linéaire-linéaire (L), linéaire-cyclique (T) et de micelles mixtes linéaire-cyclique/linéaire-linéaire 20%/80% (LT20) et 60%/40% (LT60).  
 (a) Bloc cyclique dans le cœur, (b) Bloc cyclique dans la couronne <sup>77,78</sup>

Dans certaines études, il est rapporté que le mélange physique de deux copolymères de natures différentes permettrait la formation de micelles mixtes par le cœur, mais l'incompatibilité des blocs hydrophiles serait si forte, que les interactions répulsives qu'ils exercent l'un sur l'autre entraîneraient une ségrégation de phase dans la couronne, et la formation de micelles Janus. Dans une étude théorique, Charlaganov *et al.* <sup>79</sup> ont suggéré qu'une transition d'une couronne hétérogène vers une couronne homogène pouvait avoir lieu dans le cas de micelles de type Janus, en diminuant le nombre d'agrégation  $N_{ag}$ . En effet, en diminuant  $N_{ag}$ , le nombre de contacts énergétiquement défavorables entre les deux chaînes hydrophiles diminuerait, jusqu'à un point où l'entropie de mélange deviendrait plus importante que l'énergie empêchant le mélange. Les chaînes polymères commenceraient donc à se mélanger dans la couronne. Il est également possible de varier le nombre de contacts entre les chaînes hydrophiles en créant une disparité de la longueur des chaînes dans la couronne.

Expérimentalement, l'obtention d'une couronne homogène n'est pas toujours possible, comme dans l'étude de Voets *et al.* <sup>80</sup> où les copolymères poly(N-méthyl-2-vinyl pyridinium iodide)-*b*-poly(ethylene oxide) (P2MVP-*b*-PEO) et poly(acide acrylique)-*b*-poly(acrylamide) (PAA-*b*-PAAm) forment des micelles de type Janus où les deux polymères PEO et PAAm de la couronne se séparent en deux phases bien distinctes. Malgré toutes les tentatives de modifications de la composition (fraction EO, diminution longueur PEO ( $N_{PEO}$ ) à une longueur de PAAm ( $N_{PAAm}$ ) fixe, diminution longueur couronne à longueur  $N_{PAAm}=N_{PEO}$ ), aucun mélange

homogène de la couronne n'a été possible sur ce système, à cause de la trop grande incompatibilité entre le PEO et le PAAm.

Il existe malgré tout un grand nombre de cas où la formation de micelles mixtes avec cœur et couronne homogènes est possible, que le mélange soit fait de deux copolymères linéaires ou de copolymères linéaires et branchés <sup>81</sup>.

Par comparaison avec les micelles pures (c'est-à-dire constituées d'un seul copolymère à blocs), ces micelles mixtes présentent un certain nombre d'avantages.

D'abord, elles permettent d'avoir un meilleur contrôle de la taille et de la distribution des micelles <sup>81</sup>, ainsi que de leur nombre d'agrégation.

Mingvanish *et al.* <sup>82</sup> ont étudié un mélange physique de copolymères dibloc et tribloc de composition proche (PEO<sub>60</sub>-*b*-PBO<sub>12</sub> et PEO<sub>60</sub>-*b*-PBO<sub>20</sub>-*b*-PEO<sub>60</sub>, PBO = poly(oxyde de butylène)). Les auteurs ont montré que les deux copolymères s'organisent en phase aqueuse sous forme de micelles mixtes, de taille inchangée par rapport aux micelles pures, mais ayant un nombre d'agrégation qui diminue lorsque la proportion de tribloc augmente. Cela est dû à la nécessité pour le tribloc de former une boucle dans la micelle, induisant la présence de deux jonctions EO-BO à l'interface cœur-couronne.

D'autres auteurs ont également montré la possibilité de mélanger un dibloc et un tribloc de natures différentes, et d'obtenir des micelles composées d'un cœur commun et d'une couronne mixte (ADN-*b*-PPO/PEO-*b*-PPO-*b*-PEO <sup>83</sup>) ou d'une couronne commune et d'un cœur mixte (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO/PPS-*b*-PEO, PPS = Poly(propylène sulfide)<sup>84</sup>).

Ensuite, les micelles mixtes sont intéressantes pour moduler facilement les propriétés du système étudié, par exemple sa stabilité thermodynamique et cinétique ou son comportement stimuli-sensible.

Lo *et al.* <sup>65</sup> ont par exemple choisi de mélanger un copolymère thermosensible [methoxy poly(éthylène glycol)-*b*-poly(N-n-propylacrylamide-co-vinylimidazole) PEG-*b*-P(NnPAAm-co-VIm)] (Figure 17) avec un copolymère non thermosensible (PEG-*b*-PLA) mais plus stable thermodynamiquement (cmc plus faible), et ce afin de conserver la sensibilité à la température sur un système se dissociant moins facilement.

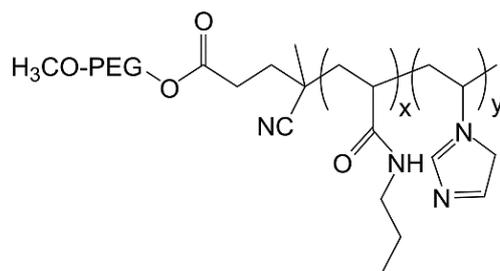


Figure 17 : Structure chimique du methoxy poly(éthylène glycol)-*b*-poly(N-n-propylacrylamide-co-vinylimidazole)<sup>65</sup>

Leroux *et al.*<sup>85</sup> ont quant à eux amélioré la stabilité cinétique de leurs micelles par stéréocomplexation du cœur, en préparant des mélanges équimolaires de PEG-*b*-PLLA/PEG-*b*-PDLA où PDLA et PLLA sont les énantiomères du poly(acide lactique) très utilisé pour ses propriétés biodégradables et biocompatibles. Ces stéréocomplexes ont montré une meilleure stabilité cinétique et de meilleures propriétés de redispersion que les micelles pures préparées avec les polymères isotactiques ou les copolymères statistiques racémiques dans leur cœur.

Wu *et al.*<sup>66</sup> ont obtenu des micelles mixtes PEO-*b*-PLA/PNIPAAm-*b*-PLA avec un cœur commun PLA et une couronne mixte PEO/PNIPAAm. Par augmentation de la température au-dessus de la température de point de trouble du PNIPAAm, les micelles peuvent être converties en structure oignon « cœur-écorce-couronne » avec un cœur PLA, une écorce formée par l'effondrement des chaînes PNIPAAm, et une couronne soluble de PEO où les chaînes PEO étirées permettent la stabilisation de la micelle et la formation de canaux. Ces canaux sont un moyen d'échange entre l'intérieur et l'extérieur de la micelle, et permettent notamment le relargage de l'ibuprofène encapsulé, la cinétique de relargage étant contrôlée par la proportion en chacun des copolymères.

Il y a quelques années, notre équipe<sup>86</sup> a également contribué au développement de micelles mixtes, en mélangeant physiquement un copolymère thermosensible lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) LPiPrOx et un copolymère pH-sensible lipide-*b*-poly(acide acrylique) afin de combiner deux sensibilités différentes, et donc d'avoir un meilleur contrôle sur le comportement du système. Les micelles obtenues ne se déstabilisent que lorsque deux stimuli sont simultanément appliqués : Une température supérieure à la  $T_{PT}$  du bloc thermosensible, conduisant à son agrégation, et un  $pH > 7$  conduisant à une augmentation importante de

l'hydrophilie du bloc poly(acide acrylique) (consécutif à sa déprotonation) et résultant en une baisse drastique de ses propriétés tensio-actives.

Enfin, la formulation de micelles mixtes permet à la fois l'incorporation de plusieurs fonctionnalités ou ligands en surface des micelles<sup>71,81,87</sup> (ce qui est plus difficile sur un unique copolymère) et le contrôle de la densité de ligands présents sur une micelle<sup>88</sup>. Les micelles mixtes peuvent être constituées d'un unique copolymère où certaines chaînes sont modifiées et pas d'autres, ou bien de copolymères différents tous les deux modifiés<sup>89</sup> ou non<sup>90</sup>.

Beaucoup d'études se sont intéressées au mélange physique de deux copolymères triblocs thermosensibles PEO-*b*-PPO-*b*-PEO, linéaires (Pluronic<sup>®</sup>) ou non (Tétronics<sup>®</sup>), et ce grâce à l'existence d'une large gamme de compositions EO/PO, avec des masses molaires comprises entre 2000 et 20000 g/mol et des pourcentages massiques en PEO de 10 à 80 %<sup>91</sup>.

Lee *et al.*<sup>92</sup> ont regardé l'influence de la longueur du bloc hydrophile PEO (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO) sur la mixité des micelles en analysant les mélanges réalisés avec trois Pluronic<sup>®</sup> de longueurs du bloc PEO différentes mais de longueur du bloc PPO identique. La variation de la longueur du bloc hydrophile contribue à modifier l'hydrophobie du copolymère et peut avoir une influence sur sa température de micellisation ( $T_m$ ). Cependant, au-dessus de la  $T_m$  des deux copolymères, quelle que soit la longueur du bloc PEO, ils ont systématiquement obtenu des micelles mixtes dont la couronne adopte la taille du bloc le plus hydrophile qu'elle contient. Renou *et al.* ont observé le même phénomène lors du mélange de deux PEO-C<sub>18</sub> avec des chaînes PEO de 19 et 92 unités EO, tout à fait capables de co-micelliser, comme le montrent les analyses en diffusion de lumière. Cette étude est évoquée ici car la nature des copolymères correspond aux systèmes étudiés dans la suite de ce manuscrit, mais elle n'est pas détaillée davantage. En effet, les résultats s'en éloignent car les solutions analysées sont 200 à 300 fois plus concentrées, et la formation de micelles mixtes permet ici d'impacter les interactions répulsives entre micelles et donc les propriétés rhéologiques des solutions.<sup>93</sup>

Chiappetta *et al.*<sup>69</sup> sont arrivés aux mêmes conclusions que les études précédentes, en mélangeant physiquement des copolymères d'architectures différentes, un Pluronic<sup>®</sup> (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO linéaire) et un Tetronic<sup>®</sup> (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO étoile à 4 branches) de composition

variable en fonction du Tetronic® sélectionné, avec des longueurs de blocs hydrophile et/ou hydrophobe plus ou moins proches du Pluronic® (Figure 18).

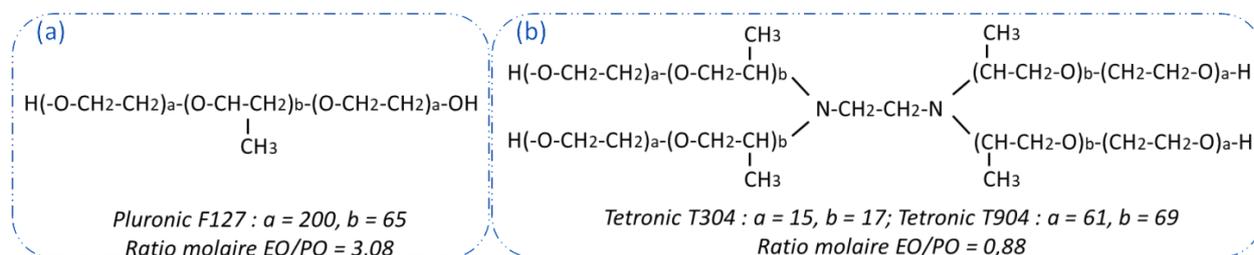


Figure 18 : Caractéristiques structurales des copolymères amphiphiles linéaire et branché PEO-PPO étudiés <sup>69</sup>

Ils ont établi la présence de micelles mixtes après avoir réalisé les mélanges F127/T304 et F127/T904, avec une diminution de la température de point de trouble par incorporation des Tetronics® plus hydrophobes.

Ils ont de plus noté le mélange favorable de F127 et T904 avec une meilleure stabilité et une meilleure capacité d'encapsulation.

En revanche, bien que le mélange soit possible entre F127 et T304, leur différence importante de longueurs des blocs entraîne une dégradation des propriétés du système.

Cette étude met donc en avant le faible impact du bloc hydrophile mais le fort impact du bloc hydrophobe sur la capacité des systèmes à se mélanger de manière homogène au sein d'une unique structure micellaire.

La différence de longueur de bloc hydrophobe est particulièrement connue pour gêner voire empêcher complètement la mixité des systèmes micellaires, ce que montrent les études sur des solutions diluées de Pluronic® <sup>69,72,74,94,95</sup>.

Lee *et al.* <sup>92</sup> ont montré qu'une différence de 28 unités oxyde de propylène (PO) permet un mélange coopératif des copolymères, c'est-à-dire leur mélange homogène au sein d'une micelle mixte. Ce n'est pas le cas lorsque la différence est de 37 unités PO (P123 : PEO<sub>21</sub>-b-PPO<sub>67</sub>-b-PEO<sub>21</sub> ; F68 : PEO<sub>80</sub>-b-PPO<sub>30</sub>-b-PEO<sub>80</sub>), où la coopérativité est diminuée, entraînant la cohabitation de quelques micelles mixtes P123/F68 et de micelles pures F68. Des mesures du nombre volumique (nombre d'objets par unités de volume) en diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont permis de dénombrer 35% en nombre de micelles mixtes pour 65% de micelles pures, pour une fraction molaire F68/P123 de 1,37.

Renou *et al.* <sup>96</sup> ont étudié l'influence de la longueur du bloc hydrophobe avec des chaînes PEO- $C_n$  ( $n = 12$  à  $22$ ). Ils ont montré la possibilité de former des micelles mixtes, et ont également confirmé le comportement théorique établi par Sens <sup>72</sup> et Borovinskii <sup>73</sup> (cf. page 23 § 4), où les mélanges d'une chaîne courte avec une chaîne plus longue montraient d'abord la micellisation de la plus longue, suivie de l'incorporation de la plus courte avec la co-micellisation. Les micelles mixtes formées adoptent alors le comportement rhéologique de micelles de chaînes PEO- $C_n$  avec  $n$  correspondant à la moyenne des deux chaînes mélangées. König *et al.* <sup>97</sup> ont d'ailleurs qualifié ce résultat de surprenant, car les mélanges de  $n$ -alcanes avec une différence de  $n \geq 6$  sont connus pour démixer en phase solide. Cependant, le confinement dans le cœur des micelles semble améliorer leur miscibilité en supprimant le mécanisme de démixtion dû au phénomène de cristallisation des chaînes qui diffère en fonction de leur longueur.

En réalité, ce n'est pas tant la longueur du bloc hydrophobe qui impacte la mixité, mais plutôt son hydrophobie. Que l'hydrophobie du bloc soit apportée par sa longueur ou par sa nature chimique (pour des polymères de familles différentes PEG-*b*-PCL/PEG-*b*-PLA <sup>98</sup> ou de la même famille PEO<sub>45</sub>-*b*-PBO<sub>14</sub>-*b*-PEO<sub>45</sub>/PEO<sub>99</sub>-*b*-PPO<sub>69</sub>-*b*-PEO<sub>99</sub> <sup>99</sup>), elle a généralement pour conséquence de changer la cmc et la température critique de micellisation <sup>95</sup>.

Ricardo *et al.* <sup>100</sup> ont mélangé les copolymères triblocs PEO-*b*-PBO-*b*-PEO (EBE) et PEO-*b*-PSO-*b*-PEO (ESE) où PSO est le poly(oxyde de styrène). Dans cette étude, la longueur du bloc hydrophile PEO a peu d'impact, mais l'hydrophobie du bloc formant le cœur (PSO et PBO) a une importance capitale sur la formation des micelles mixtes. Lorsqu'ils mélangent E<sub>64</sub>B<sub>20</sub>E<sub>64</sub> et E<sub>137</sub>S<sub>18</sub>E<sub>137</sub>, les blocs PBO et PSO ont la même longueur mais une hydrophobie différente, et donc ils co-micellent difficilement, alors que les triblocs E<sub>135</sub>B<sub>20</sub>E<sub>135</sub> et E<sub>82</sub>S<sub>9</sub>E<sub>82</sub> qui ont la même hydrophobie bien que pas la même longueur, co-micellent de manière favorable. Cela est principalement dû à la différence de cmc entre les copolymères.

Si les copolymères ont une cmc très différente (facteur 10 pour E<sub>64</sub>B<sub>20</sub>E<sub>64</sub> et E<sub>137</sub>S<sub>18</sub>E<sub>137</sub>), et si l'on se place à une concentration supérieure à la cmc des deux copolymères, ils ne forment pas des micelles pures de l'un et l'autre des copolymères mais deux populations de co-micelles de compositions différentes. C'est ce que confirme la comparaison entre les résultats en

diffusion de lumière et le calcul théorique du  $N_{ag}$  en présence de micelles pures de deux copolymères, bien que cette étude ne précise pas la nature des co-micelles formées.

Si les copolymères ont une cmc proche (facteur 2 pour  $E_{135}B_{20}E_{135}$  et  $E_{82}S_9E_{82}$ ), ils vont s'auto-assembler dans des micelles mixtes de manière bien plus favorable.

Lorsque la différence d'hydrophobie entre les blocs formant le cœur est contrôlée, les mélanges physiques peuvent apporter des propriétés intéressantes.

Wright *et al.* <sup>63</sup> ont montré l'intérêt de mélanger physiquement deux copolymères  $P(DMAEMA_{1-x}-co-DEAEMA_x)-b-PDMAEMA$  d'hydrophobies différentes dans le cœur en modulant la proportion molaire  $x$  de monomère hydrophobe DEAEMA (avec  $x = 32\%$  pour le copolymère 1 et  $91\%$  pour le 2). Les mélanges physiques des copolymères 1 (sous forme d'unimères en solution) et 2 (sous forme de micelles) en différentes proportions massiques, ont été comparés aux micelles de copolymères statistiques  $P(DMAEMA_{1-x}-co-DEAEMA_x)-b-PDMAEMA$  de même composition globale.

Les auteurs ont montré que des micelles mixtes étaient obtenues avec des caractéristiques structurales (rayon hydrodynamique  $R_h$ , rayon du cœur  $R_c$  et nombre d'agrégation  $N_{ag}$ ) variables en fonction des proportions en chacun des copolymères, mais similaires aux micelles pures contenant un unique copolymère de même composition globale.

Cette approche de mélanges physiques présente donc un certain nombre d'avantages puisqu'elle permet d'affiner les propriétés d'un système simplement en variant les proportions relatives en l'un et l'autre des copolymères le constituant, tout en s'affranchissant de multiples étapes de synthèse. Ainsi, elle permet d'obtenir un meilleur contrôle de la taille et de la distribution des micelles en solution, elle améliore leur stabilité (cinétique et thermodynamique), et rend plus accessible l'incorporation de plusieurs fonctionnalités en surface des micelles.

## II.2. Impact du mélange physique sur la température de point de trouble

De plus en plus d'articles référencent la stratégie de mélanges physiques pour combiner l'action de plusieurs stimuli différents (pH, T, redox, UV) <sup>86,101–107</sup>.

En revanche, la combinaison de deux copolymères thermosensibles dans le but de faire varier la température de point de trouble globale du système n'a pas été beaucoup décrite.

La première étude publiée en 2014 par Wu *et al.*<sup>108</sup> étudie le mélange physique de deux copolymères à blocs amphiphiles obtenus via la modification post-polymérisation d'un unique copolymère. Le caractère thermosensible est apporté par le triéthylène glycol méthacrylate (TEGMA) et le caractère pH-sensible vient de l'acide 6-amino caproïque (ACA). Les deux structures obtenues sont les suivantes (Figure 19) :

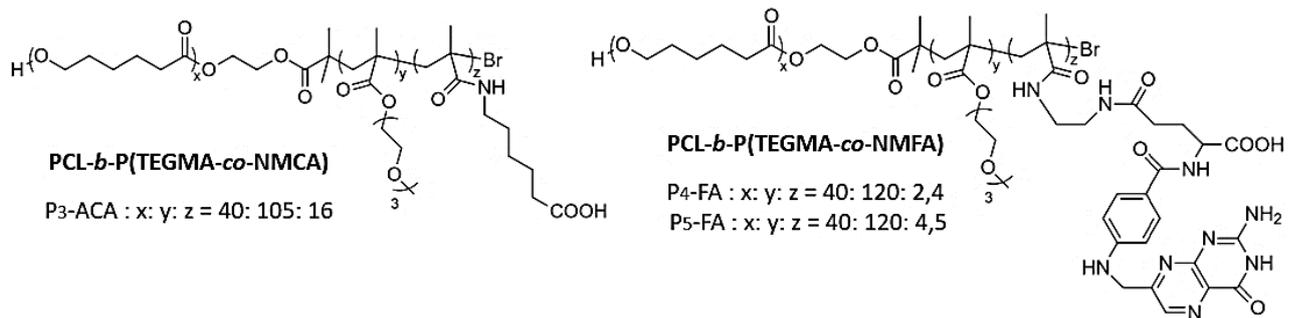


Figure 19 : Structure chimique des copolymères poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*b*-poly(triéthylène glycol méthacrylate-*co*-N-méthacryloyl caproic acid) [PCL-*b*-P(TEGMA-*co*-NMCA)] et poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*b*-poly(triéthylène glycol méthacrylate-*co*-N-(2-(méthacrylamido)ethyl)folatic amide) [PCL-*b*-P(TEGMA-*co*-NMFA)]<sup>108</sup>

Les auteurs ont choisi de mélanger physiquement le copolymère pH- et thermosensible P<sub>3</sub>-ACA avec les copolymères thermosensibles P<sub>4</sub>-FA ou P<sub>5</sub>-FA fonctionnalisés avec de l'acide folique (FA), afin de combiner les caractères pH et thermosensibles et d'ajuster la quantité de ligands acide folique à la surface des micelles. Ils ont alors démontré la possibilité d'obtenir des structures homogènes en taille, de T<sub>PT</sub> variable comprise entre les T<sub>PT</sub> des copolymères individuels, en fonction de la composition du système micellaire (fraction massique en P-FA entre 20 et 50%) (Figure 20).

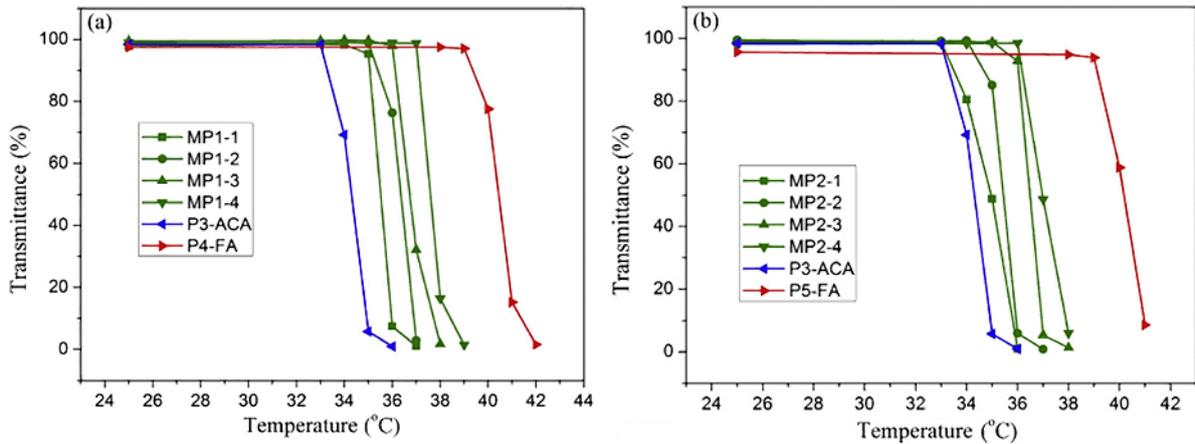


Figure 20 : Transitions de phase à pH = 5,3 des micelles mixtes P<sub>3</sub>-ACA/P<sub>4</sub>-FA (MP1-n) (gauche) et P<sub>3</sub>-ACA/P<sub>5</sub>-FA (MP2-n) (droite) avec n = 1 à 4 pour une fraction massique en P-FA de 20, 30, 40 et 50% respectivement<sup>108</sup>

Quelques années plus tard, la même équipe <sup>109</sup> a réalisé des expériences similaires sur un mélange de PCL<sub>52</sub>-*b*-P(TEGMA<sub>119</sub>-*co*-NMFA<sub>4,4</sub>) (PTF) de l'étude précédente et d'un copolymère Poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*b*-poly(diéthylène glycol monométhylether méthacrylate) PCL<sub>52</sub>-*b*-PDEGMA<sub>140</sub> (PD). Contrairement à l'exemple précédent, ces deux copolymères ont des T<sub>PT</sub> plus éloignées, de 20 °C pour PD et 43°C pour PTF. La variation de la fraction massique des copolymères permet de faire varier la quantité d'acide folique en surface des micelles et donc d'améliorer la stabilité à pH neutre pendant le stockage (stabilisation par anions folate). Elle permet également de moduler la T<sub>PT</sub> entre 40 et 37 °C pour des fractions massiques en PD de 30 à 50% respectivement.

Notre équipe a également développé des systèmes constitués de deux copolymères thermosensibles de même nature, formant des micelles mixtes composées d'un cœur lipidique en C<sub>18</sub> issu de l'huile de lin, et d'une couronne mixte PiPrOx/PEtOx <sup>110</sup>. Le mélange physique des deux copolymères LPiPrOx (T<sub>PT</sub> = 35 °C) et LPEtOx (T<sub>PT</sub> = 76 °C), schématisés en Figure 21, a permis de moduler la T<sub>PT</sub> du système global. En augmentant la fraction massique en LPEtOx jusqu'à 52%, la T<sub>PT</sub> croît de manière linéaire entre 35 et 42 °C, avec des températures identiques à celles des copolymères statistiques lipide-*b*-poly(EtOx-*co*-iPrOx) de même composition globale. Au-dessus de 52 % massique en LPEtOx, deux transitions sont observées lors de la montée en température. Le second phénomène d'agrégation se produit à la T<sub>PT</sub> du LPEtOx, attribué à un phénomène de démixtion soit initial soit au cours du chauffage.

Une étude similaire a été réalisée sur des polymères de natures différentes, permettant de la même manière, la formation de micelles avec un cœur lipidique en C<sub>18</sub> et une couronne mixte contenant un polymère thermosensible PiPrOx et un polymère pH et thermosensible PDMAEMA<sup>105</sup>. Les deux copolymères LPiPrOx (T<sub>PT</sub> = 33 °C) et LPDMAEMA (T<sub>PT</sub> = 54 °C à pH 7,4) schématisés en Figure 21, ont été mélangés physiquement dans différentes proportions (11 à 81 % molaire en LPDMAEMA) et analysés en spectrophotométrie UV-visible.

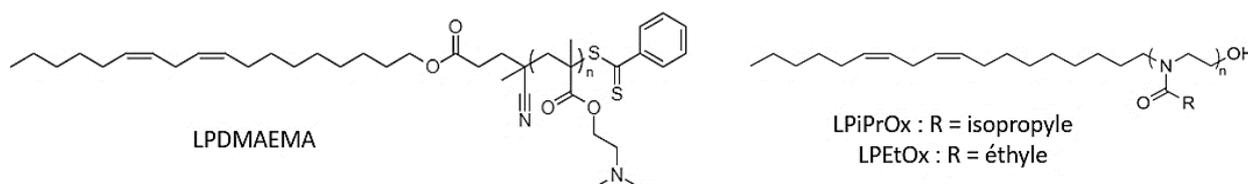


Figure 21 : Structures chimiques du lipide-*b*-poly(méthacrylate de diméthyle(aminoéthyle)) LPDMAEMA, du lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) LPiPrOx et du lipide-*b*-poly(2-éthyl-2-oxazoline) LPEtOx.

Une seule transition en température est observée pour chaque ratio, ce qui permet de confirmer la formation de micelles mixtes malgré la nature différente des copolymères. La T<sub>PT</sub> globale du système est alors modulée linéairement entre 33 et 42 °C en fonction du ratio en chacun des copolymères. Dans ce cas, contrairement au mélange précédent LPiPrOx/LPEtOx, les T<sub>PT</sub> des deux copolymères étant plus proches, une seule transition apparaît sur toute la gamme de composition.

Enfin, Keogh *et al.*<sup>111</sup> ont publié en 2020 des résultats sur le mélange de copolymères thermosensibles contenant un unique copolymère statistique poly(n-butyl acrylate-co-N,N-diméthylacrylamide) pour former le cœur des micelles, et différents polymères thermosensibles dans la couronne (PDEGMA, PNIPAAm, PDEAM, POEGMA). Ils ont montré que des micelles mixtes se forment de manière favorable si le copolymère formant le cœur est court, possède un caractère hydrophobe relativement faible, ainsi qu'une forte mobilité, ce qui permet une certaine dynamique d'échange.

Le mélange physique d'un copolymère branché (PDEGMA) avec un copolymère linéaire (PDEAM ou PNIPAAm) résulte en un comportement non coopératif, c'est-à-dire que des micelles mixtes se forment avec une séparation de phase partielle dans la couronne. Le ratio Copolymère 1/Copolymère 2 n'étant en plus pas toujours le même dans chaque micelle, cela se traduit par un élargissement en température de la transition de phase.

Au contraire, le mélange de deux copolymères branchés (PDEGMA/POEGMA) permet la formation de micelles mixtes avec une couronne homogène. Les auteurs parlent donc d'un comportement coopératif car il existe une unique transition de phase à une  $T_{PT}$  intermédiaire à celles des micelles de copolymères purs.

### II.3. Conclusion

L'enjeu principal est de comprendre, de prédire et de contrôler le comportement d'auto-association des copolymères à blocs stimuli-sensibles si l'on veut pouvoir les utiliser de manière fiable dans les domaines de relargage de principe actifs, de capteurs biologiques, de catalyse, etc.

Ainsi, l'approche de la formulation est un avantage, puisqu'elle permet de stabiliser les micelles formées, tout en incorporant de multiples fonctionnalités tels des ligands pour le ciblage actif ou des unités stimuli-répondantes pour le contrôle du relargage d'un principe actif. Il a été vu que cette approche nécessite l'association de copolymères compatibles l'un avec l'autre, c'est-à-dire une hydrophobie suffisamment proche dans le cœur pour que le mélange soit faisable. Mélanger physiquement des copolymères amphiphiles permet d'obtenir des propriétés et des structures variables, principalement dépendantes de la nature et de l'affinité des blocs <sup>112</sup>, ainsi que des proportions introduites en chacun des copolymères. Cela permet notamment de combiner plusieurs stimuli au sein d'une même structure pour affiner le contrôle que l'on a de ces systèmes, par exemple en modulant très finement la température de point de trouble par l'association de deux copolymères thermosensibles.

Cependant, l'un des inconvénients de cette stratégie est de parvenir à démontrer la mixité des systèmes formés. Généralement, des techniques indirectes (turbidimétrie, DLS, SEC, RMN 2D, fluorescence etc.)<sup>84,111,113,114</sup> sont utilisées et les résultats sont comparés aux micelles pures de copolymères étudiés pour confirmer la mixité.

Aussi, le développement d'une technique directe de mise en évidence de micelles mixtes serait intéressant.

Une technique basée sur un transfert de fluorescence entre deux fluorophores greffés chacun sur l'un des copolymères mélangés est envisagée dans la partie qui suit.

### III. Le Transfert d'Énergie entre molécules fluorescentes (FRET), une technique applicable à la caractérisation de systèmes micellaires mixtes ?

Pour vérifier la formation des micelles mixtes, de nombreuses méthodes sont citées dans la littérature (ultracentrifugation analytique/RMN  $^1\text{H}$ , DLS, SEC, 2D NOE, TEM, ITC). La plupart d'entre elles n'étant pas spécifiques à la nature des interactions existant dans la micelle mixte, elles peuvent être employées dans presque tous les cas <sup>107</sup>. Cependant, certaines de ces techniques sont complexes et coûteuses, et nécessitent un équipement et des compétences techniques qui ne sont pas toujours accessibles. De plus, ces techniques démontrent la mixité de manière indirecte en analysant les différences de caractéristiques entre micelles pures et micelles mixtes. Par conséquent, en présence de copolymères se comportant de manière similaire ou proche en solution, l'utilisation de la fluorescence pourrait être un atout supplémentaire pour l'analyse de ces systèmes et en particulier pour montrer la formation de micelles mixtes.

La fluorescence est une technique largement utilisée dans de nombreux domaines tels que l'analyse (air et polluants), la criminologie, les modifications de surfaces, les solutions colloïdales (cmc, dynamique, ...), les biotechnologies, le diagnostic médical, le séquençage d'ADN et les analyses génétiques. Elle a l'avantage d'être très sensible, d'être spécifique à l'environnement dans lequel se trouve la molécule fluorescente, et elle est capable de fournir des informations spatio-temporelles. Elle peut ainsi remplacer les traceurs radioactifs coûteux et plus difficiles d'utilisation, ainsi que les sondes EPR (Electronic Paramagnetic Resonance) qui ne renseignent que sur la mobilité moléculaire <sup>115</sup>.

#### III.1. Généralités sur la fluorescence

La fluorescence est un phénomène qui fait partie de la famille des processus luminescents, dans laquelle une substance absorbe de la lumière, ce qui entraîne le déplacement d'un électron vers un niveau orbital d'énergie plus élevée. Après un temps de résidence sur cet état excité (noté \*), correspondant à la durée de vie de fluorescence, l'électron revient sur son niveau orbital initial en dissipant son énergie par émission d'un photon <sup>115</sup> (Figure 22).

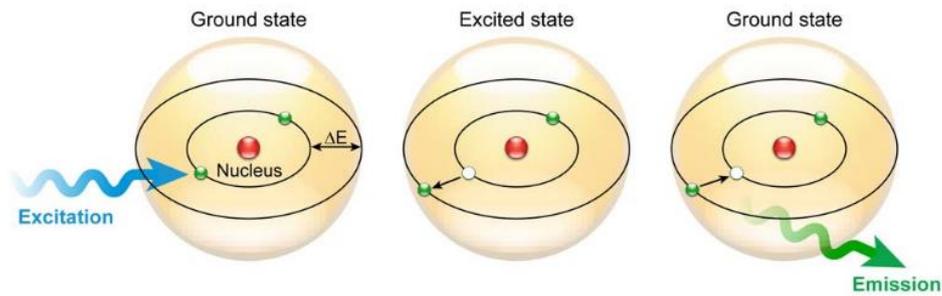


Figure 22: Représentation schématique des interactions photon/matière d'après le modèle de Bohr classique

116

Les processus photoluminescents sont divisés en deux catégories, la fluorescence et la phosphorescence, en fonction de la nature de l'état excité.

La fluorescence caractérise l'émission d'un photon depuis un état excité singulet, dans lequel l'électron de l'orbitale excitée est de spin opposé à l'électron de l'état fondamental. Le retour à un état normal est donc autorisé et se produit rapidement par émission d'un photon. La durée de vie typique de fluorescence est de l'ordre de 10 ns.

Les processus qui se produisent entre l'absorption et l'émission de lumière sont détaillés sur le diagramme de Jablonski <sup>117</sup>, représenté ici de manière simplifiée, sans toutes les interactions plus complexes de type quenching, transfert d'énergie et interactions du solvant (Figure 23).

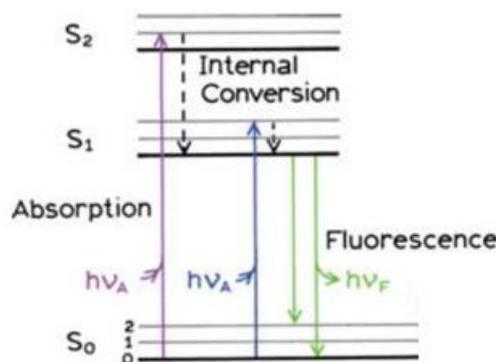


Figure 23: Représentation simplifiée d'un diagramme de Jablonski <sup>117</sup>

Sur un diagramme de Jablonski classique, les états singulets fondamental et excités sont notés respectivement  $S_0$ ,  $S_1$  et  $S_2$ . Sur chacun de ces états électroniques, le fluorophore peut exister dans différents niveaux d'énergie vibrationnelle notés 0, 1 et 2. Les transitions entre les états sont représentées par des flèches verticales pour illustrer la nature instantanée de l'absorption ou émission de lumière <sup>117</sup>.

Comme expliqué au préalable, quand une longueur d'onde spécifique atteint l'échantillon fluorescent, les atomes, ions ou molécules qui le constituent absorbent une certaine quantité de lumière, et permettent à un électron de valence de transiter vers des états plus énergétiques. Ce processus est rapide, de l'ordre de la femtoseconde ( $10^{-15}$  s), et requiert au moins l'énergie  $\Delta E = E_{S_n} - E_{S_0}$  pour franchir le gap d'énergie existant entre état fondamental et états excités, permettant l'excitation.

L'énergie des photons impliqués dans la fluorescence est exprimée par la loi de Planck :

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

où E est l'énergie quantique (J), h est la constante de Planck (J.s),  $\nu$  est la fréquence ( $s^{-1}$ ),  $\lambda$  est la longueur d'onde du photon (m), et c est la vitesse de la lumière ( $m \cdot s^{-1}$ ).

L'irradiation avec un spectre de longueurs d'onde engendre un certain nombre de transitions autorisées qui peuplent les différents niveaux d'énergie vibrationnelle excités, certaines transitions étant plus probables que d'autres.

Une fois le composé excité à son plus haut niveau d'énergie, l'énergie absorbée est rapidement dissipée sous forme de chaleur par des processus non radiatifs. La chaleur produite est absorbée par les collisions entre les molécules fluorescentes excitées et les molécules de solvant <sup>116</sup>. Ces processus non radiatifs, qui sont de l'ordre de la picoseconde, donc bien plus rapides que les émissions de fluorescence, permettent le respect de la loi de Kasha <sup>118</sup> qui stipule que l'émission radiative de fluorescence ou de phosphorescence se fait toujours à partir de l'état excité de plus basse énergie. Par conséquent, le spectre d'émission ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation, car l'excès d'énergie qu'apporterait une longueur d'onde plus faible est très rapidement dissipée avant même l'émission de fluorescence.

Lorsque l'électron retourne finalement à son état initial  $S_0$ , un photon de longueur d'onde plus grande que celle absorbée est émise, car l'énergie d'émission est plus faible que l'énergie d'absorption. La différence entre les maxima d'absorption et d'émission est appelée « déplacement de Stokes ». Il peut être expliqué par des effets de solvant, des réactions à l'état excité, la formation de complexes et/ou à un transfert d'énergie, pouvant parfois conduire à du quenching, c'est-à-dire à une diminution de l'émission de fluorescence <sup>117</sup>.

Les molécules fluorescentes ou fluorophores utilisés sont généralement des molécules aromatiques <sup>117</sup> (Figure 24).

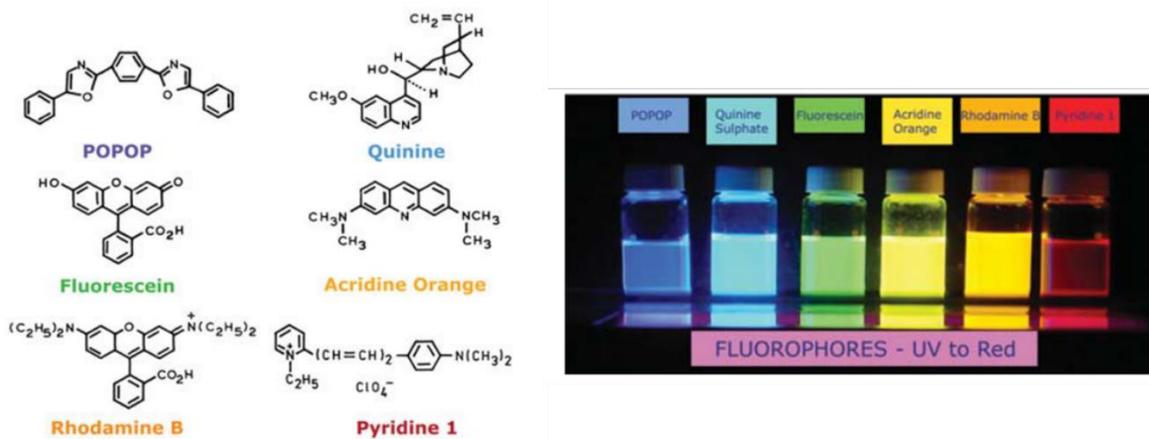


Figure 24 : Structures de molécules fluorescentes typiques <sup>117</sup>

Les molécules fluorescentes comprennent les molécules organiques (colorants), les ions inorganiques (ions lanthanides Eu, Tb, Yb, etc. par exemple), les protéines fluorescentes (green fluorescent protein GFP), et plus récemment les nanoparticules semi-conductrices et les quantum dots, qui ont été introduits pour des applications de bio-imagerie ou comme étiquettes biologiques par exemple.

La fluorescence de ces composés est caractérisée par deux grandeurs importantes <sup>115</sup>:

- Le rendement quantique  $\Phi$ , qui détermine la brillance de l'émission de fluorescence. Il est donné par la formule suivante :

$$\Phi = \frac{\text{Nb photons émis}}{\text{Nb photons absorbés}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}$$

où  $\Gamma$  est la constante de vitesse d'émission et  $k_{nr}$  est la somme des processus de dissipation d'énergie non radiatifs.

- Le temps de vie de fluorescence du fluorophore  $\tau$ , qui représente le temps moyen que passe le fluorophore dans son état excité avant de se désexciter. Concrètement pendant ce temps  $\tau$ , le fluorophore peut adopter des changements conformationnels, diffuser ou interagir avec les molécules environnantes. La population sur les états excités suit une décroissance exponentielle pendant  $\tau$ .

Ces deux grandeurs sont très largement dépendantes de l’environnement du fluorophore, et peuvent être affectées par de nombreux facteurs tels que la polarité, le pH, la température, la viscosité, etc. <sup>115</sup>

### III.2. Le FRET : Principe et applications aux systèmes polymériques

#### III.2.1. Principe et conditions d'utilisation

Le transfert d’énergie par résonance (RET) est un transfert d’énergie non radiatif qui se produit à l’état excité, lorsque le spectre d’émission d’un fluorophore, appelé donneur (D), se superpose partiellement au spectre d’absorption d’une autre molécule fluorescente ou non, appelée accepteur (A). Si l’accepteur est en plus fluorescent, on parle de FRET pour Fluorescence Resonance Energy Transfer (ou Förster Resonance Energy Transfer) <sup>117</sup>, comme schématisé en Figure 25.

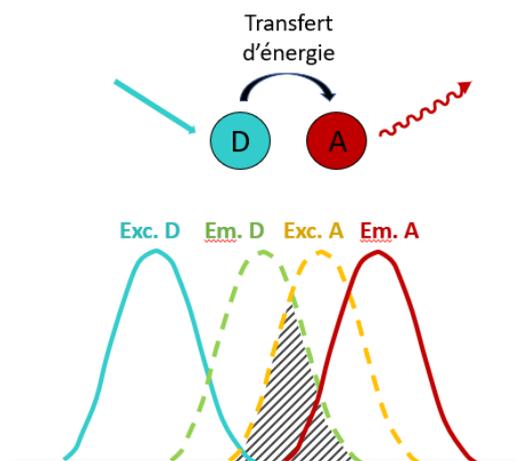


Figure 25 : Principe du FRET. La zone rayée représente le recouvrement spectral.

Le recouvrement partiel des spectres implique que le donneur et l’accepteur présentent des transitions vibroniques avec quasiment la même énergie. Ces transitions sont alors couplées, c’est-à-dire qu’elles sont en résonance. Si la relaxation vibrationnelle est plus rapide que le transfert d’énergie, le couplage est faible <sup>115</sup>.

La faisabilité et la probabilité du transfert d’énergie tiennent compte du taux de recouvrement du spectre d’émission du donneur et d’absorption de l’accepteur. Plus le recouvrement spectral est important, plus le FRET a de chance d’être efficace <sup>119</sup>.

Lors d'un transfert d'énergie, l'électron du donneur D initialement excité retourne à son état fondamental, pendant qu'un électron de A transite vers l'état excité puis retourne alors à son état fondamental en émettant un photon. Cela implique concrètement que l'excitation de D conduit à l'émission de A, et non pas de D.

Le transfert d'énergie peut résulter de différents mécanismes d'interactions, des interactions coulombiennes et/ou dues au chevauchement des orbitales intermoléculaires.

Le FRET est dû à des interactions coulombiennes dipôle-dipôle de longue portée (80-100 Å), et le transfert d'énergie se fait uniquement entre états singulets ( $^1D^* + ^1A \rightarrow ^1D + ^1A^*$ ).

La constante de vitesse du transfert d'énergie entre D et A est inversement proportionnelle à la distance D-A à la puissance 6, et s'exprime comme :

$$k_T^{dd} = k_D \left[ \frac{R_0}{r} \right]^6 = \frac{1}{\tau_D^0} \left[ \frac{R_0}{r} \right]^6$$

où  $k_D$  est la constante de vitesse d'émission du donneur,  $\tau_D^0$  le temps de vie de fluorescence du donneur en l'absence de transfert,  $r$  la distance entre donneur et accepteur, et  $R_0$  le rayon de Förster qui représente la distance D-A à laquelle le transfert et la désexcitation du donneur sont équiprobables ( $k_T = k_D$ ).

L'efficacité du transfert  $\phi_T$ , qui équivaut donc à la proportion de transfert par rapport à la proportion de désexcitation, peut s'écrire :

$$\phi_T = \frac{k_T}{k_D + k_T} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Le transfert d'énergie est égal à 50% lorsque la distance D-A est égale au rayon de Förster <sup>120</sup>.

Le FRET se produit généralement sur des distances D-A comparables aux dimensions de la plupart des macromolécules biologiques, c'est-à-dire entre 1 et 10 nm. Globalement, pour que le transfert d'énergie soit possible, la distance entre donneur et accepteur doit être du même ordre de grandeur que le rayon de Förster du couple de fluorophores choisi (Figure 26).

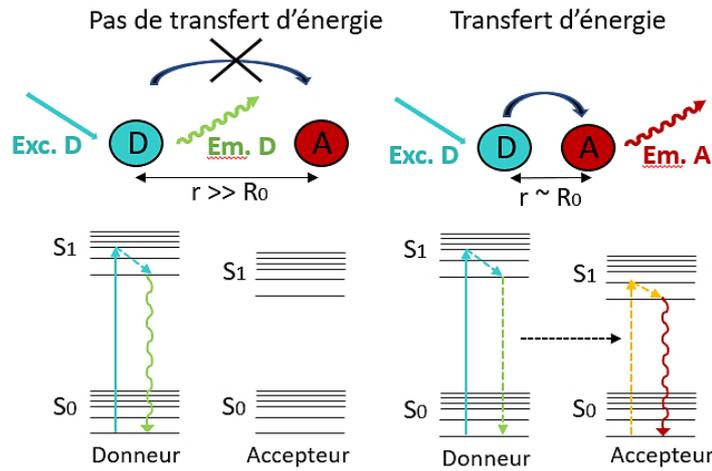


Figure 26 : Diagramme de Jablonski illustrant le processus photophysique du FRET et sa dépendance avec la séparation  $r$  entre D et A <sup>121</sup>.

L'efficacité du FRET dépend aussi de l'orientation relative des moments dipolaires de transition du donneur et de l'accepteur, définie par le facteur d'orientation  $\kappa^2$  :

$$\kappa^2 = (\sin \theta_D \cdot \sin \theta_A \cdot \cos \varphi - 2 \cos \theta_D \cdot \cos \theta_A)^2$$

où  $\theta_D$  et  $\theta_A$  sont les angles des moments dipolaires de transition du donneur et de l'accepteur respectivement, et  $\varphi$  est l'angle entre les projections des moments de transition sur un plan perpendiculaire à la ligne centrale <sup>120</sup> (Figure 27).

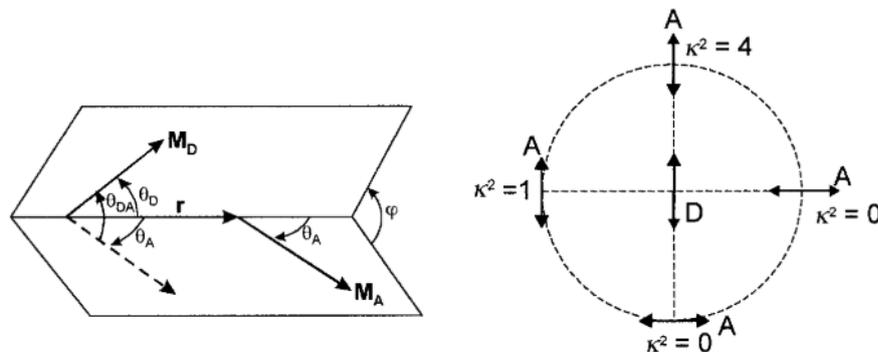


Figure 27: Angles impliqués dans la définition du facteur d'orientation  $\kappa^2$  (gauche) et exemples de valeurs de  $\kappa^2$  (droite).  $M_A$  et  $M_D$  = moments dipolaires de transition du donneur D et de l'accepteur A <sup>120</sup>

La valeur du facteur d'orientation peut être comprise entre 0 et 4.  $\kappa^2$  vaut 0 pour des dipôles statiques et perpendiculaires entre eux, auquel cas le transfert d'énergie est impossible, et  $\kappa^2$  vaut 4 pour des dipôles statiques et colinéaires. Il est généralement impossible de déterminer cette valeur expérimentalement, d'autant plus que les moments dipolaires peuvent adopter toutes les orientations relatives possibles pendant le transfert d'énergie, à condition que les molécules soient libres de tourner. Généralement,  $\kappa^2$  prend une valeur moyenne de 2/3, cette

approximation étant suffisante pour le calcul de  $R_0$  si l'on veut s'affranchir de la mesure des distances de façon absolue <sup>122</sup>.

De par l'obligation de respecter ces trois conditions autorisant le transfert d'énergie (orientation des moments dipolaires, recouvrement spectral et distance entre fluorophores inférieure à 10 nm), le FRET est une technique qui ne peut pas être utilisée dans tous les domaines. De plus, c'est une méthode généralement non quantitative, car elle est particulièrement sensible aux propriétés photophysiques des fluorophores, qui dépendent eux-mêmes des interactions entre la sonde fluorescente et son microenvironnement, ainsi que de l'incertitude sur la position et l'orientation relative des fluorophores entre eux et avec la biomolécule sur laquelle ils peuvent être attachés <sup>123</sup>. Enfin, le FRET met en jeu des fluorophores de taille relativement imposante, et peut parfois être perturbé par la présence d'un signal « background » provenant de la diffusion, de l'excitation directe de l'accepteur, et/ou d'autofluorescence <sup>124</sup>.

En revanche, c'est une technique qui a aussi de nombreux avantages. Les expériences de FRET sont rapides, le transfert d'énergie étant de l'ordre de la nanoseconde, elles sont faciles à mettre en place et sont capables d'analyser des solutions diluées <sup>125</sup>, avec une concentration en fluorophore de  $10^{-5}$ - $10^{-4}$  mol/L <sup>126</sup>. Le FRET fait également preuve d'une bonne versatilité, et d'une forte sensibilité, le signal étant impacté lors d'un changement de la distance D-A compris entre 10 et 80 Å <sup>123,127</sup>, et il permet en plus un suivi en temps réel des systèmes étudiés <sup>128</sup>. Enfin, l'intensité de fluorescence est directement dépendante du ratio accepteur/donneur et de leur concentration en solution, et il est donc tout à fait envisageable de trouver une relation linéaire entre le rapport des intensités de fluorescence FRET/donneur et les concentrations en A et D <sup>128,129</sup>.

### *III.2.2. Exemples d'applications du FRET*

Le FRET présente un intérêt particulier pour la caractérisation de systèmes biologiques. Son application principale est de fournir des informations spatiales et en particulier les distances entre deux molécules fluorescentes, à haute résolution, ce qui peut être obtenu par des techniques de microscopie conventionnelle. C'est ce qui qualifie le FRET de « Règle spectroscopique ».

De nombreuses réponses dans le domaine biologique peuvent être apportées par le FRET, concernant par exemple les mécanismes de transcription, les mouvements moléculaires, le repliement des protéines, les interactions protéine-protéine, etc.<sup>130</sup>.

Mais cette technique peut également s'avérer intéressante pour la caractérisation de systèmes micellaires polymériques, qu'ils soient utilisés en biologie, ou dans tout autre domaine (détection, optoélectronique, ...<sup>131</sup>) où il se produit un changement de comportement (conformation, taille, interactions).

De nombreux exemples montrent que le FRET permet notamment de suivre en temps réel, grâce à l'évolution du signal FRET et à de l'imagerie de fluorescence, l'association et la dissociation des nanoparticules suite à un changement d'environnement (solvant, concentration, pH, température)<sup>132</sup>. Lorsque la nanoparticule se dissocie, les deux fluorophores qui étaient confinés dans un espace restreint autorisant le FRET, s'éloignent l'un de l'autre jusqu'à une distance trop importante pour permettre le transfert d'énergie (Figure 28).

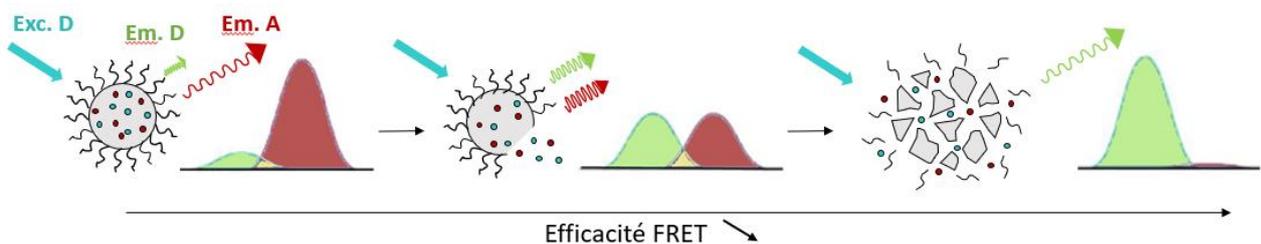


Figure 28 : Exemple schématique du FRET pour contrôler l'intégrité de la structure de nanoparticules par encapsulation de D et A dans le cœur, et suivi du ratio des signaux de fluorescence<sup>121</sup>

L'avantage dans cette application est que l'intégrité d'une structure micellaire peut être évaluée quelle que soit la méthode d'incorporation des fluorophores dans le système. Soit ils sont tous les deux co-encapsulés, ce qui est probablement la voie la plus simple car elle ne requiert aucune synthèse<sup>133,134</sup>, soit l'un des fluorophores est encapsulé et l'autre attaché de manière covalente<sup>135,136</sup>, soit encore les deux fluorophores sont attachés de manière covalente<sup>137</sup>.

Wu *et al.*<sup>138</sup> ont étudié grâce au transfert d'énergie, les processus de formation et de dissociation, par le biais de stimuli (température et lumière), des micelles constituées de leurs copolymères. Cette application du FRET a été largement étudiée par de nombreux chercheurs. Dans cette étude, les micelles ont une couronne commune et un cœur légèrement différent dû à la présence de  $PEO_{113}-b-P(NIPAm_{0,91}-co-DMNA_{0,09}-co-NBDAE)_{90}$  et de  $PEO_{113}-b-$

P(NIPAAm<sub>0,91-co</sub>-DMNA<sub>0,09-co</sub>-RhBEA)<sub>68</sub>, où DMNA est le 5-(2'-(Diméthylamino)ethoxy)-2-nitrobenzyl acrylate) et le 4-(2-acryloyloxyethylamino)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBDAE) et le dérivé de Rhodamine B (RhBEA) sont les deux fluorophores donneur et accepteur respectivement (Figure 29).

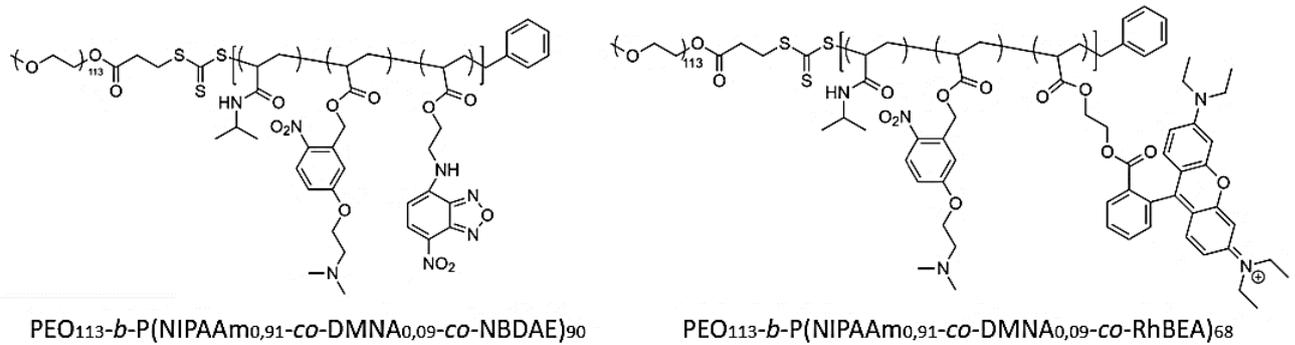


Figure 29 : Structure moléculaire des deux copolymères PEO<sub>113</sub>-b-P(NIPAAm<sub>0,91-co</sub>-DMNA<sub>0,09-co</sub>-NBDAE)<sub>90</sub> et de PEO<sub>113</sub>-b-P(NIPAAm<sub>0,91-co</sub>-DMNA<sub>0,09-co</sub>-RhBEA)<sub>68</sub>.<sup>138</sup>

Les deux copolymères sont solubles dans l'eau à température ambiante, mais lorsque la solution est chauffée à 40 °C, au-dessus de la T<sub>PT</sub> des blocs P(NIPAAm-co-DMNA-co-NBDAE) (30 °C) et P(NIPAAm-co-DMNA-co-RhBEA) (32 °C), ils s'auto-assemblent sous forme de micelles mixtes avec une couronne hydrophile PEO et un cœur mixte contenant les donneur et accepteur FRET. Ainsi, la proximité spatiale des deux fluorophores (NBDAE et RhBEA) entraîne une élévation du signal FRET (à 585 nm), par comparaison avec le signal de fluorescence observé en présence d'unimères (à 520 nm) à température ambiante (Figure 30).

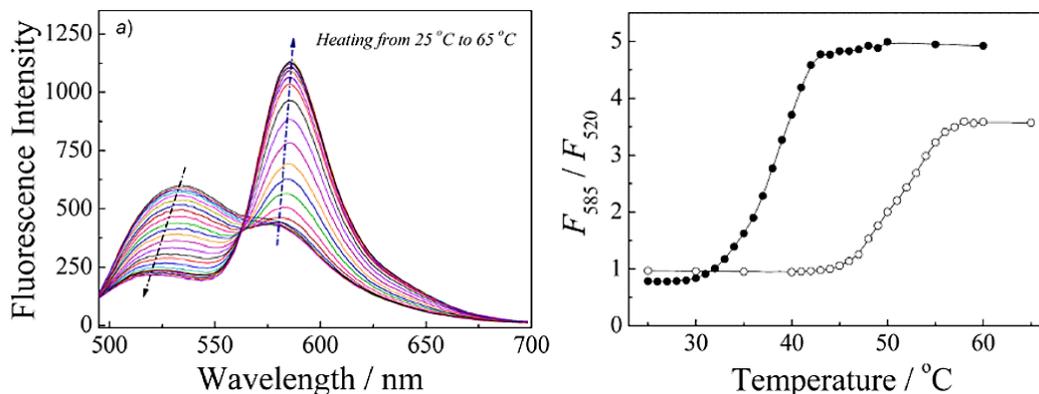


Figure 30 : Spectre d'émission de fluorescence ( $\lambda_{ex} = 470$  nm) avant irradiation (gauche) et variation du rapport d'intensités d'émission (D/A)  $F_{585}/F_{520}$  (●) avant irradiation et (○) après irradiation (droite) pour des températures de 25 à 65 °C d'une solution aqueuse à 0,1 g/L et pH 8,5 contenant le mélange PEO<sub>113</sub>-b-P(NIPAAm<sub>0,91-co</sub>-DMNA<sub>0,09-co</sub>-NBDAE)<sub>90</sub> / PEO<sub>113</sub>-b-P(NIPAAm<sub>0,91-co</sub>-DMNA<sub>0,09-co</sub>-RhBEA)<sub>68</sub> (1 :1 w/w).<sup>138</sup>

Lorsque le système micellaire est ensuite irradié sous UV à pH 8,5, le motif DMNA étant sensible à la lumière, il se clive entre la fonction ester et l'aromatique. Ce clivage permet la formation d'un résidu carboxylate chargé négativement (pKa 4,5), ce qui génère une augmentation de la  $T_{PT}$ , supérieure à la température de chauffe (46 °C pour le bloc NBDAE et 51 °C pour le bloc RhBEA), et donc la dissociation des micelles en unimères avec une diminution du signal FRET.

Le FRET peut aussi être très intéressant comme sonde de haute sensibilité pour suivre une modification de la taille du système, suite à un phénomène de « gonflement/dégonflement » par exemple. Basak et Ghosh <sup>139</sup> ont étudié un copolymère dibloc amphiphile dont le bloc hydrophobe a été partiellement fonctionnalisé avec des groupements pendants acide carboxylique pour apporter une sensibilité pH au polymère. A pH acide, la formation de liaisons H permet l'obtention d'un système micellaire très stable. A pH basique, des analyses en DLS et TEM ont permis de mettre en évidence un gonflement des micelles dû à la déprotonation des groupements -COOH. La fonctionnalisation partielle permet d'éviter une dissociation complète des micelles. Dans cette étude, le FRET est complètement dépendant du pH par co-encapsulation du pyrène comme fluorophore donneur et du 1,8-diméthoxynaphtalène (DMN) comme fluorophore accepteur. En effet, le gonflement de la micelle contribue à augmenter la distance entre fluorophores encapsulés dans le cœur et donc à diminuer le signal FRET, le contraire étant observé par diminution du pH et « dégonflement » de la micelle.

Lorsque les micelles se dissocient ou changent de conformation, elles permettent généralement la libération d'une molécule encapsulée dans leur cœur.

Il est d'ailleurs possible de suivre le relargage de cette molécule grâce au FRET. Dans ce cas, au moins l'un des fluorophores doit être libre, c'est-à-dire non lié chimiquement à une chaîne de polymère. L'autre peut être soit encapsulé comme le premier, soit attaché, cette dernière solution étant la plus courante parce qu'elle permet d'éviter la libération éventuelle des deux molécules <sup>140</sup>. Cependant, la co-encapsulation des deux fluorophores est également envisageable et a été rapportée en présence de molécules photochromes telles que le spiropyrane. Celui-ci, initialement hydrophobe, est co-encapsulé avec un fluorophore partenaire lui aussi hydrophobe, le BODIPY. Puis, une irradiation UV transforme le spiropyrane en mérocyanine plus hydrophile, et donc capable de s'échapper de la micelle, induisant une

diminution du signal FRET. Ce processus est également réalisable par conjugaison d'une molécule d'intérêt thérapeutique sur le spiropyrane <sup>141</sup>.

Dans les 30 dernières années, le FRET est une technique qui a été largement utilisée pour l'étude du comportement de nombreux copolymères amphiphiles en solution. En revanche, très peu d'études s'en sont servies pour étudier la dynamique de leurs systèmes.

Lorsque les copolymères amphiphiles s'auto-organisent dans l'eau sous forme de structures micellaires, il existe un équilibre régi par la dynamique d'échange entre micelles et unimères. Le FRET a été reconnu comme un outil spectroscopique attractif pour étudier cette dynamique d'échange. Dans ce cas, soit l'un des fluorophores est simplement encapsulé et l'autre attaché de manière covalente <sup>9</sup>, soit les deux fluorophores sont attachés chimiquement sur le bloc hydrophile ou hydrophobe du polymère. Initialement, il co-existe des micelles contenant l'accepteur et des micelles contenant le donneur. Si les micelles sont gelées, l'absence d'échanges de chaînes entre micelles ne permet pas l'obtention d'un signal FRET. Au contraire, si des échanges se produisent, toutes les micelles sont progressivement constituées à la fois de donneurs et d'accepteurs, ce qui est observé par une augmentation du signal FRET avec le temps en fonction de la cinétique d'échange <sup>131</sup>.

Rajdev *et al.* <sup>132</sup> ont étudié il y a quelques années l'impact des interactions physiques se produisant dans le cœur de la micelle sur sa dynamique d'échange. Le copolymère amphiphile PEO-*b*-PMMA-*co*-PHEMA a été modifié par incorporation d'un fluorophore donneur ou accepteur via une liaison covalente sur le bloc constitutif du cœur. Les deux solutions micellaires {copolymère + accepteur} et {copolymère + donneur} ont été mélangées. Le signal FRET augmente petit à petit, mais plus de 50 heures sont nécessaires pour que le signal atteigne un plateau, ce qui indique une dynamique d'échange relativement lente. Lorsque les groupements hydroxyle présents dans le cœur sont bloqués par un groupement acétyle, ou protonés par l'ajout d'acide trifluoroacétique (TFA), les liaisons H ne peuvent plus se former, et les auteurs observent donc une dynamique d'échange bien plus rapide avec un signal FRET maximum en 2 ou 3h <sup>132</sup>. Bien que cette étude apporte des résultats concluants pour comprendre les processus se produisant dans les micelles et impactant leur dynamique, les auteurs n'évoquent pas la possibilité que l'introduction d'une molécule extérieure au système puisse influencer le comportement de celui-ci (hydrophobie, nouvelles interactions, modification de la dynamique). Il semble donc tout à fait envisageable de comparer le

comportement d'un système en fonction des conditions dans lesquelles il se trouve, mais les résultats quantitatifs obtenus sont probablement à prendre avec prudence.

Enfin, le FRET peut être également particulièrement utile pour comprendre le mécanisme d'interactions entre les micelles et des molécules externes fluorescentes. Wang *et al.*<sup>125</sup> ont étudié un système micellaire PEG-*b*-PCL/PNIPAAm-*b*-PCL possédant un fluorophore accepteur (Rhodamine B) en extrémité de chaîne hydrophobe (PEG ou PNIPAAm), en présence de la protéine lysosyme sur laquelle a été greffée le fluorophore donneur FITC (Isothiocyanate de fluorescéine). Lorsque la température est augmentée jusqu'à dépasser la  $T_{PT}$  du PNIPAAm, celui-ci collapse, permettant la pré-adsorption des protéines sur le PNIPAAm hydrophobe. Cela a pour conséquence de diminuer fortement l'agrégation inter-protéines, et donc d'empêcher leur dénaturation lors d'une augmentation de la température. Ce phénomène a pu être mis en évidence grâce au FRET entre le FITC et la Rhodamine B (Figure 31).

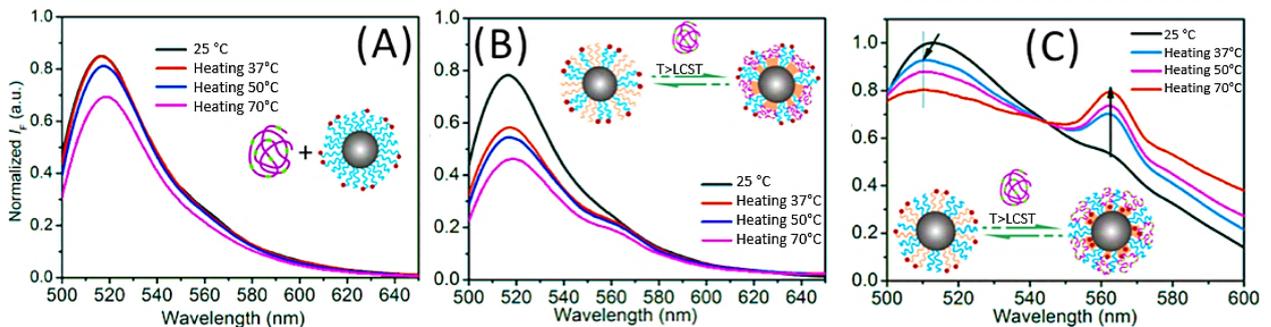


Figure 31 : Spectres d'émission de fluorescence pendant la chauffe du mélange (A) FITC-lysosyme/micelles PEG-*b*-PCL, (B) FITC-lysosyme/micelles PEG-*b*-PCL/PNIPAAm-*b*-PCL 1 : 6 avec accepteur sur PEG, (C) FITC-lysosyme/micelles PEG-*b*-PCL/PNIPAAm-*b*-PCL 1 : 6 avec accepteur sur PNIPAAm.

(—) FITC-lysosyme (émission 515 nm), (●) Rhodamine B (émission 562 nm), (—) PEG, (—) PNIPAAm<sup>125</sup>.

Lorsque les protéines sont uniquement mélangées avec les micelles de PEG-*b*-PCL (A), les chaînes PEG hydrophiles empêchent l'approche des protéines vers les micelles. L'augmentation de la température entraîne l'agrégation des protéines, ce qui génère un changement dans l'environnement du FITC, et conduit donc à une diminution de son émission de fluorescence. L'absence de FRET (fluorescence de la rhodamine à 562 nm) démontre l'absence d'interaction entre protéines et micelles.

Lorsque les protéines sont mélangées avec des micelles mixtes PEG-*b*-PCL/PNIPAAm-*b*-PCL, la formation de domaines hydrophobes par « collapse » du PNIPAAm permet l'approche des protéines et leur interaction avec les micelles. Si la Rhodamine B est greffée sur le PEG (B), le

rayon de Förster du couple FITC/Rhodamine B étant de 5 nm, la distance entre les deux fluorophores est trop importante pour permettre une bonne efficacité du FRET. Si maintenant, la Rhodamine B est greffée sur le PNIPAAm (C), les deux fluorophores se trouvent à des distances suffisamment proches pour conduire à un phénomène FRET. Les auteurs sont donc capables de contrôler et de suivre la réversibilité de l'adsorption des protéines par modulation de la température via cette technique.

Ainsi, l'utilisation de fluorophores liés de façon covalente peut apporter des informations intéressantes, mais elle nécessite au préalable une étape de synthèse, si l'unité fluorescente n'est pas naturellement présente dans la structure étudiée comme dans certaines biomolécules (protéines <sup>119</sup>) ou polymères conjugués <sup>142</sup>.

L'incorporation de l'unité fluorescente dans la structure d'un copolymère (Figure 32) a été décrite selon différentes approches : 1) par copolymérisation avec un motif fluorescent contenant une fonction polymérisable <sup>135</sup>, 2) par l'utilisation d'un amorceur fluorescent (mono- ou polyfonctionnel) <sup>136</sup> ou encore 3) via une fonctionnalisation post-polymérisation par chimie click, soit sur une fonction présente sur le motif de répétition du polymère <sup>137</sup>, soit par réaction avec la fonction de bout de chaîne du polymère <sup>125,140,143</sup>.

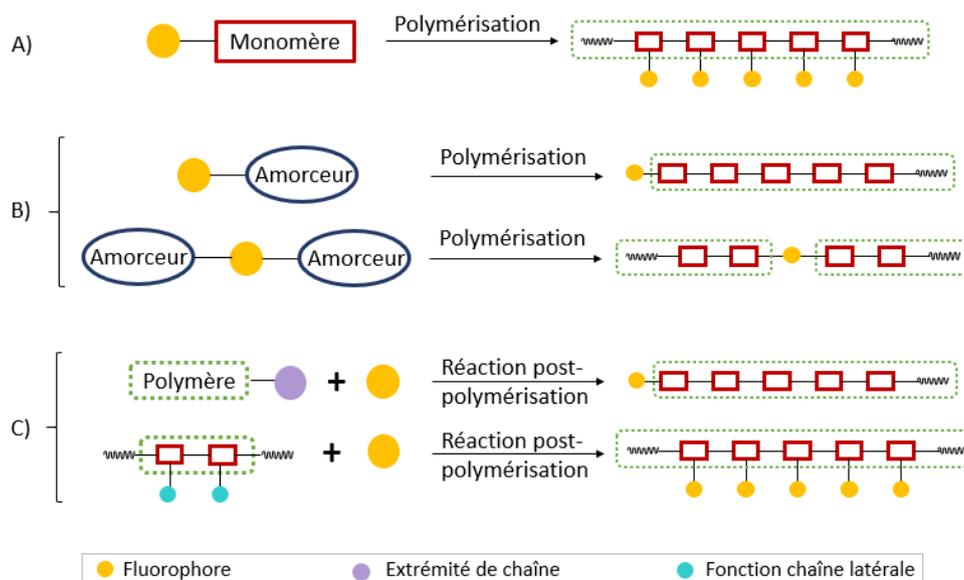


Figure 32 : Différentes voies d'incorporation du fluorophore par formation d'une liaison covalente sur le polymère étudié. (A) Motif fluorescent modifié par ajout d'une fonction polymérisable ; (B) Polymérisation en présence d'un amorceur fluorescent ; (C) Fonctionnalisation post-polymérisation sur fonction d'extrémité de chaîne ou de la chaîne latérale.

Selon l'application visée, lorsque les deux fluorophores sont attachés par une liaison covalente, le transfert d'énergie peut être inter- ou intramoléculaire <sup>144,145</sup> (Figure 33).

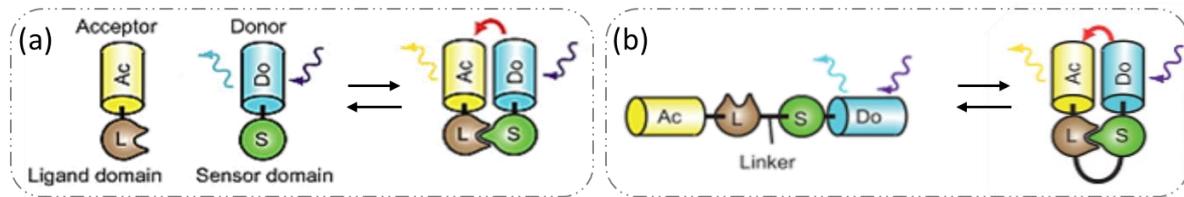


Figure 33: Deux types de biocapteurs FRET. (a) Intermoléculaire, (b) intramoléculaire. Le capteur (S) change de conformation avec une modification de son environnement, et le ligand (L) reconnaît le changement de conformation de S, induisant le FRET <sup>144</sup>

Parmi toute cette liste d'applications, la capacité du FRET à démontrer la mixité de micelles formées par un mélange physique de plusieurs copolymères différents a été très peu décrite. C'est ce qui va nous intéresser dans la suite de cette étude.

### III.2.3. Utilisation du FRET pour montrer la mixité de systèmes micellaires

La technique FRET n'a été que très peu exploitée pour démontrer la mixité de systèmes micellaires constitués de copolymères possédant un bloc hydrophile ou hydrophobe de natures différentes.

Kwak *et al.* <sup>83</sup> ont mélangé deux copolymères ADN-*b*-PPO/PEO-*b*-PPO-*b*-PEO avec un bloc hydrophobe PPO commun. Ils ont attaché de manière covalente le fluorophore donneur FAM (6-carboxyfluorescéine) sur l'ADN (position 3' ou 5') du copolymère ADN-*b*-PPO, et le fluorophore accepteur TAMRA (Carboxytetramethylrhodamine) à l'extrémité de la chaîne PEG du Pluronic®. En fonction de la position du FAM sur l'ADN, soit les deux fluorophores sont situés à l'extérieur de la couronne, soit le TAMRA est à l'extérieur de la couronne et le FAM se trouve à l'interface cœur couronne, entre les blocs PPO et ADN (Figure 34).

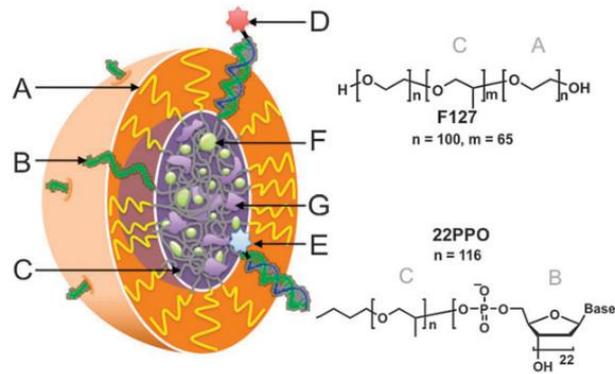


Figure 34 : Représentation schématique de l'architecture d'une micelle mixte et des structures chimiques des copolymères. (A) Bloc PEO du Pluronic®, (B) Bloc d'ADN, (C) Blocs PPO, (D) et (E) Sondes fluorescentes sur positions respectives 5' et 3' de l'ADN, (F) Composé hydrophobe encapsulé dans le cœur, (G) Nanodomains de PETA réticulés dans le cœur<sup>83</sup>.

La fraction molaire en chacun des copolymères modifiés (FAM ou TAMRA) n'étant que de 10 %, les fluorophores ne sont à une distance suffisamment petite pour autoriser le transfert d'énergie, que lorsque le TAMRA est à l'extérieur de la couronne et le FAM à l'interface cœur-couronne. Dans ce cas uniquement, le FRET est possible, ce qui rappelle la nécessité de la proximité entre les deux fluorophores, et il permet de montrer la mixité des micelles ADN-*b*-PPO/PEO-*b*-PPO-*b*-PEO.

Quant à Soon *et al.*<sup>143</sup>, ils ont montré la mixité de leur système ELPs (Elastin-like polypeptides) A80-I60/P40-I60 (Figure 35), où chacun des blocs polypeptides est thermosensible avec  $T_{PT,I60} < T_{PT,A80} < T_{PT,P40}$ .

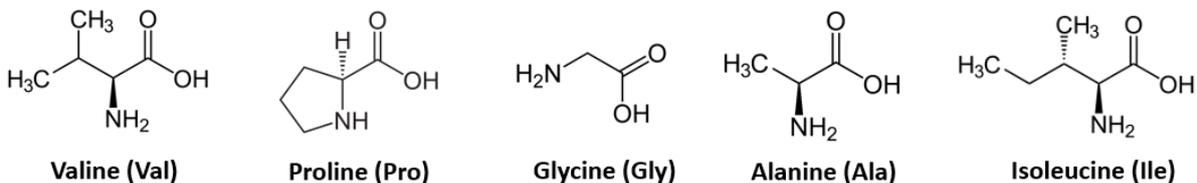
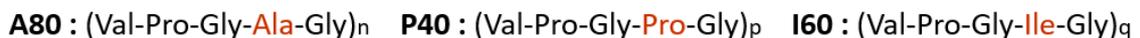


Figure 35 : Structure moléculaire des ELPs étudiés. Environ 60 répétitions du motif Val-Pro-Gly-X-Gly dans la couronne (A80, P40) et environ 40 dans le cœur (I60).

La cystéine terminale en bout de chaîne I60 de chaque ELP est conjugué soit au fluorophore donneur Alexa Fluor 488, soit au fluorophore accepteur Alexa Fluor 546, ces deux molécules

étant donc localisées dans le cœur de la micelle après micellisation, c'est-à-dire au-dessus de la température de point de trouble de I60.

La mesure de fluorescence indique une diminution de l'intensité de fluorescence du donneur au profit de l'intensité d'émission de l'accepteur lorsque la température est augmentée et dépasse la température critique de I60 (29°C), ce qui prouve la formation de micelles mixtes composées des deux polypeptides (Figure 36).

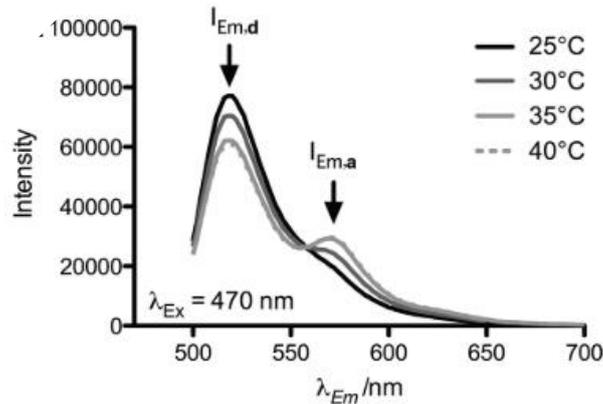


Figure 36 : Spectre d'émission obtenu pour un mélange équimolaire des deux ELPs fonctionnalisés GPRP-A80-I60-AF488 et GPSP-P40-I60-AF546 (Concentration finale de 1μM) excité à 470 nm à différentes températures.  $I_{Em,d}$  et  $I_{Em,a}$  sont les intensités d'émission du donneur et de l'accepteur respectivement <sup>143</sup>.

Lorsque la température augmente encore, tout en restant inférieure aux températures de point de trouble de A80 et P40, le signal FRET continue de croître jusqu'à se stabiliser entre 35 et 40°C. Un refroidissement suivi d'un nouvel échauffement de la solution permet de montrer la réversibilité de la formation des micelles mixtes.

### III.3. Conclusion

Les techniques de fluorescence sont très utilisées pour l'étude et la compréhension du comportement des systèmes biologiques et autres systèmes polymériques.

Le FRET est capable d'apporter des informations spatiales en temps réel, souvent combiné à de l'imagerie, ce qui fait de lui une méthode très intéressante pour évaluer l'impact de l'environnement (T, pH, enzyme,...) et des interactions sur les micelles formées, et leurs propriétés d'encapsulation et de relargage.

Enfin, l'importance de la proximité spatiale des deux fluorophores utilisés lui permet également d'être une excellente sonde pour détecter la formation de micelles mixtes de manière directe, sans avoir à regarder les propriétés intrinsèques des systèmes mixtes, qui sont en général dues à une modulation des caractéristiques de chacun des systèmes purs.

## Conclusion

Cet état de l'art a permis de montrer la possibilité de mimer le comportement des systèmes biologiques grâce au développement de copolymères amphiphiles capables de s'auto-organiser en milieu aqueux, sous forme d'objets nanométriques de conformations différentes en fonction de paramètres tels que leur concentration, leur taille, ou encore leur équilibre hydrophile/hydrophobe.

L'utilisation de polymères stimulables, c'est-à-dire répondant à un stimulus interne ou externe, de nature physique, chimique ou biologique (T, pH, redox, etc.) a permis le développement des systèmes micellaires dont la stabilité peut être finement ajustée. La combinaison de plusieurs stimuli a même été réalisée dans de nombreux travaux de recherche, et ce afin d'affiner le contrôle que l'on a de ces systèmes.

La quantité phénoménale d'articles traitant de la synthèse de copolymères amphiphiles di- et triblocs est une conséquence de la nécessité de synthétiser systématiquement de nouveaux copolymères avec des compositions chimiques ajustées pour modifier le comportement des systèmes micellaires associés.

Plus récemment, de nombreux auteurs ont donc choisi de travailler sur des mélanges physiques de copolymères, répondants ou non à un ou plusieurs stimuli, et capables de s'auto-assembler sous forme de micelles mixtes pour combiner les propriétés de l'un et l'autre des copolymères.

Nous avons choisi de nous intéresser à des copolymères combinant deux thermosensibilités différentes, pour essayer de moduler la température critique globale du système.

Afin de démontrer la mixité de ces objets, les études se réfèrent souvent à leurs caractéristiques intrinsèques, intermédiaires à celles des deux composants, et évoluant en fonction des proportions relatives introduites. Ainsi, une méthode de fluorescence très utilisée pour de nombreuses applications du domaine biologique, le Transfert d'Énergie entre Molécules Fluorescentes (FRET), mais très peu employée pour prouver la mixité des systèmes, va être envisagée dans ce projet pour répondre à cette question de manière directe et innovante.

## Références

- (1) Tanbour, R.; M. Martins, A.; G. Pitt, W.; A. Hussein, G. Drug Delivery Systems Based on Polymeric Micelles and Ultrasound: A Review. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22* (19), 2796–2807.
- (2) Pharm, I. J.; No, V.; Nagaich, U.; Deepak, P.; Sharma, A.; Gulati, N.; Chaudhary, A. Polymeric Micelles : Potential Drug Delivery Devices. **2013**, *24* (4), 222–237.
- (3) Lombardo, D.; Kiselev, M. A.; Magazù, S.; Calandra, P. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015**, *2015*.
- (4) Letchford, K.; Burt, H. A Review of the Formation and Classification of Amphiphilic Block Copolymer Nanoparticulate Structures: Micelles, Nanospheres, Nanocapsules and Polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65* (3), 259–269.
- (5) Rijcken, C. J. F.; Soga, O.; Hennink, W. E.; Nostrum, C. F. va. Triggered Destabilisation of Polymeric Micelles and Vesicles by Changing Polymers Polarity: An Attractive Tool for Drug Delivery. *J. Control. Release* **2007**, *120* (3), 131–148.
- (6) Greyling, G.; Pasch, H. Characterisation of Block Copolymer Self-Assemblies by Thermal Field-Flow Fractionation. *Polym. Int.* **2017**, *66* (6), 745–751.
- (7) Ariga, K.; Nishikawa, M.; Mori, T.; Takeya, J.; Shrestha, L. K.; Hill, J. P. Self-Assembly as a Key Player for Materials Nanoarchitectonics. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2019**, *20* (1), 51–95.
- (8) Owen, S. C.; Chan, D. P. Y.; Shoichet, M. S. Polymeric Micelle Stability. *Nano Today* **2012**, *7* (1), 53–65.
- (9) Creutz, S.; Van Stam, J.; Antoun, S.; De Schryver, F. C.; Jérôme, R. Exchange of Polymer Molecules between Block Copolymer Micelles Studied by Emission Spectroscopy. A Method for the Quantification of Unimer Exchange Rates. *Macromolecules* **1997**, *30* (14), 4078–4083.
- (10) Rharbi, Y. Fusion and Fragmentation Dynamics at Equilibrium in Triblock Copolymer Micelles. *Macromolecules* **2012**, *45* (24), 9823–9826.
- (11) Wright, D. B.; Patterson, J. P.; Gianneschi, N. C.; Chassenieux, C.; Colombani, O.; O'Reilly, R. K. Blending Block Copolymer Micelles in Solution; Obstacles of Blending. *Polym. Chem.* **2016**, *7* (8), 1577–1583.

- (12) Gil, E. S.; Hudson, S. M. Stimuli-Responsive Polymers and Their Bioconjugates. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29* (12), 1173–1222.
- (13) Tao, H. *Stimuli-Responsive Copolymers and Their Applications*; Parthiban, A., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2014.
- (14) Kelley, E. G.; Albert, J. N. L.; Sullivan, M. O.; Epps, T. H. Stimuli-Responsive Copolymer Solution and Surface Assemblies for Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (17), 7057–7071.
- (15) Qin, X.; Li, Y. Strategies To Design and Synthesize Polymer-Based Stimuli-Responsive Drug-Delivery Nanosystems. *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1–19.
- (16) García-Peñas, A.; Wang, Y.; Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M.; Stadler, F. J. Lower Critical Solution Temperature Sensitivity to Structural Changes in Poly(N-Isopropyl Acrylamide) Homopolymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2019**, *57* (20), 1386–1393.
- (17) Ward, M. A.; Georgiou, T. K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*. **2011**, *3* (3), 1215–1242.
- (18) Teotia, A. K.; Sami, H.; Kumar, A. *Thermo-Responsive Polymers: Structure and Design of Smart Materials*; Elsevier Ltd, 2015.
- (19) Papadakis, C. M.; Müller-Buschbaum, P.; Laschewsky, A. Switch It Inside-out: “Schizophrenic” Behavior of All Thermoresponsive UCST-LCST Diblock Copolymers. *Langmuir* **2019**, *35* (30), 9660–9676.
- (20) Schild, H. G. Poly(N-Isopropylacrylamide): Experiment, Theory and Application. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17* (2), 163–249.
- (21) Müller, A. H. E.; Borisov, O. *Self Organized Nanostructures of Amphiphilic Block Copolymers II*; Müller, A. H. ., Borisov, O., Eds.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
- (22) Zhu, X. X.; Avoce, D.; Liu, H. Y.; Benrebouh, A. Copolymers of N-Alkylacrylamides as Thermosensitive Hydrogels. *Macromol. Symp.* **2004**, *207*, 187–191.
- (23) Sugihara, S.; Hashimoto, K.; Okabe, S.; Shibayama, M.; Kanaoka, S.; Aoshima, S. Stimuli-Responsive Diblock Copolymers by Living Cationic Polymerization: Precision Synthesis and Highly Sensitive Physical Gelation. *Macromolecules* **2004**, *37* (2), 336–343.
- (24) Kotsuchibashi, Y.; Ebara, M.; Aoyagi, T.; Narain, R. Recent Advances in Dual Temperature Responsive Block Copolymers and Their Potential as Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*. **2016**, *8* (11).

- (25) Weber, C.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Temperature Responsive Bio-Compatible Polymers Based on Poly ( Ethylene Oxide ) and Poly ( 2-Oxazoline ) S. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (5), 686–714.
- (26) Peng, H.; Rübsam, K.; Hu, C.; Jakob, F.; Schwaneberg, U.; Pich, A. Stimuli-Responsive Poly(N-Vinyl lactams) with Glycidyl Side Groups: Synthesis, Characterization, and Conjugation with Enzymes. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (2), 992–1006.
- (27) Lutz, J. F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470.
- (28) Prhashanna, A.; Taylor, P. A.; Qin, J.; Kiick, K. L.; Jayaraman, A. Effect of Peptide Sequence on the LCST-Like Transition of Elastin-Like Peptides and Elastin-Like Peptide-Collagen-Like Peptide Conjugates: Simulations and Experiments. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (3), 1178–1189.
- (29) Qiu, X.; Koga, T.; Tanaka, F.; Winnik, F. M. New Insights into the Effects of Molecular Weight and End Group on the Temperature-Induced Phase Transition of Poly(N-Isopropylacrylamide) in Water. *Sci. China Chem.* **2013**, *56* (1), 56–64.
- (30) García-Peñas, A.; Biswas, C. S.; Liang, W.; Wang, Y.; Stadler, F. J. Lower Critical Solution Temperature in Poly(N-Isopropylacrylamide): Comparison of Detection Methods and Molar Mass Distribution Influence. *Macromol. Chem. Phys.* **2019**, *220* (13), 1–6.
- (31) Liu, H. Y.; Zhu, X. X. Lower Critical Solution Temperatures of N-Substituted Acrylamide Copolymers in Aqueous Solutions. *Polymer (Guildf)*. **1999**, *40* (25), 6985–6990.
- (32) Ishizone, T.; Seki, A.; Hagiwara, M.; Han, S.; Yokoyama, H.; Oyane, A.; Deffieux, A.; Carlotti, S. Anionic Polymerizations of Oligo(Ethylene Glycol) Alkyl Ether Methacrylates: Effect of Side Chain Length and  $\omega$ -Alkyl Group of Side Chain on Cloud Point in Water. *Macromolecules* **2008**, *41* (8), 2963–2967.
- (33) Mertoglu, M.; Garnier, S.; Laschewsky, A.; Skrabania, K.; Storsberg, J. Stimuli Responsive Amphiphilic Block Copolymers for Aqueous Media Synthesised via Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerisation (RAFT). *Polymer (Guildf)*. **2005**, *46* (18), 7726–7740.
- (34) Xia, Y.; Yin, X.; Burke, N. A. D.; Stöver, H. D. H. Thermal Response of Narrow-Disperse Poly(N-Isopropylacrylamide) Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2005**, *38* (14), 5937–5943.

- (35) Xia, Y.; Burke, N. A. D.; Stöver, H. D. H. End Group Effect on the Thermal Response of Narrow-Disperse Poly(N-Isopropylacrylamide) Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2006**, *39* (6), 2275–2283.
- (36) Hoffman, A. S.; Stayton, P. S.; Bulmus, V.; Chen, G.; Chen, J.; Cheung, C.; Chilkoti, A.; Ding, Z.; Dong, L.; Fong, R.; Lackey, C. A.; Long, C. J.; Miura, M.; Morris, J. E.; Murthy, N.; Nabeshima, Y.; Park, T. G.; Press, O. W.; Shimoboji, T.; Shoemaker, S.; Yang, H. J.; Monji, N.; Nowinski, R. C.; Cole, C. A.; Priest, J. H.; Harris, J. M.; Nakamae, K.; Nishino, T.; Miyata, T. Really Smart Bioconjugates of Smart Polymers and Receptor Proteins. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52* (4), 577–586.
- (37) Park, J. S.; Kataoka, K. Comprehensive and Accurate Control of Thermosensitivity of Poly(2-Alkyl-2-Oxazoline)s via Well-Defined Gradient or Random Copolymerization. *Macromolecules* **2007**, *40* (10), 3599–3609.
- (38) Kasprów, M.; MacHnik, J.; Otulakowski, Ł.; Dworak, A.; Trzebicka, B. Thermoresponsive P(HEMA- Co-OEGMA) Copolymers: Synthesis, Characteristics and Solution Behavior. *RSC Adv.* **2019**, *9* (70), 40966–40974.
- (39) Dimitrov, I.; Trzebicka, B.; Müller, A. H. E.; Dworak, A.; Tsvetanov, C. B. Thermosensitive Water-Soluble Copolymers with Doubly Responsive Reversibly Interacting Entities. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32* (11), 1275–1343.
- (40) Soga, O.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. Poly(N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide Mono/Di Lactate): A New Class of Biodegradable Polymers with Tuneable Thermosensitivity. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (3), 818–821.
- (41) Pich, A. Stimuli-Responsive Poly( N - Vinyl lactams) with Glycidyl Side Groups: Synthesis, Characterization, and Conjugation with Enzymes. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 992–1006.
- (42) Zhang, Y.; Yarin, A. L. Stimuli-Responsive Copolymers of n-Isopropyl Acrylamide with Enhanced Longevity in Water for Micro- and Nanofluidics , Drug Delivery and Non-Woven Applications. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 4732–4739.
- (43) Trongsatitkul, T.; Budhlall, B. M. Synthesis of Thermoresponsive Copolymers Composed of Poly(Ethylene Glycol) and Poly(N-Isopropyl Acrylamide) for Cell Encapsulation. *Mater. Res.* **2009**, *1134*, 2–7.
- (44) Weber, C.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Temperature Responsive Bio-Compatible Polymers Based on Poly(Ethylene Oxide) and Poly(2-Oxazoline)s. *Prog. Polym. Sci.* **2012**,

- 37 (5), 686–714.
- (45) Chung, J. E.; Yokoyama, M.; Okano, T. Inner Core Segment Design for Drug Delivery Control of Thermo-Responsive Polymeric Micelles. *J. Control. Release* **2000**, *65* (1–2), 93–103.
- (46) Xu, F.; Yan, T. T.; Luo, Y. L. Synthesis and Micellization of Thermosensitive PNIPAAm-b-PLA Amphiphilic Block Copolymers Based on a Bifunctional Initiator. *Macromol. Res.* **2011**, *19* (12), 1287–1295.
- (47) Hu, Y.; Darcos, V.; Monge, S.; Li, S. Synthesis and Self-Assembling of Poly(N-Isopropylacrylamide-Block-Poly(L-Lactide)-Block-Poly(N-Isopropylacrylamide) Triblock Copolymers Prepared by Combination of Ring-Opening Polymerization and Atom Transfer Radical Polymerization. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2013**, *51* (15), 3274–3283.
- (48) Chung, J. E.; Yokoyama, M.; Aoyagi, T.; Sakurai, Y.; Okano, T. Effect of Molecular Architecture of Hydrophobically Modified Poly(N-Isopropylacrylamide) on the Formation of Thermoresponsive Core-Shell Micellar Drug Carriers. *J. Control. Release* **1998**, *53* (1–3), 119–130.
- (49) Han, S.; Hagiwara, M.; Ishizone, T. Synthesis of Thermally Sensitive Water-Soluble Polymethacrylates by Living Anionic Polymerizations of Oligo(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylates. *Macromolecules* **2003**, *36* (22), 8312–8319.
- (50) Bertrand, O.; Fustin, C. A.; Gohy, J. F. Multiresponsive Micellar Systems from Photocleavable Block Copolymers. *ACS Macro Lett.* **2012**, *1* (8), 949–953.
- (51) Qin, S.; Geng, Y.; Discher, D. E.; Yang, S. Temperature-Controlled Assembly and Release from Polymer Vesicles of Poly(Ethylene Oxide)-Block-Poly(N-Isopropylacrylamide). *Adv. Mater.* **2006**, *18* (21), 2905–2909.
- (52) Su, Y. L.; Wang, J.; Liu, H. Z. FTIR Spectroscopic Investigation of Effects of Temperature and Concentration on PEO-PPO-PEO Block Copolymer Properties in Aqueous Solutions. *Macromolecules* **2002**, *35* (16), 6426–6431.
- (53) Jochum, F. D.; Roth, P. J.; Kessler, D.; Theato, P. Double Thermoresponsive Block Copolymers Featuring a Biotin End Group. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (9), 2432–2439.
- (54) Weiss, J.; Böttcher, C.; Laschewsky, A. Self-Assembly of Double Thermoresponsive Block Copolymers End-Capped with Complementary Trimethylsilyl Groups. *Soft Matter* **2011**, *7* (2), 483–492.

- (55) Kermagoret, A.; Fustin, C. A.; Bourguignon, M.; Detrembleur, C.; Jérôme, C.; Debuigne, A. One-Pot Controlled Synthesis of Double Thermo-responsive N-Vinylcaprolactam-Based Copolymers with Tunable LCSTs. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (8), 2575–2583.
- (56) Liang, X.; Liu, F.; Kozlovskaya, V.; Palchak, Z.; Kharlampieva, E. Thermo-responsive Micelles from Double LCST-Poly(3-Methyl-N-Vinylcaprolactam) Block Copolymers for Cancer Therapy. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4* (3), 308–311.
- (57) Hasan, E.; Zhang, M.; Müller, A. H. E.; Tsvetanov, C. B. Thermoassociative Block Copolymers of Poly(N-Isopropylacrylamide) and Poly(Propylene Oxide). *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.* **2004**, *41 A* (5), 467–486.
- (58) Skrabania, K.; Kristen, J.; Laschewsky, A.; Akdemir, Ö.; Hoth, A.; Lutz, J. F. Design, Synthesis, and Aqueous Aggregation Behavior of Nonionic Single and Multiple Thermo-responsive Polymers. *Langmuir* **2007**, *23* (1), 84–93.
- (59) Cao, Y.; Zhao, N.; Wu, K.; Zhu, X. X. Solution Properties of a Thermosensitive Triblock Copolymer of N-Alkyl Substituted Acrylamides. *Langmuir* **2009**, *25* (3), 1699–1704.
- (60) Razavi, B.; Abdollahi, A.; Roghani-Mamaqani, H.; Salami-Kalajahi, M. Light-, Temperature-, and PH-Responsive Micellar Assemblies of Spiropyran-Initiated Amphiphilic Block Copolymers: Kinetics of Photochromism, Responsiveness, and Smart Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *109* (December 2019), 110524.
- (61) Chen, X.; Sun, H.; Xu, J.; Han, X.; Liu, H.; Hu, Y. PH-Modulated Double LCST Behaviors with Diverse Aggregation Processes of Random-Copolymer Grafted Silica Nanoparticles in Aqueous Solution. *RSC Adv.* **2015**, *5* (105), 86584–86592.
- (62) Aqil, A.; Vasseur, S.; Duguet, E.; Passirani, C.; Benoît, J. P.; Jérôme, R.; Jérôme, C. Magnetic Nanoparticles Coated by Temperature Responsive Copolymers for Hyperthermia. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18* (28), 3352–3360.
- (63) Wright, D. B.; Patterson, J. P.; Pitto-Barry, A.; Lu, A.; Kirby, N.; Gianneschi, N. C.; Chassenieux, C.; Colombani, O.; O'Reilly, R. K. The Copolymer Blending Method: A New Approach for Targeted Assembly of Micellar Nanoparticles. *Macromolecules* **2015**, *48* (18), 6516–6522.
- (64) Tian, M.; Qin, A.; Ramireddy, C.; Webber, S. E.; Munk, P.; Tuzar, Z.; Procházka, K. Hybridization of Block Copolymer Micelles. *Langmuir* **1993**, *9* (7), 1741–1748.
- (65) Lo, C. L.; Lin, S. J.; Tsai, H. C.; Chan, W. H.; Tsai, C. H.; Cheng, C. H. D.; Hsiue, G. H. Mixed Micelle Systems Formed from Critical Micelle Concentration and Temperature-

- Sensitive Diblock Copolymers for Doxorubicin Delivery. *Biomaterials* **2009**, *30* (23–24), 3961–3970.
- (66) Wu, C.; Ma, R.; He, H.; Zhao, L.; Gao, H.; An, Y.; Shi, L. Fabrication of Complex Micelles with Tunable Shell for Application in Controlled Drug Release. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9* (12), 1185–1193.
- (67) Xie, D.; Xu, K.; Bai, R.; Zhang, G. Structural Evolution of Mixed Micelles Due to Interchain Complexation and Segregation Investigated by Laser Light Scattering. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (4), 778–781.
- (68) Torchilin, V. P. Structure and Design of Polymeric Surfactant-Based Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2001**, *73* (2–3), 137–172.
- (69) Chiappetta, D. A.; Facorro, G.; Rubin de Celis, E.; Sosnik, A. Synergistic Encapsulation of the Anti-HIV Agent Efavirenz within Mixed Poloxamine/Poloxamer Polymeric Micelles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2011**, *7* (5), 624–637.
- (70) Shim, D. F. K.; Marques, C.; Cates, M. E. Diblock Copolymers: Comicellization and Coadsorption. *Macromolecules* **1991**, *24* (19), 5309–5314.
- (71) Ebrahim Attia, A. B.; Ong, Z. Y.; Hedrick, J. L.; Lee, P. P.; Ee, P. L. R.; Hammond, P. T.; Yang, Y. Y. Mixed Micelles Self-Assembled from Block Copolymers for Drug Delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16* (3), 182–194.
- (72) Sens, P.; Marques, C. M.; Joanny, J. F. Mixed Micelles in a Bidisperse Solution of Diblock Copolymers. *Macromolecules* **1996**, *29* (14), 4880–4890.
- (73) Borovinskii, A. L.; Khokhlov, A. R. Micelle Formation in the Dilute Solution Mixtures of Block-Copolymers. *Macromolecules* **1998**, *31* (22), 7636–7640.
- (74) Prhashanna, A.; Khan, S. A.; Chen, S. B. Co-Micellization Behavior in Poloxamers: Dissipative Particle Dynamics Study. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (2), 572–582.
- (75) Prhashanna, A.; Tan, W. K.; Khan, S. A.; Chen, S. B. Co-Micellization Behavior of Triblock Copolymers in the Presence of Hydrophobic Drug Molecules: A Simulation Study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *148*, 299–307.
- (76) Hafezi, M. J.; Sharif, F. Brownian Dynamics Simulation of Comicellization of Amphiphilic Block Copolymers with Different Tail Lengths. *Langmuir* **2012**, *28* (47), 16243–16253.
- (77) Prhashanna, A.; Dormidontova, E. E. Tadpole and Mixed Linear/Tadpole Micelles of Diblock Copolymers: Thermodynamics and Chain Exchange Kinetics. *Macromolecules* **2017**, *50* (4), 1740–1748.

- (78) Prhashanna, A.; Dormidontova, E. E. Micelle Self-Assembly and Chain Exchange Kinetics of Tadpole Block Copolymers with a Cyclic Corona Block. *Macromolecules* **2020**.
- (79) Charlaganov, M.; Borisov, O. V.; Leermakers, F. A. M. Modeling of Triblock Terpolymer Micelles with a Segregated Corona. *Macromolecules* **2008**, *41* (10), 3668–3677.
- (80) Voets, I. K.; Fokkink, R.; De Keizer, A.; May, R. P.; De Waard, P.; Cohen Stuart, M. A. On the Transition between a Heterogeneous and Homogeneous Corona in Mixed Polymeric Micelles. *Langmuir* **2008**, *24* (21), 12221–12227.
- (81) Huang, C. K.; Lo, C. L.; Chen, H. H.; Hsiue, G. H. Multifunctional Micelles for Cancer Cell Targeting, Distribution Imaging, and Anticancer Drug Delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17* (14), 2291–2297.
- (82) Mingvanish, W.; Chaibundit, C.; Booth, C. Mixed Micellisation of Oxyethylene-Oxybutylene Diblock and Triblock Copolymers in Water Studied by Light Scattering. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4* (5), 778–784.
- (83) Kwak, M.; Musser, A. J.; Lee, J.; Herrmann, A. DNA-Functionalised Blend Micelles: Mix and Fix Polymeric Hybrid Nanostructures. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (27), 4935–4937.
- (84) O’Neil, C. P.; van der Vlies, A. J.; Velluto, D.; Wandrey, C.; Demurtas, D.; Dubochet, J.; Hubbell, J. A. Extracellular Matrix Binding Mixed Micelles for Drug Delivery Applications. *J. Control. Release* **2009**, *137* (2), 146–151.
- (85) Kang, N.; Perron, M. È.; Prud’Homme, R. E.; Zhang, Y.; Gaucher, G.; Leroux, J. C. Stereocomplex Block Copolymer Micelles: Core-Shell Nanostructures with Enhanced Stability. *Nano Lett.* **2005**, *5* (2), 315–319.
- (86) Hespel, L.; Morandi, G.; Grossel, M.; Lecamp, L.; Picton, L.; Burel, F. Synthesis of Lipid-b-Poly(2-Isopropyl-2-Oxazoline) and Successive Study of PH- and Thermo-Sensitive Mixed Micelles by Combination with Lipid-b-Poly(Acrylic Acid). *Polym. Chem.* **2014**, *5* (13), 4009–4015.
- (87) Cao, Y.; Liu, M.; Zhang, K.; Zu, G.; Kuang, Y.; Tong, X.; Xiong, D.; Pei, R. Poly(Glycerol) Used for Constructing Mixed Polymeric Micelles as T1 MRI Contrast Agent for Tumor-Targeted Imaging. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (1), 150–158.
- (88) Khoee, S.; Kavand, A. Preparation, Co-Assembling and Interfacial Crosslinking of Photocurable and Folate-Conjugated Amphiphilic Block Copolymers for Controlled and Targeted Drug Delivery: Smart Armored Nanocarriers. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *73*, 18–29.

- (89) Wang, Y.; Li, Y.; Zhang, L.; Fang, X. Pharmacokinetics and Biodistribution of Paclitaxel-Loaded Pluronic P105 Polymeric Micelles. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31* (4), 530–538.
- (90) Akash, M. S. H.; Rehman, K. Recent Progress in Biomedical Applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical Perspectives. *J. Control. Release* **2015**, *209*, 120–138.
- (91) Khimani, M.; Patel, H.; Patel, V.; Parekh, P.; Vekariya, R. L. Self-Assembly of Stimuli-Responsive Block Copolymers in Aqueous Solutions: An Overview. *Polym. Bull.* **2019**.
- (92) Lee, C. F.; Yang, C. H.; Lin, T. L.; Bahadur, P.; Chen, L. J. Role of Molecular Weight and Hydrophobicity of Amphiphilic Tri-Block Copolymers in Temperature-Dependent Co-Micellization Process and Drug Solubility. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *183* (August), 110461.
- (93) Renou, F.; Benyahia, L.; Nicolai, T.; Glatter, O. Structure and Rheology of Mixed Polymeric Micelles Formed by Hydrophobically End-Capped Poly(Ethylene Oxide). *Macromolecules* **2008**, *41* (17), 6523–6530.
- (94) Zhang, M.; Djabourov, M.; Bourgaux, C.; Bouchemal, K. Nanostructured Fluids from Pluronic® Mixtures. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454* (2), 599–610.
- (95) Gaisford, S.; Beezer, A. E.; Mitchell, J. C. Diode-Array UV Spectrometric Evidence for Cooperative Interactions in Binary Mixtures of Pluronics F77, F87, and F127. *Langmuir* **1997**, *13* (10), 2606–2607.
- (96) Renou, F.; Nicolai, T.; Nicol, E.; Benyahia, L. Structure and Viscoelasticity of Mixed Micelles Formed by Poly(Ethylene Oxide) End Capped with Alkyl Groups of Different Length. *Langmuir* **2009**, *25* (1), 515–521.
- (97) König, N.; Willner, L.; Lund, R. Structure and Thermodynamics of Mixed Polymeric Micelles with Crystalline Cores: Tuning Properties: Via Co-Assembly. *Soft Matter* **2019**, *15* (39), 7777–7786.
- (98) Lin, T. Y.; Zhu, T. T.; Xun, Y.; Tao, Y. S.; Yang, Y. Q.; Xie, J. L.; Zhang, X. M.; Chen, S. X.; Ding, B. J.; Chen, W. D. A Novel Drug Delivery System of Mixed Micelles Based on Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Lactide) and Poly(Ethylene Glycol)-Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) for Gambogic Acid. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2019**, *35* (12), 757–764.
- (99) Liu, T.; Nace, V. M.; Chu, B. Self-Assembly of Mixed Amphiphilic Triblock Copolymers in Aqueous Solution. *Langmuir* **1999**, *15* (9), 3109–3117.
- (100) Ricardo, N. M. P. S.; Chaibundit, C.; Yang, Z.; Attwood, D.; Booth, C. Association Behavior of Mixed Triblock Copoly(Oxyalkylene)s (Type EBE and ESE) in Aqueous Solution.

- Langmuir* **2006**, *22* (3), 1301–1306.
- (101) Li, G.; Shi, L.; Ma, R.; An, Y.; Huang, N. Formation of Complex Micelles with Double-Responsive Channels from Self-Assembly of Two Diblock Copolymers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, *45* (30), 4959–4962.
- (102) Luo, Y.; Yin, X.; Yin, X.; Chen, A.; Zhao, L.; Zhang, G.; Liao, W.; Huang, X.; Li, J.; Zhang, C. Y. Dual Ph/Redox-Responsive Mixed Polymeric Micelles for Anticancer Drug Delivery and Controlled Release. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (4).
- (103) Shuai, S.; Zhou, S.; Liu, Y.; Huo, W.; Zhu, H.; Li, Y.; Rao, Z.; Zhao, C.; Hao, J. The Preparation and Property of Photo- and Thermo-Responsive Hydrogels with a Blending System. *J. Mater. Sci.* **2020**, *55* (2), 786–795.
- (104) Zhang, W.; Xiao, Y.; Bian, Q.; Lang, M. Photo-Cross-Linkable Mixed Micelles with Dual Response to PH and Temperature. *Mater. Today Chem.* **2019**, *11*, 69–79.
- (105) El Asmar, A.; Morandi, G.; Burel, F. Synthesis of Dual Sensitive Lipid- b- Poly(Dimethylaminoethyl Methacrylate) Copolymers, Self-Assemblies and Modulation of Cloud Point Temperatures through Physical Blends with Lipid- b-Poly(2-Isopropyl-2-Oxazoline). *Macromolecules* **2019**, *52* (23), 9160–9167.
- (106) Kamenova, K.; Trzebicka, B.; Momekova, D.; Petrov, P. Double Stimuli Responsive Mixed Aggregates from Poly(Acrylic Acid)-Block-Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)-Block-Poly(Acrylic Acid) and Poly(Ethylene Oxide)-Block-Poly(Propylene Oxide)-Block-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers. *Polym. Bull.* **2017**, *74* (3), 707–720.
- (107) Manjappa, A. S.; Kumbhar, P. S.; Patil, A. B.; Disouza, J. I.; Patravale, V. B. Polymeric Mixed Micelles: Improving the Anticancer Efficacy of Single-Copolymer Micelles. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2019**, *36* (1), 1–58.
- (108) Wu, W. C.; Huang, C. M.; Liao, P. W. Dual-Sensitive and Folate-Conjugated Mixed Polymeric Micelles for Controlled and Targeted Drug Delivery. *React. Funct. Polym.* **2014**, *81* (1), 82–90.
- (109) Chien, Y. Y.; Wang, T. Y.; Liao, P. W.; Wu, W. C.; Chen, C. Y. Folate-Conjugated and Dual Stimuli-Responsive Mixed Micelles Loading Indocyanine Green for Photothermal and Photodynamic Therapy. *Macromol. Biosci.* **2018**, *18* (6), 1–12.
- (110) El Asmar, A.; Gimello, O.; Morandi, G.; Le Cerf, D.; Lapinte, V.; Burel, F. Tuning the Thermo-Sensitivity of Micellar Systems through a Blending Approach. *Macromolecules* **2016**, *49* (11), 4307–4315.

- (111) Keogh, R.; Blackman, L. D.; Foster, J. C.; Varlas, S.; O'Reilly, R. K. The Importance of Cooperativity in Polymer Blending: Toward Controlling the Thermoresponsive Behavior of Blended Block Copolymer Micelles. *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *1900599*, 1–6.
- (112) Yan, N.; Liu, X.; Zhang, Y.; Sun, N.; Jiang, W.; Zhu, Y. Confined Co-Assembly of AB/BC Diblock Copolymer Blends under 3D Soft Confinement. *Soft Matter* **2018**, *14* (23), 4679–4686.
- (113) Vakil, R.; Kwon, G. S. Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) and PEG-Phospholipid Form Stable Mixed Micelles in Aqueous Media. *Langmuir* **2006**, *22* (23), 9723–9729.
- (114) 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.
- (115) Valeur, B. *Advanced Techniques in Fluorescence Spectroscopy.* **2001**, *8*.
- (116) Ishikawa-Ankerhold, H. C.; Ankerhold, R.; Drummen, G. P. C. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* **2012**, *17* (4), 4047–4132.
- (117) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 2006.
- (118) Michael, K. Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules. *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14–19.
- (119) Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor-Acceptor Combinations. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, *45* (28), 4562–4588.
- (120) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; 2001; Vol. 8.
- (121) Charron, D. M.; Zheng, G. Nanomedicine Development Guided by FRET Imaging. *Nano Today* **2018**, *18*, 124–136.
- (122) Margeat, E. Transfert d'Énergie de Förster Sur Molécules Uniques Applications En Biologie. *Actual. Chim.* **2010**, No. 347, 30–40.
- (123) Wang, S.; Deng, H.; Huang, P.; Sun, P.; Huang, X.; Su, Y.; Zhu, X.; Shen, J.; Yan, D. Real-Time Self-Tracking of an Anticancer Small Molecule Nanodrug Based on Colorful Fluorescence Variations. *RSC Adv.* **2016**, *6* (15), 12472–12478.
- (124) Preus, S.; Wilhelmsson, L. M. Advances in Quantitative FRET-Based Methods for Studying Nucleic Acids. *ChemBioChem* **2012**, *13* (14), 1990–2001.

- (125) Wang, J.; Yin, T.; Huang, F.; Song, Y.; An, Y.; Zhang, Z.; Shi, L. Artificial Chaperones Based on Mixed Shell Polymeric Micelles: Insight into the Mechanism of the Interaction of the Chaperone with Substrate Proteins Using Förster Resonance Energy Transfer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (19), 10238–10249.
- (126) Taya, P.; Maiti, B.; Kumar, V.; De, P.; Satapathi, S. Design of a Novel FRET Based Fluorescent Chemosensor and Their Application for Highly Sensitive Detection of Nitroaromatics. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, *255*, 2628–2634.
- (127) Li, X. L.; Hao, N.; Chen, H. Y.; Xu, J. J. Tumor-Marker-Mediated “on-Demand” Drug Release and Real-Time Monitoring System Based on Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (20), 10239–10245.
- (128) Sanchez-Gaytan, B. L.; Fay, F.; Hak, S.; Alaarg, A.; Fayad, Z. A.; Pérez-Medina, C.; Mulder, W. J. M.; Zhao, Y. Real-Time Monitoring of Nanoparticle Formation by FRET Imaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (11), 2923–2926.
- (129) Fu, Y.; Chen, X.; Mou, X.; Ren, Z.; Li, X.; Han, G. A Dual-Color Luminescent Localized Drug Delivery System with Ratiometric-Monitored Doxorubicin Release Functionalities. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2* (4), 652–661.
- (130) Elangovan, M.; Day, R. N.; Periasamy, A. Dynamic Imaging Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biotechniques* **2002**, *32* (6), 1260–1265.
- (131) Rajdev, P.; Ghosh, S. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): A Powerful Tool for Probing Amphiphilic Polymer Aggregates and Supramolecular Polymers. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123* (2), 327–342.
- (132) Rajdev, P.; Basak, D.; Ghosh, S. Insights into Noncovalently Core Cross-Linked Block Copolymer Micelles by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Studies. *Macromolecules* **2015**, *48* (10), 3360–3367.
- (133) Gravier, J.; Sancey, L.; Hirsjärvi, S.; Rustique, E.; Passirani, C.; Benoît, J. P.; Coll, J. L.; Texier, I. FRET Imaging Approaches for in Vitro and in Vivo Characterization of Synthetic Lipid Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (9), 3133–3144.
- (134) Lee, S. Y.; Tyler, J. Y.; Kim, S.; Park, K.; Cheng, J. X. FRET Imaging Reveals Different Cellular Entry Routes of Self-Assembled and Disulfide Bonded Polymeric Micelles. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (9), 3497–3506.
- (135) Maiti, C.; Dhara, D. Energy-Transfer Phenomena in Thermoresponsive and PH-Switchable Fluorescent Diblock Copolymer Vesicles. *Langmuir* **2017**, *33* (43), 12130–

- 12139.
- (136) Kulkarni, B.; Jayakannan, M. Fluorescent-Tagged Biodegradable Polycaprolactone Block Copolymer FRET Probe for Intracellular Bioimaging in Cancer Cells. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3* (9), 2185–2197.
- (137) Quadir, M. A.; Morton, S. W.; Deng, Z. J.; Shopsowitz, K. E.; Murphy, R. P.; Epps, T. H.; Hammond, P. T. PEG-Polypeptide Block Copolymers as PH-Responsive Endosome-Solubilizing Drug Nanocarriers. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (7), 2420–2430.
- (138) Wu, Y.; Hu, H.; Hu, J.; Liu, T.; Zhang, G.; Liu, S. Thermo- and Light-Regulated Formation and Disintegration of Double Hydrophilic Block Copolymer Assemblies with Tunable Fluorescence Emissions. *Langmuir* **2013**, *29* (11), 3711–3720.
- (139) Basak, D.; Ghosh, S. PH-Regulated Controlled Swelling and Sustained Release from the Core Functionalized Amphiphilic Block Copolymer Micelle. *ACS Macro Lett.* **2013**, *2* (9), 799–804.
- (140) Hao, N.; Sun, C.; Wu, Z.; Xu, L.; Gao, W.; Cao, J.; Li, L.; He, B. Fabrication of Polymeric Micelles with Aggregation-Induced Emission and Forster Resonance Energy Transfer for Anticancer Drug Delivery. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (7), 1944–1954.
- (141) Aibani, N.; da Costa, P. F.; Masterson, J.; Marino, N.; Raymo, F. M.; Callan, J.; Callan, B. The Integration of Triggered Drug Delivery with Real Time Quantification Using FRET; Creating a Super ‘Smart’ Drug Delivery System. *J. Control. Release* **2017**, *264* (July), 136–144.
- (142) Harbron, E. J. Fluorescence Intensity Modulation in Photochromic Conjugated Polymer Systems. *Isr. J. Chem.* **2013**, *53* (5), 256–266.
- (143) Soon, A. S. C.; Smith, M. H.; Herman, E. S.; Lyon, L. A.; Barker, T. H. Development of Self-Assembling Mixed Protein Micelles with Temperature-Modulated Avidities. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2* (7), 1045–1055.
- (144) Aoki, K.; Kamioka, Y.; Matsuda, M. Fluorescence Resonance Energy Transfer Imaging of Cell Signaling from in Vitro to in Vivo: Basis of Biosensor Construction, Live Imaging, and Image Processing. *Dev. Growth Differ.* **2013**, *55* (4), 515–522.
- (145) Truong, K.; Ikura, M. The Use of FRET Imaging Microscopy to Detect Protein-Protein Interactions and Protein Conformational Changes in Vivo. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11* (5), 573–578.

## Chapitre II :

Caractérisation des copolymères lipide-  
*b*-poly(2-alkyl-2-oxazoline) et de leurs  
mélanges physiques



## Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude des caractéristiques physico-chimiques de deux copolymères lipide-*b*-poly(2-alkyl-2-oxazoline) dont le bloc hydrophile est thermosensible. La famille des poly(oxazoline) est très largement étudiée comme une alternative au poly(oxyde d'éthylène) PEO en particulier dans le domaine biomédical, car ces polymères présentent des propriétés de solubilité, biocompatibilité et furtivité similaires sans toxicité particulière sur les animaux <sup>1</sup>. Les poly(oxazoline)s ont également l'avantage de couvrir une large gamme de températures en fonction du groupement présent sur le motif oxazoline qui les rend plus ou moins hydrophile.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au comportement de copolymères lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) et lipide-*b*-poly(2-éthyl-2-oxazoline).

Cette partie décrira les caractérisations de ces deux copolymères afin de déterminer leurs propriétés, c'est-à-dire leur température de point de trouble, ainsi que leur auto-organisation en solution aqueuse. Dans la seconde partie, nous verrons comment les propriétés finales des objets micellaires peuvent être modulées via le mélange physique de ces deux copolymères en différentes proportions, et étudierons plus précisément l'origine du second phénomène d'agrégation observé à haute proportion en LPEtOx dans l'étude précédente.

### I. Caractérisations physico-chimiques des copolymères LPiPrOx et LPEtOx

#### I.1. Présentation des polymères étudiés

Les copolymères amphiphiles lipide-*b*-poly(2-alkyl-2-oxazoline)s étudiés ont été synthétisés à partir d'un amorceur composé d'une chaîne grasse à 18 carbones issue de l'huile de lin, et des monomères 2-alkyl-2-oxazoline, le motif alkyle étant un éthyle ou un isopropyle. Le schéma réactionnel mis en place lors des études précédentes <sup>2,3</sup>, est décrit ci-dessous (Figure 1).

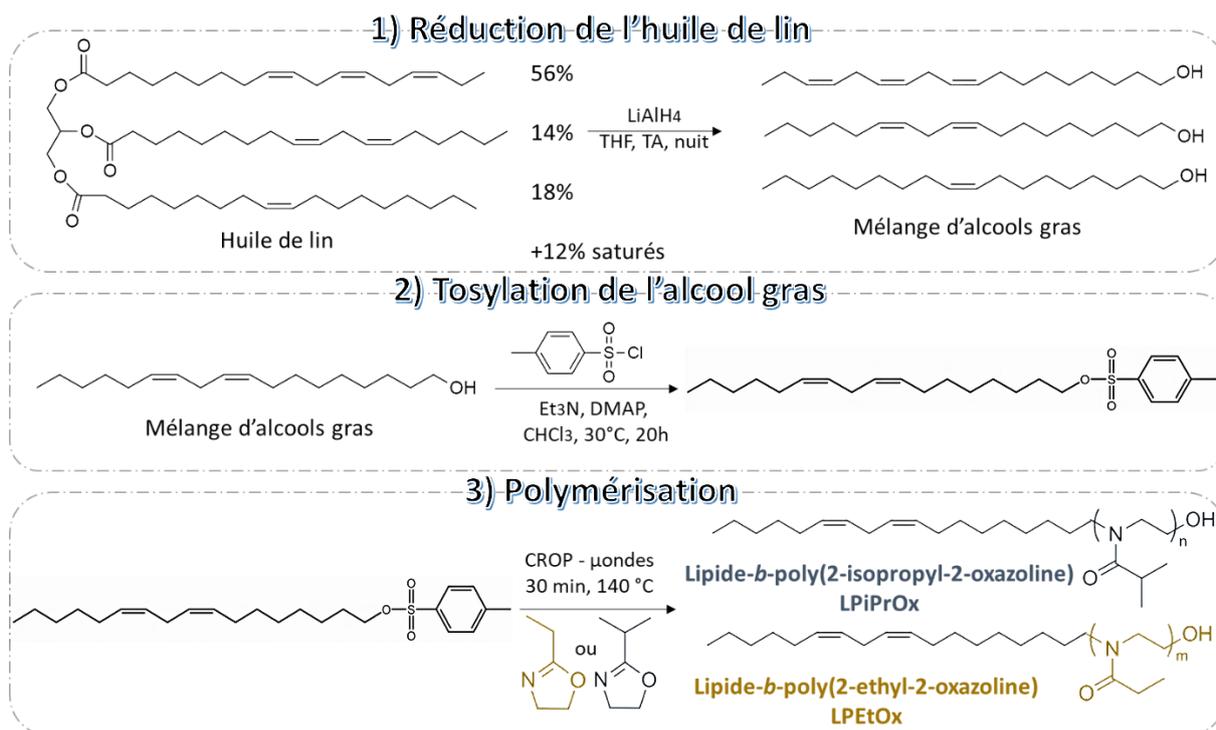


Figure 1 : Schéma réactionnel de la synthèse des copolymères amphiphiles lipide-*b*-poly(2-alkyl-2-oxazoline)

L'huile de lin est composée d'un mélange statistique d'acides gras à 18 carbones, saturés (acide stéarique) et insaturés (acides linoléique, linolénique et oléique), la proportion entre chacun de ces acides variant en fonction de la variété de lin et de la localisation géographique. D'après une analyse RMN  $^1\text{H}$ , l'huile de lin utilisée dans notre étude est majoritairement composée de chaînes contenant trois insaturations (56 % d'acide linoléique), et contient également 14 % de chaînes à deux insaturations (acide linolénique), 18 % à une insaturation (acide oléique) et 12 % de chaînes saturées (acide stéarique). Dans un premier temps, les fonctions ester de l'huile de lin sont réduites en présence de tétrahydroaluminate de lithium ( $\text{LiAlH}_4$ ) dans le THF anhydre, pour donner un mélange d'alcools gras avec un rendement de 88%. En accord avec la composition de l'huile de lin de départ, un mélange statistique d'alcools gras contenant de 0 à 3 insaturation(s) est obtenu. Les analyses RMN  $^1\text{H}$  conduisent à un nombre moyen de deux insaturations par chaîne <sup>3</sup>, aussi, par soucis de clarté dans les schémas réactionnels, ce mélange d'alcools gras sera représenté par la suite sous forme d'une unique chaîne d'alcool gras à deux insaturations.

Le mélange d'alcools gras est ensuite engagé dans une réaction de tosylation afin d'introduire un site amorceur de polymérisation cationique par ouverture de cycle en extrémité de la chaîne grasse. Cette réaction est réalisée en présence de chlorure de tosylo et du couple

Et<sub>3</sub>N/DMAP, où la triéthylamine (Et<sub>3</sub>N) joue le rôle de base nucléophile et la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) est un catalyseur de la réaction, dans le chloroforme à 30 °C pendant 20 h<sup>2</sup>. Le lipoamorceur tosylé est obtenu, après purification sur colonne de silice, avec un rendement de 52 %.

La dernière étape est la réaction de polymérisation des monomères 2-isopropyl-2-oxazoline ou 2-éthyl-2-oxazoline à partir du lipoamorceur tosylé. Il s'agit d'une polymérisation cationique par ouverture de cycle (CROP – « Cationic Ring Opening Polymerization »), qui est une technique de polymérisation vivante et contrôlée, permettant ainsi d'obtenir des polymères avec une dispersité faible. La CROP est réalisée dans l'acétonitrile à 140 °C pendant 30 min, à l'aide d'un appareil à micro-ondes selon le protocole mis au point précédemment dans l'équipe<sup>2</sup>.

Les copolymères lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) LPiPrOx et lipide-*b*-poly(2-éthyl-2-oxazoline) LPEtOx sont obtenus de façon contrôlée, avec un degré de polymérisation,  $\bar{X}_n$ , et des masses molaires moyennes en nombre,  $\bar{M}_n$ , déterminés par RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub> (Tableau 1). Des homopolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline) PiPrOx et poly(2-éthyl-2-oxazoline) PEtOx ont parallèlement été synthétisés dans des conditions identiques à partir d'un amorceur classique (p-toluènesulfonate de méthyle MeOTs).

Tableau 1 : Caractéristiques chimiques des copolymères LPiPrOx et LPEtOx synthétisés

(Co)polymère	N°	$\bar{X}_n^{\text{expé (a)}}$	$\bar{M}_n^{\text{RMN (b)}}$ (g/mol)	$\bar{M}_n^{\text{SEC (c)}}$ (g/mol)	Đ
LPiPrOx	1a	19	2600	2300 <sup>(d)</sup>	1,31
	1b	18	2500	2300 <sup>(d)</sup>	1,34
	1c	28	3600	3000 <sup>(d)</sup>	1,19
	1d	54	6500	5800 <sup>(d)</sup>	1,31
LPEtOx	2a	21	2500	1200 <sup>(d)</sup>	1,55
	2b	18	2200	1500 <sup>(d)</sup>	1,23
	2c	26	3000	6100 <sup>(e)</sup>	1,47
	2d	64	6800	6100 <sup>(d)</sup>	1,19
PiPrOx	3	/	/	2100 <sup>(d)</sup>	1,14
PEtOx	4	/	/	2200 <sup>(d)</sup>	1,23

(a)  $\bar{X}_n$  déterminé par RMN <sup>1</sup>H.

(b) RMN faite dans le CDCl<sub>3</sub>;  $\bar{M}_n^{\text{RMN}} = \bar{X}_n^{\text{RMN}} * M(\text{monomère}) + M(\text{Lipoamorceur})$ .

(c) Etalons PMMA ; (d) SEC faite dans le dichlorométhane ; (e) SEC dans le DMAc.

Ces polymères amphiphiles ont été caractérisés en solution aqueuse par turbidimétrie pour déterminer leur température de point de trouble caractéristique, et par diffusion de la lumière pour connaître la taille et le nombre d'agrégation des objets formés en solution.

## 1.2. Comportement des copolymères avec la température

### 1.2.1. Mesure en turbidimétrie de la température de point de trouble

Les mesures en turbidimétrie ont été faites par spectrophotométrie UV-visible dans un bain thermostaté, sur des solutions de copolymères amphiphiles LP(iPrOx)<sub>19</sub> **1a** ou LP(EtOx)<sub>21</sub> **2a**, et d'homopolymères PiPrOx et PEtOx dans le PBS, à une concentration de 1 g/L. Les mesures ont été faites dans le PBS afin de mimer au mieux le milieu physiologique dans lequel les polymères pourraient se trouver pour une application biomédicale.

La température de point de trouble est déterminée à 10% de l'augmentation de l'absorbance.

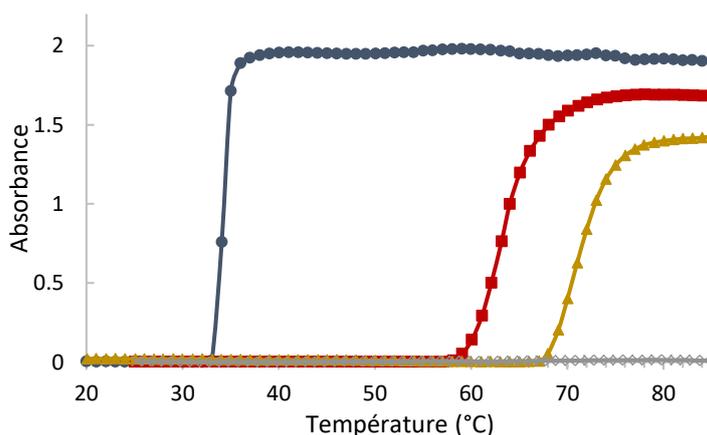


Figure 2 : Spectres d'absorbance UV-visible ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ,  $v = 0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ ) en fonction de la température du (—●—) LPiPrOx ( $\overline{M}_n = 2600 \text{ g/mol}$ ), (—■—), PiPrOx ( $\overline{M}_n = 2100 \text{ g/mol}$ ) et (—▲—) LPEtOx ( $\overline{M}_n = 2500 \text{ g/mol}$ ) à 1 g/L et du (—x—) PEtOx ( $\overline{M}_n = 2200 \text{ g/mol}$ ) à 2 g/L dans le PBS.

Les spectres d'absorbance (Figure 2) montrent une température de point de trouble de 60 °C pour l'homopolymère PiPrOx et une température supérieure à 85 °C pour l'homopolymère PEtOx qui est beaucoup plus hydrophile. Lorsque les poly(2-alkyl-2-oxazoline)s sont liés chimiquement à une chaîne lipidique à 18 carbones, l'hydrophobie du copolymère LPOx augmente, ce qui entraîne une diminution significative de la température de point de trouble jusqu'à 33 °C pour le LP(iPrOx)<sub>19</sub> et jusqu'à 67 °C pour le LP(EtOx)<sub>21</sub>, et ce pour des solutions aqueuses de même concentration. Ce résultat est tout à fait cohérent avec l'analyse effectuée

dans l'étude bibliographique : lors de l'incorporation d'une chaîne hydrophobe à l'extrémité d'un polymère thermosensible, la  $T_{PT}$  a tendance à diminuer.

Il a d'ailleurs été montré que des courtes chaînes de polymères sont plus influencées par le caractère hydrophile ou hydrophobe du groupement d'extrémité de chaîne. Les plus grandes chaînes étant moins impactées<sup>5</sup>. La variation de la température de point de trouble observée sur les LPiPrOx et LPEtOx synthétisés dans ce projet (Tableau 2) peuvent donc être expliqués par une légère variation du degré de polymérisation entre les synthèses.

Tableau 2 : Evolution de la température de point de troubles du LPiPrOx et du LPEtOx de différentes tailles, dans le PBS à une concentration de 1 g/L.

Copolymère	N°	$\overline{X}_n^{\text{expé}}$	$\overline{M}_n^{\text{RMN (a)}}$ (g/mol)	$T_{PT}$ (°C)
LPiPrOx	1a	19	2600	33
	1b	18	2500	32
	1c	28	3600	38
	1d	54	6500	49
LPEtOx	2a	21	2500	69
	2b	18	2200	67
	2c	26	3000	72
	2d	64	6800	82

L'évolution de la température de point de trouble des différents copolymères LPiPrOx et LPEtOx synthétisés lors de ce projet a été tracée en fonction de leur masse molaire en nombre déterminée en RMN <sup>1</sup>H (Figure 3).

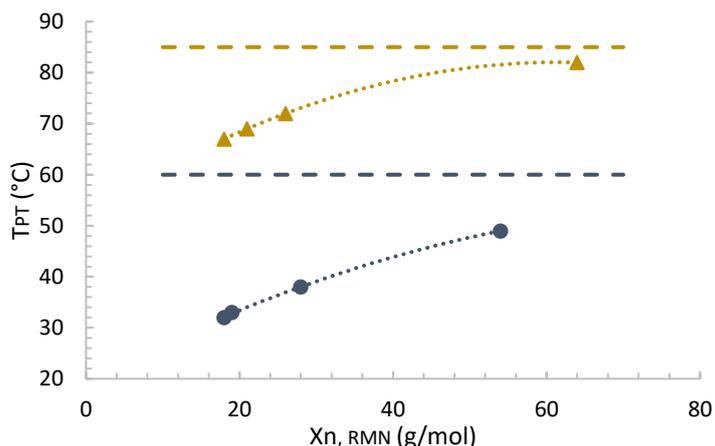


Figure 3 : Evolution de la température de point de trouble en fonction de la masse molaire des copolymères (●) LPIPrOx et (▲) LPEtOx. (---)  $T_{PT}$  de l'homopolymère PiPrOx ( $\overline{X}_{n,SEC} = 19$ ) et (---)  $T_{PT}$  de l'homopolymère PEtOx ( $\overline{X}_{n,SEC} = 22$ ).

Ainsi, plus le degré de polymérisation est élevé, plus la température de point de trouble est élevée, ce qui peut s'expliquer de manière assez logique par l'augmentation de l'hydrophilie globale du polymère lorsque sa taille augmente.

Un autre paramètre pouvant impacter la température de point de trouble est la concentration des polymères en solution.

Des mesures de point de trouble en spectrophotométrie UV-visible ont été faites sur des solutions de LP(iPrOx)<sub>19</sub> **1a**, LP(EtOx)<sub>21</sub> **2a** et d'homopolymère PiPrOx, dans le PBS à différentes concentrations (Figure 4).

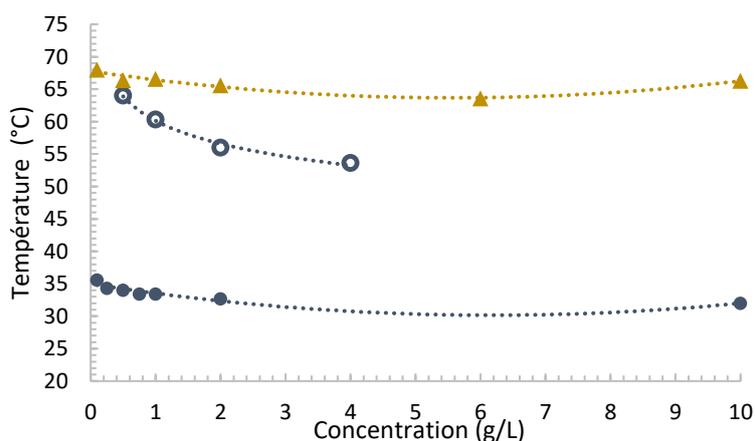


Figure 4 : Evolution de la température de point de trouble des copolymères (●) LPIPrOx, (▲) LPEtOx et de l'homopolymère (○) PiPrOx dans le PBS. Mesures au spectrophotomètre UV-visible avec bain thermostaté à  $v = 0,5$  °C/min et une mesure tous les 1 °C.

Contrairement à l'homopolymère PiPrOx dont la  $T_{PT}$  dépend beaucoup de la concentration (environ 20 °C de différence entre 0,5 et 4 g/L), l'évolution de la température de point de trouble avec la dilution est négligeable pour les deux copolymères LPiPrOx et LPEtOx puisqu'elle ne varie que de 3 °C entre 0,1 et 10 g/L. Cela est probablement dû à la présence de la chaîne lipidique qui rend les copolymères amphiphiles. Sur la gamme de concentration étudiée (toujours supérieure à la concentration micellaire critique des copolymères qui est respectivement de 29 mg/L et 17 mg/L pour le LPiPrOx et le LPEtOx), les chaînes sont donc organisées dans des structures micellaires de mêmes caractéristiques. Cela favorise leur proximité et donc les interactions qu'elles créent les unes avec les autres. Au contraire, les chaînes d'homopolymère libres en solution ont une probabilité de rencontre qui diffère avec la concentration. Plus la concentration en homopolymère augmente dans la solution, plus les chaînes se rencontrent facilement, et peuvent donc créer des interactions, ce qui entraîne une diminution de la  $T_{PT}$ .

### 1.3. Caractérisation des objets micellaires en solution par diffusion de la lumière

Dans un premier temps, les solutions de copolymères lipide-*b*-poly(2-alkyl-2-oxazoline)s (LPOx) ont été analysées au nanosizer. Ces mesures ont permis de déterminer la présence d'une unique population de micelles de même taille pour le LPiPrOx et le LPEtOx avec un rayon hydrodynamique  $R_h$  (en intensité) égal à 6,5 nm.

Des caractérisations physico-chimiques de LPOx ont été réalisées par diffusion statique et dynamique de la lumière pour confirmer les tailles des micelles mesurées au nanosizer, et déterminer leur forme ainsi que leur nombre d'agrégation dans l'eau milliQ.

Ces analyses ont été réalisées à l'Institut des Matériaux Moléculaires et Macromoléculaires (IMMM) de l'Université du Maine sous la supervision des Dr. Olivier Colombani et Frédéric Renou.

Le principe général de la diffusion de lumière est expliqué en annexe (cf. annexe 1).

#### 1.3.1. Détermination du $dn/dc$ des polymères

L'incrément d'indice de réfraction  $dn/dc$  est une grandeur qui dépend du polymère analysé, et qui doit donc être connue avant les mesures en diffusion de lumière.

Le  $dn/dc$  de notre système a été mesuré grâce à un réfractomètre différentiel sur les homopolymères poly(oxazoline)s POx. L'approximation a été faite que le  $dn/dc$  du POx est proche de celui du copolymère amphiphile LPOx. En effet, la chaîne lipidique ne représentant que 7 % en masse du copolymère, le contraste du bloc hydrophile domine la valeur du  $dn/dc$ . L'indice de réfraction de solutions d'homopolymères PiPrOx et PEtOx dans l'eau milliQ, à des concentrations comprises entre 1 et 5 g/L a été mesuré. La droite ci-dessous a été tracée à partir des valeurs expérimentales, permettant de déterminer un  $dn/dc = 0,16$  mL/g pour les deux homopolymères (Figure 5).

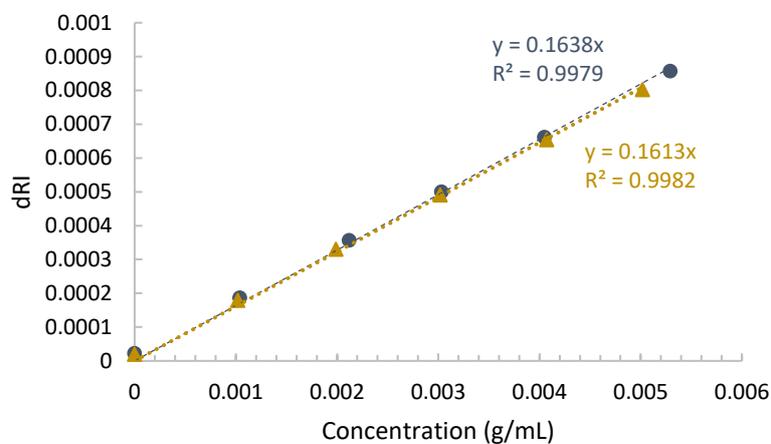


Figure 5 : Mesure de la différence d'indice de réfraction dRI entre la solution de polymère et le solvant (eau) en fonction de la concentration en homopolymère (—●—) PiPrOx et (—▲—) PEtOx dans l'eau milliQ.

Cette valeur de 0,16 mL/g dans l'eau milliQ a été utilisée pour les mesures en diffusion de lumière sur les copolymères amphiphiles LPiPrOx et LPEtOx.

### 1.3.2. Mesures de la taille et du nombre d'agrégation

En solution diluée, les analyses en diffusion de la lumière permettent de déterminer la taille des objets en solution aqueuse, leur masse molaire dont on déduit ensuite leur nombre d'agrégation, ainsi que les interactions pouvant exister entre les objets s'il l'on regarde l'effet de la concentration.

La taille des objets est représentée d'une part par leur rayon hydrodynamique  $R_h$ , qui est défini comme le rayon d'une sphère dure théorique qui aurait le même coefficient de diffusion que la particule considérée dans l'eau à une température donnée, et d'autre part par leur rayon

de gyration  $R_g$ . Dans le cas de micelles dont la taille est inférieure à 20 nm, aucune dépendance angulaire n'est observée, donc le  $R_g$  n'est pas mesurable.

Le nombre d'agrégation  $N_{ag}$  représente le nombre de chaînes de copolymères présentes dans un objet en solution.

Des solutions de LP(iPrOx)<sub>28</sub> **1c** et LP(EtOx)<sub>26</sub> **2c** ont été préparées à 1 et 10 g/L, les solutions à 1 g/L étant préparées soit par solubilisation directe du copolymère dans l'eau milliQ, soit par dilution de la solution à 10 g/L. L'étude de ces différentes voies de préparation a deux objectifs:

Premièrement, il est important de déterminer la concentration de la solution permettant d'obtenir une intensité diffusée suffisante pour pouvoir exploiter de manière fiable les résultats obtenus et qui soit suffisamment faible pour s'affranchir de toutes interactions entre les objets en solution. L'étude n'étant ici réalisée que sur deux concentrations, seules des valeurs apparentes sont déterminées, ces valeurs pouvant être influées par des interactions et donc différer des valeurs réelles.

Deuxièmement, les solutions ont été préparées soit par solubilisation directe à la concentration finale souhaitée, soit par dilution, et ce afin de vérifier le dynamisme des objets. En effet, une différence devrait être observée si le système est figé et qu'aucune ré-organisation ne se produit après dilution.

Les solutions ont été analysées en diffusion de lumière avant et après filtration (0,45  $\mu$ m).

Les mesures ont mis en évidence la nécessité de filtrer sur 0,45  $\mu$ m avant analyse en diffusion de lumière pour les deux copolymères LP(iPrOx)<sub>28</sub> et LP(EtOx)<sub>26</sub>. Il a été vérifié en UV-visible que la filtration n'entraîne aucune perte de matière significative mais elle permet d'éliminer les agrégats parasites qui sont présents en quantité négligeable, mais viennent parfois perturber le signal DLS aux temps longs, et augmenter l'intensité diffusée (cf. annexe 2).

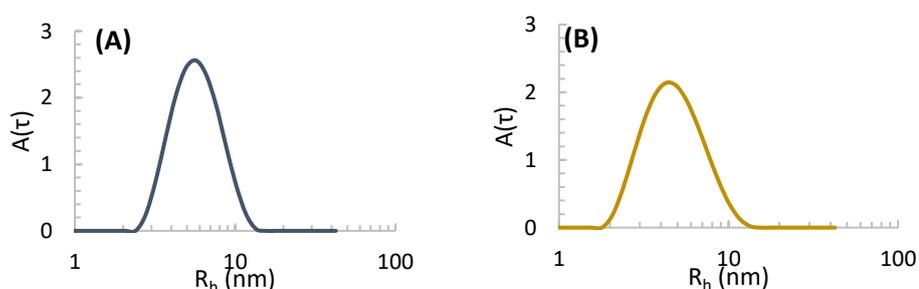


Figure 6 : Distributions des  $R_h$  (échelle log) de solutions filtrées (0,45  $\mu$ m) de (A) LPiPrOx et (B) LPEtOx à 10 g/L dans l'eau, mesurée à 90°

Les solutions filtrées ne présentent qu'une seule population correspondant à des objets micellaires petits et probablement sphériques (Figure 6).

Les résultats obtenus pour des solutions de LP(iPrOx)<sub>28</sub> et LP(EtOx)<sub>26</sub> dans l'eau milliQ, à 10 g/L et 1 g/L (direct ou dilution) sont donnés dans le Tableau 3.

M<sub>app</sub> est la masse molaire apparente des objets, c'est-à-dire leur masse molaire calculée en considérant la possibilité que des interactions existent entre les micelles.

Tableau 3 : Comparaison des différents chemins de préparation pour les solutions aqueuses de LP(EtOx)<sub>26</sub> et LP(iPrOx)<sub>28</sub>. Les solutions ont été filtrées sur 0,45 µm et analysées à 20 °C.

Polymère	Solution	M <sub>app</sub> (x 10 <sup>4</sup> g/mol)	N <sub>ag</sub> *	R <sub>h</sub> (nm)
LP(iPrOx) <sub>28</sub>	10 g/L	6,3	15	5,5
	1 g/L (dilution 10 g/L)	7,7	18	6,0
	1 g/L direct	11	26	7,0
LP(EtOx) <sub>26</sub>	10 g/L	5,3	12	5,0
	1 g/L (dilution 10 g/L)	7,7	17	6,0
	1 g/L direct	13	29	7,0

\* Le N<sub>ag</sub> a été déterminé grâce au rapport  $M_{app}/\overline{M}_w(LPOx)$ , où  $\overline{M}_w$  est la masse molaire en masse d'une chaîne de polymère.

Les valeurs de la masse apparente et du rayon hydrodynamique des solutions de LPiPrOx et LP(EtOx)<sub>26</sub> à 10 g/L et 1 g/L (obtenue par dilution) sont très proches, ce qui signifie que la dilution impacte peu les objets micellaires présents en solution. Il est donc possible de supposer que les interactions sont négligeables en solution, et donc que la masse molaire apparente et le rayon hydrodynamique apparent sont proches des valeurs réelles de M<sub>w</sub> et R<sub>h</sub> du système.

Le très faible écart observé entre les solutions à 10 g/L et celles à 1 g/L obtenues par dilution peut être dû :

- A la présence de méthanol résiduel dans la solution à 10 g/L issu de la méthode de préparation de la solution. Afin d'obtenir une solution finale parfaitement limpide, le copolymère est d'abord pré-solubilisé dans du méthanol, puis la solution méthanolique est ajoutée au goutte à goutte dans de l'eau milliQ. La solution est enfin agitée pendant une nuit pour évaporer la totalité du méthanol. Cependant, on sait que le méthanol est un solvant dissociant. Quelques ppm de méthanol pourraient donc diminuer l'association du système. En

diluant, on diminue la proportion de méthanol résiduel dans l'eau, ce qui peut favoriser l'association.

- A des interactions répulsives menant à une augmentation de  $M_{app}$  quand  $C$  diminue.

NB : à partir des dimensions et masses des objets, on peut calculer  $C^*$  la concentration critique de recouvrement, qui représente la concentration au-dessus de laquelle les pelotes de polymères en solution sont en contact. Elle peut s'écrire comme :

$$C^* = \frac{M_{app}}{\frac{4}{3}\pi R_h^3 N_A}$$

avec  $N_A$  le nombre d'Avogadro.

Pour les valeurs de  $M_{app}$  et  $R_h$  déterminées dans le Tableau,  $C^*$  est de l'ordre de 100 g/L pour le LP(iPrOx)<sub>28</sub> et le LP(EtOx)<sub>26</sub>, donc la concentration des solutions étudiées de 10 g/L est assez éloignée de ces conditions. Par conséquent, les interactions peuvent être négligées à 1 g/L, mais ils pourraient exister des interactions à 10 g/L, qui bien que faibles, suffiraient à expliquer les différences observées entre 1 et 10 g/L.

Le Tableau 3 révèle en plus que les solutions obtenues par dissolution directe du polymère à 1 g/L ont un nombre d'agrégation légèrement plus élevé que celles obtenues par dilution d'une solution à 10 g/L. La différence est relativement significative par rapport à la variation observée entre 10 g/L et 1 g/L par dilution.

La différence de  $R_h$  ne peut pas être considérée comme significative en revanche (Figure 7).

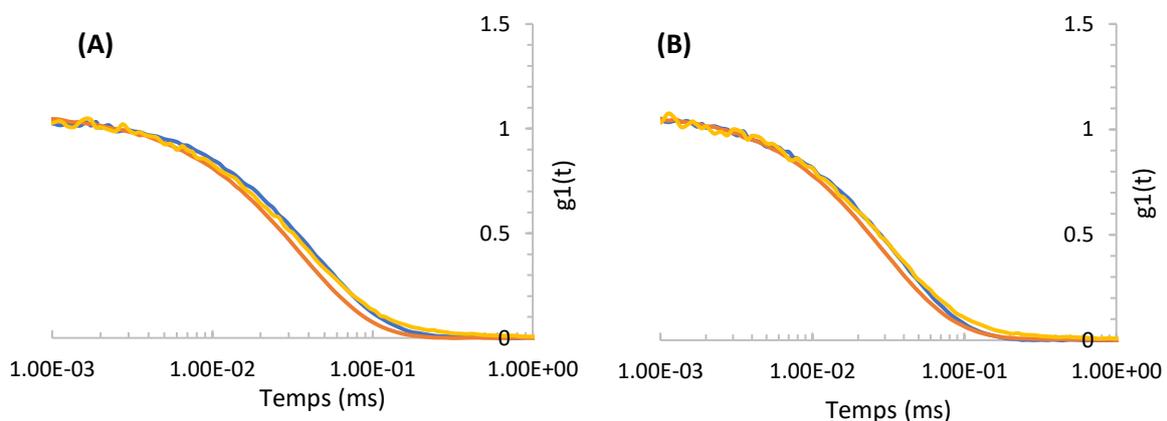


Figure 7 : Fonctions d'autocorrélation de solutions de (A) LP(iPrOx)<sub>28</sub> et (B) LP(EtOx)<sub>26</sub> à (—) 10 g/L et 1 g/L obtenues (—) par dissolution directe ou (—) par dilution dans l'eau milliQ, mesurées à 90°

La variation de  $M_{app}$  entre 1 g/L direct et 1 g/L par dilution ne peut pas être liée à la filtration qui est identique et qui n'entraîne aucune perte de matière. La différence pourrait venir du fait que les solutions préparées directement à 1 g/L ne contiennent pas du tout de méthanol, ce qui augmente leur état d'agrégation. Cette différence ne peut alors pas être considérée comme significative, et ne permet donc pas de conclure sur la dynamique du système.

Pour la suite, on va considérer que les caractéristiques des solutions obtenues par solubilisation directe à 1 g/L sont les plus fiables (absence de méthanol, interactions plus faibles qu'à 10 g/L voire négligeables). Cette concentration de 1 g/L diffuse suffisamment pour obtenir des résultats interprétables en diffusion de lumière, et correspond à l'ordre de grandeur des concentrations utilisées tout au long du projet. Ainsi, on obtient le rayon hydrodynamique, ainsi que le nombre d'agrégation calculé via le rapport de la masse molaire apparente d'une micelle sur la masse molaire en masse  $\overline{M}_w$  d'une chaîne de copolymère.

Par conséquent, les deux copolymères conduisent à des systèmes quasiment identiques en s'auto-organisant sous forme de micelles de **rayon hydrodynamique égal à 7 nm** et de **nombre d'agrégation respectifs de 26 pour le LP(iPrOx)<sub>28</sub> et de 29 pour le LP(EtOx)<sub>26</sub>**.

## II. Mélanges physiques LPiPrOx/LPEtOx

Il a été noté dans la littérature référencée dans l'étude bibliographique (cf. II.) la possibilité de moduler les caractéristiques de systèmes stimuli-sensibles en combinant les propriétés et sensibilités d'au moins deux copolymères grâce à leur mélange physique. Cette approche de mixité est intéressante car elle permet un bon contrôle des systèmes étudiés, tout comme elle permet la synthèse de copolymères statistiques de même composition globale. Cependant, contrairement à l'approche synthétique qui nécessite systématiquement de nouvelles réactions pour obtenir des copolymères statistiques avec des proportions variables en chacun des monomères constitutifs, le mélange physique est une voie bien plus rapide et facile à mettre en œuvre.

Par le mélange physique des deux copolymères LPiPrOx et LPEtOx, nous avons voulu voir s'il était possible de moduler la température de point de trouble globale du système.

Les mélanges physiques peuvent être réalisés de deux façons, soit les copolymères sont mélangés à l'état solide et mis simultanément en solution, soit des solutions individuelles de chacun des copolymères sont préparées puis mélangées postérieurement. Lors des études précédentes sur ce projet, ces différentes voies de préparation ont été testées et ont conduit aux mêmes solutions finales, démontrant le caractère dynamique de ces systèmes micellaires. Toutes les solutions préparées par la suite sont donc issues du mélange des solutions individuelles de chacun des copolymères (Figure 8).

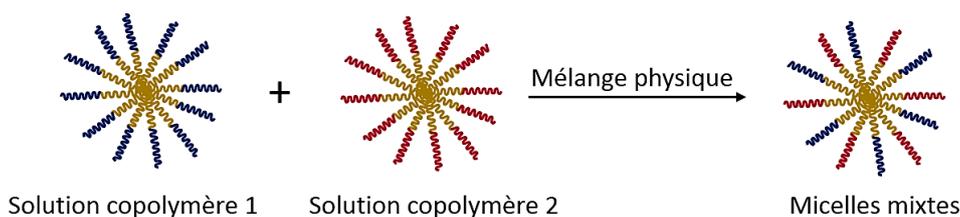


Figure 8 : Schéma illustrant la formation de micelles mixtes attendues après le mélange physique de deux solutions de copolymères différents dans l'eau.

### II.1. Etude des propriétés macroscopiques en spectrophotométrie UV-visible

Les deux copolymères amphiphiles LP(iPrOx)<sub>19</sub> **1a** et LP(EtOx)<sub>21</sub> **2a** mis en solution par dissolution directe puis étudiés individuellement, ont été mélangés physiquement afin d'obtenir des solutions micellaires avec différentes proportions massiques relatives en chacun des copolymères, à une concentration totale de 2 g/L dans le PBS. Les solutions préparées ont ainsi été analysées en spectrophotométrie UV-visible pour en déterminer leur température de point de trouble.

Cette étude permet de compléter les premiers résultats qui avaient été obtenus au préalable, et qui comparaient l'évolution de la  $T_{PT}$  de mélanges physiques LPiPrOx/LPEtOx avec celle de copolymères statistiques lipide-*b*-poly((EtOx)<sub>x</sub>-co-(iPrOx)<sub>y</sub>) de même composition globale <sup>2</sup>. En augmentant la proportion massique en LPEtOx dans le mélange physique de 0 à 52%, il avait été montré que la température de point de trouble du système augmente linéairement, de manière tout à fait comparable au copolymère statistique de même composition globale en EtOx et iPrOx. Cette étude avait également montré qu'au-delà de 52%, il apparaît une

deuxième transition en température correspondant à la température de point de trouble du LP(EtOx). L'origine de cette seconde transition n'avait pas été clairement identifiée.

Afin d'approfondir les résultats précédents obtenus pour quelques proportions en LP(EtOx) dans le mélange physique LP(iPrOx)/LP(EtOx), des mesures de point de trouble ont été réalisées avec le spectrophotomètre UV-visible, sur des solutions LP(iPrOx)<sub>19</sub>/LP(EtOx)<sub>21</sub> avec une proportion massique en LP(EtOx) variant de 0 à 100 % et un pas de 5 % entre chaque mélange. Cette étude permet d'une part de préciser le comportement en température des mélanges physiques, et d'autre part de déterminer beaucoup plus finement la proportion en LP(EtOx) à partir de laquelle apparaît la deuxième transition.

Dans un souci de clarté, les courbes d'évolution de l'absorbance en fonction de la température obtenues en UV-visible et leurs dérivées n'ont pas toutes été reportées sur la Figure 9 (seulement de 10 % en 10 %).

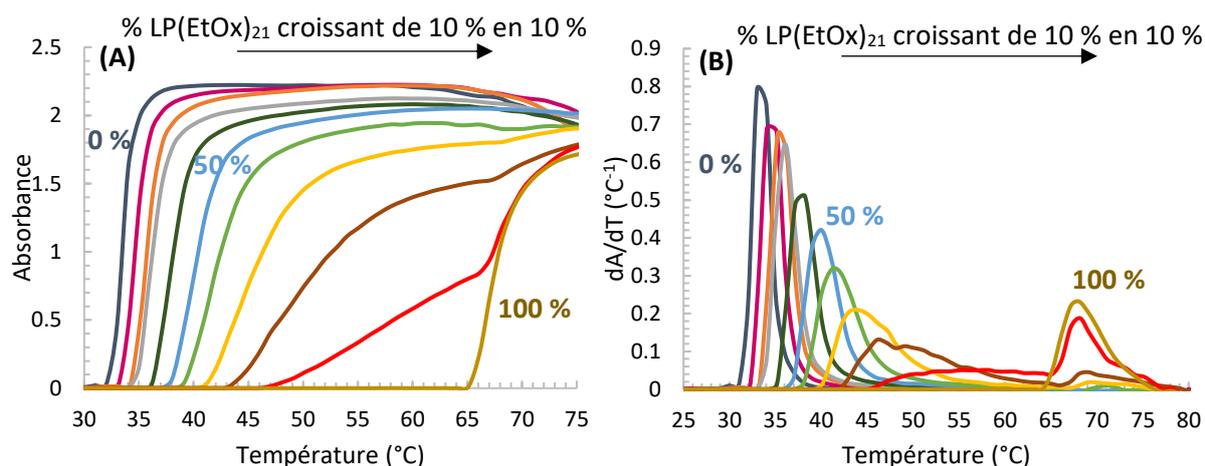


Figure 9 : (A) Spectres d'absorbance UV-visible de mélanges physiques LP(iPrOx)<sub>19</sub>/LP(EtOx)<sub>21</sub> (w:w)% dans le PBS à 2 g/L en fonction de la température et (B) leur dérivées. Montée en T de  $v = 0,5$  °C/min, 1 mesure tous les 1 °C.

Les mesures au spectrophotomètre UV-visible (Figure 9) montrent une augmentation significative de la température de point de trouble avec l'augmentation de la proportion massique en LP(EtOx)<sub>21</sub>. Ces résultats peuvent être dissociés en deux parties, la première pour des proportions massiques inférieures à 60 % en LP(EtOx)<sub>21</sub> et la deuxième pour des proportions massiques supérieures à 60 % en LP(EtOx)<sub>21</sub>.

De 0 à 60 % en LP(EtOx)<sub>21</sub>, une seule température de point de trouble intermédiaire à celles des deux copolymères apparaît pour le mélange. Le tracé de la température de point de trouble en fonction de la fraction massique en LP(EtOx)<sub>21</sub> dans le mélange (Figure 10) montre d'ailleurs une évolution linéaire de la température de point de trouble de 0 à 60% en LP(EtOx)<sub>21</sub>.

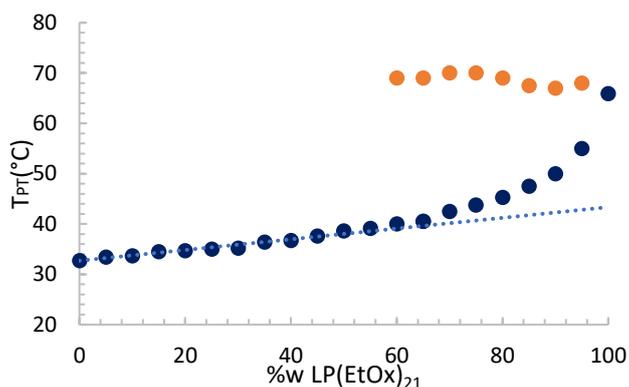


Figure 10 : Evolution de la T<sub>PT</sub> des mélanges LP(iPrOx)<sub>19</sub>/LP(EtOx)<sub>21</sub> dans le PBS à 2 g/L en fonction de la proportion massique en LP(EtOx)<sub>21</sub>

De plus, d'après les résultats démontrant que la concentration a très peu d'influence sur la température de point de trouble des copolymères (cf. I.2.1.), il est ici tout à fait possible d'affirmer que l'évolution de la T<sub>PT</sub> ne peut être due à la variation de la concentration de chaque copolymère dans le mélange, la concentration totale de la solution étant constante.

Une autre expérience a été réalisée pour vérifier que l'hybridation des deux copolymères amphiphiles au sein d'une même micelle est nécessaire pour permettre la forte variation de la T<sub>PT</sub> du mélange.

Des mesures de point de trouble ont été réalisées, dans les mêmes conditions que les expériences précédentes, mais cette fois-ci sur des mélanges copolymère LPOx/homopolymère POx, à différentes proportions massiques en chaque constituant mais à concentration totale constante.

Des solutions préparées avec le copolymère LPiPrOx et l'homopolymère PiPrOx ( $\overline{M}_n = 2100$  g/mol, T<sub>PT,1 g/L</sub> = 60 °C) ou PEtOx ( $\overline{M}_n = 2200$  g/mol, T<sub>PT</sub> > 85 °C) ont été analysées en UV-visible pour déterminer leur température de point de trouble en fonction de la proportion massique en copolymère et homopolymère, la concentration totale de la solution étant constante (Figure 11).

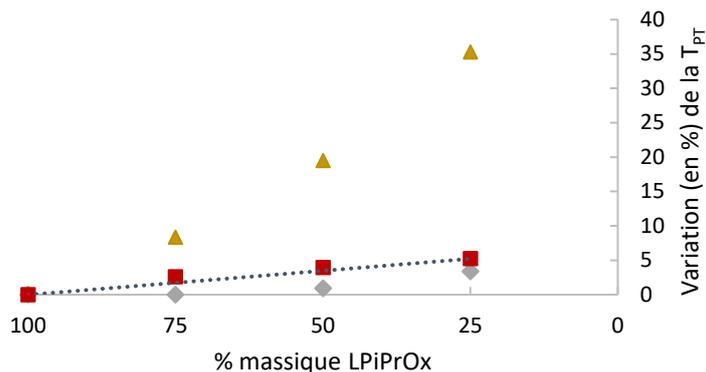


Figure 11 : Variation de la température de point de trouble (en % par rapport au LPiPrOx pur) en fonction de la proportion massique de LPiPrOx dans les mélanges (▲) LPiPrOx/LPEtOx (2 g/L), (◆) LPiPrOx/PEtOx (2 g/L) et (■) LPiPrOx/PiPrOx (1 g/L). La ligne pointillée représente la variation de  $T_{PT}$  d'une solution de LPiPrOx seul en fonction de sa concentration dans chaque mélange.

La ligne pointillée représente la variation de la  $T_{PT}$  du LPiPrOx sur la gamme de concentrations étudiée. Les valeurs obtenues pour les différents couples sont donc comparées au LPiPrOx seul pour savoir si la présence de l'homopolymère en solution impacte la  $T_{PT}$  des micelles (Figure 11).

Lorsque le LPiPrOx est en présence de PiPrOx, la variation de la  $T_{PT}$  suit la tendance imposée par le LPiPrOx seul. La simple présence du PiPrOx en solution avec les micelles de LPiPrOx n'a par conséquent aucune influence sur la température de point de trouble de ce dernier.

Dans le cas du couple LPiPrOx/PEtOx, si l'on trace la variation en % de la température de point de trouble mesurée pour les différentes proportions, les valeurs suivent exactement la tendance imposée par le LPiPrOx seul, ce qui montre que le comportement des micelles de LPiPrOx n'est pas impacté par la présence des chaînes hydrophiles de PEtOx environnantes.

A titre de comparaison, l'évolution de la température de point de trouble pour le couple LPiPrOx/LPEtOx en fonction de la fraction massique en LPiPrOx a également été reportée sur le graphique de la Figure 11. Cette fois-ci, une variation de la  $T_{PT}$  de près de 35% est observée entre 25 et 100 % en LPiPrOx.

Par comparaison avec les mélanges LPiPrOx/PEtOx et LPiPrOx/PiPrOx (variation d'environ 5%), il est donc clairement visible que la présence d'homopolymère PiPrOx ou PEtOx n'a aucune influence sur la  $T_{PT}$  du LPiPrOx dans le mélange, quelles que soient leurs proportions relatives. Ces résultats en spectrophotométrie UV-visible tendent donc à confirmer que la co-existence des deux copolymères au sein d'une même micelle est nécessaire pour obtenir une modulation de la température de point de trouble. Cela démontre donc de façon indirecte la

formation de micelles mixtes lors des mélanges physiques des copolymères amphiphiles LPiPrOx et LPEtOx.

Premièrement, au-delà de 60% en LPEtOx, les valeurs de  $T_{PT}$  obtenues ne suivent plus la régression linéaire des proportions précédentes et on s'éloigne des copolymères statistiques de composition identique (40 °C pour 42 % en EtOx et 54 °C pour 75 % en EtOx) <sup>2</sup>.

Deuxièmement, il apparaît en plus une seconde transition dont la température correspond à la température de point de trouble du LPEtOx pur. Deux hypothèses étaient avancées dans l'étude précédente pour expliquer l'apparition de cette deuxième transition et l'écart observé avec le copolymère statistique. Soit une population de micelles uniquement composées de LPEtOx est présente initialement à cette proportion dans le mélange, soit elle apparaît par démixtion lors de la chauffe.

## II.2. Etude en diffusion de la lumière

Afin de compléter l'étude des propriétés macroscopiques obtenues lors du mélange physique des deux copolymères LPOx, des mesures en diffusion de lumière ont été réalisées sur les mélanges physiques LPiPrOx **1c**/LPEtOx **2c** (issus des solutions préparées par dissolution directe) pour déterminer leurs caractéristiques.

Des mélanges physiques LPiPrOx/LPEtOx ont été préparés à une concentration totale de copolymère constante (1 g/L). Les solutions ont été préparées, filtrées (0,45  $\mu$ m) et analysées immédiatement à  $T = 20$  °C.

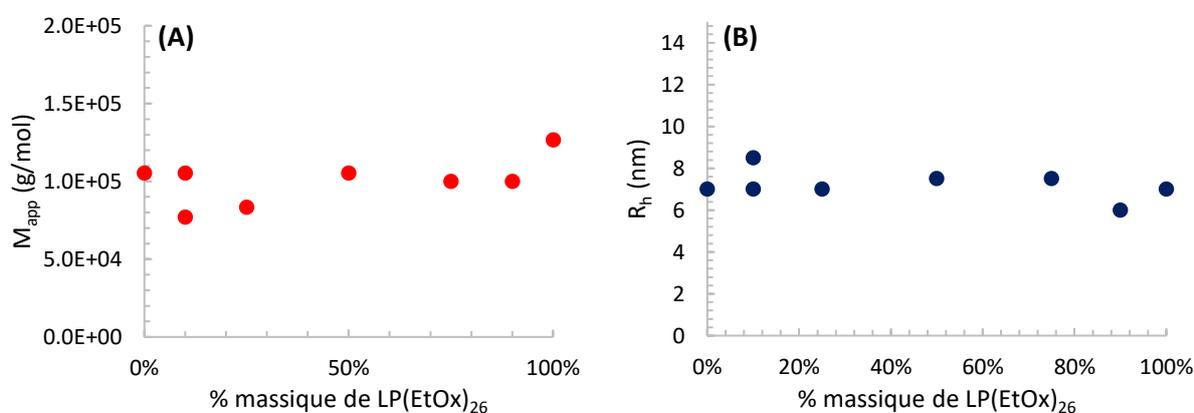


Figure 12 : Evolution (A) de la masse molaire apparente  $M_{app}$  et (B) du rayon hydrodynamique  $R_h$  avec le % massique en LP(EtOx)<sub>26</sub> dans le mélange à 20 °C et 1 g/L de concentration totale en polymère

Dans la partie précédente (cf. I.4.3), des mesures en diffusion de la lumière sur des solutions de LP(iPrOx)<sub>28</sub> et LP(EtOx)<sub>26</sub> à 1 g/L avaient permis de déterminer un rayon hydrodynamique de 7 nm pour les deux copolymères et un nombre d'agrégation de 26 (ou  $M_{app} = 1,1 \cdot 10^5$  g/mol) pour le LP(iPrOx)<sub>28</sub> et de 29 (ou  $M_{app} = 1,3 \cdot 10^5$  g/mol) pour le LP(EtOx)<sub>26</sub>.

Les résultats (Figure 12) révèlent que les objets de LP(EtOx)<sub>26</sub> et LP(iPrOx)<sub>28</sub> seuls, ainsi que leurs mélanges, sont identiques en termes de  $M_{app}$  et  $R_h$  dans la barre d'erreur. On ne peut donc pas conclure par la diffusion de lumière à température ambiante sur les deux scénarios possibles :

- Soit il n'y a pas hybridation.

- Soit les deux copolymères forment des micelles hybrides mais dont les caractéristiques sont identiques à celles des micelles de départ. Cette hypothèse ne serait pas surprenante car :

- Le nombre d'agrégation  $N_{ag}$  des polymères est contrôlé par la partie hydrophobe (identique) et l'hydrophilie du bloc hydrophile (proche car même degré de polymérisation et nature chimique similaire menant en tout cas à une forte hydrophilie pour les deux polymères à 20°C).
- Le rayon hydrodynamique  $R_h$  est contrôlé par le nombre d'agrégation (qu'on attend identique ici) et le degré de polymérisation des bras (identique).

Les mesures à  $T = 20$  °C n'ont donc pas permis de démontrer directement la mixité des systèmes à cause des trop grandes similitudes entre ces derniers.

Une étude en température a donc été faite sur le mélange LPiPrOx/LPEtOx 10/90 (%w/%w).

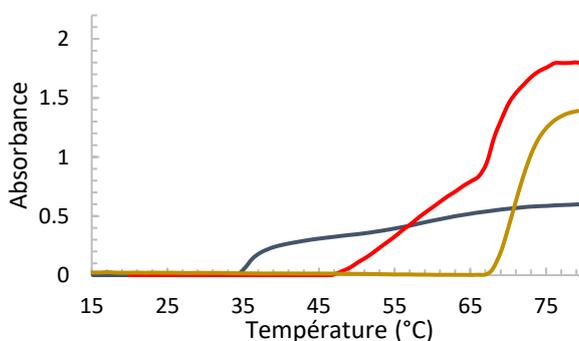


Figure 13 : Spectres d'absorbance de solutions de (—) LP(iPrOx)<sub>19</sub> 0,1 g/L, (—) LP(EtOx)<sub>21</sub> 1 g/L et (—) LP(iPrOx)<sub>19</sub>/LP(EtOx)<sub>21</sub> (10/90 w/w) avec concentration totale de 1 g/L, dans le PBS.

D'après les mesures UV-visible (Figure 13), à la concentration à laquelle ils sont chacun dans le mélange LPiPrOx/LPEtOx 10/90, les deux copolymères LP(iPrOx)<sub>19</sub> **1a** et LP(EtOx)<sub>21</sub> **2a** présentent des températures de point de trouble de 35 et 67 °C respectivement, tandis que le mélange montre deux transitions à 50 et 67 °C. Le bain thermostaté de l'appareil de diffusion de lumière a donc été fixé à 45 °C pour être au-dessus de la T<sub>PT</sub> du LPiPrOx mais juste en dessous de celle du mélange, et ce afin de conserver une solution limpide pour le mélange. A cette proportion (LPiPrOx 0,1 g/L), bien que la solution soit transparente, la valeur non nulle de l'absorbance indique l'apparition de diffusion multiple qui rend l'interprétation des valeurs expérimentales très difficile.

Compte tenu des T<sub>PT</sub> caractéristiques de chaque solution, à 45 °C, on s'attend alors à mesurer des caractéristiques d'objets micellaires pour le LPEtOx qui n'a pas passé sa T<sub>PT</sub>, et des agrégats plus volumineux pour le LPiPrOx qui est au-dessus de sa T<sub>PT</sub>. Quant au mélange 10/90, deux possibilités sont envisagées. Soit deux populations coexistent (des micelles de LPEtOx et des agrégats de LPiPrOx), soit il y a bien hybridation entre les deux copolymères et une seule population est visible car le LPEtOx stabilise le LPiPrOx et empêche la formation d'agrégats de taille plus importante.

L'intensité diffusée par le mélange et par chacun des copolymères LP(iPrOx)<sub>28</sub> **1c** et LP(EtOx)<sub>26</sub> **2c** dans des solutions pures de mêmes concentrations que dans le mélange, a été mesurée (Tableau 4).

Tableau 4 : Caractéristiques du mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/LP(EtOx)<sub>26</sub> 10/90 en masse à 1 g/L en concentration totale pour T = 45°C et comparaison aux solutions de copolymères seuls.

Echantillon	C totale (g.L <sup>-1</sup> )	1/M <sub>app</sub> (mol.g <sup>-1</sup> )	M <sub>app</sub> (g.mol <sup>-1</sup> )	R <sub>h</sub> (nm)	R/K = M <sub>app</sub> *C (g <sup>2</sup> .mol <sup>-1</sup> .L <sup>-1</sup> )
(A) 0,1 g/L LP(iPrOx) <sub>28</sub>	0,1	1,6.10 <sup>-8</sup>	6,3.10 <sup>7</sup>	100	6,3.10 <sup>6</sup>
(B) 0,9 g/L LP(EtOx) <sub>26</sub>	0,9	1,0.10 <sup>-5</sup>	1,0.10 <sup>5</sup>	6	8,8.10 <sup>4</sup>
Somme mathématique de (A)+(B) (Supposant non hybridation)	1	1,6.10 <sup>-7</sup>	6,4.10 <sup>6</sup>	82	6,4.10 <sup>6</sup>
(C) 0,1 g/L LP(iPrOx) <sub>28</sub> + 0,9 g/L LP(EtOx) <sub>26</sub>	1	1,0.10 <sup>-5</sup>	1,0.10 <sup>5</sup>	6	9,7.10 <sup>4</sup>

On observe tout d'abord qu'à 45 °C, le LPiPrOx est bien sous forme d'agrégats, ce qui est démontré par les valeurs élevées de  $M_{app}$  et de  $R_h$ , et que les micelles de LPEtOx sont préservées. Quant au mélange, il est représenté par la dernière ligne du Tableau 4, et montre la présence de micelles et non d'agrégats, ce qui reflète l'incorporation du LPiPrOx dans des micelles mixtes.

En outre, si on calcule l'intensité diffusée et le rayon hydrodynamique théoriques attendus en l'absence d'hybridation, on trouve que les valeurs théoriques de ces deux grandeurs sont bien plus grandes que celles mesurées expérimentalement.

En conséquence, la comparaison qualitative entre le LPEtOx, le mélange et le LPiPrOx à 45 °C permet de mettre en évidence une différence de comportement entre les deux premiers qui prouve l'hybridation. De plus, l'analyse du mélange à 45 °C par diffusion de la lumière peut être faite de façon quantitative pour pouvoir déduire les caractéristiques des objets formés.

D'après les résultats obtenus, il y a donc très clairement hybridation du système menant à des micelles hybrides stables alors que LPiPrOx seul dans les mêmes conditions forme des agrégats. Cette étude de diffusion de lumière en température vient donc appuyer les résultats obtenus en spectrophotométrie UV-visible qui indiquaient la formation de micelles mixtes.

### II.3. Etude en micro-DSC

L'appareil de micro-DSC (ou microcalorimétrie haute pression) permet d'observer des phénomènes endothermiques et exothermiques par mesure des échanges de chaleur, comme une DSC classique. En revanche, elle a l'avantage de pouvoir analyser de manière très sensible de faibles volumes de solutions pour des températures allant de -45 °C à 120 °C.

La transition macroscopique observée en UV-visible lors de l'augmentation de la température a été également étudiée en micro-DSC (Microcalorimétrie à balayage) avec une vitesse de chauffe de 0,5 °C/min identique à celle utilisée en UV-visible.

Des solutions de LP(iPrOx)<sub>28</sub> **1c** ( $T_{PT,1g/L} = 38$  °C) à 10 g/L et LP(EtOx)<sub>26</sub> **2c** ( $T_{PT,1g/L} = 72$  °C) à 30 g/L ont été analysées dans l'eau distillée. Les mesures en spectrophotométrie UV-visible étant faites dans le PBS, les valeurs de point de trouble obtenues avec l'une et l'autre des techniques peuvent être légèrement différentes. De plus, la micro-DSC caractérise le phénomène au

niveau microscopique alors que l'UV-visible le caractérise au niveau macroscopique, et donc se produisant généralement avec un léger retard.

Les thermogrammes obtenus pour les deux copolymères sont représentés en Figure 14.

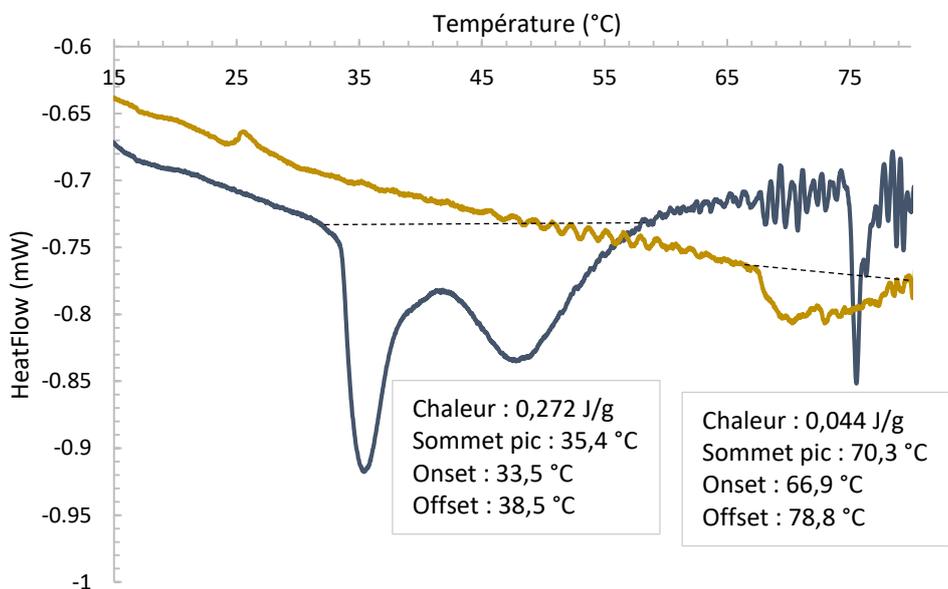


Figure 14 : Thermogramme d'une solution de (—) LP(iPrOx)<sub>28</sub> à 10 g/L et (—) LP(EtOx)<sub>26</sub> à 29,5 g/L dans l'eau distillée. Montée en température à  $v = 0,5$  K/min.

Pour le LPiPrOx, le thermogramme montre deux transitions endothermiques successives. Pour le LPEtOx, la transition est nettement moins énergétique même à une concentration trois fois plus élevée que celle du LPiPrOx.

L'hypothèse avancée pour expliquer le double pic est que lorsque la température de la solution augmente et atteint la température de point de trouble du copolymère, la partie hydrophile des copolymères se déshydrate et entraîne l'apparition d'interactions intra- et interchaines dans la couronne, mais les micelles individuelles sont dans un premier temps préservées (Figure 15). Si la température continue à augmenter, la solubilité continue à diminuer et les micelles vont progressivement se désolvater et s'agréger les unes aux autres, conduisant au second pic. Par conséquent, des objets formés lors de cette agrégation présentent une taille suffisamment importante pour observer l'apparition d'un trouble à l'échelle macroscopique détectable en UV-Visible.

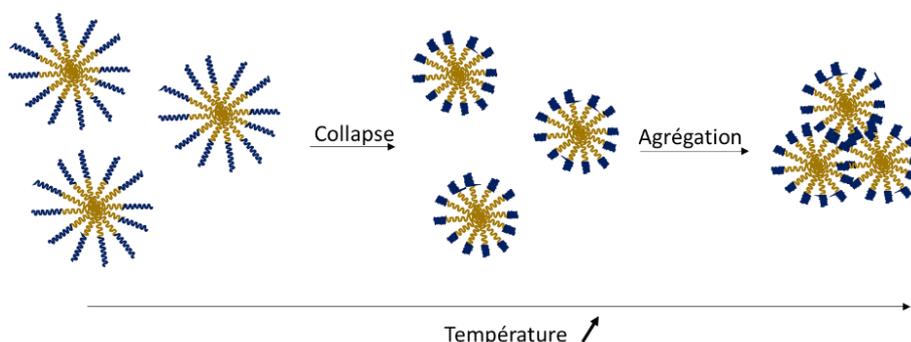


Figure 15 : Représentation schématique du comportement des micelles de LPOx en solution aqueuse lors d'une augmentation de la température.

Des mesures en micro-DSC ont ensuite été faites sur des mélanges LP(iPrOx)<sub>28</sub>/LP(EtOx)<sub>26</sub> pour étudier les interactions entre les deux copolymères présents en solution lors de la chauffe. Une première solution contenant 50% massique en chacun des copolymères a été préparée dans l'eau et analysée (Figure 16).

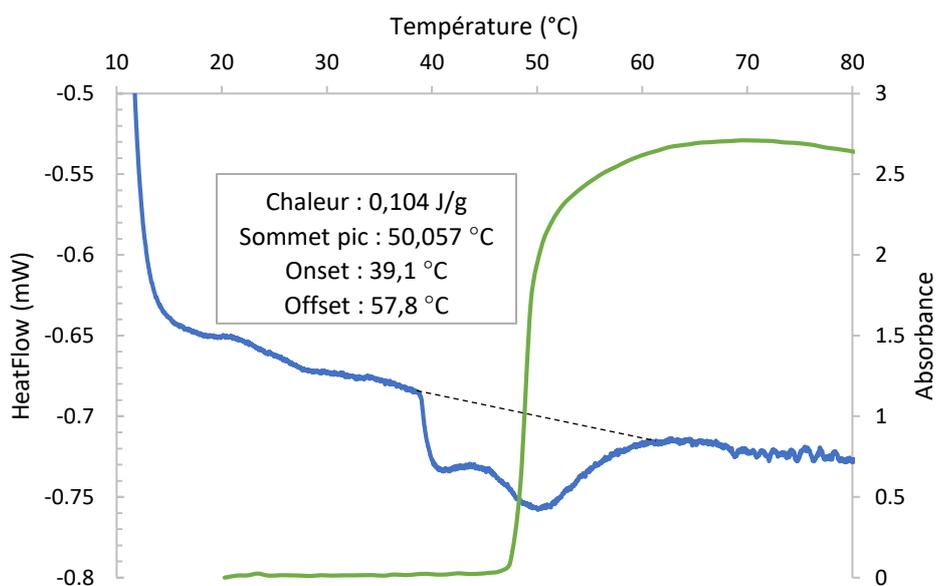


Figure 16 : Thermogramme d'un mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/LP(EtOx)<sub>26</sub> 50/50 (w/w) à 10 g/L dans l'eau distillée. Montée en température à  $v = 0,5$  K/min. Superposition du spectre UV-visible obtenu avec la même solution.

Le thermogramme obtenu sur le mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/LP(EtOx)<sub>26</sub> 50/50 montre deux pics comme la solution de LP(iPrOx)<sub>28</sub> analysée précédemment.

D'abord, il est important de mentionner que, comme les  $N_{ag}$  des deux copolymères sont proches, il est raisonnable de supposer que les ratios LPiPrOx/LPEtOx dans les micelles sont proportionnels aux ratios LPiPrOx/LPEtOx en solution.

Lorsque la proportion massique en LPiPrOx est supérieure à 40 % en solution, et lorsque la température dépasse son point de trouble, les chaînes de LPiPrOx qui se déshydratent au profit d'interactions interchaines sont suffisamment nombreuses pour entraîner une agrégation importante avec les micelles environnantes. Il est donc possible de considérer que tout le système est agrégé (Figure 17). Cette conclusion coïncide d'ailleurs avec le fait que la courbe d'absorbance qui reflète la turbidité et donc la formation d'agrégats, débute à peu près au niveau de la deuxième transition.

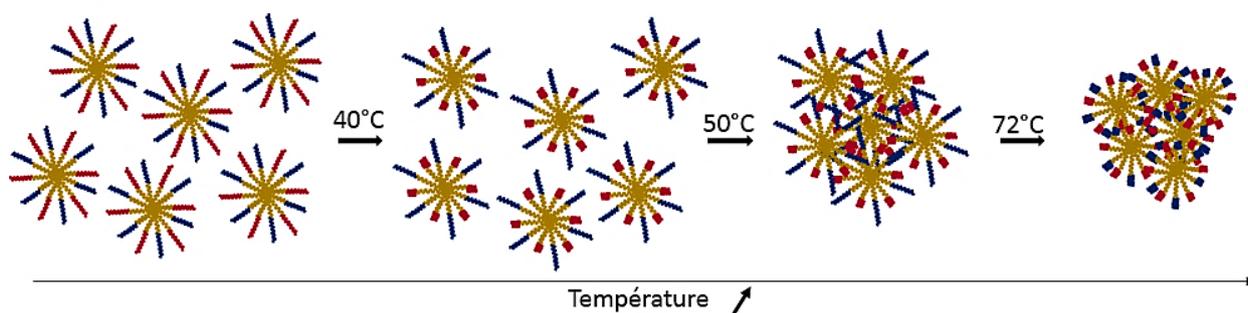


Figure 17 : Représentation schématique du comportement hypothétique des micelles mixtes LPiPrOx/LPEtOx en solution aqueuse, en fonction de la température, avec une proportion massique en LPEtOx inférieure à 60%. Les températures indiquées correspondent au mélange 50/50 (w/w).

Les techniques d'analyse utilisées précédemment ne permettant pas la compréhension du phénomène de la deuxième transition visible pour des fortes proportions en LPEtOx, un mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/LP(EtOx)<sub>26</sub> 20/80 a également été analysé en micro-DSC pour tenter de comprendre le comportement des copolymères en solution et leurs interactions lors d'une augmentation de température (Figure 18).

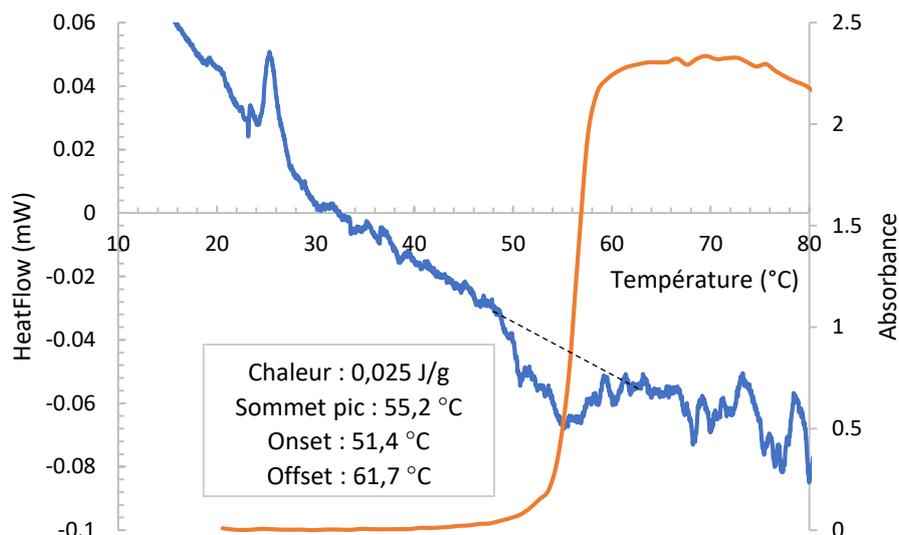


Figure 18 : Thermogramme d'un mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/LP(EtOx)<sub>26</sub> 20/80 (w/w) à 20 g/L dans l'eau distillée. Montée en température à  $v = 0,5$  K/min. Superposition du spectre UV-visible obtenu avec la même solution.

D'abord, la superposition de la courbe d'absorbance avec la courbe de micro-DSC permet à nouveau de voir une corrélation de la température de transition mesurée par ces deux techniques. De plus, de façon intéressante, pour cette proportion LP(iPrOx)<sub>28</sub>/LP(EtOx)<sub>26</sub> 20/80 et à cette concentration totale de 20 g/L, l'absorbance ne présente qu'une seule transition alors qu'à une concentration plus faible (2 g/L), une seconde transition correspondant au point de trouble du LP(EtOx) était également visible. Une saturation du signal due à la concentration élevée de la solution pourrait être à l'origine de ce phénomène. Cependant, il est aussi possible qu'à cette concentration, les micelles soient si proches les unes des autres que cela favorise l'agrégation rapide de tout le système.

Deuxièmement, une seule transition est visible ici, avec une endothermie beaucoup plus faible et une forme qui se rapproche de celle du LP(EtOx) seul. Ce résultat va donc également dans le sens d'une hybridation totale du système quelle que soit la proportion entre les deux copolymères.

Finalement, l'ensemble des résultats obtenus via les différentes techniques présentées précédemment nous ont amené à envisager une nouvelle hypothèse pour la double transition obtenue au-delà de 60 % en LP(EtOx).

Lorsque la proportion massique de LPiPrOx est inférieure à 40 %, la deshydratation des chaînes de LPiPrOx ne serait suivie que d'une agrégation partielle du système, celle-ci étant limitée par la forte proportion de LPEtOx dans le milieu entraînant une dilution des chaînes PiPrOx qui se rencontrent et s'agrègent donc de façon plus limitée. Ainsi l'agrégation totale du système ne serait observée pour ces proportions que lorsque la température de point de trouble du LPEtOx est atteinte, d'où la deuxième transition observée en UV-Visible (Figure 19).

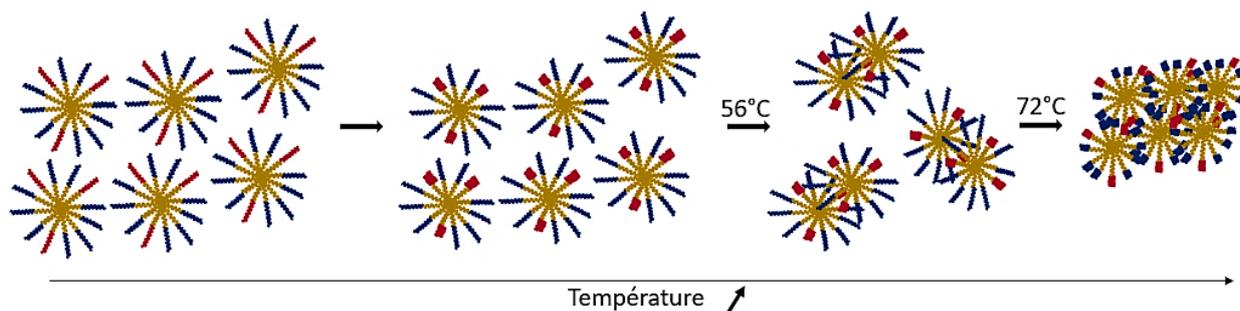


Figure 19 : Représentation schématique du comportement hypothétique des micelles mixtes LPiPrOx/LPEtOx en solution aqueuse, en fonction de la température, avec une proportion massique en LPEtOx supérieure à 60%. Les températures indiquées correspondent au mélange 20/80 (w/w).

#### II.4. Etude de la deuxième transition par réticulation du cœur des micelles

Afin d'améliorer la compréhension du comportement des micelles LPiPrOx/LPEtOx à haute proportion en LPEtOx, et d'écarter définitivement l'hypothèse d'une hétérogénéité de départ dans la composition du mélange, il a été envisagé de réticuler chimiquement le cœur des micelles pour bloquer les échanges unimères-micelles se produisant constamment en solution.

Le cœur des micelles est constitué de chaînes lipidiques insaturées. Un dithiol, encapsulé dans le cœur des micelles, peut donc lier les chaînes polymères entre elles par réaction thiol-ène entre les fonctions -SH du dithiol et les insaturations des chaînes lipidiques présentes dans le cœur. Cette réaction a été réalisée dans l'équipe il y a quelques années, et a permis de réticuler des micelles mixtes lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline)/lipide-*b*-poly(acide acrylique) en présence d'un équivalent d'éthylène glycol dithioacétate (EGBMA) par insaturation de la chaîne lipidique, par irradiation pendant 30 minutes avec une lampe Hg-Xe (Hamamatsu, LCL8) qui émet un rayonnement d'intensité  $170 \text{ mW.cm}^{-2}$  à  $365 \text{ nm}$ <sup>6</sup>. Cette lampe émet également dans le domaine IR ce qui a pour conséquence d'échauffer la solution.

La problématique majeure pour adapter cette approche sur le système LPiPrOx/LPEtOx est la mise en place d'un protocole adéquat pour éviter de trop chauffer la solution aqueuse lors de l'irradiation, car la  $T_{PT}$  du LPiPrOx est très basse. Ainsi, un échauffement trop important ferait précipiter le LPiPrOx, entraînant la réticulation d'agrégats non représentatifs du mélange initial. Plusieurs protocoles ont été testés en présence d'un équivalent d'éthylène glycol dithioacétate par chaîne de copolymère. Le nombre moyen d'insaturations par chaîne étant de 2, cela revient à un ratio thiol/insaturation de 1. La structure de l'EGBMA est donnée sur la Figure 20 ci-dessous.

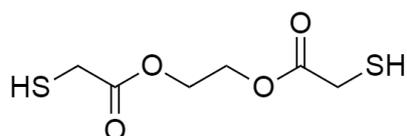


Figure 20 : Structure chimique de l'éthylène glycol dithioacétate utilisé pour la réticulation du coeur lipidique par réaction thiol-ène

Le premier protocole met en jeu une réaction thiol-ène sous UV avec la même lampe polychromatique que dans l'étude précédente, la solution micellaire irradiée étant plongée dans un bain de glace pour éviter l'échauffement de la solution. Après une heure de réaction en changeant le bain de glace toutes les 30 min, la température du milieu réactionnel est de 16 °C, mais la solution est légèrement trouble. Pour comprendre l'apparition de ce trouble, la solution a été analysée au nanosizer, comme le montre la Figure 21.

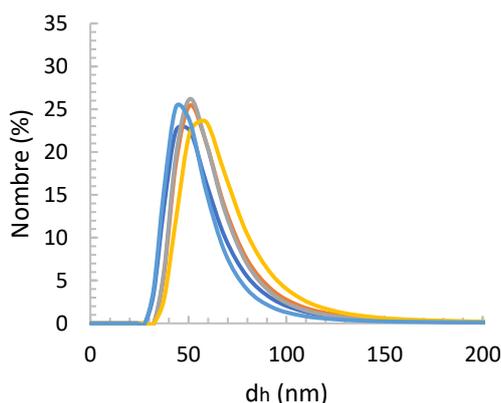


Figure 21 : Mesures au nanosizer des solutions LPiPrOx/LPEtOx 20/80 %(w/w) + EGBMA irradiée 1h sous la lampe polychromatique.

De manière assez prévisible, la mesure de taille des objets en solution après la réaction de réticulation sous la lampe polychromatique a permis de mettre en avant la formation

d'agrégats, d'où le trouble observé en fin de réaction. Ces agrégats ont éventuellement pu se former à cause d'une élévation localisée de la température. Ce protocole ne convient donc pas pour la réticulation de nos systèmes thermosensibles.

Le deuxième protocole testé utilise une lampe monochromatique haute intensité à 365 nm (AnalytikJena, 100W). Lors de cette réaction, 0,2 équivalent (par molécule de dithiol) de photoamorceur 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA) a été introduit pour favoriser le greffage du thiol sur les insaturations peu réactives de la chaîne lipidique. Cette réaction a été réalisée sur une unique solution de copolymères LPiPrOx/LPEtOx 20/80 dans laquelle ont été introduits le dithiol et le photoamorceur.

Une analyse de ces solutions au nanosizer a permis de déterminer la taille des objets présents en solution après réaction (Figure 22).

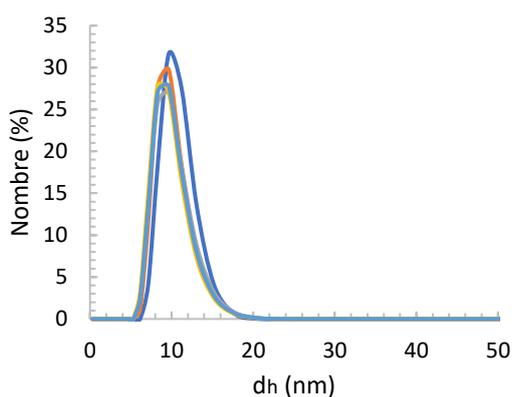


Figure 22 : Mesures au nanosizer des solutions LPiPrOx/LPEtOx 20/80 %(w/w) + EGBMA irradiée 2h à 365 nm en présence de DMPA.

De manière très intéressante, le second protocole avec la lampe UV à 365 nm permet la conservation des micelles initialement formées mais sont-elles réticulées ?

Pour le vérifier, cette solution a également été analysée en fluorescence en présence de pyrène à différentes concentrations en copolymères.

Le pyrène est une molécule fluorescente sensible à la polarité du milieu dans lequel il se trouve, et son émission de fluorescence diffère s'il se trouve en milieu hydrophobe ou en solution aqueuse<sup>7</sup>. Le suivi de ses spectres d'émission ou d'excitation permet ainsi de détecter l'apparition de clusters hydrophobes dans une solution.

Toutes les solutions sont préparées par dilution d'une solution mère pour obtenir une gamme de concentrations variables en copolymère. Avant réticulation, on observe une transition du pyrène d'un milieu hydrophobe ( $I_{338}/I_{333} > 0,8$ ) vers un milieu hydrophile ( $I_{338}/I_{333} \sim 0,5$ ) lorsque la concentration passe sous la cmc du système (autour de 20 mg/L soit environ  $6,7 \cdot 10^{-6}$  mol/L) du fait de la dissociation des micelles (Figure 23). Après irradiation pendant 2h avec la lampe monochromatique, on observe que le rapport  $I_{338}/I_{333}$  reste au dessus de 0,8 sur toute la gamme de concentration étudiée. Cela démontre la préservation de clusters hydrophobes en deça de la cmc du système et donc l'efficacité de la réaction de réticulation.

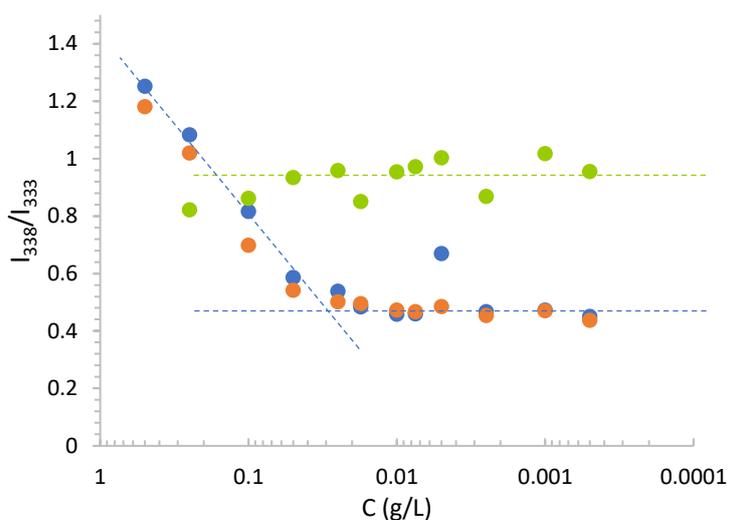


Figure 23 : Mesures de cmc de solutions LPIPrOx/LPEtOx 20/80 % (w/w) + EGBMA + DMPA à différentes concentrations en présence de pyrène après réaction de réticulation par thiol-ène sous irradiation à 365 nm pendant (●)  $t_0$ , (●) 1h, (●) 2h.

Le système réticulé a ensuite été étudié en turbidimétrie avec deux cycles chauffe/refroidissement afin de suivre l'évolution du signal, et de détecter un éventuel changement de comportement comparé au système non réticulé.

Seule la solution irradiée 2h ayant été complètement réticulée est représentée sur la Figure 24.

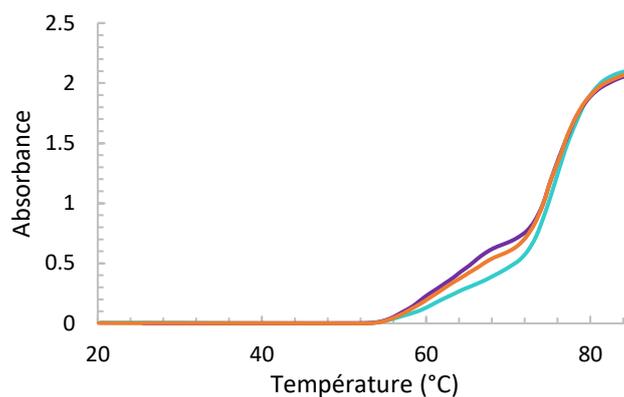


Figure 24 : Mesure d'absorbance au spectrophotomètre UV-visible avec bain thermostaté sur la solution LPIPrOx/LPEtOx 20/80 % (w/w) + EGBMA (—) avant irradiation (1<sup>ère</sup> montée) et irradiée 2h à 365 nm en présence de DMPA : (—) 1<sup>ère</sup> montée en température ; (—) 2<sup>ème</sup> montée en température.

Au vu de ces courbes, la réticulation n'impacte pas le comportement du système lors d'une montée en température. Cela permet donc d'éliminer définitivement l'hypothèse d'une démixtion du système lors du chauffage qui conduirait à l'agrégation du LPEtOx seul.

## Conclusion

Deux familles de copolymères lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) et lipide-*b*-poly(2-éthyl-2-oxazoline) ont été synthétisés par CROP à partir d'un lipoamorceur tosylé issu de l'huile de lin. Le comportement physico-chimique de ces copolymères a été caractérisé de manière approfondie, d'abord, au niveau macroscopique en spectrophotométrie UV-visible pour déterminer leur température de point de trouble, puis au niveau moléculaire en diffusion de la lumière et micro-DSC pour déterminer leur organisation et leur comportement en solution aqueuse, en particulier avec la température. Ces deux copolymères de structures chimiques très proches s'auto-organisent en solution aqueuse de manière très similaire avec la formation de micelles sphériques de rayon hydrodynamique 7 nm et de nombre d'agrégation proche de 30. Ils ont cependant une température de point de trouble très différentes, avec une valeur d'environ 40°C pour le LPiPrOx et d'environ 70 °C pour le LPEtOx.

Des expériences similaires ont ensuite été réalisées sur des mélanges physiques LPiPrOx/LPEtOx. Elles ont notamment permis de mettre en avant l'apparition d'une unique température de point de trouble intermédiaire et sa modulation en fonction des proportions massiques en l'un et l'autre des copolymères. Les mesures en diffusion de la lumière ont permis d'approfondir la compréhension de ce phénomène, en montrant l'hybridation du LPiPrOx et du LPEtOx, c'est-à-dire leur incorporation dans des micelles mixtes. Cette hybridation est indispensable pour permettre au LPEtOx de stabiliser le LPiPrOx, donc de retarder son agrégation, et par conséquent d'augmenter la température de point de trouble du système.

Il a d'ailleurs été noté une évolution linéaire de la température de point de trouble du système pour des proportions massiques en LPEtOx comprises entre 0 et 60 %, et l'apparition d'une deuxième transition au-delà se produisant à la  $T_{PT}$  du LPEtOx seul. Deux hypothèses avaient alors été avancées à ce stade, soit deux populations étaient initialement présentes, soit une démixtion avait lieu pendant la chauffe. Finalement, l'ensemble des analyses réalisées ont permis d'expliquer cela par un phénomène de double agrégation pour les fortes proportions en LPEtOx. En effet, lorsque le LPiPrOx est majoritaire, de nombreuses interactions intermoléculaires LPiPrOx-LPiPrOx à sa  $T_{PT}$  sont susceptibles d'entraîner l'agrégation de tout le système. Au contraire, lorsqu'il est minoritaire, ces interactions sont plus difficiles à créer et donc seule une partie du mélange s'agrège, le reste de l'agrégation ayant lieu à la  $T_{PT}$  du

LPEtOx, d'où le deuxième saut d'absorbance. Ce constat met en avant le réel intérêt de cette approche formulatoire pour stabiliser le système micellaire et par conséquent moduler sa température de point de trouble.

### Références

- (1) Weber, C.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Temperature Responsive Bio-Compatible Polymers Based on Poly ( Ethylene Oxide ) and Poly ( 2-Oxazoline ) S. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (5), 686–714.
- (2) El Asmar, A.; Gimello, O.; Morandi, G.; Le Cerf, D.; Lapinte, V.; Burel, F. Tuning the Thermo-Sensitivity of Micellar Systems through a Blending Approach. *Macromolecules* **2016**, *49* (11), 4307–4315.
- (3) Hespel, L.; Kaifas, E.; Lecamp, L.; Picton, L.; Morandi, G.; Burel, F. Synthesis of PH-Sensitive Micelles from Linseed Oil Using Atom Transfer Radical Polymerisation (ATRP). *Polymer*. **2012**, *53* (20), 4344–4352.
- (4) Huber, S.; Hutter, N.; Jordan, R. Effect of End Group Polarity upon the Lower Critical Solution Temperature of Poly(2-Isopropyl-2-Oxazoline). *Colloid Polym. Sci.* **2008**, *286* (14–15), 1653–1661.
- (5) García-Peñas, A.; Wang, Y.; Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M.; Stadler, F. J. Lower Critical Solution Temperature Sensitivity to Structural Changes in Poly(N-Isopropyl Acrylamide) Homopolymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2019**, *57* (20), 1386–1393.
- (6) Hespel, L.; Asmar, A. El; Morandi, G.; Lecamp, L.; Picton, L.; Burel, F. Synthesis of Dual-Sensitive Core Cross-Linked Mixed Micelles through Thiol–Ene Addition and Subsequent Drug Release Behavior. *Macromol. Chem. Phys.* **2017**, *218* (15), 1–8.
- (7) Mehreteab, A.; Chen, B. Fluorescence Technique for the Determination of Low Critical Micelle Concentrations. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72* (1), 49–52.

## Chapitre III :

Etude de mélanges de copolymères de nature et/ou architecture différentes



## Introduction

Jusqu'ici, ce projet s'est intéressé au mélange de deux copolymères de la même famille, les lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) et lipide-*b*-poly(2-éthyl-2-oxazoline) <sup>1</sup>, et de deux copolymères de familles différentes, les lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) et lipide-*b*-poly(méthacrylate de diméthyl(aminoéthyle)) <sup>2</sup> mais comportant chacun une fonction de type amine, amide ou ester au sein de leur motif de répétition. Ces mélanges avaient tous les deux permis la modulation de la température de point de trouble de façon très intéressante par la formation de micelles mixtes permettant la stabilisation du LPiPrOx de plus faible  $T_{PT}$ .

Ce chapitre a pour objectif de poursuivre l'étude de cette approche formulatoire novatrice, et d'en rechercher les limites, en l'étendant au mélange physique de deux copolymères de nature chimique, et éventuellement d'architecture, différentes. Dans la première partie de ce chapitre, le LP(iPrOx)<sub>n</sub> a ainsi été mélangé à différents copolymères linéaires commerciaux (Brij®) dont le bloc hydrophobe est constitué d'une chaîne en C<sub>18</sub> afin de se rapprocher le plus possible de sa chaîne lipidique, et dont le bloc hydrophile est un poly(oxyde d'éthylène) (PEO). Différents mélanges ont été réalisés avec trois C<sub>18</sub>-*b*-PEO dont le bloc hydrophile a un degré de polymérisation variable, et ceci à différentes proportions massiques. Tous ces mélanges ont été analysés en spectrophotométrie UV-visible pour déterminer leur température de point de trouble et en diffusion de la lumière pour comprendre leur comportement à l'échelle moléculaire.

Dans une deuxième partie, le LP(iPrOx)<sub>n</sub> a été mélangé avec un copolymère possédant un bloc hydrophile avec une architecture en peigne. Ce copolymère original a été synthétisé au laboratoire, à partir d'un lipoamorceur issu de l'huile de lin par polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) d'un méthacrylate de poly(éthylène glycol) (OEGMA). De même que dans la partie précédente, des mélanges en proportions variables ont été analysés pour déterminer leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques, et vérifier si l'hybridation est envisageable entre deux copolymères d'architectures différentes.

## I. Etude de mélanges physiques des copolymères LP(iPrOx)<sub>n</sub> et C<sub>18</sub>-b-PEO

### I.1. Description des copolymères commerciaux Brij®

Les trois copolymères étudiés dans cette partie sont des copolymères commerciaux de type C<sub>18</sub>-b-PEO, constitués d'une chaîne alkyle saturée à 18 carbones et d'un bloc hydrophile PEO de longueur variable. Ces copolymères seront notés par la suite C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>x</sub>, avec x le degré de polymérisation du PEO. Ainsi, les trois copolymères analysés sont le Brij® 76 (C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>10</sub>;  $\overline{M}_w = 700$  g/mol), le Brij® 78 (C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>19</sub>;  $\overline{M}_w = 1100$  g/mol) et le Brij® 700 (C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>92</sub>;  $\overline{M}_w = 4300$  g/mol).

Chacun des trois copolymères a été solubilisé dans de l'eau distillée à une concentration de 1 g/L et analysé en spectrophotométrie UV-visible pour déterminer sa température de point de trouble. Les deux plus grands Brij® (C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>19</sub> et C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>92</sub>) ne présentent pas de point de trouble jusqu'à 85°C, et conservent donc leur caractère amphiphile quelle que soit la température.

Le C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>10</sub> a quant à lui un bloc hydrophile plus court que les autres qui lui confère une solubilité plus faible dans l'eau. La solution est donc légèrement trouble initialement. Cette solubilité s'améliore lors du chauffage initial, ce qui est visible par une légère diminution de l'absorbance de la solution vers 50 °C. De plus, du fait de sa plus faible solubilité que les autres Brij®, le copolymère a une température de point de trouble de 84 °C. Celle-ci ne peut évidemment pas être mesurée précisément car la montée en température du bain s'arrête à 85 °C, donc il apparaît seulement le début de l'augmentation de l'absorbance (Figure 1).

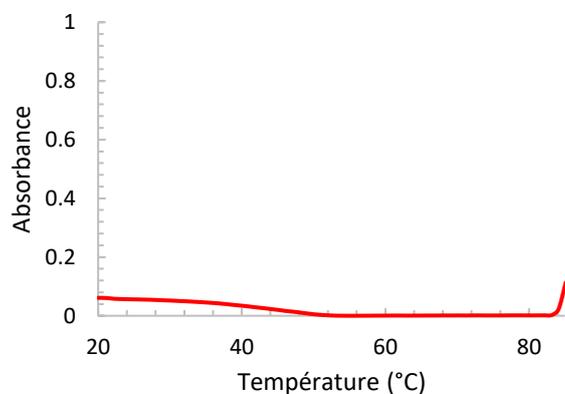


Figure 1: Spectre d'absorbance du C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>10</sub> dans l'eau à 1 g/L.  $v = 1$  °C/min

Les caractéristiques des objets formés par l'auto-organisation des copolymères C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>x</sub> ont été mesurées en diffusion de la lumière dans l'eau à une concentration de 0,5 g/L.

Pour ces mesures, un incrément d'indice de réfraction de 0,13 mL/g rapporté dans la littérature<sup>3</sup> pour le PEO homopolymère dans l'eau a été utilisé.

Les valeurs de la masse molaire des objets, de leur rayon hydrodynamique et de leur nombre d'agrégation ont été reportées dans le Tableau 1.

Pour C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>10</sub>, les valeurs ont été extrapolées à  $q \rightarrow 0$  (en traçant  $R/Kc = f(q)$  en échelle log-log) car la taille importante des objets en solution entraîne une légère dépendance angulaire. Or, pour un vecteur d'onde  $q$  proche de 0, c'est-à-dire aux très petits angles, la totalité de la solution est observée et permet donc d'avoir une idée réaliste de la taille des objets en solution.

Tableau 1 : Caractéristiques des copolymères mesurées en diffusion de la lumière dans l'eau milliQ à 0,5 g/L à 20 °C

	$\overline{X}_n$ Bloc hydrophile	$\overline{M}_u$ (g/mol)	$\overline{M}_w$ (c) (g/mol)	R <sub>h</sub> (nm)	N <sub>ag</sub> (d)
LP(iPrOx) <sub>n</sub>	28	3600 (a)	6,0.10 <sup>4</sup>	6,0	17
C <sub>18</sub> -b-PEO <sub>10</sub>	10	700 (b)	2,0.10 <sup>8</sup>	140	2,9.10 <sup>5</sup>
C <sub>18</sub> -b-PEO <sub>19</sub>	19	1100 (b)	1,2.10 <sup>5</sup>	5,5	109
C <sub>18</sub> -b-PEO <sub>92</sub>	92	4300 (b)	1,8.10 <sup>5</sup>	8,5	42

(a) Masse molaire en masse des unimères mesurées par RMN; (b) Masse molaire en masse des unimères données par le fournisseur; (c) Masse molaire en masse des objets en solution aqueuse; (d)  $N_{ag} = \overline{M}_w / \overline{M}_u$

Tout comme le LP(iPrOx)<sub>28</sub> étudié dans le chapitre 2, les deux Brij® les plus longs C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>19</sub> et C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>92</sub> forment des objets micellaires de rayon hydrodynamique et masse molaire apparente relativement proches des valeurs mesurées pour le LP(iPrOx)<sub>28</sub>, et dont les valeurs mesurées ici sont comparables à celles obtenues dans la littérature<sup>4</sup>.

Quant au C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>10</sub>, bien que la solution soit parfaitement transparente, il présente des fortes valeurs de rayon hydrodynamique et de masse molaire apparente caractéristiques d'objets de plus grande taille dont la nature exacte n'a pas été déterminée. En effet, le calcul théorique du R<sub>h</sub> maximum pour une micelle sphérique de C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>10</sub> dont les bras sont totalement étirés donne une valeur d'environ 5- 6 nm qui confirme la présence d'objets qui ne sont pas des micelles sphériques.

Afin d'étudier la possibilité d'obtenir des micelles mixtes nous avons étudié le mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub>. Ce Brij<sup>®</sup> forme des micelles sphériques bien définies, et a un degré de polymérisation proche du LP(iPrOx)<sub>28</sub>, et *de facto* une HLB équivalente, qui pourrait favoriser un mélange homogène des copolymères en solution aqueuse.

## 1.2. Mélanges physiques de copolymères linéaires LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub>

### 1.2.1. Comportement macroscopique du mélange

Des mélanges physiques ont été préparés à partir des solutions aqueuses de chacun des copolymères dans des proportions massiques bien définies, afin d'obtenir une concentration totale finale de 1 g/L (Tableau ) puis analysés en spectrophotométrie UV-visible (Figure 2).

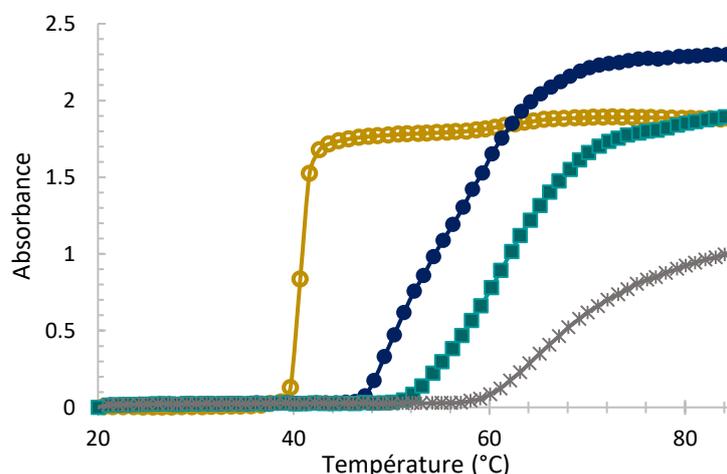


Figure 2 : Spectres d'absorbance du (●) LP(iPrOx)<sub>28</sub> et des mélanges LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> à différentes fractions massiques : (●) 75/25, (■) 50/50 et (\*) 25/75 dans l'eau à 1 g/L.  $v = 1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Il est tout d'abord notable que pour chaque mélange, une seule transition d'absorbance apparaît à une température intermédiaire entre celles des deux copolymères purs.

La température de point de trouble du mélange évolue linéairement de 49 °C à 61 °C avec la proportion de C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> introduite comme le montre la Figure 3. Ces résultats indiquent un comportement coopératif entre les deux copolymères et l'hybridation du système avec la formation de micelles mixtes contenant les deux copolymères est donc probable.

Il est cependant nécessaire de s'assurer que le comportement en température observé pour les mélanges ne provient pas simplement d'interactions entre les couronnes de systèmes micellaires de LP(iPrOx)<sub>28</sub> et C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> non hybridés.

Pour répondre à cette question, le LP(iPrOx)<sub>28</sub> a été mélangé physiquement à un homopolymère PEO de masse molaire en masse 1500 g/mol, dans les mêmes proportions massiques que les mélanges LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> (Figure 3).

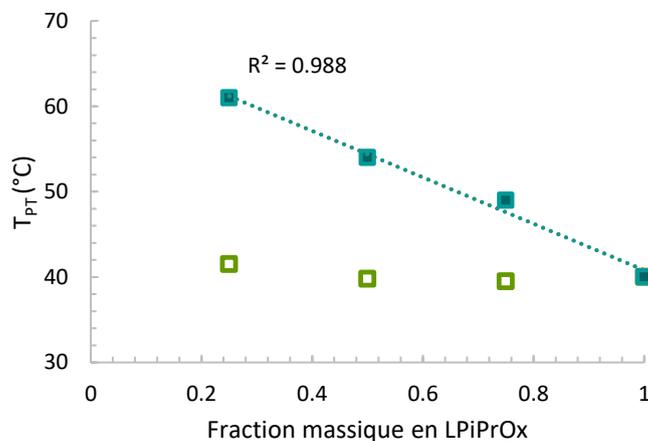


Figure 3 : Evolution de la température de point de trouble des mélanges (■) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> et (□) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/PEO en fonction de la fraction massique en LP(iPrOx)<sub>28</sub> dans l'eau à une concentration totale de 1 g/L.

Aucune différence significative n'est observée entre les températures de point de trouble des mélanges LP(iPrOx)<sub>28</sub>/PEO et celles du LP(iPrOx)<sub>28</sub> seul à la même concentration que dans les mélanges. L'écart est en revanche significatif pour les mélanges LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> où la température de point de trouble est jusqu'à 20 °C supérieure à celle du LP(iPrOx)<sub>28</sub>.

Pour rappel de ce qui avait été mentionné dans le chapitre 2 (p. 6-7), la variation de la concentration du LP(iPrOx)<sub>n</sub> en solution dans chaque mélange n'est pas responsable de la variation significative de la température de point de trouble.

Ces premiers résultats mettent en avant le fait qu'une simple interaction entre les couronnes PiPrOx et PEO n'est pas suffisante pour stabiliser le LP(iPrOx)<sub>n</sub> et moduler le point de trouble du système global, et d'autre part que nous sommes probablement bien en présence de micelles mixtes pour le couple LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub>.

### 1.2.2. Etude de la variation du point de trouble au niveau moléculaire

Les caractéristiques des micelles de LP(iPrOx)<sub>28</sub> et C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> sont relativement proches en terme de rayon hydrodynamique et de masse molaire apparente (Tableau 1). Ces deux copolymères ont été mélangés dans des proportions massiques bien définies avec une

concentration totale de 1 g/L, et le système a été analysé de manière approfondie en diffusion de la lumière à 20 °C.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au mélange 50/50. La Figure 4 représente la fonction d'auto-corrélation  $g_1$  (Figure 4A) et l'intensité diffusée (Figure 4B) pour les solutions individuelles de LP(iPrOx)<sub>28</sub> et C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>19</sub>, ainsi que pour le mélange 50/50. L'intensité théorique (---) qui serait diffusée en l'absence d'hybridation des deux systèmes a été calculée et ajoutée sur la Figure 4B.

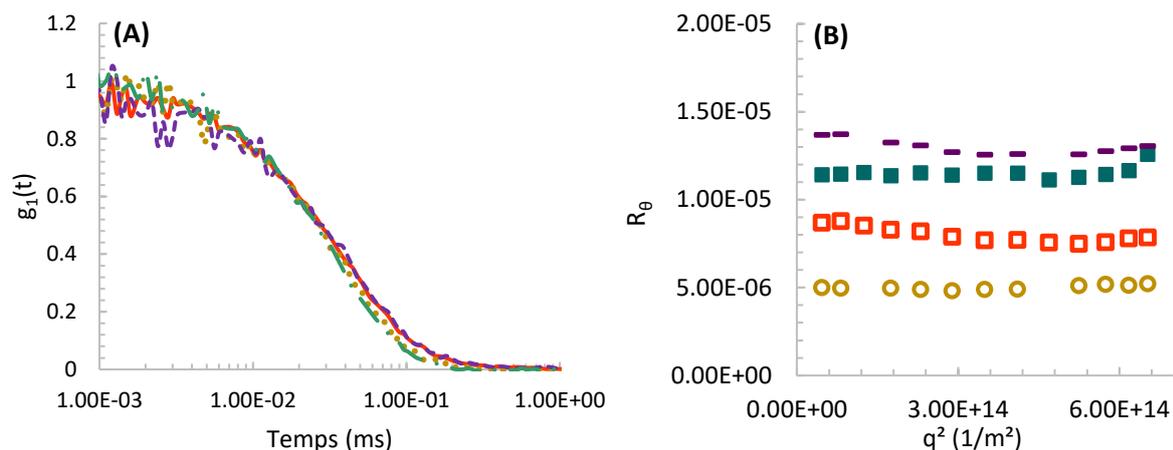


Figure 4 : (A) Fonctions d'autocorrélation et (B) intensité diffusée  $R_\theta$  en fonction de l'angle pour (--- et ○) LP(iPrOx)<sub>28</sub> 1 g/L, (— et □) C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>19</sub> 1 g/L, (-●- et ■) le mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>19</sub> 50/50 1 g/L et (--- et -) la somme mathématique théorique {LP(iPrOx)<sub>28</sub> + C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>19</sub>} en l'absence d'hybridation.

Les fonctions d'autocorrélation sont directement reliées au rayon hydrodynamique des objets en solution. En effet, plus leur taille est petite, plus ils relaxent rapidement et inversement pour des objets plus gros. Les fonctions d'auto-corrélation sont ici quasiment superposées.

Les valeurs d'intensité diffusée sont reliées à la masse molaire des objets, à leur concentration mais aussi à leur contraste qui est proportionnel au carré de l'incrément d'indice de réfraction  $(dn/dc)^2$ . Dans ce cas particulier, le copolymère C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>19</sub> a un nombre d'agrégation bien plus grand que celui du LP(iPrOx)<sub>28</sub>, mais cette différence est compensée par un contraste plus faible  $(dn/dc \text{ (PiPrOx)} = 0,16 \text{ mL/g}$  et  $dn/dc \text{ (PEO)} = 0,13 \text{ mL/g}^3)$ , induisant une intensité diffusée peu différente entre les deux copolymères.

Ainsi, la comparaison du rayon hydrodynamique et de l'intensité diffusée entre le mélange et la somme théorique calculée en l'absence d'hybridation ne permet pas de conclure sur l'hybridation ou non du système à 20 °C parce que leurs valeurs sont trop proches et dans la barre d'erreur considérée pour cette technique ( $\approx 10\text{-}20\%$ ).

Pour contourner ce problème, les mêmes solutions ont été analysées en diffusion de la lumière en température (Figure 5).

La solution de LP(iPrOx)<sub>28</sub> a servi de référence pour démontrer l'hybridation. Elle a été chauffée par pas de 5 °C de 30 à 45 °C. La transition de point de trouble, attendue aux alentours de 40 °C d'après la mesure en UV-visible (pointillé jaune), se traduit ici par une forte augmentation de M<sub>app</sub> (symbole jaune) dans cette plage de températures. Les mesures de M<sub>app</sub> sur le mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/PEO confirment la non influence du PEO sur le système micellaire (symbole bleu/ symbole jaune) comme attendu d'après la mesure en UV-visible (pointillé bleu). A 40 °C, le système est agrégé, ce qui signifie que le PEO n'est pas capable de stabiliser les micelles de LP(iPrOx)<sub>28</sub> au-delà de leur température de point de trouble. Pour le C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> seul la M<sub>app</sub> est constante comme attendu sur la gamme de températures étudiées (symbole rouge).

Les spectres d'absorbance obtenus en UV-visible (lignes) ont été superposés aux valeurs de diffusion de la lumière (symboles) représentées en Figure 5.

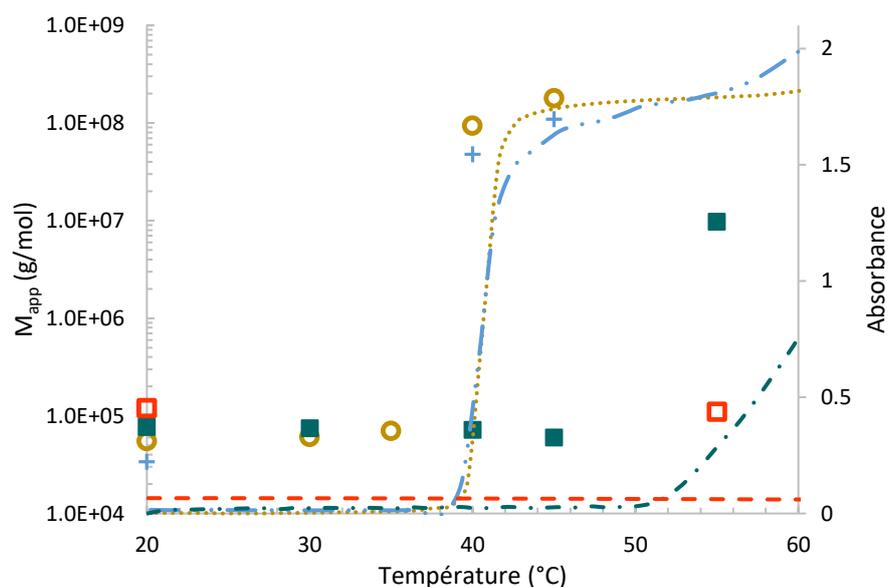


Figure 5 : Mesures en diffusion de la lumière – M<sub>app</sub> (échelle log) et absorbance en fonction de la température pour (■ et ---) C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> 0,5 g/L, (○ et ...) LP(iPrOx)<sub>28</sub> 0,5 g/L, (■ et -.-) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> 50/50 % (w/w) 1 g/L et (+ et -.-.-) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/PEO 50/50 % (w/w) 1 g/L dans l'eau milliQ.

De manière intéressante en revanche, quand le LP(iPrOx)<sub>28</sub> est mélangé au C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub>, le système est toujours stable à 40 °C et même à 45 °C. Puis de manière tout à fait cohérente avec les résultats obtenus en UV-visible, une agrégation a lieu vers 55 °C, ce qui génère un léger trouble de la solution et une augmentation significative de la taille et de la masse molaire

apparente des objets en solution. Un graphique similaire est obtenu par représentation du rayon hydrodynamique en fonction de la température (cf. annexe 5).

Ces résultats viennent conforter l'idée qu'il y a bien hybridation entre les deux copolymères, et que c'est bien la formation de micelles mixtes qui est responsable de la modulation du point de trouble.

Afin d'approfondir l'étude de ce système  $\text{LP}(\text{iPrOx})_{28}/\text{C}_{18}\text{-}b\text{-PEO}_{19}$ , la même expérience a été réalisée sur les solutions avec des proportions massiques 25/75 et 75/25, comme le montre la Figure 6.

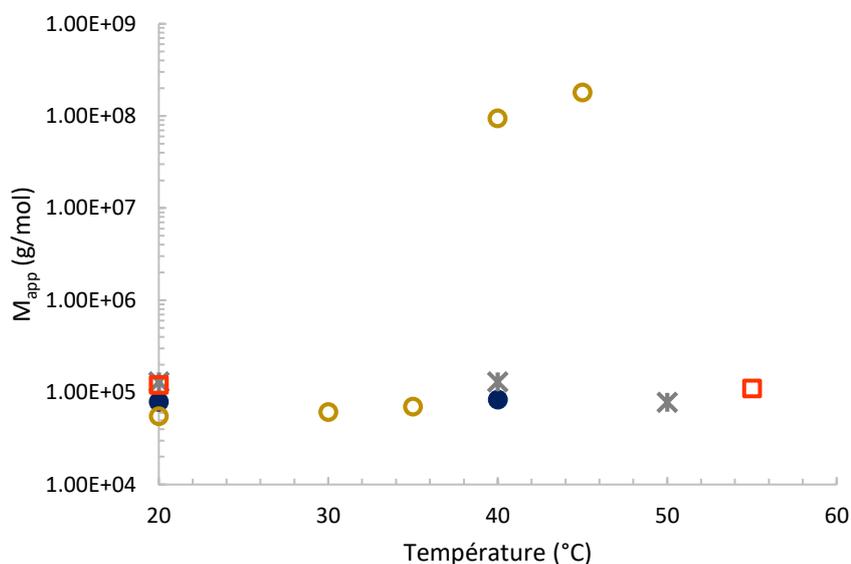


Figure 6 : Mesures en diffusion de la lumière –  $M_{app}$  en fonction de la température pour (○)  $\text{LP}(\text{iPrOx})_{28}$  0,5 g/L, (□)  $\text{C}_{18}\text{-}b\text{-PEO}_{19}$  0,5 g/L, (●)  $\text{LP}(\text{iPrOx})_{28}/\text{C}_{18}\text{-}b\text{-PEO}_{19}$  75/25 % (w/w) 1 g/L et (\*)  $\text{LP}(\text{iPrOx})_{28}/\text{C}_{18}\text{-}b\text{-PEO}_{19}$  25/75 % (w/w) 1 g/L dans l'eau milliQ

D'abord, le mélange 75/25 reste parfaitement stable à 40 °C comme en témoigne la faible valeur de  $M_{app}$ , ce qui signifie que le  $\text{LP}(\text{iPrOx})_{28}$  est stabilisé et ne s'agrège plus à cette température. Ce résultat permet de confirmer la présence de micelles mixtes sur cette proportion également.

Par la suite, le mélange 25/75, dont la température de point de trouble est plus élevée (61 °C), a été chauffée jusqu'à 50 °C pour s'en rapprocher le plus possible. A cette température, il y a également conservation des objets formés initialement, ce qui démontre à nouveau l'hybridation du système.

L'évolution est d'ailleurs strictement la même si le graphique représente le rayon hydrodynamique des micelles.

Ces analyses confirment donc bien la formation de micelles mixtes entre le copolymère LP(iPrOx)<sub>28</sub> et le C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>19</sub> sur toute la gamme de proportions étudiée. L'approche formulatoire permet donc bien de moduler la température de point de trouble via le mélange physique de copolymères présentant des blocs hydrophiles de natures relativement différentes et de taille comparable.

Par la suite, nous avons voulu savoir si une variation de la longueur du bloc hydrophile PEO pouvait favoriser ou au contraire empêcher la formation de micelles mixtes entre les deux copolymères mis en solution.

### I.3. Influence de la longueur du bloc PEO

L'objectif de cette partie est d'étudier l'influence de la longueur du bloc PEO sur la température de point de trouble de mélanges avec le LP(iPrOx)<sub>28</sub>.

Le LP(iPrOx)<sub>28</sub> a donc été mélangé, soit avec le copolymère C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>10</sub> qui possède un bloc hydrophile beaucoup plus court que le LP(iPrOx)<sub>28</sub>, soit avec le copolymère C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>92</sub> qui possède au contraire un bloc hydrophile très long. De la même façon que pour le C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>19</sub> étudié précédemment, des mesures en UV-visible ont été réalisées sur des mélanges LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>10</sub> et LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>92</sub> en proportions massiques variables : 25/75, 50/50 et 75/25. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 7.

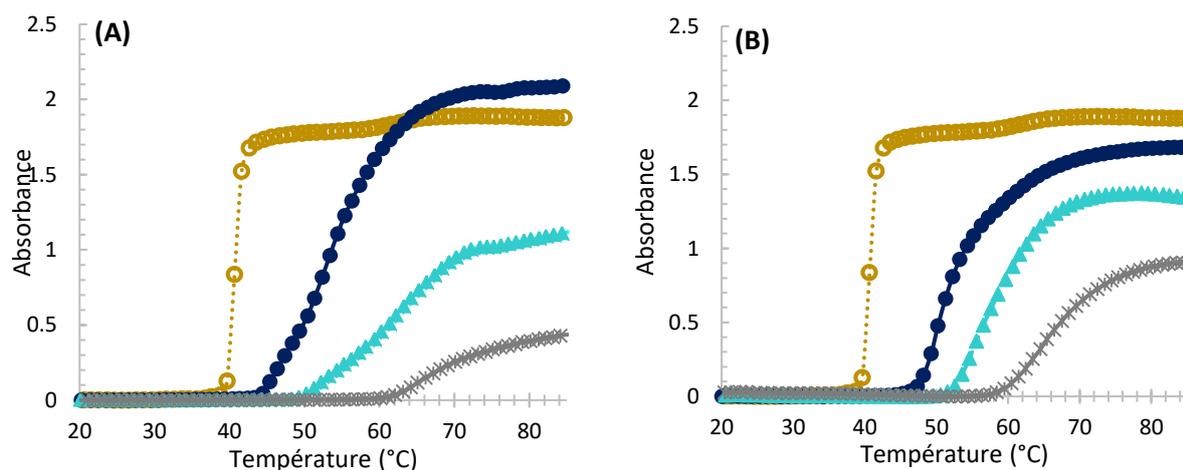


Figure 7 : Spectres d'absorbance du (○) LPiPrOx et des mélanges (A) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>92</sub> et (B) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>10</sub> en % (w/w) : (●) 75/25, (▲) 50/50 et (\*) 25/75 dans l'eau à 1 g/L. v = 1 °C/min.

De nouveau, une seule transition à une température intermédiaire entre les deux copolymères de départ est observée pour chaque mélange, reflétant le comportement coopératif des copolymères. Les mesures d'absorbance sur le système LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>92</sub> (Figure 7A) montrent une augmentation significative de la température de point de trouble de 40 °C pour le LP(iPrOx)<sub>28</sub> jusqu'à environ 60 °C pour le mélange 25/75. De plus, la valeur de l'absorbance chute assez brutalement reflétant une agrégation plus faible lorsque la proportion en C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>92</sub> augmente. Cela pourrait s'expliquer par la présence majoritaire de PEO dans la couronne qui entraînerait la stabilisation des agrégats et limiterait la formation de gros agrégats.

Les mesures d'absorbance pour le système LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>10</sub> (Figure 7B) présentent également une évolution de la température de point de trouble de 40 °C à 60 °C. Cette évolution est également accompagnée d'une diminution plus progressive de la valeur de l'absorbance démontrant une stabilisation certes moindre, mais existante des micelles par les chaînes C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>10</sub>.

Afin de confirmer l'hybridation, les mélanges LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>10</sub> et LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>92</sub> en proportion massique 50/50 ont été analysés en diffusion de la lumière en température à 40 °C.

Les valeurs obtenues sont répertoriées sur la Figure 8.

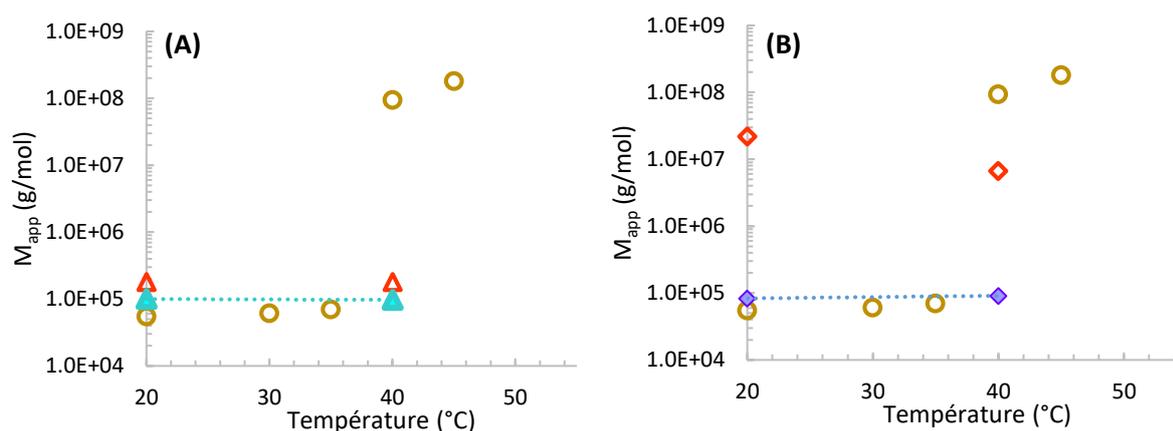


Figure 8 : Mesures en diffusion de la lumière –  $M_{app}$  (échelle log) en fonction de la température pour (○) LP(iPrOx)<sub>28</sub> 0,5 g/L, et (A) (△) C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>92</sub> 0,5 g/L, (▲) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>92</sub> 50/50 % (w/w) 1 g/L, et (B) (◇) C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>10</sub> 0,5 g/L et (◆) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>10</sub> 50/50 % (w/w) 1 g/L dans l'eau milliQ.

Quelle que soit la température, jusqu'à 85 °C, le copolymère C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>92</sub> reste sous forme de petites micelles sphériques dans l'eau. Quand il est mélangé au LP(iPrOx)<sub>28</sub>, il y a également

conservation de la taille des objets au-delà de la  $T_{PT}$  du  $LP(iPrOx)_{28}$ , ce qui montre l'hybridation du système. Il paraît tout à fait logique que les longs bras de PEO soient parfaitement capables de stabiliser les micelles mixtes et d'empêcher l'aggrégation du  $LP(iPrOx)_{28}$  à 40 °C. Qu'en est-il du mélange avec des bras PEO plus courts que le  $PiPrOx$  ?

Seul en solution, le copolymère  $C_{18-b-PEO_{10}}$  ne s'organise pas sous forme de micelles mais en objets plus gros et moins bien définis, même à température ambiante. En revanche, quand ce copolymère est mélangé au  $LP(iPrOx)_{28}$ , ce dernier permet au  $C_{18-b-PEO_{10}}$  de former des micelles mixtes bien plus définies, comme en témoignent les valeurs de la masse molaire apparente et le rayon hydrodynamique du mélange à 20 °C. Ce résultat démontre à lui seul l'hybridation de ces deux copolymères sous la forme de micelles mixtes.

Le  $C_{18-b-PEO_{10}}$  apporte également sa contribution puisqu'il rend le  $LP(iPrOx)_{28}$  plus stable face à une augmentation de la température en retardant l'aggrégation du système mixte. L'intérêt de l'approche formulatoire pour combiner les propriétés des deux copolymères de départ est ici clairement démontrée.

Cette partie démontre que la longueur du bloc hydrophile PEO n'est pas un facteur décisif sur l'hybridation, et sur la formation de micelles mixtes homogènes. Cette conclusion est cohérente avec les études de la littérature citées en chapitre 1 (cf. II.2.) qui ont montré que la différence de longueur du bloc hydrophile des copolymères mélangés peut impacter les caractéristiques des objets en solution, mais n'empêche généralement pas leur hybridation. Néanmoins, il est intéressant d'étudier l'impact de la longueur du bras PEO sur la température de point de trouble du mélange final. En comparant les températures de point de trouble de tous les mélanges pour les trois  $C_{18-b-PEO_x}$ , la modulation est très similaire à proportion massique équivalente (Figure 9A). Quelle que soit la longueur de la chaîne PEO, à proportion massique identique, le rapport entre le nombre de segments EO et  $iPrOx$  est comparable. L'hypothèse avancée est donc que c'est ce rapport entre le nombre de segments de chaque chaîne hydrophile qui gouverne la variation du point de trouble.

A titre de comparaison, l'évolution de la température de point de trouble a également été tracée en fonction de la proportion molaire en chaque copolymère (Figure 9B).

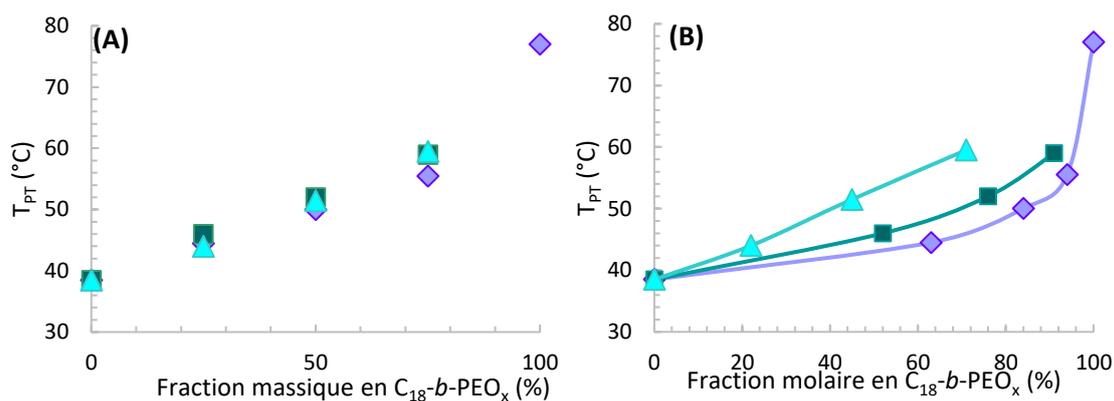


Figure 9 : Mesures en UV-visible – Comparaison des températures de point de trouble en fonction (A) des proportions massiques et (B) des proportions molaires des mélanges (◆) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>10</sub>, (■) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>19</sub> et (▲) LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>92</sub> dans l'eau à 1 g/L.

La Figure 9B montre qu'à proportion molaire identique, les chaînes les plus longues sont plus efficaces pour stabiliser les micelles mixtes lors d'une élévation de la température.

Afin d'appuyer ces conclusions, des calculs ont été faits et reportés dans le Tableau 2 pour déterminer le nombre de bras LP(iPrOx)<sub>28</sub> et C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>x</sub> dans chaque système en proportion 50/50 en considérant que la composition des micelles est la même que celle du mélange de départ et que toutes les micelles ont la même composition.

Tableau 2 : Mesures en diffusion de la lumière – Caractéristiques des différents mélanges LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-b-PEO<sub>x</sub> 50/50 % (w/w) dans l'eau à 1 g/L.

	$M_{app}$ (g/mol)	$M_{app}^{(a)}$ (LP(iPrOx) <sub>28</sub> )	Nb bras LP(iPrOx) <sub>28</sub> (b)	$M_{app}^{(a)}$ C <sub>18</sub> -b- PEO <sub>x</sub>	Nb bras C <sub>18</sub> -b- PEO <sub>x</sub> (b)	Nb segments EO	Nb segments iPrOx	EO/ iPrOx
LP(iPrOx) <sub>28</sub> / C <sub>18</sub> -b-PEO <sub>10</sub> 50/50	$8,3 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^4$	12	$4,2 \cdot 10^4$	59	590	336	1,8
LP(iPrOx) <sub>28</sub> / C <sub>18</sub> -b-PEO <sub>19</sub> 75/25	$7,9 \cdot 10^4$	$5,9 \cdot 10^4$	16	$2,0 \cdot 10^4$	18	342	448	0,76
LP(iPrOx) <sub>28</sub> / C <sub>18</sub> -b-PEO <sub>19</sub> 50/50	$7,7 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^4$	11	$3,9 \cdot 10^4$	35	665	308	2,2
LP(iPrOx) <sub>28</sub> / C <sub>18</sub> -b-PEO <sub>19</sub> 25/75	$1,3 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^4$	9	$9,8 \cdot 10^4$	89	1691	252	6,7
LP(iPrOx) <sub>28</sub> / C <sub>18</sub> -b-PEO <sub>92</sub> 50/50	$1,0 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^4$	14	$5,0 \cdot 10^4$	12	1100	392	2,8

(a)  $M_{app}$  (copolymère 1) =  $M_{app}$  (mélange) \* w (copolymère 1)

(b) Nb bras (copolymère 1) =  $M_{app}$  (copolymère 1) /  $\overline{M_w}$  (copolymère 1)

Ce tableau indique que le nombre de bras  $\text{LP}(\text{iPrOx})_{28}$  est relativement constant quel que soit le copolymère  $\text{C}_{18}\text{-}b\text{-PEO}_x$  mélangé. Le nombre de chaînes  $\text{C}_{18}\text{-}b\text{-PEO}_x$  augmente lorsque la taille de la chaîne hydrophile diminue, ce qui est en accord avec les nombres d'agrégation des  $\text{C}_{18}\text{-}b\text{-PEO}_x$  de départ (Tableau 1). Cela induit un rapport EO/iPrOx relativement proche pour les trois systèmes  $\text{LP}(\text{iPrOx})_{28}/\text{C}_{18}\text{-}b\text{-PEO}_x$  50/50, ce qui explique que la température de point de trouble augmente de façon similaire. Ce rapport permet également d'expliquer la meilleure capacité de stabilisation du  $\text{C}_{18}\text{-}b\text{-PEO}_{92}$  par rapport aux deux autres plus petits à proportion molaire identique.

Cette première partie a finalement permis de montrer que deux copolymères linéaires dont les blocs hydrophiles sont de natures chimiques différentes peuvent tout à fait être mélangés physiquement et former des micelles mixtes, tout en modulant la température de point de trouble du système par stabilisation du copolymère ayant la  $T_{PT}$  la plus faible.

La deuxième partie de ce chapitre portera sur la possibilité d'hybrider deux copolymères de natures et architectures différentes. Ainsi, le  $\text{LP}(\text{iPrOx})_{28}$  sera mélangé à un copolymère greffé dérivé du PEO, le lipide-*b*-poly(oligo(éthylène glycol)méthacrylate de méthyle) (LPOEGMA).

## **II. Etude de mélanges physiques des copolymères $\text{LP}(\text{iPrOx})_{28}$ et lipide-*b*-poly(oligo(éthylène glycol)méthacrylate de méthyle)**

### **II.1. Synthèse du lipide-*b*-poly(oligo(éthylène glycol)méthacrylate de méthyle)**

La synthèse du lipoamorceur pour l'ATRP et la polymérisation du LPOEGMA ont été réalisées par une post-doctorante de l'équipe.

#### *II.1.1. Généralités sur la polymérisation par ATRP*

L'ATRP est l'acronyme de polymérisation radicalaire par transfert d'atome (« Atom Transfer Radical Polymerization »). Cette réaction de polymérisation est contrôlée par un équilibre réversible entre espèces actives, les radicaux, et espèces dormantes, via un processus redox catalysé par un complexe de métal de transition  $\text{M}_t^m\text{X}/\text{ligand}$ , où  $m$  est le degré d'oxydation. Ce catalyseur s'oxyde par le transfert d'un atome d'halogène  $X$  provenant de l'espèce



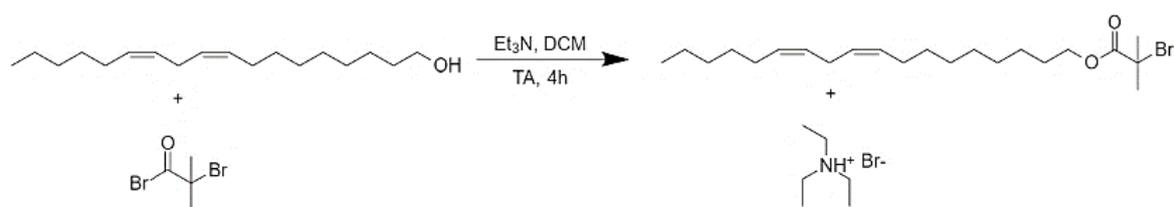


Figure 11 : Schéma réactionnel de la synthèse du lipoamorceur bromé LBr pour l'ATRP <sup>6</sup>

De même que pour le lipoamorceur tosylé pour la CROP, le lipoamorceur bromé comporte en moyenne deux insaturations par chaîne, et sera donc toujours schématisé comme ci-dessus (Figure 11).

### II.1.3. Synthèse par ATRP du lipide-b-poly(oligo(éthylène glycol)méthacrylate de méthyle)

Le lipoamorceur bromé est ensuite engagé dans une réaction de polymérisation par ATRP en présence du monomère OEGMA (Figure 12).

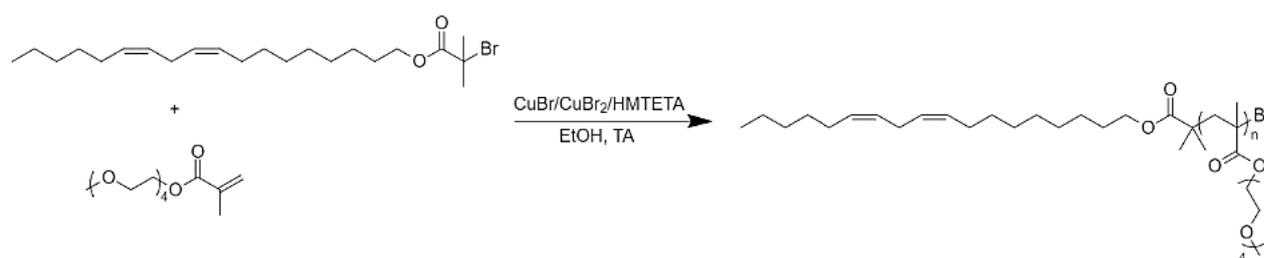


Figure 12 : Synthèse par ATRP du LPOEGMA

Plusieurs essais ont été réalisés pour obtenir le LPOEGMA avec une dispersité la plus faible possible (Tableau 3).

Tableau 3 : Conditions expérimentales testées pour la synthèse par ATRP du LPOEGMA. Les valeurs sont données en nombre d'équivalents.

Exp.	OEGMA/LBr/HMTETA*	CuBr	CuBr <sub>2</sub>	V <sub>EtOH</sub> /V <sub>OEGMA</sub>	T (°C)
1	25/1/1	0,5	0,025	1,25	50
2	25/1/1	1	0,05	3	TA

\* HMTETA = 1,1,4,7,10,10 - hexaméthyltriéthylènetétramine

La première réaction de polymérisation a été tout d'abord conduite dans l'éthanol à 50 °C en présence du système catalytique CuBr/CuBr<sub>2</sub>/HMTETA. Ces conditions ont été choisies car les catalyseurs bromés et les solvants polaires protiques permettent d'obtenir des cinétiques de réaction très rapides<sup>7</sup>. La cinétique de la polymérisation a été réalisée par prélèvements d'un échantillon à différents temps de la réaction. L'analyse des échantillons prélevés par RMN <sup>1</sup>H a permis d'obtenir la conversion.

Dans de telles conditions, une conversion de 90% a été atteinte en une heure. Bien que la réaction permette d'obtenir une forte conversion très rapidement avec une dispersité faible (inférieure à 1,3), la cinétique est trop rapide pour permettre un suivi convenable de la polymérisation et vérifier son caractère contrôlé.

Les conditions expérimentales ont donc été modifiées pour ralentir la cinétique de polymérisation.

Ainsi lors du deuxième essai, la proportion du système catalytique CuBr/CuBr<sub>2</sub> ainsi que la dilution du milieu réactionnel ont été augmentées. La température de polymérisation a été quant à elle diminuée (Tableau 3). Dans ces conditions, la linéarité observée pour  $\ln([M]_0/[M])$  en fonction du temps est caractéristique d'une concentration constante en espèces propageantes pendant toute la durée de la polymérisation, et d'une cinétique du premier ordre conduisant à une conversion de 94%.

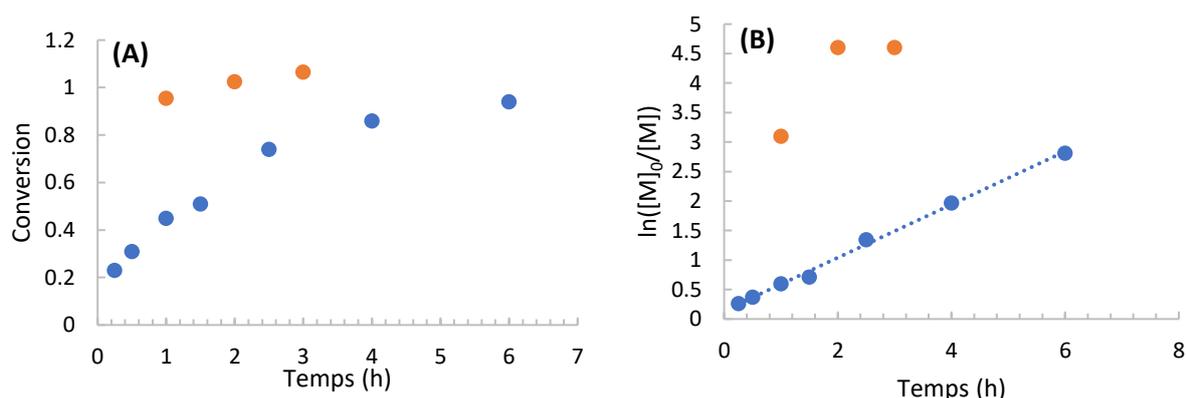


Figure 13 : (A) Evolution de la conversion et (B)  $\ln([M]_0/[M])$  en fonction du temps des (●) 1<sup>er</sup> essai et (●) 2<sup>ème</sup> essai de la réaction de polymérisation par ATRP du LPOEGMA.

L'analyse par SEC dans le dichlorométhane des échantillons prélevés pendant la polymérisation a permis de déterminer les masses molaires et dispersités (Figure 14).

Le tracé de la masse molaire en fonction de la conversion est linéaire et montre une bonne corrélation entre les masses molaires obtenues expérimentalement (SEC, étalonnage PMMA) et celles calculées théoriquement (RMN  $^1\text{H}$ ).

De plus, le contrôle de la réaction de polymérisation est satisfaisant puisque la dispersité est de l'ordre de 1,2.

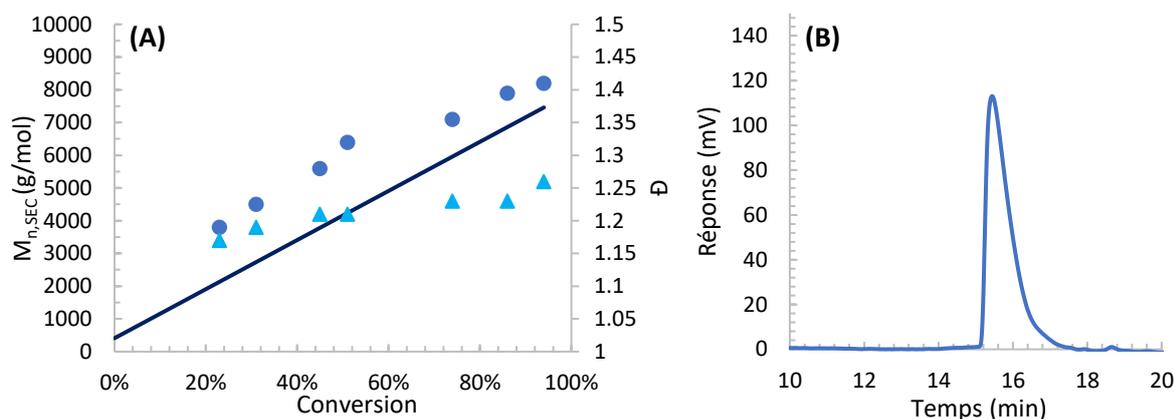


Figure 14 : (A) Evolution de (●) la masse molaire et de (▲) l'indice de polydispersité en fonction de la conversion pour LPOEGMA-Exp.2, obtenus par SEC. (—) est la masse molaire théorique obtenue par RMN dans  $\text{CDCl}_3$ . (B) Chromatogramme SEC du LPOEGMA –Exp.2 dans le dichlorométhane (étalons PMMA).

La polymérisation par ATRP de monomère OEGMA permet donc d'accéder à des copolymères LPOEGMA de structure et de taille contrôlée.

Cette réaction de polymérisation a finalement permis d'obtenir deux polymères LPOEGMA de masses molaires différentes en adaptant le temps de polymérisation (Tableau 4), ce qui démontre le caractère contrôlé de cette réaction de polymérisation par ATRP.

Tableau 4 : Caractéristiques des copolymères LPOEGMA synthétisés.

Copolymère	N°	$\bar{X}n^{\text{expé}}$	$\bar{M}n^{\text{RMN}}$ (g/mol) <sup>(a)</sup>	$\bar{M}n^{\text{SEC}}$ (g/mol) <sup>(b)</sup>	$\bar{D}$
LPOEGMA	3a	16	5200	5300	1,17
	3b	22	7000	7900	1,16

(d) RMN faite dans le  $\text{CDCl}_3$ ;  $\bar{M}n^{\text{RMN}} = \bar{X}n^{\text{RMN}} * M(\text{monomère}) + M(\text{Lipoamorceur})$ .

(e) Etalons PMMA ; SEC faite dans le dichlorométhane.

## II.2. Caractérisations physico-chimiques des copolymères LPOEGMA

Nous nous sommes ensuite intéressés au comportement en solution de ce nouveau copolymère amphiphile. Les solutions de LPOEGMA sont préparées par solubilisation directe du copolymère dans l'eau ou le PBS à la concentration souhaitée, puis elles sont agitées pendant au moins 4 h.

### II.2.1. Détermination de la concentration micellaire critique

La détermination de la cmc par fluorescence en présence de pyrène a tout d'abord été réalisée sur cette famille de copolymère.

Cette expérience consiste à préparer une gamme de solutions de LPOEGMA à différentes concentrations. Ce protocole a été expliquée plus en détails lors des essais de réticulation du cœur des micelles de lipide-*b*-poly(2-alkyl-2-oxazoline) LPOx dans le chapitre 2 (cf. II.4.).

L'évaluation du rapport des intensités à 338 et 333 nm ( $I_{338}/I_{333}$ ) du spectre d'excitation du pyrène ( $\lambda_{em} = 374$  nm) avec la concentration en LPOEGMA<sub>22</sub> **3b** permet de déterminer une valeur de **cmc de 5 mg/L (soit  $6.3 \cdot 10^{-7}$  mol/L)** (Figure 15), cette valeur étant tout à fait cohérente avec les valeurs de cmc décrites dans la littérature <sup>8</sup> sur des copolymères amphiphiles de nature proche.

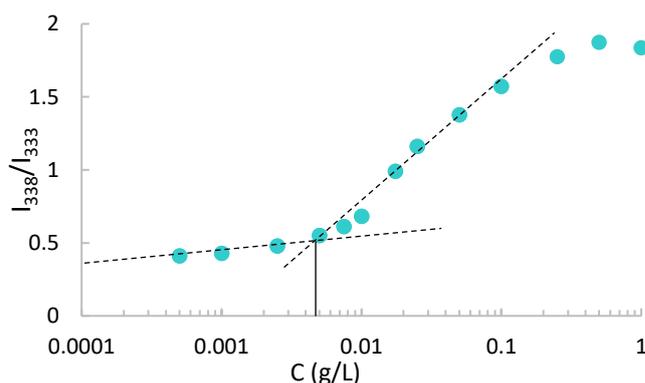


Figure 15 : Détermination de la cmc par fluorescence du pyrène dans l'eau distillée à température ambiante. Evolution du rapport des intensités  $I_{338}/I_{333}$  en fonction de la concentration massique en LPOEGMA<sub>22</sub> **3b**.

### II.2.2. Détermination de la température de point de trouble

Les mesures en turbidimétrie ont été faites par spectrophotométrie UV-visible dans un bain thermostaté, sur une solution de copolymère amphiphile LPOEGMA<sub>22</sub> **3b** dans le PBS à une concentration de 1 g/L, puis à différentes concentrations pour déterminer l'impact de la dilution sur la T<sub>PT</sub> (Figure 16).

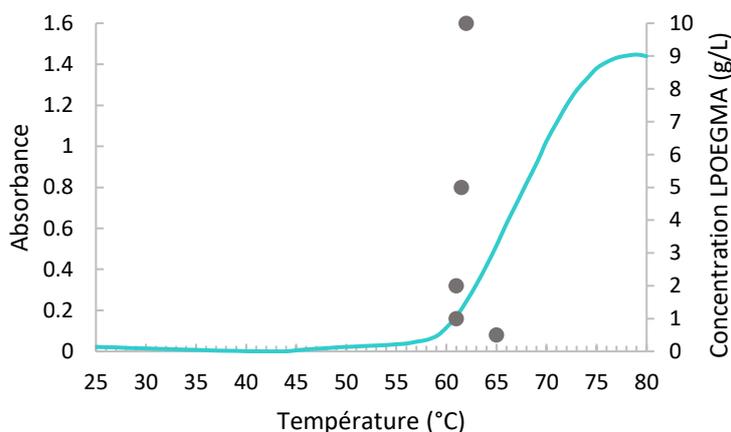


Figure 16 : (—) Spectre d'absorbance UV-visible ( $\lambda = 600$  nm,  $v = 0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ ) en fonction de la température d'une solution de LPOEGMA<sub>22</sub> **3b** à 1 g/L dans le PBS. (•) Evolution de la T<sub>PT</sub> du LPOEGMA<sub>22</sub> en fonction de sa concentration massique en solution aqueuse.

Le spectre d'absorbance a permis de déterminer une température de point de trouble de 61 °C pour une solution à 1 g/L. Une diminution de la T<sub>PT</sub> du LPOEGMA<sub>22</sub> de 5°C est relevée entre 0,5 g/L et 1 g/L. Au-delà de 1 g/L, la T<sub>PT</sub> n'est pas impactée par sa concentration en solution aqueuse.

### II.2.3. Caractérisation des objets formés en diffusion de la lumière

#### II.2.3.1. Auto-organisation en solution aqueuse à température ambiante

Afin d'approfondir les connaissances que nous avons de ce copolymère récemment synthétisé, des analyses en diffusion de la lumière ont été effectuées pour étudier son auto-organisation en solution aqueuse.

Les premières expériences ont été réalisées au nanosizer afin de connaître la taille des objets formés en solution par les deux copolymères synthétisés. Des solutions des deux copolymères

LPOEGMA **3a** et **3b** ont été préparées par deux voies différentes, soit le copolymère a été solubilisé directement dans l'eau, soit il a été pré-solubilisé dans du méthanol avant d'être incorporé au goutte à goutte dans l'eau. Les résultats obtenus au nanosizer sont présentés dans la Figure 17.

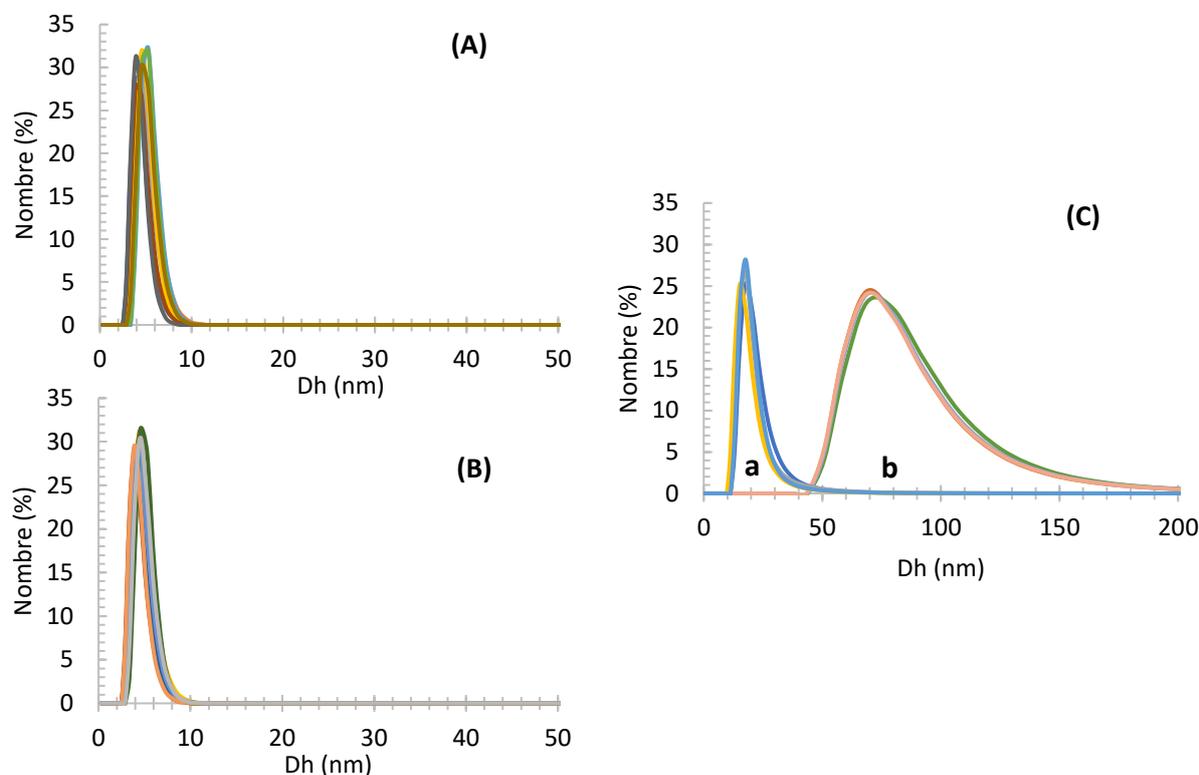


Figure 17 : Mesures DLS (Nanosizer) à 25 °C des copolymères LPOEGMA dans le PBS à 1 g/L ; (A) 7900 g/mol directement solubilisé dans l'eau, (B) 7900 g/mol pré-solubilisé dans MeOH, (C)-a 5200 g/mol pré-solubilisé dans MeOH et (C)-b 5200 g/mol directement solubilisé dans l'eau.

Le LPOEGMA<sub>16</sub> **3a** ( $\overline{M}_n = 5200$  g/mol) forme des objets d'environ 18 nm lorsqu'il est pré-solubilisé dans du méthanol et des objets bien plus gros (environ 70 nm) s'il est introduit directement dans l'eau. Quant au LPOEGMA<sub>22</sub> **3b** ( $\overline{M}_n = 7900$  g/mol), il forme des objets de diamètre hydrodynamique d'environ 5 nm, et ce quelle que soit la voie de préparation de la solution. Ces deux copolymères ont donc des comportements bien différents l'un de l'autre, et ce potentiellement à cause de la variation importante de la balance hydrophile-hydrophobe lors de l'ajout d'un motif du fait de la structure en peigne.

Par la suite, seul le copolymère **3b** sera étudié, d'une part car il est le seul qui semble former des objets micellaires par solubilisation directe dans l'eau, tout comme le LP(iPrOx)<sub>28</sub>, et

d'autre part car il présente un degré de polymérisation comparable aux LPOx étudiés dans le chapitre précédent, et permet donc de mélanger des polymères de même longueur.

La suite des analyses a été effectuée à l'IMMM au Mans en diffusion statique et dynamique de la lumière avec le même appareil multiangle (ALV-5000, ALV-Langen) que celui décrit précédemment (cf Chapitre 2 – I.3.). La solution de LPOEGMA<sub>22</sub> **3b** a été préparée par solubilisation directe dans l'eau milliQ.

Les premières analyses en diffusion de la lumière ont mis en évidence la nécessité de filtrer sur 0,02 µm avant toute analyse. En effet, il y a en solution de gros agrégats (d'une centaine de nm) qui sont en quantité minime dans la solution, donc ne reflètent pas la vraie nature des objets en solution, mais faussent les résultats en diffusant beaucoup plus que les petits objets majoritairement présents (Figure 18).

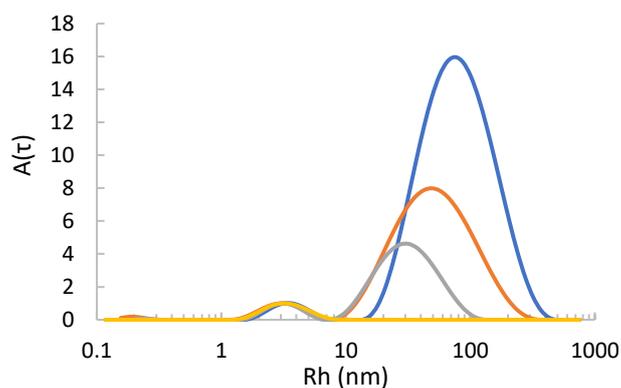


Figure 18 : Distributions des  $R_h$  à  $90^\circ$  d'une solution de LPOEGMA<sub>22</sub> à 1 g/L dans l'eau milliQ filtrées successivement sur (—) 0,45 µm, (—) 0,2 µm, (—) 0,1 µm et (—) 0,02 µm.

La distribution des rayons hydrodynamiques montre la disparition de la population de plus grande taille avec la filtration de 0,45 µm à 0,02 µm, avec très peu de perte de matière d'après des mesures en UV-visible ( $\lambda_{\max} = 280$  nm). Il ne reste alors que les petits objets, dont les caractéristiques sont semblables après filtration (Figure 19).

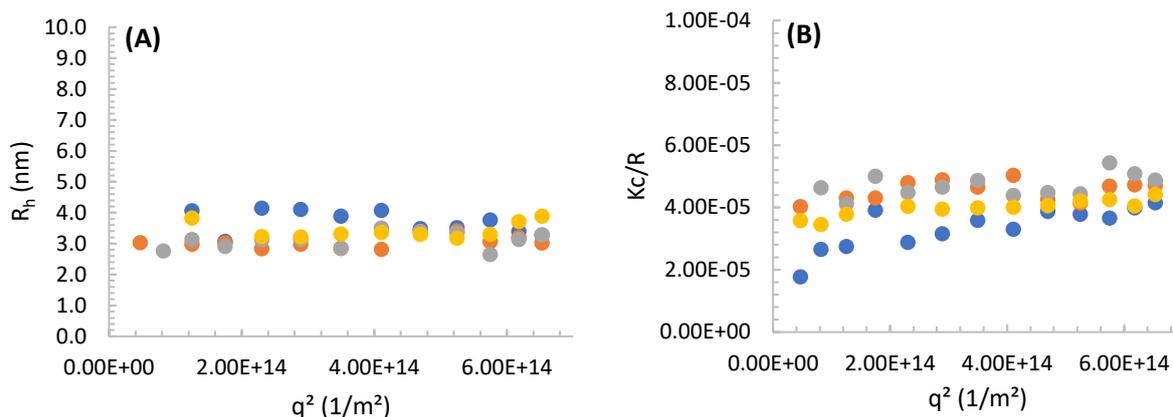


Figure 19 : Evolution (A) du  $R_h$  et (B) de  $Kc/R$  ( $=1/M_{app}$ ) du mode rapide (petite population) en fonction de l'angle pour 4 filtrations d'une solution de LPOEGMA<sub>22</sub> à 1 g/L à (●) 0,45  $\mu m$ , (●) 0,2  $\mu m$ , (●) 0,1  $\mu m$  et (●) 0,02  $\mu m$ .

Malgré tout, deux problèmes se posent. D'une part, l'intensité diffusée par la solution à 1 g/L filtrée sur 0,02  $\mu m$  est très faible (environ 7 fois plus que l'eau), et donc les résultats sont difficiles à exploiter. D'autre part, les mesures sur la solution à 1 g/L donnent une masse molaire apparente d'environ 25 000 g/mol et donc un nombre d'agrégation faible de 3, donc il est difficile de dire avec certitude si l'échantillon comporte un mélange d'unimères et de micelles ou uniquement des micelles de  $N_{ag} = 3$ , même si la concentration est très au-dessus de la cmc du copolymère.

Pour répondre à cette seconde interrogation, des solutions de LPOEGMA<sub>22</sub> à différentes concentrations ont été analysées. Des solutions de LPOEGMA<sub>22</sub> à 1, 2 et 5 g/L ont été préparées par dilution d'une solution à 10 g/L non filtrée. Puis, une solution à 0,3 g/L a été préparée par dilution de la solution à 5 g/L. Chaque solution a été filtrée sur 0,2  $\mu m$  avant analyse.

Comme le montre le Tableau 5, les données sont difficiles à traiter pour les solutions à 1 g/L et 0,3 g/L car l'intensité diffusée est très, voire trop, faible.

Cependant, quelle que soit la concentration, une même tendance semble apparaître (Tableau 5).

Tableau 5 : Influence de la concentration sur  $M_{app}$  et  $R_h$  des objets de LPOEGMA<sub>22</sub> en solution dans l'eau à différentes concentrations, filtrées sur 0,02  $\mu\text{m}$ .

	0,3 g/L	1 g/L	2 g/L	5 g/L
CR * eau (kHz)		1-2		
CR * solution (kHz) à 90°	3,787	7,422	12,824	27,989
$M_{app}$ (g/mol)	/	$2,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$
$R_h$ (nm)	/	3,3	2,9	3,0

\* CR = Count Rate : proportionnel à l'intensité diffusée

En conclusion, on obtient un **rayon hydrodynamique de 3 nm**, ainsi qu'un **nombre d'agrégation de 3**, calculé via le rapport de la masse molaire apparente  $M_{app}$  d'une micelle sur la masse molaire en masse  $\overline{M}_w$  d'une chaîne de copolymère.

### II.2.3.2. Comportement en température du LPOEGMA en solution aqueuse

D'après la mesure en UV-visible en température (Figure 16), il y a une augmentation significative de l'absorbance à 60°C (sa température de point trouble caractéristique), à partir de laquelle le système se trouble complètement.

Plusieurs mesures ont donc été faites sur une solution de LPOEGMA<sub>22</sub> à 5 g/L, à 55°C (juste en dessous de la  $T_{PT}$ ), et après refroidissement à température ambiante suite au chauffage dans un bain à 70°C pendant 1h.

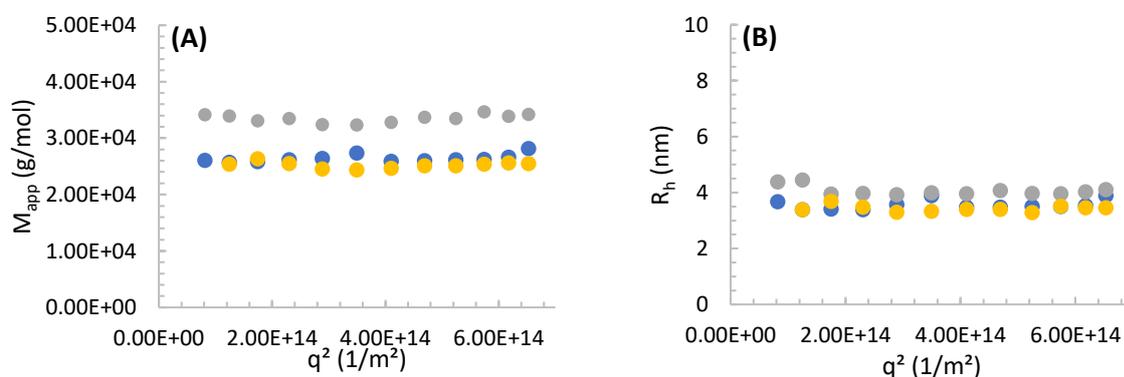


Figure 20 : Evolution de (A)  $M_{app}$  et (B)  $R_h$  d'une solution de LPOEGMA<sub>22</sub> à 5 g/L en fonction de l'angle et à différentes températures (●) 20 °C, (●) 55 °C, (●) retour à 20 °C après 1h à 70 °C.

Malgré la légère augmentation du  $R_h$  et de la masse molaire des objets à 55 °C ( $N_{ag} = 4$  au lieu de 3), la barre d'erreur considérée pour ces mesures ne permet pas d'observer une évolution significative jusqu'à 55 °C (Figure 20).

De plus, si l'on dépasse la température critique du LPOEGMA<sub>22</sub> et que l'on revient à 20°C, le système est parfaitement réversible.

Les caractéristiques physico-chimiques du LPOEGMA<sub>22</sub>, ainsi que son comportement en solution aqueuse ayant été étudiés de manière approfondie, il a par la suite été mélangé physiquement avec une solution de LP(iPrOx)<sub>28</sub> afin de déterminer si le mélange physique des deux copolymères dont les blocs hydrophiles sont de nature et architecture différentes peut avoir un impact sur le comportement global du système.

### II.3. Etude de mélanges physiques LPiPrOx/LPOEGMA

#### II.3.1. Evolution de la température de point de trouble

Les mélanges ont été faits à partir de solution de copolymères LP(iPrOx)<sub>18</sub> **1a** (cf. Chapitre 2 – p.3) et LPOEGMA<sub>22</sub> **3b**. Des mélanges physiques de LP(iPrOx)<sub>18</sub>/LPOEGMA<sub>22</sub> à des fractions massiques de 25/75, 50/50 et 75/25 et une concentration totale de 2 g/L dans le PBS ont été préparés. Des analyses UV-Visible ont ensuite permis de déterminer la température de point de trouble des mélanges.

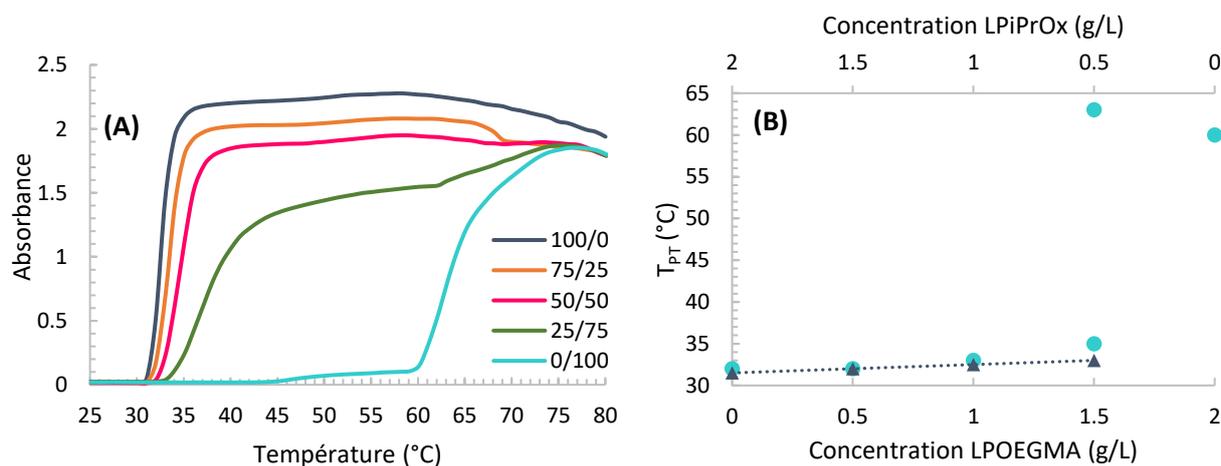


Figure 21 : (A) Spectres d'absorbance UV-visible de mélanges physiques LP(iPrOx)<sub>18</sub>/LPOEGMA<sub>22</sub> (w:w)% dans le PBS à 2 g/L en fonction de la température. Montée en T de  $v = 1$  °C/min, 1 mesure tous les 1 °C. (B) Evolution de la  $T_{PT}$  (●) du mélange en fonction de la concentration massique en LPOEGMA<sub>22</sub> et LP(iPrOx)<sub>28</sub> dans la solution ; (▲) du LP(iPrOx)<sub>18</sub> en fonction de sa concentration massique en solution.

D'après ces analyses UV-visible en température (Figure 21A), une seule transition apparaît jusqu'à la proportion massique 50/50, puis il y a apparition d'une seconde transition autour de 60 °C, température qui correspond à la  $T_{PT}$  du LPOEGMA<sub>22</sub>. Cette seconde transition pourrait être due à un phénomène d'agrégation en deux temps comme décrit sur les systèmes LP(iPrOx)<sub>n</sub>/LP(EtOx)<sub>p</sub> dans le chapitre 2. On constate bien une légère évolution de la température de point de trouble du mélange par rapport à celle du LP(iPrOx)<sub>18</sub> seul, mais cette variation reste très proche de celle observée pour le LP(iPrOx)<sub>18</sub> à une concentration identique à celle dans laquelle il est présent dans le mélange (Figure 21B). Il est donc, dans ce cas, beaucoup plus compliqué de conclure de manière fiable quant à l'hybridation de ces deux copolymères.

Il est donc incontournable ici d'étudier ces mélanges en diffusion de la lumière afin de poursuivre la caractérisation de ce système et de tenter de démontrer de façon directe l'hybridation entre les polymères.

### *II.3.2. Mesures en diffusion de lumière*

Comme décrit précédemment (cf. Chapitre 2 – p. 20), la méthode usuelle pour déterminer l'hybridation ou non entre deux copolymères consiste à comparer l'intensité diffusée par le mélange ( $I_{mél}$ ), avec la somme théorique des intensités  $I_1$  et  $I_2$  des polymères seuls (Figure 22 et Tableau 6).

Trois solutions sont alors étudiées : une solution de LP(iPrOx)<sub>28</sub> à 1 g/L, une solution de LPOEGMA<sub>22</sub> à 1 g/L et une solution de LP(iPrOx)<sub>28</sub>/LPOEGMA<sub>22</sub> 50/50 à 2 g/L.

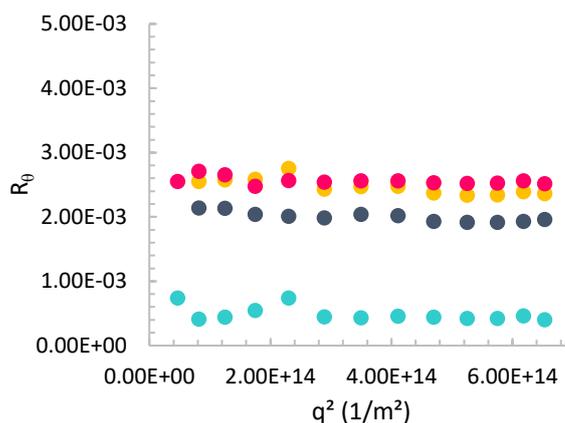


Figure 22 : Intensités diffusées (●) théoriques (en absence d'hybridation) et (●) expérimentales  $R_\theta$  du mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/LPOEGMA<sub>22</sub> 50/50 (%wt) à 2 g/L, et des copolymères (●) LP(iPrOx)<sub>28</sub> et (●) LPOEGMA<sub>22</sub> seuls à 1 g/L.

L'intensité diffusée par le mélange est quasiment la même que la somme des intensités calculée pour une co-existence des deux systèmes micellaires non hybridés.

Tableau 6 : Comparaison des données obtenues pour les copolymères seuls, le mélange 50/50 et la somme théorique LP(iPrOx)<sub>28</sub> + LPOEGMA<sub>22</sub>.

Echantillon	C totale (g.L <sup>-1</sup> )	1/M <sub>app</sub> (mol.g <sup>-1</sup> )	M <sub>app</sub> (g.mol <sup>-1</sup> )	R <sub>h</sub> (nm)	R/K = M <sub>app</sub> *C (g <sup>2</sup> .mol <sup>-1</sup> .L <sup>-1</sup> )
(A) LPOEGMA <sub>22</sub> 1 g/L	1	4,0E-05	2,5E+04	3,3	2,6E+04
(B) LP(iPrOx) <sub>28</sub> 1 g/L	1	1,3E-05	8,0E+04	6,4	7,8E+04
(C) LP(iPrOx) <sub>28</sub> 1 g/L + LPOEGMA <sub>22</sub> 1 g/L	2	1,7E-05	6,0E+04	5,8	1,2E+05
Somme mathématique de (A)+(B) (Supposant non hybridation)	2	1,9E-05	5,2E+04	5,6	1,0E+05

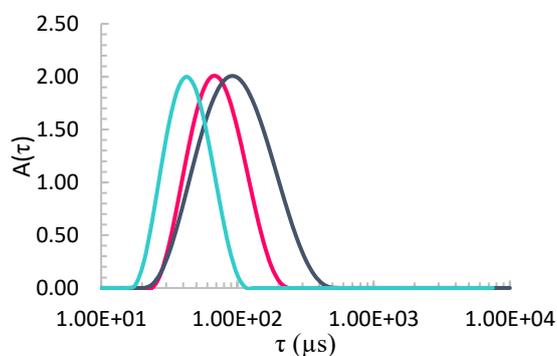


Figure 23 : Distributions à 90° des temps de relaxation pour les solutions aqueuses de (—) LP(iPrOx)<sub>28</sub> 1 g/L, (—) LPOEGMA<sub>22</sub> 1 g/L et (—) le mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/LPOEGMA<sub>22</sub> 50/50 %(w/w) 2 g/L.

Le tracé des fonctions d'autocorrélation des deux polymères seuls et du mélange massique 50/50 ont également été comparés à la fonction d'autocorrélation calculée en supposant qu'il n'y a pas hybridation entre le LP(iPrOx)<sub>28</sub> et le LPOEGMA<sub>22</sub> (Figure 24).

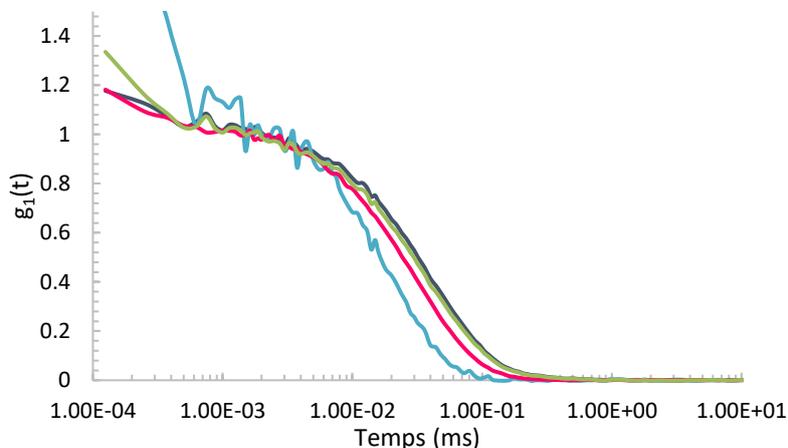


Figure 24 : Fonctions d'autocorrélation à 90° des solutions aqueuses de (—) LP(iPrOx)<sub>28</sub> 1 g/L, (—) LPOEGMA<sub>22</sub> 1 g/L, (—) mélange 50/50 % (w/w) 2 g/L et (—) somme théorique calculée si non hybridation.

Dans la barre d'erreur considérée, il y a très peu de différence entre la fonction d'autocorrélation mesurée pour le mélange 50/50 et celle calculée.

On ne peut donc pas conclure sur la base de la diffusion de lumière (ni en statique, ni en dynamique) quant à l'hybridation de ces deux copolymères.

Soit l'hybridation ne se produit pas, soit elle conduit à des objets dont les caractéristiques sont les mêmes, dans la barre d'erreur, que les caractéristiques moyennes des deux systèmes micellaires de départ (Tableau 6 et Figure 23).

Malheureusement, les caractéristiques du mélange obtenues en diffusion de la lumière ne permettent pas de confirmer ou non la présence de micelles mixtes. De plus, l'étude du mélange en température n'est pas envisageable ici car les  $T_{PT}$  du LP(iPrOx)<sub>28</sub> et des mélanges sont bien trop proches.

### II.3.3. Conclusion

Il n'a donc pas été possible pour le système LPiPrOx/LPOEGMA de démontrer de façon formelle l'hybridation des micelles, que ce soit de façon directe en diffusion de la lumière ou

indirecte via l'étude de la modulation du point de trouble. Cependant, en UV-Visible, aucune agrégation individuelle du LPOEGMA<sub>22</sub> seul n'est observé même lorsqu'il est présent à 25 % et 50 % en masse dans le mélange LP(iPrOx)<sub>n</sub>/LPOEGMA<sub>22</sub>. Cela laisse plutôt penser que le système s'hybride bien.

Il est en fait probable que le LPOEGMA, de par son architecture, ait un pouvoir tensioactif plus faible que le copolymère linéaire correspondant, et donc qu'il ne soit pas capable de stabiliser le LP(iPrOx)<sub>n</sub> lorsque celui-ci perd sa solubilité dans l'eau. Cela expliquerait l'apport très limité en termes de propriétés du système mixte final.

## Conclusion

Dans la première partie de ce chapitre, des mélanges physiques entre deux copolymères linéaires possédant des blocs hydrophobes de nature très proche et des blocs hydrophiles de natures différentes ont été étudiés.

Le mélange du LP(iPrOx)<sub>28</sub> avec chacun des trois copolymères C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>x</sub> (n= 10, 19 ou 92) étudiés permet bien la modulation de la température de point de trouble du système de 40 °C pour le LP(iPrOx)<sub>28</sub> seul à 61 °C en fonction de la proportion massique en chacun des copolymères en solution. Les mesures en diffusion de la lumière à température ambiante n'ont globalement pas permis de démontrer de façon directe la mixité des systèmes (à l'exception du C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>10</sub> dont le mélange avec LP(iPrOx)<sub>28</sub> permet la formation de micelles bien définies de petite taille, ce qui n'est pas le cas pour C<sub>18</sub>E<sub>10</sub> seul, et qui prouve donc l'hybridation du mélange LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>10</sub>). Des expériences supplémentaires en diffusion de la lumière en température ont permis de confirmer que la formation de micelles mixtes LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>19</sub> ou LP(iPrOx)<sub>28</sub>/C<sub>18</sub>-*b*-PEO<sub>92</sub> est bien responsable de la modulation de la T<sub>PT</sub>. La comparaison des résultats obtenus pour les mélanges avec les trois copolymères Brij® en fonction de leurs proportions massiques ou molaires en solution, a d'ailleurs permis de montrer que premièrement, à proportion massique équivalente, les T<sub>PT</sub> sont identiques quelle que soit la longueur du bloc PEO, et deuxièmement qu'à proportion molaire identique, les chaînes de PEO les plus longues stabilisent mieux.

La voie du mélange physique pour moduler les propriétés finales de micelles mixtes s'est donc révélée fructueuse sur des copolymères linéaires dont la nature chimique des blocs hydrophiles est très différente. Ces résultats novateurs permettent d'étendre davantage le domaine d'application de l'approche formulatoire développée dans l'équipe.

Dans une seconde partie, nous avons cherché à repousser davantage les limites de cette approche en mélangeant des copolymères possédant à la fois des natures de bloc hydrophile mais également des architectures différentes. D'abord, le LPOEGMA a été synthétisé avec succès de manière contrôlée par ATRP avec un lipoamorceur bromé issu de l'huile de lin. Sa caractérisation a mis en avant la formation d'objets de très faible nombre d'agrégation, probablement en raison de l'encombrement de chaque chaîne de copolymère. Lorsque ce copolymère est mélangé physiquement avec le LP(iPrOx)<sub>n</sub>, la température de point de trouble est très faiblement modulée, et les mesures en diffusion de la lumière ne permettent pas

d'obtenir plus d'informations sur l'hybridation du système car les  $T_{PT}$  du mélange et du  $LP(iPrOx)_n$  seul sont trop proches. Le comportement faiblement associatif du LPOEGMA pourrait expliquer la faible évolution de la  $T_{PT}$  des mélanges mais il est également possible que les limites de l'approche formulatoire aient ici été atteintes.

### Références

- (1) El Asmar, A.; Gimello, O.; Morandi, G.; Le Cerf, D.; Lapinte, V.; Burel, F. Tuning the Thermo-Sensitivity of Micellar Systems through a Blending Approach. *Macromolecules* **2016**, *49* (11), 4307–4315.
- (2) El Asmar, A.; Morandi, G.; Burel, F. Synthesis of Dual Sensitive Lipid- b- Poly(Dimethylaminoethyl Methacrylate) Copolymers, Self-Assemblies and Modulation of Cloud Point Temperatures through Physical Blends with Lipid- b-Poly(2-Isopropyl-2-Oxazoline). *Macromolecules* **2019**, *52* (23), 9160–9167.
- (3) Tumolo, T.; Angnes, L.; Baptista, M. S. Determination of the Refractive Index Increment (Dn/Dc) of Molecule and Macromolecule Solutions by Surface Plasmon Resonance. *Anal. Biochem.* **2004**, *333* (2), 273–279.
- (4) Renou, F.; Benyahia, L.; Nicolai, T.; Glatter, O. Structure and Rheology of Mixed Polymeric Micelles Formed by Hydrophobically End-Capped Poly(Ethylene Oxide). *Macromolecules* **2008**, *41* (17), 6523–6530.
- (5) Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules* **2012**, *45* (10), 4015–4039.
- (6) Hespel, L.; Kaifas, E.; Lecamp, L.; Picton, L.; Morandi, G.; Burel, F. Synthesis of PH-Sensitive Micelles from Linseed Oil Using Atom Transfer Radical Polymerisation (ATRP). *Polymer (Guildf)*. **2012**, *53* (20), 4344–4352.
- (7) Lutz, J. F.; Hoth, A. Preparation of Ideal PEG Analogues with a Tunable Thermosensitivity by Controlled Radical Copolymerization of 2-(2-Methoxyethoxy)Ethyl Methacrylate and Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylate. *Macromolecules* **2006**, *39* (2), 893–896.
- (8) Abdelhamid, D.; Arslan, H.; Zhang, Y.; Uhrich, K. E. Role of Branching of Hydrophilic Domain on Physicochemical Properties of Amphiphilic Macromolecules. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (4), 1457–1462.



## Chapitre IV :

Elaboration d'une technique de  
caractérisation directe des micelles  
mixtes par FRET



## Introduction

Ce dernier chapitre est consacré à l'étude de l'adaptation d'une technique de fluorescence, le FRET, pour démontrer la mixité des systèmes micellaires de manière directe, c'est-à-dire sans passer par l'étude des propriétés intrinsèques du système.

L'objectif est de prouver la mixité des micelles formées en greffant deux molécules fluorescentes complémentaires sur une insaturation de la chaîne lipidique de deux copolymères différents (un donneur sur le copolymère A et un accepteur sur le copolymère B). Lors de la formation de micelles mixtes, les deux fluorophores se retrouveront alors au cœur des micelles dont la taille caractéristique, couronne comprise, est d'une dizaine de nanomètres. Cette faible taille des micelles permettra alors aux deux fluorophores d'être à une distance suffisamment petite pour que le transfert d'énergie entre les deux molécules soit possible (Figure 1).

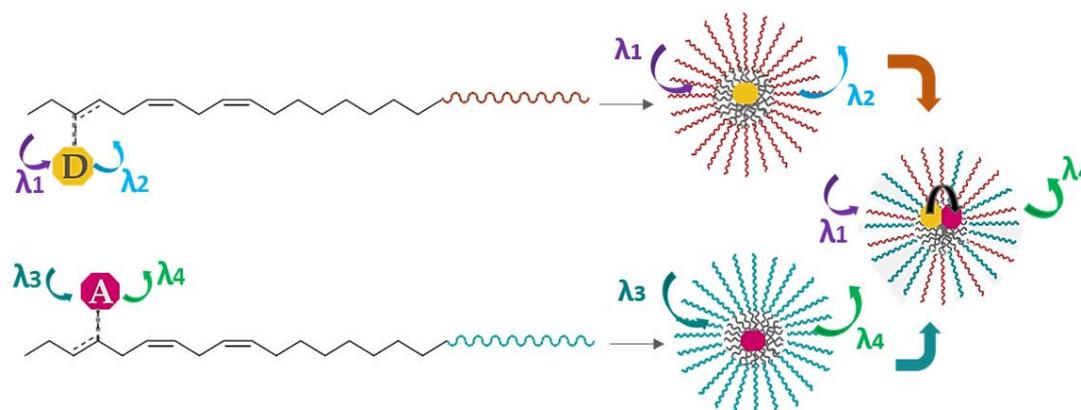


Figure 1 : Représentation schématique du greffage des fluorophores donneur (D) et accepteur (A) sur les insaturations de la chaîne lipidique du copolymère et principe du FRET.

Aussi l'apparition du phénomène de FRET (c'est-à-dire l'émission d'une longueur d'onde caractéristique de l'accepteur lors de l'excitation du donneur) servirait de méthode directe de détection des micelles mixtes.

Ce chapitre décrira dans un premier temps la synthèse des fluorophores utilisés, ainsi que leur caractérisation en spectrophotométrie UV-visible et en fluorescence. Ensuite, seront présentées les expériences de fluorescence permettant d'identifier les fluorophores complémentaires pour détecter la formation de micelles mixtes à cœur lipidique. Et enfin viendra la description des approches développées pour le greffage des fluorophores sur les copolymères.

## I. Synthèse et caractérisations des fluorophores

Afin de rendre envisageable le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes, la première contrainte à respecter est de choisir deux fluorophores complémentaires, c'est-à-dire que le spectre d'émission du donneur se superpose partiellement au spectre d'absorption de l'accepteur.

De plus, ces fluorophores seront tous deux liés de façon covalente au bloc hydrophobe des copolymères amphiphiles étudiés. Aussi, afin de perturber au minimum leur comportement physico-chimique, la taille des fluorophores a été minimisée autant que possible.

Enfin, l'objectif étant d'attacher ces fluorophores sur les copolymères étudiés, ceux-ci doivent comporter une fonction d'ancrage. La fonction thiol a été sélectionnée comme extrémité réactive afin d'incorporer les fluorophores par réaction thiol-ène sur les insaturations lipidiques.

Il a donc été tout d'abord nécessaire de mettre au point la synthèse de deux fluorophores complémentaires portant des fonctions thiols.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Ludovic Jean et le Dr. Alexandre Haefelé (Laboratoire COBRA - Equipe Chimie Bioorganique).

### I.1. Synthèse des fluorophores

Dans un premier temps, deux fluorophores couramment décrits dans la littérature pour des applications biochimiques, biomédicales et environnementales<sup>1-3</sup> ont été sélectionnés. L'un est dérivé de la coumarine et joue le rôle de fluorophore donneur, et l'autre est un dérivé du 1,8-naphtalimide et agit en tant que fluorophore accepteur. Ces deux molécules ont l'avantage d'être de petite taille, en comparaison avec les autres types de fluorophores cités dans la littérature<sup>4</sup>.

Leur structure (Figure 2) a été modifiée afin d'incorporer une fonction –thiol sur chacun de ces fluorophores.

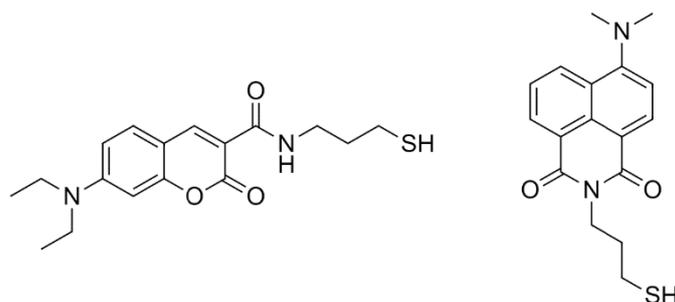


Figure 2 : Structures chimiques de la coumarine thiol déprotégé (CoumSH) (gauche) et du Naphtyle thiol déprotégé (NaphtSH) (droite)

Ces synthèses ont été mises au point en collaboration avec le laboratoire COBRA, dans l'équipe de chimie bio-organique.

Afin d'incorporer une fonction –thiol dans la structure des deux fluorophores ciblés, un unique aminothiols protégé, le 3-(tritylmercaptopropylamine), est synthétisé selon le protocole décrit dans la littérature <sup>5</sup>. Il s'agit d'une réaction de substitution nucléophile entre un thiol (tritylmercaptan) et la 3-bromopropylamine en présence d'hydruure de sodium. Après purification sur colonne de silice le produit pur est obtenu avec un rendement de 64 %.

Cette molécule intermédiaire comporte une fonction thiol protégée par un groupement trityle pour éviter sa dimérisation par création d'un pont disulfure (lors des étapes de synthèse suivantes ou du stockage) qui empêcherait le greffage ultérieur par réaction thiol-ène sur les copolymères (Figure 3).

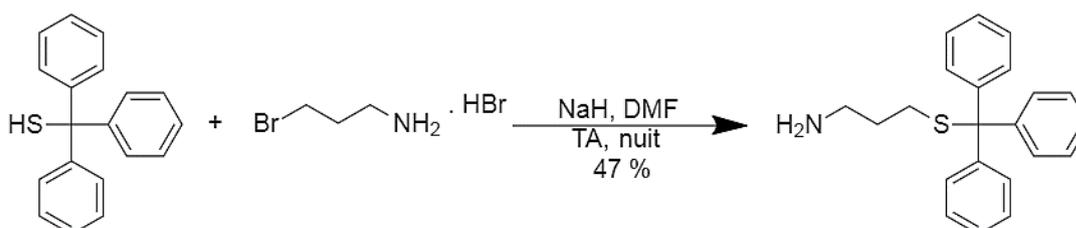


Figure 3: Schéma de synthèse de l'aminothiol protégé (NH<sub>2</sub>STr)

### 1.1.1. Synthèse du Naphtyle

Le coût d'une molécule de structure similaire au produit final étant prohibitif et la synthèse étant bien décrite dans la littérature, le fluorophore dérivé de 1,8-naphtalimide a été synthétisé à partir de l'anhydride 4-bromo-1,8-naphtalique en trois étapes (Figure 4).

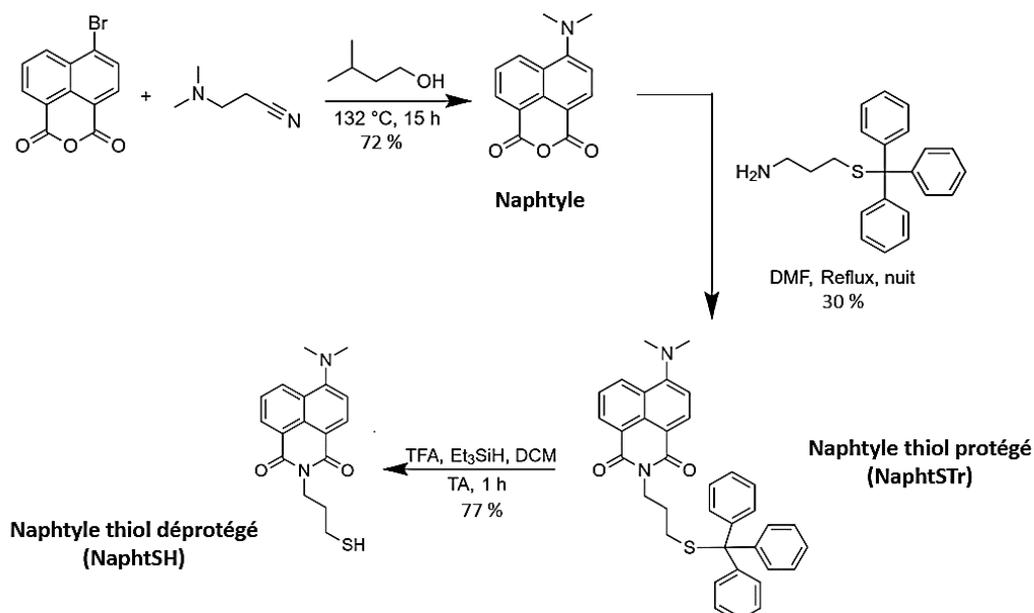


Figure 4 : Schéma réactionnel de la synthèse du dérivé du 1,8-naphtalimide (Naphtyle thiol déprotégé)

La réaction entre l’anhydride 4-bromo-1,8-naphtalique et le 3-diméthylaminopropionitrile dans le 3-méthylbutan-1-ol (étape 1) a été réalisée en suivant le protocole décrit par Kollár et al.<sup>6</sup> Le temps de réaction étant de 15 h, cette réaction a également été testée dans un appareil à micro-ondes Anton Paar à 200 °C. Cette technique permet d’obtenir le produit désiré avec un rendement après purification de 66 % en 15 minutes contre 72 % en 15 heures par voie thermique. Cependant, bien que cette voie soit très intéressante, le dispositif micro-ondes disponible au laboratoire n’a pas permis de l’envisager sur une échelle satisfaisante à l’obtention d’une quantité suffisante de produit pour les étapes suivantes.

L’anhydride 4-N,N-diméthylamino-1,8-naphtalique (appelé « Naphtyle » dans la suite de ce manuscrit pour des raisons de simplicité) formé lors de l’étape précédente est ensuite solubilisé dans le DMF en présence de l’aminothiols précédemment synthétisé, et le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant une nuit. Le protocole de cette réaction est issu de la littérature<sup>7</sup> et a été modifié pour améliorer la solubilité des réactifs et le rendement de la réaction. Le produit est finalement purifié sur colonne de silice pour obtenir le produit pur (appelé « Naphtyle thiol protégé » ou « NaphtSTr ») avec un faible rendement de 30 % (Figure 5). Cette étape est la difficulté principale de la synthèse de ce fluorophore. Dans la littérature, la réaction entre l’anhydride 4-N,N-diméthylamino-1,8-naphtalique et l’éthanolamine est pourtant décrite comme quantitative. Le faible rendement observé ici pourrait s’expliquer par l’encombrement stérique important de l’amine qui comporte trois groupements phényles.

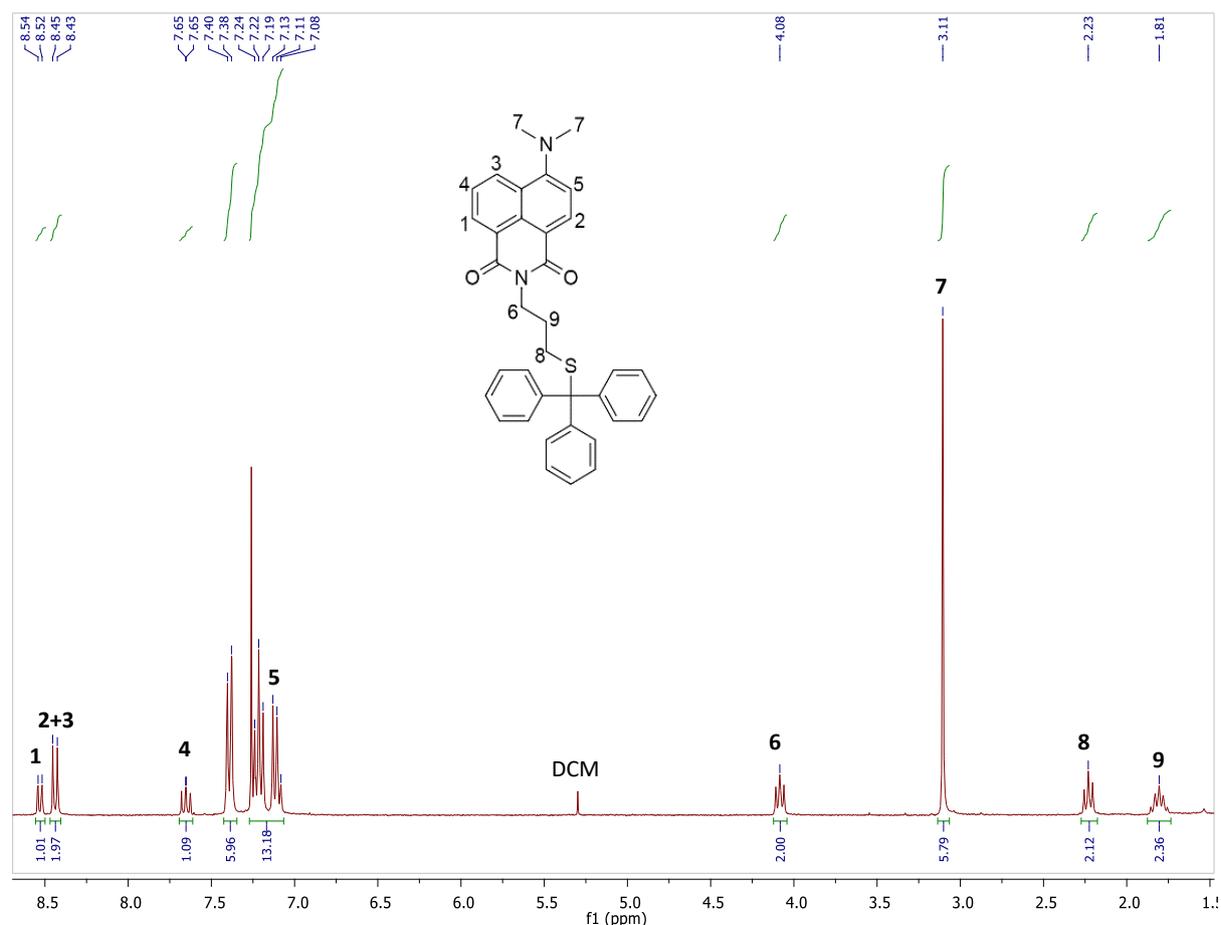


Figure 5 : Spectre RMN <sup>1</sup>H du naphtyle thiol protégé (NaphtSTR) dans CDCl<sub>3</sub>

La dernière étape est la déprotection du thiol en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) et de triéthylsilane dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 1 h. Le protocole utilisé a été extrait de la littérature où la réaction est effectuée sur une amide de structure très différente<sup>8</sup>. La fonction thiol étant connue pour se dimériser plus ou moins facilement, il est nécessaire de réaliser cette réaction de déprotection juste avant la réaction thiol-ène. Enfin, une purification sur colonne de silice permet d'obtenir le produit (appelé « Naphtyle thiol déprotégé » ou « NaphtSH ») avec un rendement de 77 %.

Le fluorophore ciblé, un dérivé du 1,8-naphthalimide fonctionnalisé par un thiol, est finalement obtenu en trois étapes avec un rendement global de 17 %.

### 1.1.2. Synthèse de la Coumarine

La synthèse du fluorophore dérivé de la coumarine se fait en 4 étapes selon le schéma réactionnel suivant (Figure 6).

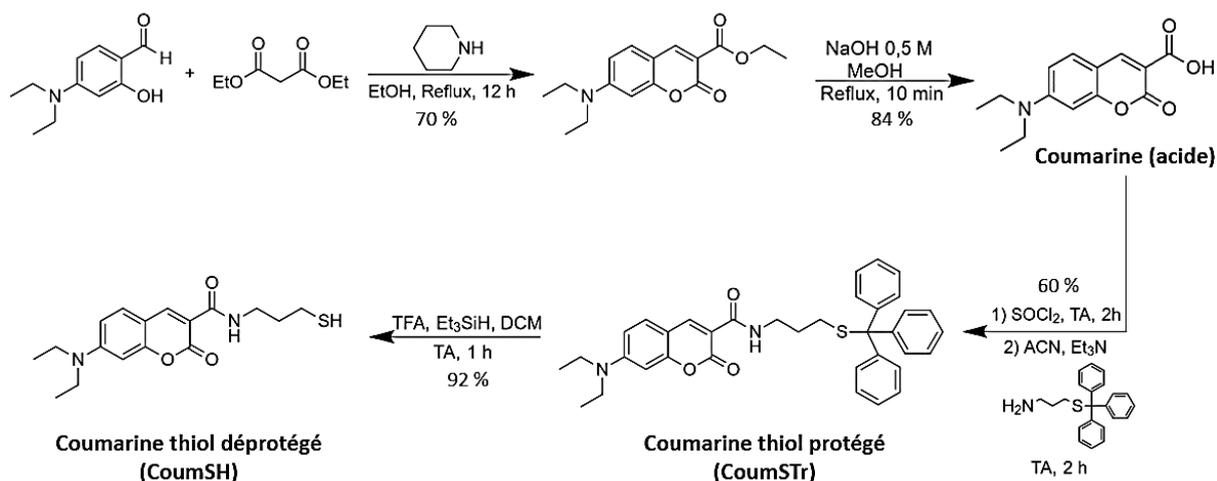


Figure 6 : Schéma réactionnel de la synthèse du dérivé de la coumarine (Coumarine thiol déprotégé).

Les deux premières étapes de la formation de la coumarine mettent en jeu un protocole établi par Corrie sur la même molécule<sup>9</sup>. La 4-(diéthylamino)salicylaldéhyde et le malonate de diéthyle sont solubilisés dans de l'éthanol avec la pipéridine. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 12 h. Il se produit au cours de cette réaction une attaque nucléophile du carbanion formé en  $\alpha$  des esters sur l'aldéhyde aromatique, et une transestérification entre l'hydroxyle aromatique et le malonate. Après différents lavages, le produit pur (appelé « Coumarine acide ») est obtenu sous forme cristalline avec un rendement de 70 %. La totalité du produit est solubilisé dans du méthanol et mis en présence d'hydroxyde de sodium afin de saponifier l'ester selon le protocole décrit par Corrie<sup>9</sup>. Après purification, la coumarine portant une fonction acide carboxylique est obtenue sous forme d'un solide cristallin avec un rendement de 84 %.

L'étape suivante est la réaction entre cette coumarine et l'aminothiols-protégé précédemment synthétisé. Le protocole de cette réaction a été mis au point dans la thèse de Roubinet<sup>10</sup> en présence de 2-iodoaniline et adapté sur ces réactifs. Au cours de cette étape, la fonction acide carboxylique est tout d'abord transformée en chlorure d'acyle par action de chlorure de thionyle (SOCl<sub>2</sub>) pendant 2 h. Après évaporation du chlorure de thionyle, le composé est

resolubilisé dans de l'acétonitrile anhydre et l'aminothiolo-protégé est introduit, en présence d'une base (triéthylamine) afin de promouvoir la réaction d'amidation. Une purification sur colonne de silice permet d'obtenir le produit pur (appelé « Coumarine thiol protégé » ou « CoumSTr ») avec un rendement de 60 %.

La formation des fluorophores a été démontrée en RMN  $^1\text{H}$  (Figure 7) et  $^{13}\text{C}$ , ainsi qu'en spectrométrie de masse.

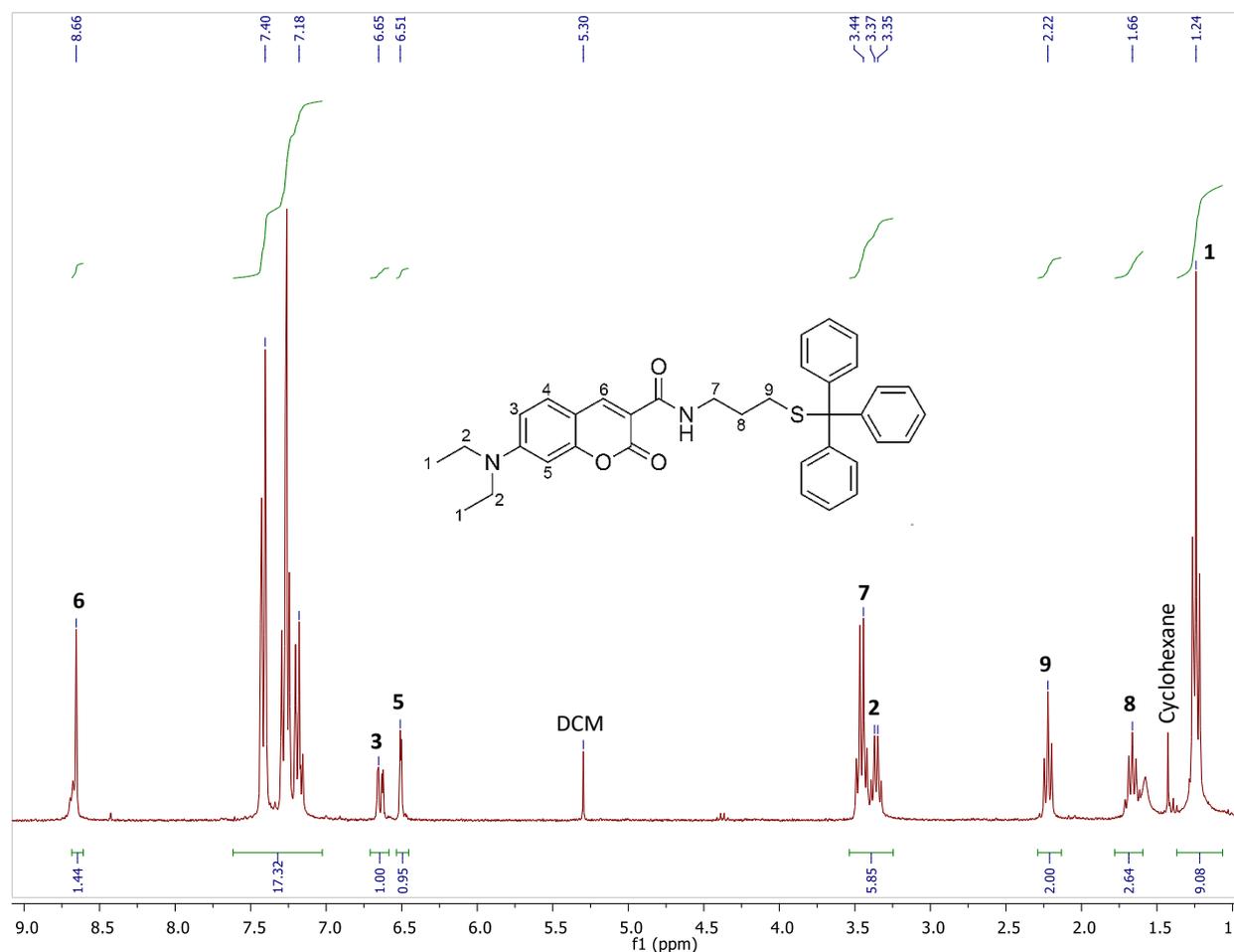


Figure 7 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la coumarine thiol protégé (CoumSTr) dans  $\text{CDCl}_3$ .

La dernière étape de déprotection du thiol en présence de TFA suit exactement le même protocole que pour le Naphtyle décrit auparavant (paragraphe I.1.1). La coumarine thiol déprotégé (ou « CoumSH ») pure est finalement obtenue avec un rendement de 92 %.

La synthèse du fluorophore dérivé de la coumarine et comportant la fonction d'ancrage thiol a donc été conduite avec succès en 4 étapes avec un rendement global de 32 %.

Les deux fluorophores synthétisés présentant une structure originale, leur caractérisation a ensuite été réalisée afin d'évaluer leur complémentarité en temps que couple FRET.

## I.2. Caractérisations et complémentarité des couples de fluorophores

### I.2.1. Couple Coumarine/Naphtyle

Les fluorophores ont d'abord été caractérisés individuellement en spectrophotométrie UV-visible et en fluorescence dans certains solvants organiques (dichlorométhane, méthanol, DMSO et DMF) pour déterminer leurs longueurs d'onde caractéristiques (absorption/excitation et émission), ainsi que leur coefficient d'absorption molaire. Ces données en solvants organiques sont détaillées en annexe 6.

Les informations les plus importantes dans le cadre de ce projet sont les caractéristiques des fluorophores lorsqu'ils sont encapsulés dans le cœur lipidique des micelles de copolymères. Les mesures suivantes visent donc à vérifier si le phénomène de FRET peut se produire entre ces deux fluorophores dans ces conditions.

Les fluorophores sont encapsulés dans les micelles selon un protocole de cosolvant/évaporation : ils sont solubilisés dans du dichlorométhane puis quelques  $\mu\text{L}$  de cette solution sont ajoutés à la solution micellaire pour atteindre une concentration en fluorophore de 1 ou 2 mg/L. La solution est ensuite agitée pendant une journée pour évaporer le solvant organique. La solution obtenue est alors limpide et aucun résidu n'est visible sur les parois. Les études précédentes conduites sur ces systèmes micellaires à cœur lipidique ont démontré une capacité d'encapsulation de la progestérone - hormone encombrée relativement difficile à encapsuler - de 14 mg/L<sup>11</sup>. Il semble donc raisonnable ici de supposer que la totalité du fluorophore a bien été encapsulée.

Des mesures de taille des micelles ont été réalisées au nanosizer avec l'un ou l'autre des fluorophores encapsulé à une concentration maximale de 10 mg/L (soit environ  $10^{-5}$  mol/L) dans une solution de LP(iPrOx)<sub>28</sub> ou de LP(EtOx)<sub>26</sub> à 1 g/L, et ont permis de montrer la conservation de la taille initiale des micelles après encapsulation.

La spectrophotométrie UV-visible et la fluorescence permettent de déterminer respectivement le spectre d'absorption et les spectres d'émission et d'excitation de chaque fluorophore encapsulé dans des micelles de LP(iPrOx)<sub>18</sub> (Figure 8).

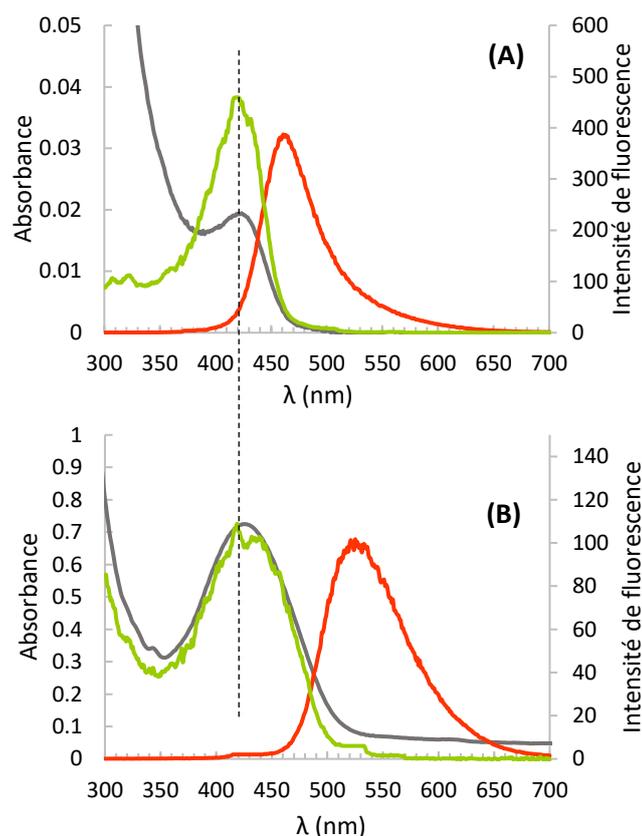


Figure 8 : Spectres (—) d’absorption (UV-visible), (—) d’excitation et (—) d’émission (fluorescence) (A) de la coumarine thiol déprotégé et (B) du naphthyle thiol déprotégé encapsulés (2 mg/L) dans une solution de LP(iPrOx)<sub>18</sub>.

Ces mesures permettent donc de déterminer pour la coumarine thiol déprotégé une longueur d’onde maximale d’excitation  $\lambda_{\text{exc}} = 421 \text{ nm}$  et une longueur d’onde maximale d’émission de  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$  et pour le naphthyle thiol déprotégé  $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ .

Ainsi, les deux fluorophores présentent un maximum d’excitation vers 420 nm, et il n’est pas possible de sélectionner une longueur d’onde qui excite sélectivement un seul fluorophore du fait du recouvrement des deux spectres d’absorbance et/ou d’excitation.

Par conséquent, ce couple de fluorophores, décrit comme complémentaire en phase aqueuse, n’est pas approprié pour une étude dans le cœur lipidique des micelles. Face à ce résultat inattendu, il a donc été nécessaire d’envisager la synthèse d’un nouveau fluorophore afin de remplacer le Naphtyle par une autre molécule fluorescente dont les spectres d’excitation et d’émission se trouvent sur une gamme de longueurs d’onde plus étroite et décalée par rapport à la coumarine.

### 1.2.2. Couple Coumarine/BODIPY

Le nouveau fluorophore accepteur envisagé pour le FRET est un dérivé de la famille des BODIPY (abréviation de bore-dipyrrométhène).

La synthèse de ce fluorophore, non détaillée ici, a été réalisée par une post-doctorante de l'équipe à partir d'un protocole décrit dans la littérature <sup>12</sup> et en collaboration avec le laboratoire COBRA. Cette synthèse est très délicate, et nécessite des temps de réaction parfaitement contrôlés afin d'obtenir la molécule souhaitée (Figure 9).

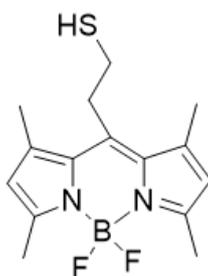


Figure 9 : Structure chimique du dérivé de BODIPY thiolé.

De la même façon que pour le Naphtyle et la Coumarine, le BODIPY a été encapsulé à 2 mg/L dans des micelles de LP(iPrOx)<sub>18</sub> via l'utilisation d'un cosolvant.

La solution de LP(iPrOx)<sub>18</sub> contenant le BODIPY encapsulé a par la suite été analysée en spectrophotométrie UV-visible et en spectroscopie de fluorescence (Figure 10) afin de déterminer les propriétés de ce fluorophore en milieu lipidique.

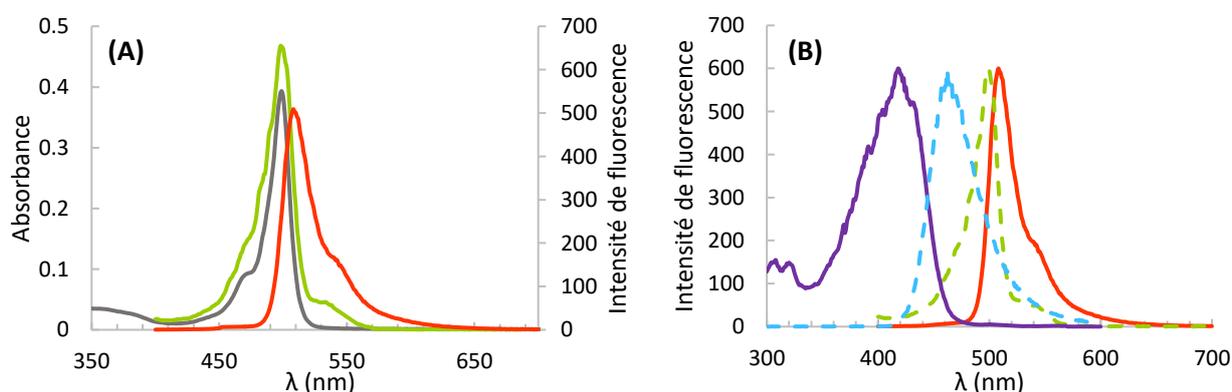


Figure 10 : (A) Spectres (—) d'absorption (UV-visible), (—) d'excitation et (—) d'émission (fluorescence) du BODIPY thiol protégé et (B) superposition des spectres d'excitation de (—) CoumSH et (—) BODIPY thiol protégé et d'émission de (—) CoumSH et (—) BODIPY thiol protégé encapsulés à 2 mg/L dans une solution de LP(iPrOx)<sub>18</sub> à 1 g/L.

Les spectres caractéristiques du BODIPY (Figure 10A) sont bien plus étroits que pour le Naphthyle et affichent leur maximum à **500 nm pour l'excitation et 510 nm pour l'émission**. La superposition des spectres d'excitation et d'émission de la coumarine et du BODIPY (Figure 10B) permet de confirmer deux conditions indispensables au FRET. D'une part, la séparation entre les spectres d'excitation de la coumarine et du BODIPY est suffisante pour limiter l'excitation directe du BODIPY lors de l'excitation de la coumarine. D'autre part, le critère autorisant le transfert d'énergie entre les deux fluorophores est respecté grâce à la superposition du spectre d'émission de la coumarine et du spectre d'excitation du BODIPY. Les deux fluorophores ont ensuite été co-encapsulés dans des micelles de LP(iPrOx)<sub>18</sub> afin de vérifier l'existence d'un phénomène de transfert d'énergie. Les fluorophores ont été encapsulés à une concentration de 1 mg/L, soit individuellement, soit simultanément, et les spectres d'émission obtenus lors d'une excitation à 400 nm ont été comparés (Figure 11).

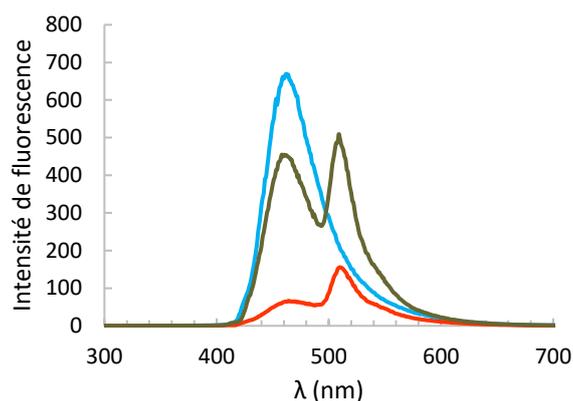


Figure 11 : Spectres d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 400$  nm) (—) de la Coumarine thiol déprotégé (1 mg/L), (—) du BODIPY thiol protégé (1 mg/L) et (—) du couple CoumSTr (1 mg/L)/BODIPY (1 mg/L) encapsulés dans une solution de LP(iPrOx)<sub>18</sub> à 2 g/L dans l'eau distillée.

Lorsque la coumarine est encapsulée seule (à 1 mg/L), une émission maximale à 460 nm est observée. On observe également une excitation très partielle du BODIPY encapsulé seul (à 1 mg/L) dans le système micellaire puisqu'il ré-émet très faiblement à 510 nm. Lorsque les deux fluorophores sont co-encapsulés (à 1mg/L chacun), on observe une réelle diminution de l'émission à 460 nm au profit d'une augmentation de l'émission à 510 nm ce qui est caractéristique d'un transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur.

Une étude préliminaire a également été effectuée pour suivre par fluorescence une éventuelle ré-organisation dans une solution contenant initialement les deux fluorophores encapsulés séparément. Pour cela, deux solutions de LP(iPrOx)<sub>18</sub> (à 2 g/L) contenant soit la coumarine thiol déprotégé (solution 1), soit le BODIPY (solution 2) ont été préparées. Puis, une troisième solution a été préparée en mélangeant les solutions 1 et 2 en volume équivalent (Figure 12).

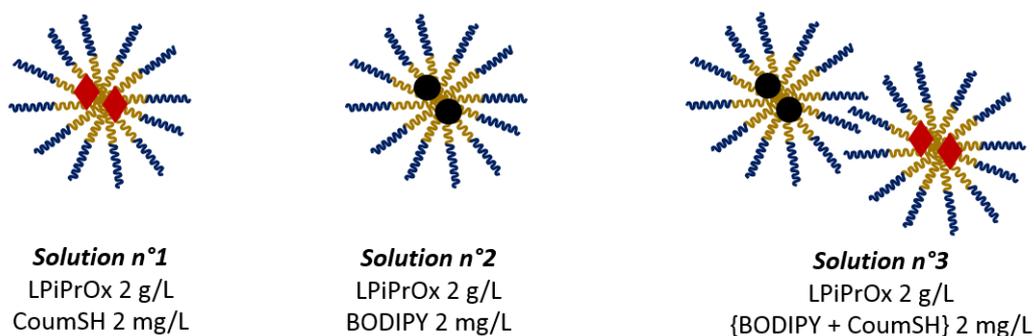


Figure 12 : Représentation schématique de la composition des trois solutions à  $t_0$ .

L'émission de fluorescence de chacune de ces solutions (lors d'une excitation à 420 nm) a été suivie pendant 2h à la longueur d'onde d'émission des fluorophores, soit 460 nm pour la coumarine seule, 510 nm pour le BODIPY seul et les deux longueurs d'onde pour le mélange. L'intensité de fluorescence des solutions 1 et 2 reste parfaitement constante au cours du temps.

Les points obtenus pour le mélange lors de cette cinétique ont été reportés sur la Figure 13.

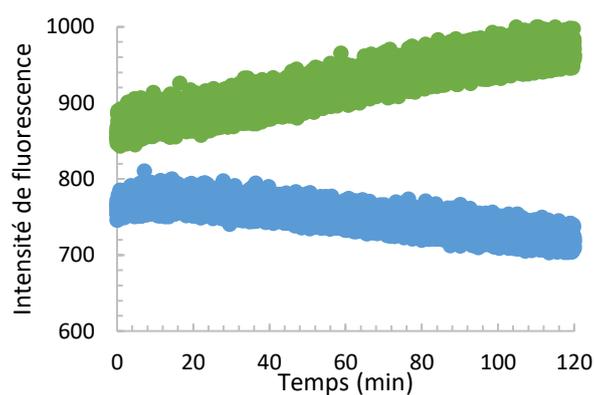


Figure 13 : Evolution de l'intensité de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 420$  nm) des fluorophores CSH/BODIPY (50/50) co-encapsulés (concentration totale 2 mg/L) dans une solution de LP(iPrOx)<sub>18</sub> à 2 g/L (Solution 3) à (●) 460 nm et (●) 510 nm.

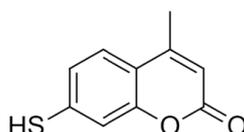
Lorsque les solutions micellaires contenant les deux fluorophores séparément encapsulés sont mises en contact, on observe, au cours du temps, une nette augmentation du signal à 510 nm, qui correspond à l'émission du BODIPY, et une diminution du signal à 460 nm, qui correspond à l'émission de la coumarine. Cela démontre bien l'apparition progressive d'un phénomène de FRET dans la solution qui provient d'une dynamique d'échange dans la solution. Les fluorophores rentrent donc progressivement en contact, avec une proportion relative variable dans les micelles. De plus, ces mêmes solutions ont été à nouveau analysées en fluorescence après 5 jours et semblent s'être stabilisées car le spectre d'émission a très peu évolué.

Cette expérience démontre que le FRET fonctionne bien entre les deux fluorophores coumarine et BODIPY. En revanche, les fluorophores étant encapsulés et non greffés, elle ne permet pas à ce stade de démontrer de façon formelle qu'il se produit une réorganisation des micelles par mobilité des chaînes de copolymères conduisant à la formation de micelles mixtes. En effet, un simple phénomène de diffusion des fluorophores à travers la phase aqueuse conduisant à une homogénéisation du milieu et à la rencontre des fluorophores dans le cœur des micelles pourrait également expliquer cette évolution.

### 1.2.3. Coumarine commerciale/Coumarine synthétisée

Bien que le couple précédent coumarine/BODIPY permette d'obtenir un phénomène de FRET, les difficultés de greffage rencontrées à posteriori et qui seront détaillées dans la partie suivante nous ont poussé à envisager l'utilisation d'un autre fluorophore donneur.

Il s'agit de la coumarine commerciale 7-mercapto-4-méthylcoumarine (MMC) (Figure 14).



Fluorophore donneur (MMC)

Figure 14 : Représentation de la structure chimique de la coumarine commerciale MMC.

D'après les informations données par le fournisseur, la MMC absorbe à 358 nm et émet à 385 nm dans le dichlorométhane. Elle semble donc compatible avec la coumarine synthétisée précédemment pour faire du FRET. Cependant, les longueurs d'onde d'excitation et

d'émission pouvant être impactées par le milieu <sup>13</sup>, ce fluorophore a lui aussi été analysé encapsulé dans une solution micellaire de LP(iPrOx)<sub>18</sub> en spectrophotométrie UV-visible et fluorescence (Figure 15).

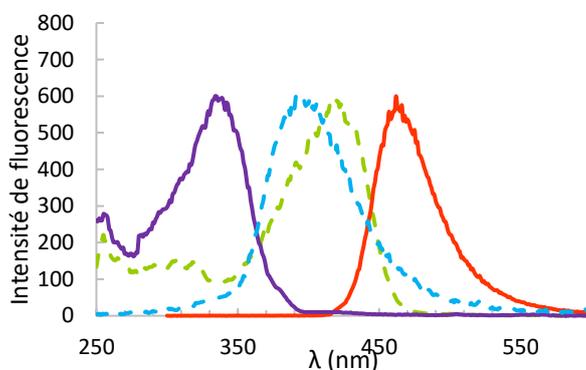


Figure 15 : Fluorescence des fluorophores encapsulés dans des solutions micellaires de LP(iPrOx)<sub>18</sub> : (—) Spectre d'excitation de la MMC ( $\lambda_{em} = 400$  nm); Spectre d'émission de (---) la MMC ( $\lambda_{exc} = 330$  nm) ; (- - -) spectre d'excitation de la CoumSH ( $\lambda_{exc} = 420$  nm) et (—) spectre d'émission de la CoumSH ( $\lambda_{em} = 510$  nm).

Ces analyses montrent un excellent recouvrement des spectres d'émission de la MMC et d'excitation de la coumarine synthétisée ainsi que la possibilité d'exciter sélectivement la MMC à des longueurs d'onde inférieure à 350 nm. La coumarine commerciale semble compatible avec la coumarine synthétisée pour des expériences de FRET. Il reste désormais à déterminer si le transfert d'énergie est suffisant pour obtenir des résultats exploitables. Afin de vérifier cela, des solutions de MMC et de CoumSH encapsulés séparément, puis conjointement dans des micelles de LP(iPrOx)<sub>18</sub> (1 g/L) ont été soumises à une irradiation à une longueur d'onde de 330 nm (Figure 16).

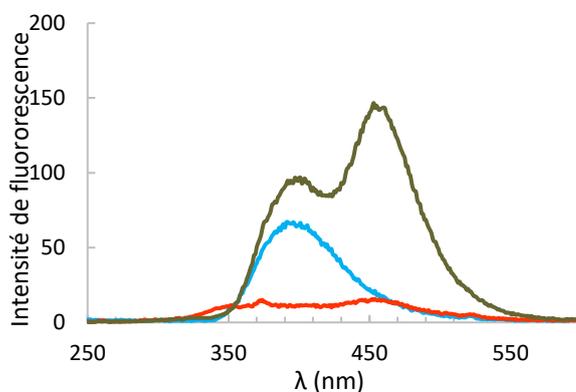


Figure 16 : Spectres d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 330$  nm) (—) de la MMC 1 mg/L, (—) de la CoumSH (1 mg/L) et (—) du couple MMC (1 mg/L)/CoumSH (1 mg/L) encapsulés dans une solution de LP(iPrOx)<sub>18</sub> à 1 g/L dans l'eau distillée.

A 330 nm, la MMC absorbe un maximum du rayonnement et le réemet à sa longueur d’onde d’émission de fluorescence caractéristique, soit 392 nm. Quant à la coumarine synthétisée, elle n’absorbe presque pas le rayonnement à 330 nm, et donc son spectre d’émission de fluorescence est très faible.

En revanche, lorsque les deux fluorophores sont co-encapsulés, il se produit très clairement un transfert d’énergie de la MMC (donneur) vers la CoumSH (accepteur) avec une augmentation significative de l’émission de fluorescence de la CoumSH. Cette expérience permet donc de démontrer la faisabilité du FRET avec ce couple de fluorophore.

### I.3. Conclusion

Cette étude a permis de caractériser les différents fluorophores synthétisés ou commerciaux sélectionnés (Tableau 1) et d'identifier deux couples de fluorophores complémentaires pour conduire des expériences de FRET dans le cœur lipidique des systèmes micellaires étudiés : 1) la coumarine synthétisée comme donneur et le BODIPY comme accepteur, ou 2) la coumarine commerciale MMC comme donneur et la coumarine synthétisée comme accepteur.

Tableau 1 : Récapitulatif des longueurs d'onde caractéristiques des différents fluorophores étudiés encapsulés dans LP(iPrOx)<sub>18</sub>.

Fluorophores	Longueur d’onde maximale d’excitation $\lambda_{exc}$	Longueur d’onde maximale d’émission $\lambda_{em}$
Naphtyle thiol déprotégé	426 nm	520 nm
Coumarine thiol déprotégé	421 nm	460 nm
BODIPY protégé	500 nm	510 nm
MMC	330 nm	392 nm

L’objectif principal du FRET dans ce projet étant de démontrer la mixité des systèmes micellaires LP(iPrOx)/LP(EtOx)<sub>26</sub> et LP(iPrOx)/LPOEGMA<sub>22</sub>, les deux fluorophores doivent nécessairement être attachés de façon covalente aux copolymères. Une réaction entre le thiol des molécules fluorescentes et l’alcène des chaînes lipidiques a donc été envisagée pour répondre à cette problématique.

## II. Greffage des fluorophores sur les copolymères amphiphiles par réaction thiol-ène

Connue depuis plus de 100 ans, la réaction thiol-ène est l'hydrothiolation d'une liaison C=C. Cette réaction a été largement utilisée dans le domaine des matériaux et des polymères pour la préparation de réseaux ou de films, et plus récemment, elle a également trouvé un intérêt dans d'autres domaines de synthèse comme « chimie-click ». La réaction thiol-ène possède un certain nombre de caractéristiques qui la rendent attractive et facile à mettre en œuvre. En effet, elle peut s'appliquer à un grand nombre de substrats contenant des insaturations plus ou moins activées, en présence d'un thiol de nature chimique variable. Cependant, la réactivité peut varier considérablement en fonction des conditions de réaction, de la nature de l'alcène considéré (encombrement stérique, stabilité du radical formé), ainsi que de la réactivité du thiol utilisé qui dépend notamment de la force de la liaison S-H (affaiblissement de la liaison S-H par liaisons H intramoléculaires, polarité) <sup>14</sup>.

La réaction de couplage thiol-ène a été choisie pour greffer les fluorophores sur les copolymères parce qu'elle permet d'exploiter les insaturations présentes sur les chaînes lipidiques et de confiner les fluorophores à l'intérieur des micelles, permettant une meilleure efficacité du FRET du fait de la proximité spatiale.

Il existe deux grands types de mécanismes pouvant être mis en jeu dans une réaction thiol-ène. Soit la réaction est faite par voie radicalaire, les radicaux étant induits par voie photochimique sous UV <sup>15</sup> ou thermique <sup>16</sup>, soit la réaction est réalisée en présence d'un catalyseur (base/nucléophile) <sup>17,18</sup> selon un mécanisme de type Thiol-Michael <sup>14</sup> (Figure 17).

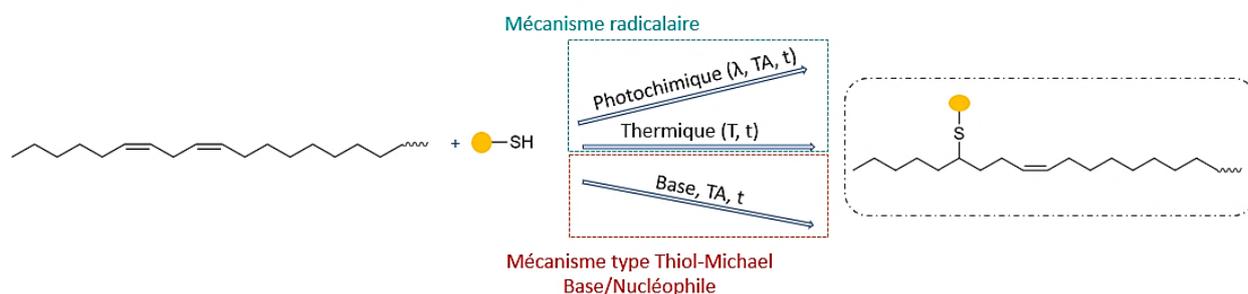


Figure 17 : Différentes voies réactionnelles pour la réaction thiol-ène.

La première voie envisagée dans notre étude est la réaction radicalaire par voie photochimique car elle met en jeu des conditions plus douces et un temps de réaction théoriquement plus court que les autres voies.

## II.1. Réaction thiol-ène par voie photochimique

Cette réaction met en jeu un mécanisme radicalaire amorcé par voie photochimique sous UV (Figure 18).

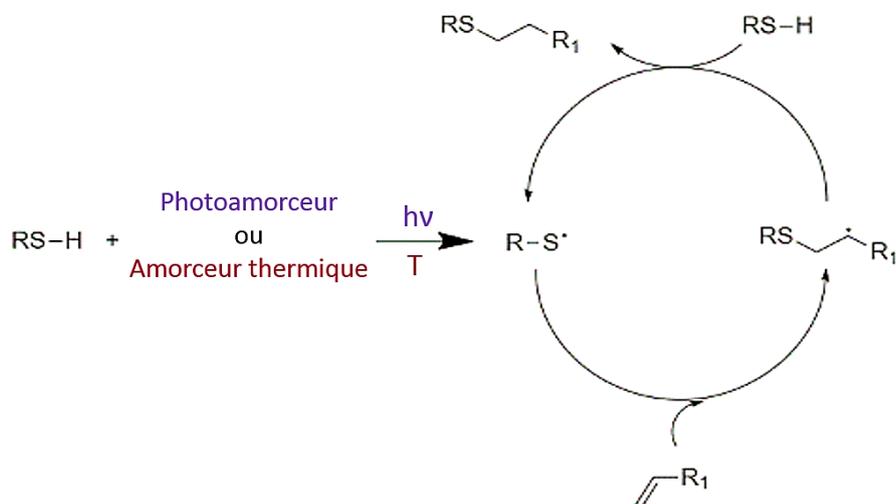


Figure 18 : Mécanisme radicalaire d’hydrothiolation d’une liaison C=C<sup>14</sup>.

La voie photochimique est la plus répandue dans la littérature pour réaliser une réaction thiol-ène, et quelques articles rapportent la faisabilité de cette réaction sur des huiles (maïs et colza) ou sur des acides gras tels que l’acide oléique en présence de thiols commerciaux (butanethiol, 2-mercaptoéthanol)<sup>15,19</sup>.

Dans la plupart de ces articles le mélange réactionnel est irradié sous atmosphère inerte à 365 nm en présence du photoamorçeur 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA).

Notre approche a été d’introduire le fluorophore le plus tard possible dans la synthèse et donc de greffer le fluorophore directement sur le copolymère plutôt que sur l’alcool gras ou le lipoamorçeur pour différentes raisons :

- Par soucis d’économie des fluorophores dont la synthèse est relativement complexe
- Le fluorophore pourrait être endommagé dans les conditions de polymérisation ou perturber le contrôle de celle-ci.
- Enfin, la purification par dialyse sur les copolymères est à priori plus simple à mettre en œuvre que les techniques de purification classiques utilisées en chimie organique sur de plus petites molécules.

La lampe polychromatique a précédemment montré son efficacité pour conduire des réactions thiol-ène sur des insaturations lipidiques<sup>20</sup>. De plus, les réactions thiolène sont ici réalisées en solvant organique, ce qui permet de s'affranchir des problématiques d'agrégation des polymères thermosensibles précédemment rencontrées avec cette lampe (cf. Chapitre 2 – II.4.). Ainsi, nous avons sélectionné la lampe polychromatique pour réaliser l'étude de la réaction thiol-ène par voie photochimique.

Cette réaction a été conduite sur les copolymères LP(iPrOx)<sub>28</sub> ou LPOEGMA<sub>22</sub> en présence de la CoumSH ou du BODIPY, ainsi que du photoamorceur DMPA. Une solution mère de DMPA a été préparée dans le solvant de la réaction, et celui-ci a été ajouté en plusieurs fractions égales toutes les 30 min pendant l'irradiation afin d'assurer la création de radicaux tout au long de la réaction et d'améliorer le rendement de la réaction

De plus, lorsque le greffage a été réalisé avec le BODIPY, la déprotection du thiol de celui-ci a été effectuée *in situ* dans un solvant dichlorométhane/méthanol 50/50, en présence de tous les réactifs pour la thiol-ène, afin de limiter sa dimérisation très rapide.

Le Tableau 2 récapitule les différents protocoles testés, avec différents ratios thiol/insaturation, différents solvants et temps d'irradiation, afin de pallier aux problèmes rencontrés qui sont évoqués par la suite.

Tableau 2 : Récapitulatif des protocoles de réaction thiol-ène testées sous UV avec une lampe polychromatique en présence du photoamorceur DMPA.

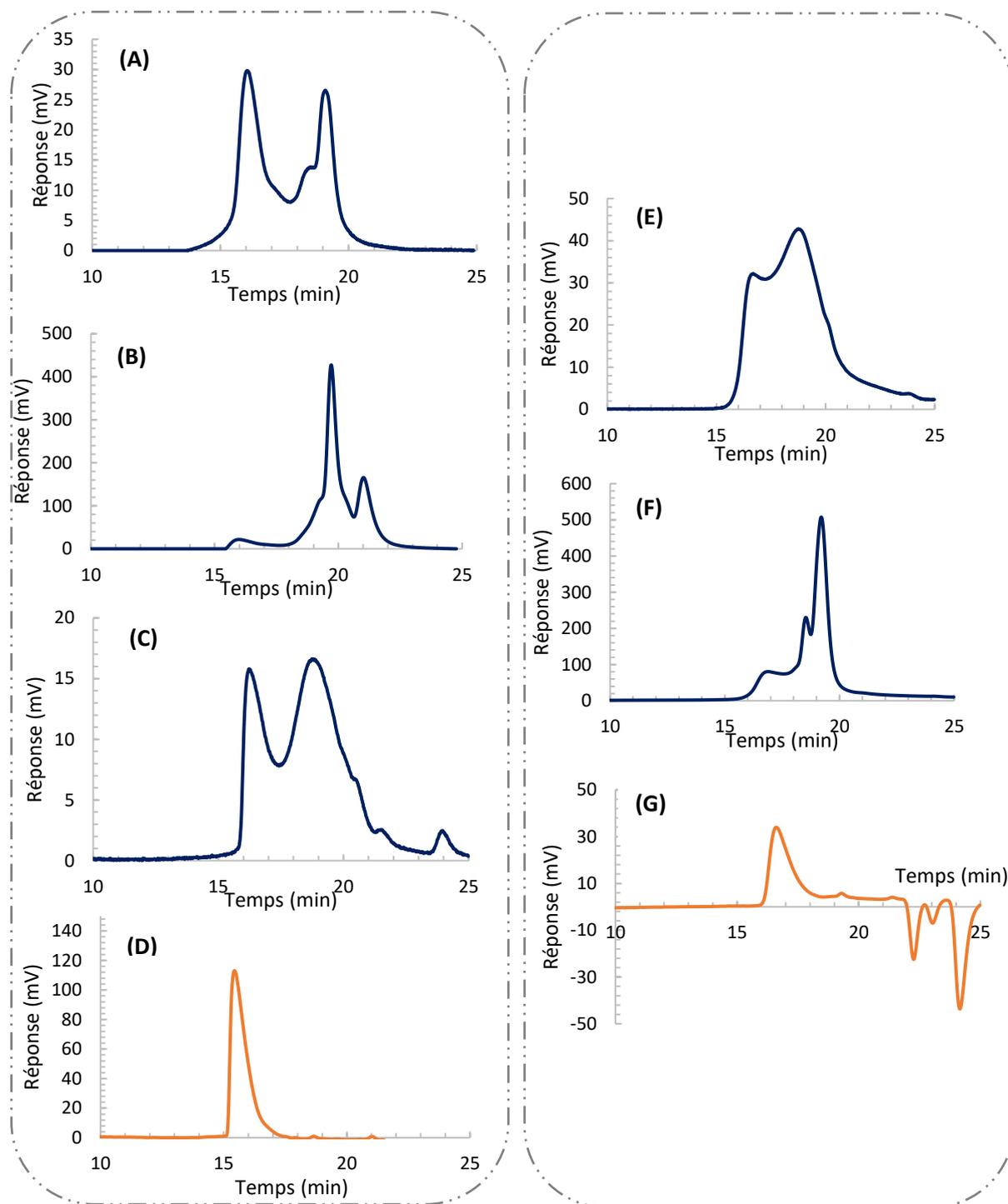
N°	Fluorophore	Nb équivalents (SH/C=C)	DMPA (total)	Solvant	Temps irradiation
1	BODIPY	0,5/1	0,5 éqv	DCM/MeOH 1 :1	4 h
2		0,35/1	1 éqv	DMF (+TCEP)	30 min
3		0,3/1	0,5 éqv	DCM/MeOH 1 :1	2 h
4			0,5 éqv	DCM/MeOH 1 :1 (+TCEP)	5 h
5		0,15/1	1 éqv	DCM/MeOH 1 :1	4 h
6	CoumSH	0,5/1	0,5 éqv	DCM	3 h
7			0,5 éqv	DCM	4 h
8			0,5 éqv	Eau (encapsulé)	2 h
9			0,5 éqv	THF	2 h
10	MMC	0,5/1	0,5 éqv	Eau (encapsulé)	2 h
11			0,5 éqv	THF	2 h
12		0,25/1	0,5 éqv	THF	2 h

A l'issue de l'irradiation, le mélange réactionnel est concentré et resolubilisé dans le solvant adéquat pour l'analyse du produit brut.

La problématique dans le cas de cette réaction est la vérification de l'efficacité du greffage, car les RMN <sup>1</sup>H des bruts sont très chargées en signaux, et les signaux intenses correspondants au copolymère cachent en partie les signaux dus au fluorophore, et donc les spectres sont difficiles à exploiter.

Pour contrer les difficultés d'analyse en RMN, il a été décidé d'utiliser la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) avec un détecteur UV et un détecteur RI pour montrer l'efficacité du couplage. Le détecteur UV a été réglé sur la longueur d'onde caractéristique du fluorophore greffé. Ainsi, le copolymère seul n'absorbant pas à la longueur d'onde détectée, un signal détecté en UV au même temps d'élution que le copolymère indique la formation du produit de thiol-ène.

Les analyses obtenues en SEC pour les réactions les plus concluantes sont données sur la Figure 19. Les signaux des produits bruts obtenus avec le détecteur UV (bleu) sont comparés à celui du copolymère seul obtenu avec le détecteur RI (orange).



**Figure 19 :** Chromatogrammes SEC du produit brut de réaction thiol-ène par irradiation sous une lampe polychromatique de (A) CoumSH + LPOEGMA<sub>22</sub> pendant 3h \_ expérience n° 6 (UV\_λ<sub>détecteur</sub> = 420 nm), (B) BODIPY + LPOEGMA<sub>22</sub> pendant 2h \_ expérience n° 1 (UV\_λ<sub>détecteur</sub> = 500 nm), (C) MMC + LPOEGMA<sub>22</sub> pendant 2h \_ expérience n°11 (UV\_λ<sub>détecteur</sub> = 350 nm), (D) LPOEGMA<sub>22</sub> (RI), (E) MMC + LP(iPrOx)<sub>28</sub> pendant 2h \_ expérience n°11 (UV\_λ<sub>détecteur</sub> = 350 nm), (F) CoumSH + LP(iPrOx)<sub>28</sub> pendant 2h \_ expérience n° 9 (UV\_λ<sub>détecteur</sub> = 420 nm) et (G) LP(iPrOx)<sub>28</sub> (RI).

Le pic observé au plus faible volume d'éluion correspond au copolymère greffé car le temps d'éluion et la masse molaire sont cohérents avec ce qui est obtenu avec le signal RI. De plus, l'analyse des fluorophores seuls et la masse molaire donnée par la SEC permettent de dire que le (ou les) pic(s) suivant(s) correspond(ent) au fluorophore qui n'a pas réagi et/ou qui s'est partiellement dimérisé par formation de ponts disulfure et/ou par cyclo-addition.

Ces analyses (Figure 19) montrent que la réaction de greffage des fluorophores a bien eu lieu à la fois pour la coumarine, le BODIPY et la MMC, même si son efficacité n'est pas de 100%. Il semblerait que cette réaction ne soit pas efficace lorsque les fluorophores sont encapsulés dans des micelles de copolymères, mais elle semble fonctionner à la fois dans le dichlorométhane et le THF. De plus, un temps d'irradiation de 2h semble largement suffisant pour avoir une conversion convenable. Un temps plus faible serait peut-être envisageable, mais n'a pas été étudié ici.

Quelles que soient les conditions expérimentales, cette voie de synthèse pose plusieurs problèmes qui peuvent expliquer les conversions limitées obtenues :

- Une problématique majeure est la dimérisation des molécules fluorescentes lors de l'irradiation. En effet, la CoumSH et le BODIPY se dimérisent par la fonction thiol pour former un pont disulfure entre deux molécules de fluorophores. Cette réaction est cependant contrôlable via l'ajout d'un agent réducteur, le tris(2-carboxyethyl)phosphine TCEP <sup>21</sup>.
- la MMC subit elle très rapidement (quelques minutes) une photo-cycloaddition [2 $\pi$  + 2 $\pi$ ] induisant la formation d'un cyclobutane par irradiation à  $\lambda > 310$  nm <sup>22</sup>, comme schématisé sur la Figure 20.

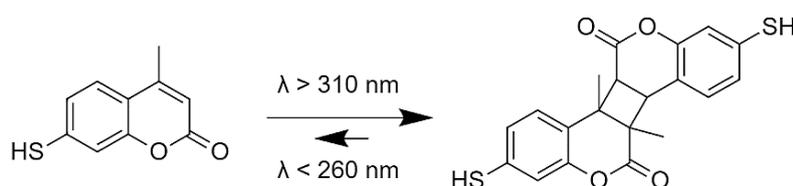


Figure 20 : Schéma de la photo-cycloaddition de la MMC

Cette photo-cycloaddition est en principe réversible via une irradiation à  $\lambda < 260$  nm. Un filtre interférentiel à 254 nm a donc été installé sur la lampe polychromatique, et la solution a été irradiée jusqu'à 7 h. Cette irradiation à 254 nm ne s'est dans notre cas pas révélée efficace pour séparer les dimères. L'intensité de la lampe à 254 nm étant de 77 mW/cm<sup>2</sup>, elle est peut-être trop faible pour permettre à ce processus d'être efficace.

- Si la coumarine CoumSH semble résister aux UV tout le temps de l'irradiation sous la lampe polychromatique, le BODIPY change de couleur au cours du temps, ce qui pourrait indiquer une dégradation et une diminution de la fluorescence pouvant le rendre inutilisable pour des expériences de FRET par la suite.

Malgré les difficultés de synthèse rencontrées, la technique de FRET est extrêmement sensible et fonctionne donc avec de faibles quantités de fluorophore. La purification des différentes expériences présentées ci-dessus a donc été entreprise par dialyse dans l'eau.

Cette voie de purification a permis d'éliminer la majeure partie des fluorophores qui n'ont pas réagi. Cependant, les fluorophores résiduels, qui sont hydrophobes, ont donc tendance à être encapsulés dans les micelles de copolymère plutôt qu'à diffuser dans l'eau. Ainsi, des fluorophores résiduels sont toujours détectés même après plusieurs semaines de dialyse dans un mélange eau/éthanol 90 :10.

Cela est particulièrement gênant car ces fluorophores libres pourraient induire une erreur dans l'exploitation du FRET.

Des essais de purification par précipitation dans du diéthyl éther ou du cyclohexane ont donc été effectués. Cependant, comme pour la purification par dialyse, il reste toujours un résidu de fluorophores même après plusieurs précipitations.

De plus, la quantité de copolymère (greffé) étant relativement faible, la combinaison de plusieurs techniques de purification successives entraîne une perte de produit trop importante, rendant cette méthode de greffage sur les copolymères peu viable pour la suite de cette étude.

Au vu des nombreuses difficultés rencontrées (conversion limitée, dimérisation des fluorophores, dégradation du BODIPY) la voie radicalaire photochimique n'a pas été retenue pour poursuivre cette étude.

Face à la problématique importante de séparation des fluorophores non greffés et des copolymères amphiphiles (la présence de traces de fluorophores pouvant compromettre l'interprétation future des résultats de FRET), nous avons également choisis d'incorporer les fluorophores plus en amont dans la synthèse des copolymères afin de pouvoir recourir à des techniques de purification classiques plus performantes.

Par conséquent, la réaction thiol-ène a par la suite été expérimentée sur l'intermédiaire précédant immédiatement la polymérisation, c'est-à-dire le lipoamorceur, toujours par voie radicalaire, mais cette fois-ci amorcée thermiquement afin de contourner les problèmes de dimérisation de la MMC et de dégradation du BODIPY rencontrés sous UV.

## II.2. Réaction thiol-ène radicalaire en thermique sur le lipoamorceur de CROP

Il s'agit là encore d'un mécanisme radicalaire, mais cette fois-ci amorcé par voie thermique à l'aide d'un amorceur qui se décompose en radicaux avec la température (Figure 18).

Hayashi et al.<sup>16</sup> ont réalisé une réaction thiol-ène *par voie radicalaire thermique* sur l'huile de lin en présence d'acide 3-mercaptopropionique. Le taux de conversion le plus élevé (62%) a été obtenu en présence de 2 équivalents de thiol par double liaison après un temps de réaction de 30 h à 80 °C.

Nous avons donc choisi de reproduire ce protocole, non pas sur l'huile de lin mais sur le lipoamorceur mésylé (LMs), et en présence de la Coumarine (CoumSH) synthétisée précédemment avec un rapport SH/insaturation de 1/1. L'amorceur thermique utilisé pour déclencher la réaction est l'azobisisobutyronitrile (AIBN).

Après 30 h de réaction à 80 °C dans le THF, le milieu réactionnel a été concentré et le produit brut a été analysé par chromatographie en phase liquide (HPLC) dans l'acétonitrile avec un détecteur UV, et comparé aux chromatogrammes des réactifs (Figure 21).

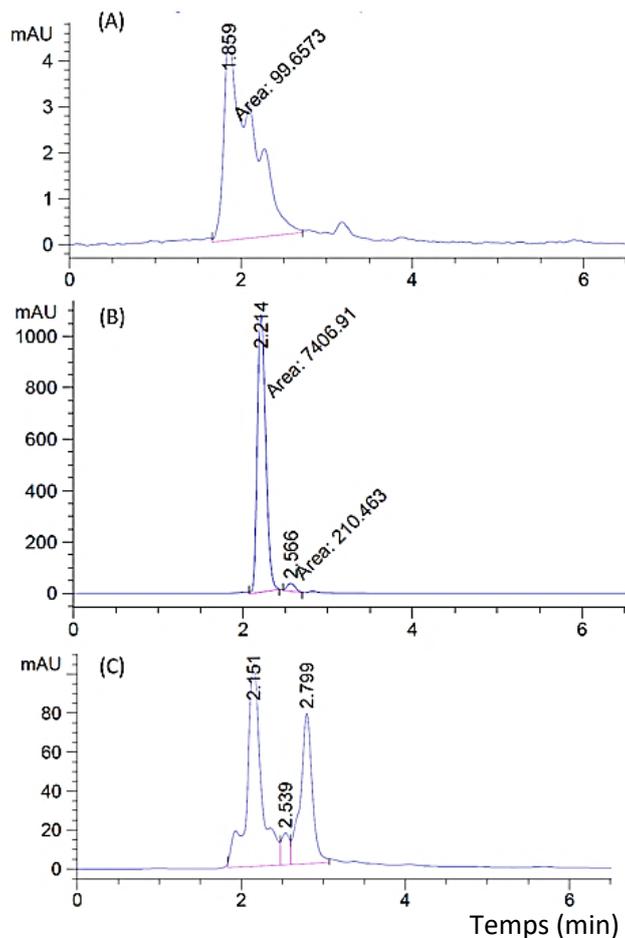


Figure 21 : Chromatogramme (HPLC) (A) du lipoamorceur LMs détecté à 242 nm, (B) de la CoumSH détectée à 420 nm et (C) du produit brut de thiol-ène détecté à 420 nm dans l’acétonitrile à 10 mg/L.

Le lipoamorceur n’est détectable que dans les longueurs d’onde aux alentours de 250 nm, et n’émet donc aucun signal à 420 nm, qui est la longueur d’onde d’absorption de la coumarine. Le chromatogramme de la coumarine thiol déprotégé montre un premier signal à 2,2 min correspondant à la molécule principale de coumarine, et un deuxième signal à 2,6 min pouvant être dû à la dimérisation de la fonction thiol, conduisant à la formation d’une molécule constituée de deux coumarines liées par un pont disulfure (CoumS-SCoum).

Sur le chromatogramme du produit brut de thiol-ène, on retrouve un restant de coumarine à 2,15 min, ainsi que la coumarine dimérisée à 2,54 min. Mais contrairement aux réactifs, il apparaît un nouveau signal à 2,8 min qui pourrait tout à fait correspondre au produit de la réaction.

Le produit brut a également été analysé en RMN  $^1\text{H}$ . La Figure 22 compare les spectres obtenus pour le LMs seul, le LMs soumis aux conditions de la réaction en l’absence de thiol dans le milieu et enfin, le produit brut de la réaction thiol-ène entre LMs et CoumSH.

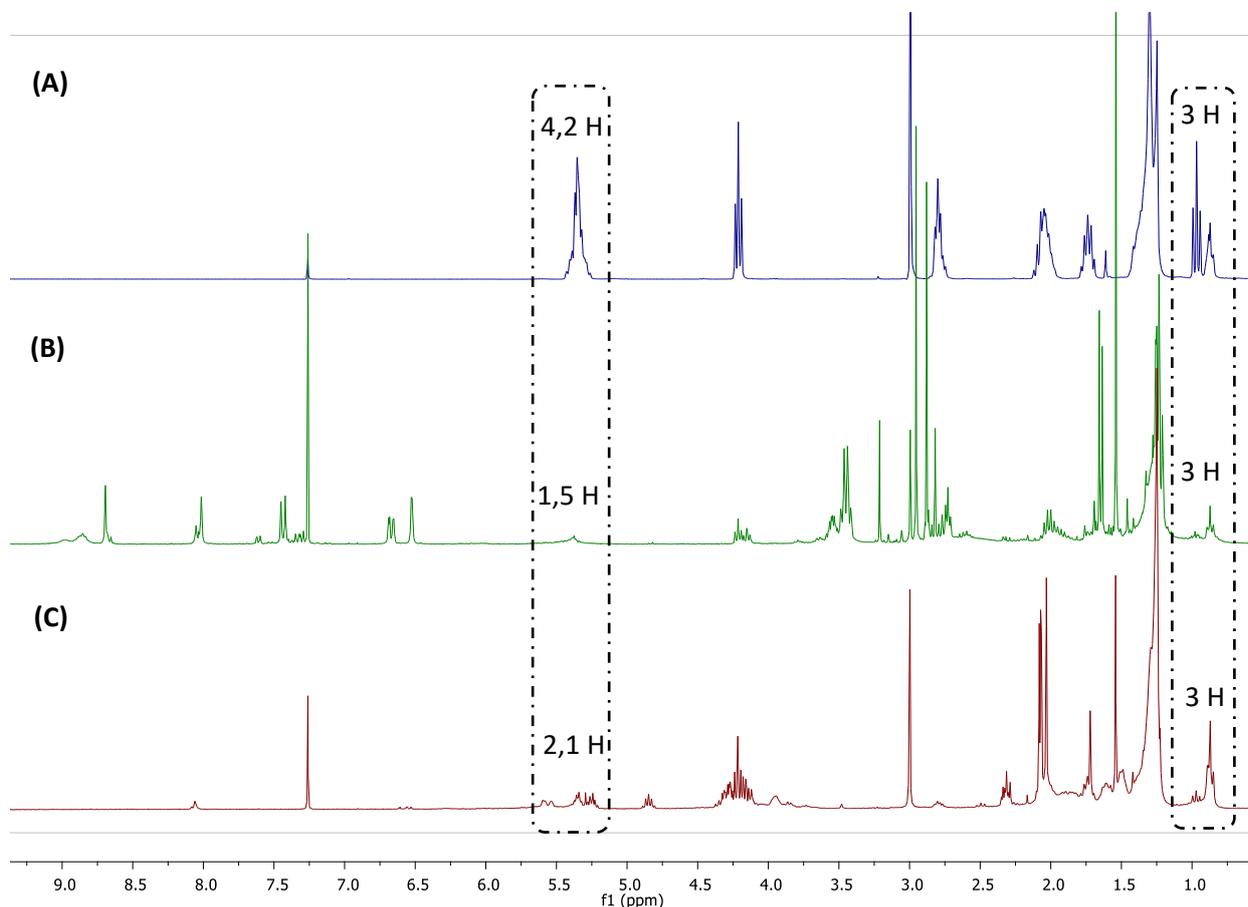


Figure 22 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (A) du lipoamorceur LMs, (B) du produit brut de la réaction thiol-ène et (C) du LMs soumis aux conditions de thiol-ène en l’absence de thiol.

Le spectre du produit brut présente un grand nombre de pics en particulier entre 0 et 4,5 ppm, qui le rendent relativement difficile à exploiter entièrement. Cependant les extrémités méthyle de la chaîne lipidique restent distinctes. On observe entre le spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit de la réaction thiolène (Figure 22B) et celui du lipoamorceur LMs (Figure 22A) que l’intégration du pic représentatif des protons du méthyle d’extrémité de chaînes d’acide linoléique à 0,9-1,0 ppm diminue de 1,64 (55%) à 1,04 (34%). Dans le même temps, l’intégration des pics représentatifs des protons du méthyle d’extrémité de chaînes des autres acides gras à 0,8-0,9 ppm augmente de 1,34 (45%) à 1,99 (66%). Cela indique la consommation préférentielle des insaturations les plus proches de l’extrémité de chaînes, ce qui est déjà

décrit dans la littérature<sup>14,16</sup>. L'intégration de ces extrémités méthyle a été fixée à 3H afin de pouvoir comparer l'intégration du signal des insaturations ( $\delta = 5,35-5,39$  ppm).

Le lipoamorceur de départ contient en moyenne deux insaturations par chaîne. Au terme de la réaction radicalaire, le nombre d'insaturations par chaîne n'est plus que de 0,75.

Cependant, le signal du CH<sub>2</sub> en  $\alpha$  du groupement OMs à  $\delta = 4,21$  ppm diminue de manière significative de 1,92 à 0,67, et il apparaît également un deuxième triplet à  $\delta = 4,15$  ppm pouvant indiquer la formation de produits secondaires.

Aussi, afin de vérifier l'existence de réaction(s) secondaire(s), une réaction témoin a été réalisée sur le LMs dans des conditions identiques mais en l'absence de thiol (Figure 22C). Le spectre RMN <sup>1</sup>H du lipoamorceur obtenu après chauffage en présence d'AIBN montre la consommation de la moitié des insaturations. Cela indique bien la présence de réactions secondaires, probablement interchaînes, conduisant à une dégradation de la structure du lipoamorceur.

D'après les résultats obtenus pour la réaction thiol-ène par voie radicalaire, que l'amorçage soit photochimique ou thermique, cette approche ne semble pas adaptée pour le greffage des fluorophores sur les insaturations lipidiques. Une voie alternative a donc été envisagée sur le lipoamorceur, il s'agit de la réaction thiol-ène de type « thiol-Michael » décrite ci-dessous.

### II.3. Réaction thiol-ène de type « Thiol-Michael » sur le lipoamorceur de CROP

Le mécanisme de type Thiol-Michael met en jeu une base ou un nucléophile, et utilise des conditions très douces car elle se fait à température ambiante. Dans ce mécanisme, l'utilisation de bases faibles telles que la triéthylamine pour déprotoner la fonction thiol est suffisante en raison de la valeur relativement faible du pKa de la plupart des thiols (pKa de l'ordre de 11 pour les thiols alors qu'il est supérieur à 15 pour les alcools). Le mécanisme de cette réaction est décrit en Figure 23.

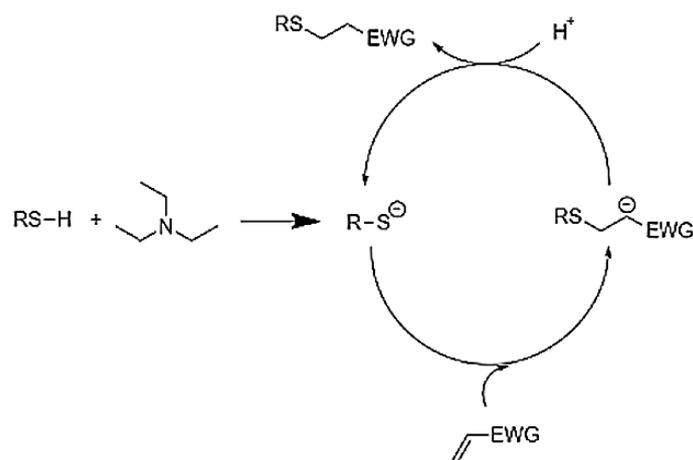


Figure 23 : Mécanisme catalysé par une base/nucléophile pour l’hydrothiolation d’une double liaison C=C <sup>14</sup>.  
EWG (Electron Withdrawing Group) = Groupement électro-attractif (ester, amide, cyano)

Alexander et al. <sup>17</sup> ont ainsi décrit une réaction thiol-ène entre une coumarine modifiée contenant une fonction thiol et la lissoclinolide (Figure 24).

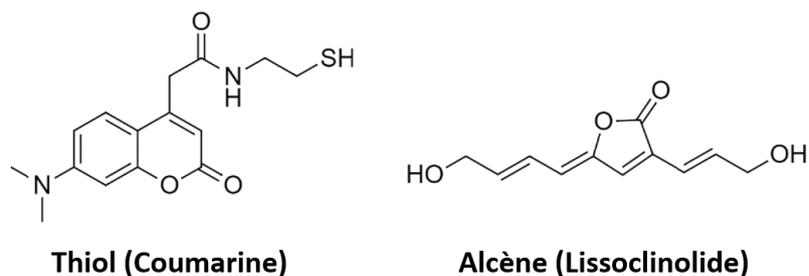


Figure 24 : Réactifs (thiol et alcène) utilisés pour une réaction thiol-ène dans la littérature <sup>17</sup>

Nous nous sommes donc inspirés de cet article pour reproduire cette réaction entre la MMC et les insaturations lipidiques.

Le lipoamorceur a été mis en présence d’un équivalent de MMC par molécule, soit une fonction thiol pour deux insaturations, et de la base diisopropyléthylamine (DIPEA) dans le THF anhydre. Le produit brut a été analysé en RMN <sup>1</sup>H dans le DMSO (Figure 25).

Son spectre a été comparé à celui du lipoamorceur dans le DMSO, et à celui de la MMC dans le CDCl<sub>3</sub> car elle n’est pas bien soluble dans le DMSO. Les déplacements chimiques de la MMC sont donc légèrement décalés par rapport à ceux détectés sur le spectre du produit.

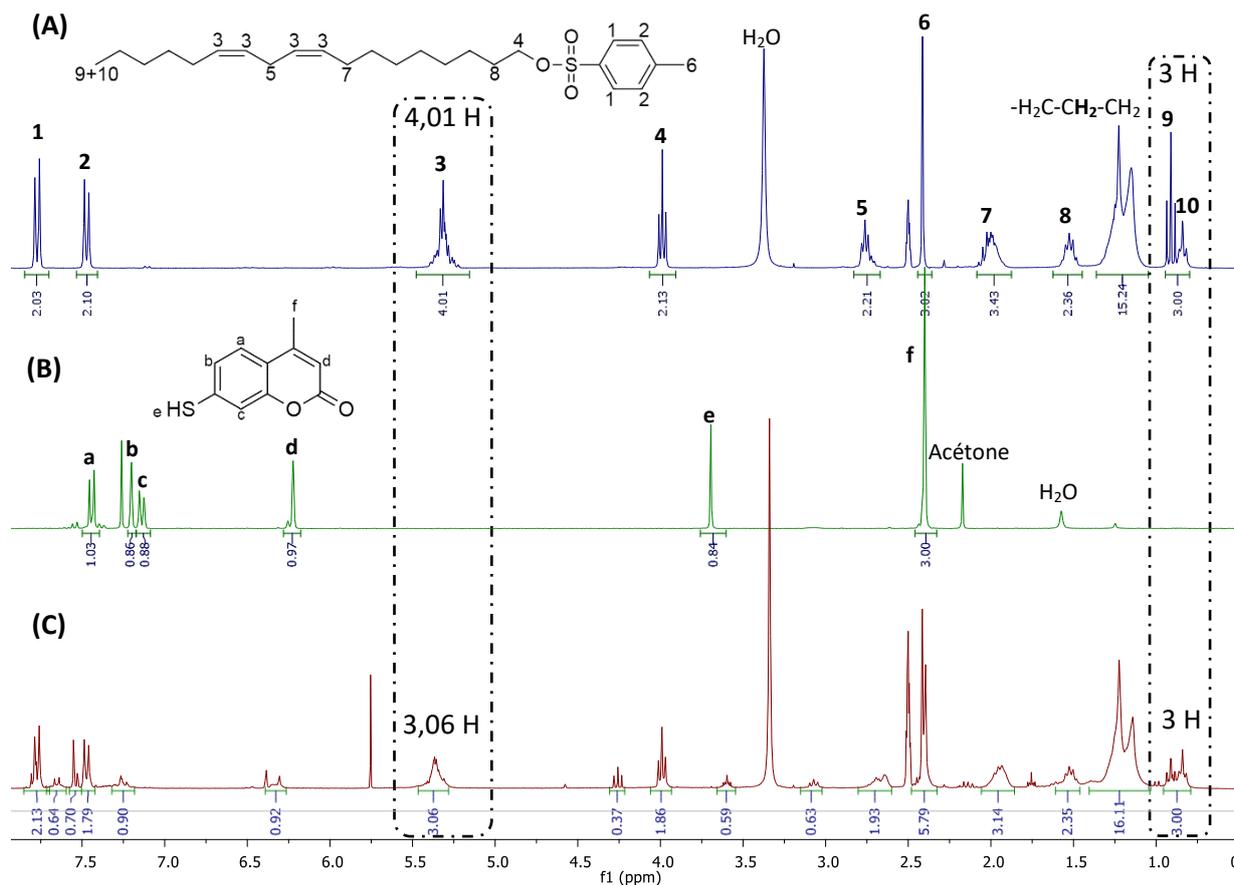


Figure 25 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (A) du lipomorceur tosylé LTs (DMSO), (B) de la MMC ( $\text{CDCl}_3$ ) et (C) du produit brut de thiol-ène entre LTs et MMC en présence de DIPEA

Là encore on observe une diminution du signal des extrémités  $\text{CH}_3$  linoléique. Le signal des insaturations lipidiques diminue d'environ 25 %. Cependant, l'intensité du signal du  $\text{CH}_2$  en  $\alpha$  de la fonction OTs diminue de façon inattendue et un autre triplet apparaît à 4,25 ppm. En parallèle, si l'on retrouve bien dans la zone des aromatiques les signaux caractéristiques de l'extrémité tosyle, leur intégration a également diminué.

Afin de déterminer la nature du produit obtenu, le produit brut a été séparé sur colonne de silice dans l'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle avec un gradient de 100/0 à 80/20, pour donner des fractions différentes qui ont toutes été analysées en RMN  $^1\text{H}$  dans le  $\text{CDCl}_3$ .

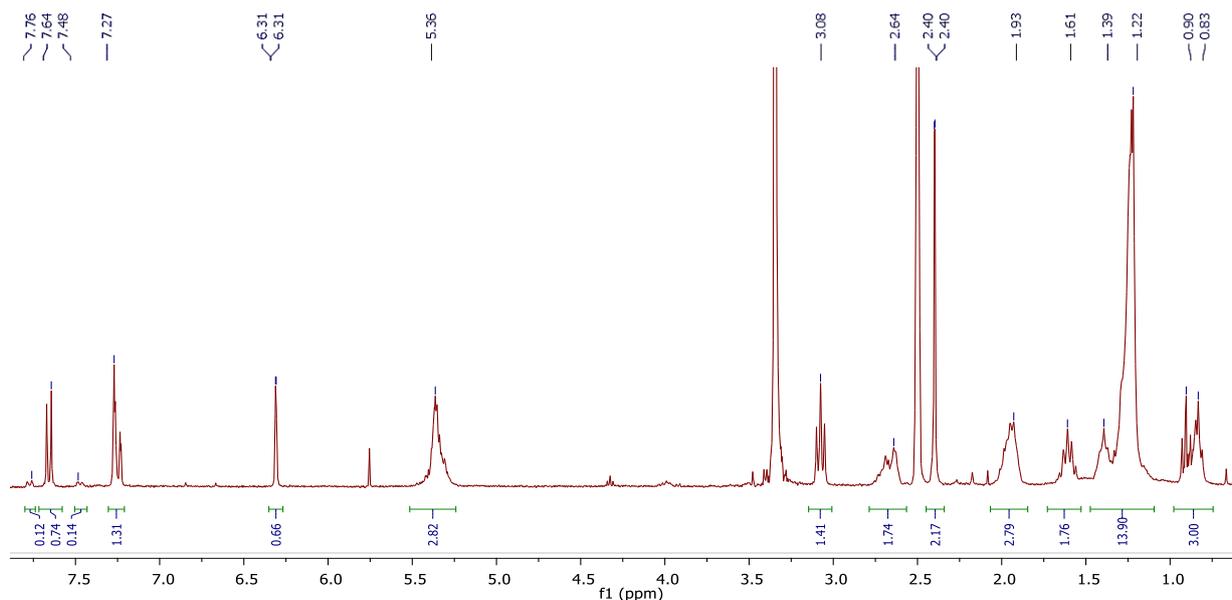


Figure 26 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  dans le DMSO du produit majoritaire de la réaction thiol-ène par voie thiol-Michael.

Le produit majoritaire de cette réaction (Figure 26) ne présente plus les signaux caractéristiques des protons aromatiques de l'extrémité tosyle, ni le signal du  $\text{CH}_2$  en  $\alpha$  de l'extrémité tosyle. En revanche, les signaux caractéristiques de la coumarine apparaissent. Le groupe OTs étant un très bon groupe partant, une probable substitution de l'extrémité tosyle par une coumarine a eu lieu dans les conditions de cette réaction.

Seule l'une des fractions obtenues après colonne pourrait correspondre au produit pur attendu, mais cette fraction ne représentant que 8% de la totalité de l'échantillon, cette voie de synthèse sur le lipoamorceur a été abandonnée.

#### II.4. Conclusion

L'objectif de cette étude était de greffer les fluorophores sur les insaturations des copolymères par réaction thiol-ène. Trois voies ont été testées, les réactions radicalaires par amorçage photochimique ou thermique et la réaction de type « thiol-Michael » catalysée par une base. Jusqu'ici, chacune de ces voies s'est révélée inefficace pour aboutir *in fine* à l'obtention d'un copolymère lié à un fluorophore, et suffisamment pur pour permettre des expériences de FRET.

## Conclusion

L'objectif de ce chapitre était la mise en place d'une technique de fluorescence, le FRET, permettant de montrer de manière directe la mixité des micelles formées décrites dans les chapitres précédents. Pour que le FRET soit envisageable, plusieurs contraintes sont à respecter, en particulier l'utilisation de deux molécules fluorescentes complémentaires, d'une part dont le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur se recourent, et d'autre part ces deux molécules se trouvant à une distance l'une de l'autre inférieure à 10 nm.

La première condition nécessite l'obtention de deux fluorophores complémentaires, un donneur et un accepteur, portant chacun une fonction thiol leur permettant à terme d'être liés à la chaîne lipidique. Un premier couple (Naphthyle et Coumarine) a été envisagé et synthétisé, mais leurs caractérisations en spectrophotométrie UV-visible et fluorescence ont mis en évidence un recouvrement presque total des spectres d'excitation des deux molécules ( $\lambda_{\text{max}} \approx 420$  nm) en milieu lipidique rendant impossible l'excitation du donneur (Coumarine) sans exciter l'accepteur (Naphthyle). Par conséquent, la coumarine synthétisée a été conservée mais le Naphthyle a été remplacé par un dérivé de BODIPY. Bien que délicat à synthétiser, le BODIPY présente des spectres d'excitation et d'émission étroits avec des maxima à respectivement  $\lambda_{\text{exc}} = 500$  nm et  $\lambda_{\text{em}} = 510$  nm, parfaitement compatibles avec la coumarine dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont  $\lambda_{\text{exc}} = 421$  nm et  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm. La co-encapsulation de ces deux fluorophores dans des micelles de LP(iPrOx) a d'ailleurs permis de montrer la faisabilité du transfert d'énergie. Le BODIPY étant tout de même disponible en très faible quantité, et sa fonction thiol se dimérisant très rapidement, un troisième couple a été caractérisé : une coumarine commerciale, la 7-mercapto-4-méthylcoumarin, comme fluorophore donneur avec  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm et  $\lambda_{\text{em}} = 392$  nm, et la coumarine synthétisée précédemment.

Pour respecter la deuxième condition du FRET, l'approche envisagée est de greffer les fluorophores sur au moins une insaturation de la chaîne lipidique des copolymères par réaction thiol-ène. Lors de la formation de micelles, les fluorophores se trouveraient ainsi encapsulés à l'intérieur du cœur lipidique des micelles dont la taille est inférieure à 10 nm. La réaction a d'abord été testée par voie radicalaire photochimique directement sur les copolymères avec une lampe polychromatique. L'efficacité de cette réaction n'est pas de 100

% mais elle resterait suffisante pour des expériences de fluorescence qui demandent une faible concentration totale en fluorophore dans les systèmes micellaires. Cependant, cette voie pose deux problèmes. D'abord, elle favorise la dimérisation (ponts disulfures et/ou cyclo-addition) des fluorophores, et ensuite, les techniques de purification (dialyse et précipitation) ne permettent pas l'élimination de la totalité des molécules de fluorophores n'ayant pas réagi, et restant encapsulées dans les micelles.

Afin de pallier à ces problèmes, la réaction a ensuite été réalisée par voie radicalaire par voie thermique sur le lipoamorceur de CROP. Dans ce cas encore, aucun résultat satisfaisant n'a été obtenu car ces conditions expérimentales entraînent la dégradation du lipoamorceur et la disparition des insaturations même en l'absence de thiol.

Par conséquent, des conditions plus douces ont été utilisées sur le lipoamorceur de CROP, avec une réaction thiol-ène de type thiol-Michael en présence d'une base faible. Ces conditions génèrent aussi des produits secondaires en quantité trop importante dans le mélange pour que cette voie de synthèse soit pertinente.

Faute de temps, ces essais n'ont pas pu être poursuivis. Une dernière voie envisageable serait de tester la réaction de type thiol-Michael sur l'alcool gras afin d'éviter certaines réactions secondaires liées au caractère « bon groupe partant » du groupement tosylé, et de permettre une purification du produit par colonne plus efficace que la dialyse des copolymères. En cas de succès de la réaction thiolène, le produit devrait ensuite être tosylé afin d'incorporer le groupement amorceur de CROP puis la polymérisation de la chaîne polyoxazoline serait conduite. La stabilité des fluorophores face à toutes ces conditions et en particulier pendant la polymérisation est inconnue, et cette voie nécessiterait entre autres de vérifier le caractère contrôlé de la polymérisation en présence d'un fluorophore.

### Références

- (1) Sun, X. Y.; Liu, T.; Sun, J.; Wang, X. J. Synthesis and Application of Coumarin Fluorescence Probes. *RSC Adv.* **2020**, *10* (18), 10826–10847.
- (2) Jang, H. J.; Kang, J. H.; Yun, D.; Kim, C. A Multi-Responsive Naphthalimide-Based “Turn-on” Fluorescent Chemosensor for Sensitive Detection of Trivalent Cations Ga<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup> and Cr<sup>3+</sup>. *J. Fluoresc.* **2018**, *28* (3), 785–794.
- (3) Popov, K.; Oshchepkov, M.; Kamagurov, S.; Tkachenko, S.; Dikareva, J.; Rudakova, G. Synthesis and Properties of Novel Fluorescent-Tagged Polyacrylate-Based Scale Inhibitors. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (26), 1–11.
- (4) Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor-Acceptor Combinations. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, *45* (28), 4562–4588.
- (5) Gellerman, G.; Gilon, C.; Glukhov, E.; Gazal, S. Synthesis of Novel Protected N $\alpha$ ( $\omega$ -Thioalkyl) Amino Acid Building Units and Their Incorporation in Backbone Cyclic Disulfide and Thioetheric Bridged Peptides. *J. Pept. Res.* **2001**, *58* (6), 527–539.
- (6) Kollár, J.; Hrdlovič, P.; Chmela, Š.; Sarakha, M.; Guyot, G. Synthesis and Transient Absorption Spectra of Derivatives of 1,8-Naphthalic Anhydrides and Naphthalimides Containing 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine; Triplet Route of Deactivation. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2005**, *170* (2), 151–159.
- (7) Alam, J.; Keller, T. H.; Loh, T. P. Functionalization of Peptides and Proteins by Mukaiyama Aldol Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (28), 9546–9548.
- (8) Ruggles, E. L.; Dekker, P. B.; Hondal, R. J. Synthesis, Redox Properties, and Conformational Analysis of Vicinal Disulfide Ring Mimics. *Tetrahedron* **2009**, *65* (7), 1257–1267.
- (9) Corrie, J. E. T. Thiol-Reactive Fluorescent Probes for Protein Labelling. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, No. 20, 2975.
- (10) Roubinet, B. Développement de Nouveaux Outils Chimiques Pour La Conception d’un Système de Détection Fluorogénique Des Réactions Catalysées Par Les Polymérase,

2015.

- (11) El Asmar, A.; Morandi, G.; Burel, F. Synthesis of Dual Sensitive Lipid- b- Poly(Dimethylaminoethyl Methacrylate) Copolymers, Self-Assemblies and Modulation of Cloud Point Temperatures through Physical Blends with Lipid- b-Poly(2-Isopropyl-2-Oxazoline). *Macromolecules* **2019**, *52* (23), 9160–9167.
- (12) Heisig, F.; Gollos, S.; Freudenthal, S. J.; El-Tayeb, A.; Iqbal, J.; Müller, C. E. Synthesis of BODIPY Derivatives Substituted with Various Bioconjugatable Linker Groups: A Construction Kit for Fluorescent Labeling of Receptor Ligands. *J. Fluoresc.* **2014**, *24* (1), 213–230.
- (13) Lanterna, A. E.; González-Béjar, M.; Frenette, M.; Scaiano, J. C. Photophysics of 7-Mercapto-4-Methylcoumarin and Derivatives: Complementary Fluorescence Behaviour to 7-Hydroxycoumarins. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, *16* (8), 1284–1289.
- (14) Lowe, A. B. Thiol-Ene “Click” Reactions and Recent Applications in Polymer and Materials Synthesis. *Polym. Chem.* **2010**, *5* (17), 4820–4870.
- (15) Pham, P. D.; Lapinte, V.; Raoul, Y.; Robin, J. J. Lipidic Polyols Using Thiol-Ene/Yne Strategy for Crosslinked Polyurethanes. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2014**, *52* (11), 1597–1606.
- (16) Hayashi, T.; Kazlauciusas, A.; Thornton, P. D. Dye Conjugation to Linseed Oil by Highly-Effective Thiol-Ene Coupling and Subsequent Esterification Reactions. *Dye. Pigment.* **2015**, *123*, 304–316.
- (17) Alexander, M. D.; Burkart, M. D.; Leonard, M. S.; Portonovo, P.; Liang, B.; Ding, X.; Joullié, M. M.; Gullledge, B. M.; Aggen, J. B.; Chamberlin, A. R.; Sandler, J.; Fenical, W.; Cui, J.; Gharpure, S. J.; Polosukhin, A.; Zhang, H. R.; Evans, P. A.; Richardson, A. D.; Harper, M. K.; Ireland, C. M.; Vong, B. G.; Brady, T. P.; Theodorakis, E. A.; La Clair, J. J. A Central Strategy for Converting Natural Products into Fluorescent Probes. *ChemBioChem* **2006**, *7* (3), 409–416.
- (18) Gok, O.; Kosif, I.; Dispinar, T.; Gevrek, T. N.; Sanyal, R.; Sanyal, A. Design and Synthesis of Water-Soluble Multifunctionalizable Thiol-Reactive Polymeric Supports for Cellular Targeting. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (8), 1550–1560.

- (19) Bantchev, G. B.; Kenar, J. A.; Biresaw, G.; Han, M. G. Free Radical Addition of Butanethiol to Vegetable Oil Double Bonds. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (4), 1282–1290.
- (20) Hespel, L.; Asmar, A. El; Morandi, G.; Lecamp, L.; Picton, L.; Burel, F. Synthesis of Dual-Sensitive Core Cross-Linked Mixed Micelles through Thiol–Ene Addition and Subsequent Drug Release Behavior. *Macromol. Chem. Phys.* **2017**, *218* (15), 1–8.
- (21) Li, G. L.; Kung, K. K. Y.; Zou, L.; Chong, H. C.; Leung, Y. C.; Wong, K. H.; Wong, M. K. Multifunctional Bioconjugation by Morita–Baylis–Hillman Reaction in Aqueous Medium. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (29), 3527–3529.
- (22) Fan, W.; Tong, X.; Yan, Q.; Fu, S.; Zhao, Y. Photodegradable and Size-Tunable Single-Chain Nanoparticles from a Single Main-Chain Coumarin-Containing Polymer Precursor. *Chem. Commun.* **2014**, *13*, 13492–13494.

## Conclusion générale



L'objectif de ce travail de thèse était le développement et la caractérisation de systèmes micellaires mixtes composés de deux copolymères amphiphiles thermosensibles, mélangés physiquement afin de déterminer l'impact de leur mélange sur les propriétés finales du système, et en particulier sur la modulation de la température de point de trouble. Différentes familles de polymères de nature et/ou architecture différentes ont été étudiées pour tenter de définir les limites de cette approche de formulation.

La première famille des poly(oxazoline)s est constituée des copolymères lipide-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) et lipide-*b*-poly(2-éthyl-2-oxazoline). Très proches structurellement, ces deux copolymères thermosensibles s'auto-assemblent individuellement sous forme d'objets micellaires de rayon hydrodynamique d'environ 7 nm et de nombre d'agrégation d'environ 30. Ils présentent des températures de point de trouble d'environ 40 °C pour le LPiPrOx et 70 °C pour le LPEtOx.

Ces valeurs très éloignées de température de point de trouble leur confèrent un comportement très intéressant lorsqu'ils sont mélangés physiquement en solution aqueuse. En effet, le mélange de ces deux copolymères permet une modulation de la  $T_{PT}$  globale du système à une température intermédiaire à celle des deux copolymères individuels et dépendante des proportions massiques relatives en chacun des copolymères.

Des mesures en diffusion de la lumière ont permis d'expliquer cette évolution de la  $T_{PT}$  en mettant en évidence la capacité du LPEtOx à stabiliser le LPiPrOx au-dessus de sa  $T_{PT}$  par la formation de micelles mixtes contenant les deux copolymères.

Ainsi, en augmentant la quantité de LPEtOx par rapport au LPiPrOx, la  $T_{PT}$  du système augmente linéairement jusqu'à une fraction massique en LPEtOx de 60 %, puis apparaît une deuxième transition d'absorbance correspondant à la  $T_{PT}$  du LPEtOx.

Les différentes analyses réalisées ont permis d'avancer l'hypothèse suivante pour expliquer ce comportement : lorsque le LPiPrOx est majoritairement présent en solution et jusqu'à 60 % en LPEtOx, il est capable de créer de nombreuses interactions intermoléculaires (et intermicellaires) LPiPrOx-LPiPrOx lorsque la  $T_{PT}$  du système est atteinte, et ces nombreuses interactions peuvent alors facilement entraîner l'agrégation de tout le système. En revanche, lorsque le LPiPrOx est minoritaire au sein des micelles mixtes, les interactions hydrophobes inter-micelles deviennent beaucoup moins nombreuses, ce qui génère une agrégation seulement partielle du système à la  $T_{PT}$  du système mixte, et l'apparition d'un phénomène

d'agrégation secondaire lorsque le LPeTOx dépasse sa  $T_{PT}$ , ce qui explique le second saut d'absorbance observé en UV-visible (Figure 1).

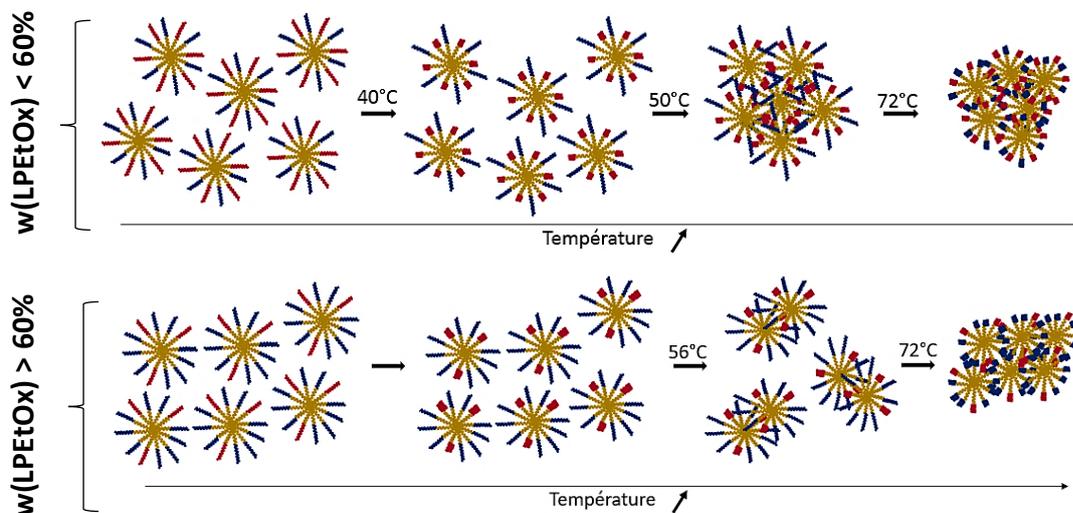


Figure 1 : Schéma récapitulatif du comportement des micelles mixtes LPIPrOx/LPeTOx en fonction des proportions massiques en LPeTOx dans le mélange

Afin d'étendre l'étude de systèmes micellaires mixtes, le LPIPrOx a été également mélangé à un copolymère linéaire dont le bloc hydrophobe présente une structure proche (chaîne alkyle à 18 carbones), mais avec un bloc hydrophile de nature chimique différente de type poly(oxyde d'éthylène) PEO de degré de polymérisation  $n = 10, 19$  ou  $92$ . Quelle que soit la longueur du bloc hydrophile du copolymère  $C_{18}\text{-}b\text{-PEO}_n$ , le mélange physique du LPIPrOx avec l'un de ces copolymères conduit à une modulation significative de la température de point de trouble de  $40\text{ °C}$  à  $61\text{ °C}$  en fonction des proportions massiques en chacun des copolymères. Cette étude a mis en avant la capacité des  $C_{18}\text{-}b\text{-PEO}_n$  à stabiliser le LPIPrOx quelle que soit la longueur du bloc hydrophile PEO avec une modulation de la  $T_{PT}$  du système identique à proportion massique équivalente. Il a ainsi été remarqué que c'est le ratio entre le nombre de segments EO et le nombre de segments iPrOx qui gouverne l'évolution de la  $T_{PT}$  plutôt que la longueur de chaque chaîne individuelle de PEO.

Les mélanges physiques réalisés entre le LPIPrOx et les copolymères  $C_{18}\text{-}b\text{-PEO}_n$  ont donc démontré la possibilité de former des micelles mixtes avec des copolymères linéaires de natures chimiques différentes pour stabiliser le système final et moduler ses propriétés.

Nous avons par la suite étudié le comportement de mélanges physiques entre deux copolymères amphiphiles de nature chimique et d'architecture différentes. Le LPIPrOx a été mélangé au lipide- $b$ -poly(oligo(éthylène glycol) méthacrylate de méthyle) LPOEGMA,

synthétisé par ATRP à partir du monomère OEGMA et d'un lipoamorceur bromé issu de l'huile de lin.

Les analyses en UV-visible et en diffusion de la lumière du LPOEGMA en solution aqueuse ont mis en évidence la formation d'objets très faiblement agrégés ( $N_{ag} \approx 3$ ), probablement en raison de l'encombrement stérique important de chaque chaîne de copolymère. Bien que le LPOEGMA présente une  $T_{PT}$  de 60 °C éloignée de celle du LPiPrOx, ses mélanges physiques avec le LPiPrOx en différentes proportions massiques ne permettent pas une modulation significative de la  $T_{PT}$  du système global. Les différentes analyses réalisées n'ont pas permis de démontrer de façon certaine la présence de micelles mixtes.

Par conséquent, il n'est pas possible de déterminer ici s'il y a hybridation avec une modulation des propriétés finales négligeable en raison de la faible agrégation du LPOEGMA, ou si l'hybridation n'est tout simplement pas possible entre ces deux copolymères.

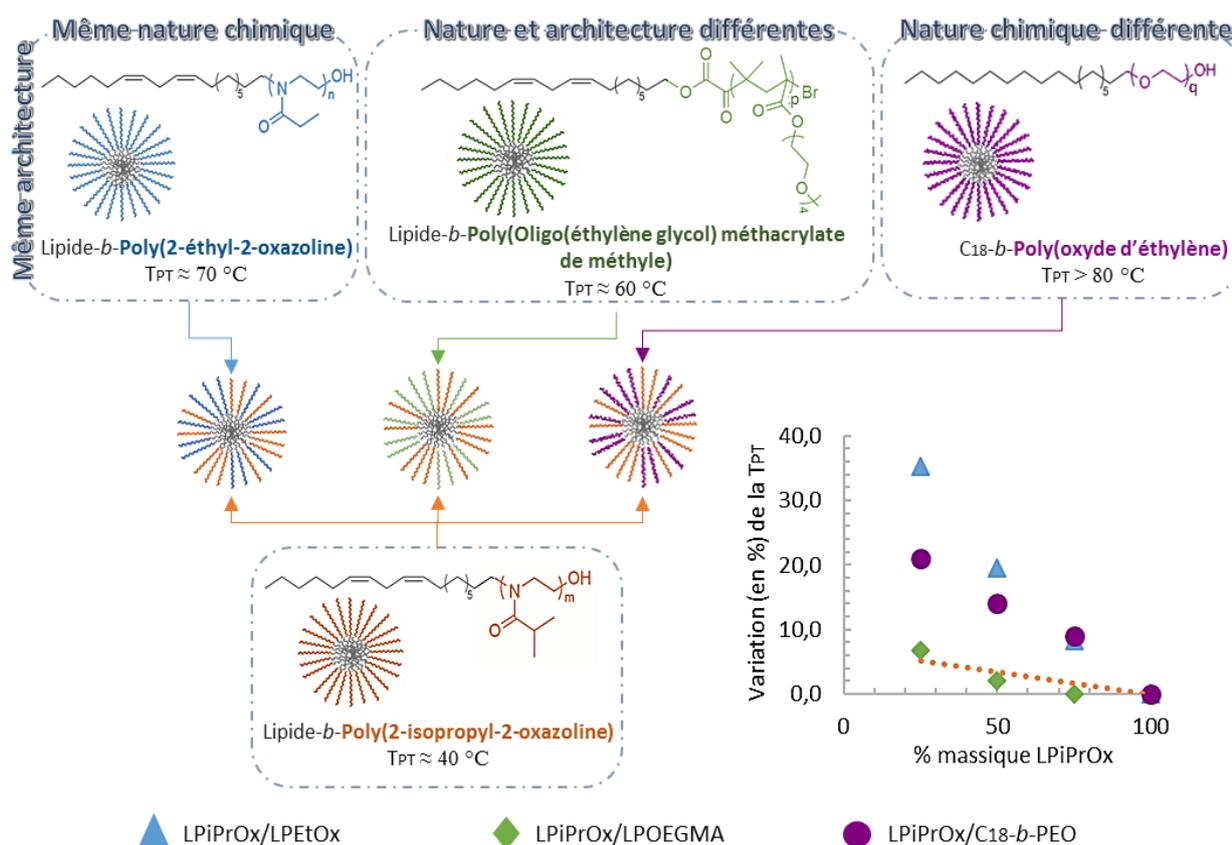


Figure 2 : Schéma général des systèmes micellaires obtenus avec les différents copolymères étudiés

## Conclusion générale

Les différents résultats obtenus dans le cadre de cette étude démontrent bien que cette approche de formulation constitue donc un apport considérable dans le développement de systèmes micellaires stimuli-sensibles parce qu'elle permet généralement de moduler finement les propriétés finales du système, tout en évitant un grand nombre de synthèses supplémentaires.

Chaque système étant différent, et l'hybridation pouvant dépendre d'un certain nombre de paramètres difficilement généralisables, nous avons choisi de développer une nouvelle technique de caractérisation innovante par fluorescence, permettant de montrer la mixité directement en s'affranchissant de l'étude poussée des propriétés du mélange.

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), ou Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster, a été choisi en tant que technique facile et rapide à mettre en place pour démontrer l'hybridation de tout système micellaire mixte.

Plusieurs fluorophores ont été synthétisés puis caractérisés afin d'identifier les couples complémentaires pour obtenir un phénomène de FRET dans le cœur lipidique de nos systèmes micellaires. Ils ont ensuite été engagés dans des réactions thiol-ène afin de les greffer sur les insaturations lipidiques.

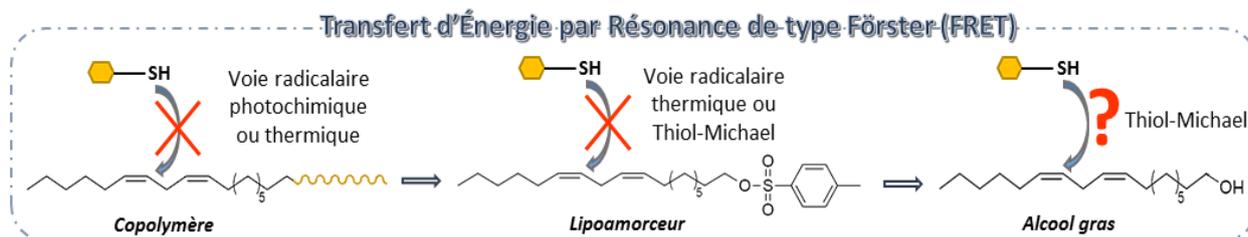
Notre stratégie a d'abord été d'étudier la possibilité de greffer les fluorophores directement sur les copolymères, afin d'éviter une éventuelle dégradation de leur structure lors des polymérisations et de faciliter la purification des produits finaux par dialyse.

Trois voies ont été testées : radicalaire photochimique, radicalaire thermique et thiol-Michael. Aucune de ces voies n'a permis un greffage quantitatif de chacun des fluorophores, et des problèmes de purification ont été rencontrés puisque l'élimination de la totalité du fluorophore non greffé est très difficile.

Pour pallier à ces différentes problématiques, la deuxième stratégie a donc consisté à essayer de greffer les fluorophores sur le lipoamorceur de la CROP. Quelle que soit la voie réactionnelle envisagée, la présence de réactions secondaires conduisant à une dégradation de la structure du lipoamorceur a cependant rendu cette stratégie non viable pour la suite.

Bien que peu concluantes jusque-là, cette réaction thiol-ène pourrait par la suite être testée directement sur le mélange d'alcools gras selon le mécanisme de type Thiol-Michael qui met en jeu les conditions les plus douces. Cette réaction permettrait éventuellement d'éviter toutes les problématiques rencontrées auparavant sur le copolymère et le lipoamorceur. Il resterait ensuite cependant à déterminer si les réactions de tosylation et de polymérisation

effectuées après le greffage ne dégradent pas le fluorophore, et ne sont pas perturbées par celui-ci.



D'après les résultats obtenus et les difficultés rencontrées lors de ce travail de thèse, plusieurs perspectives peuvent être proposées sur ce projet.

D'abord, des voies alternatives pourraient être testées pour réaliser le greffage des fluorophores sur les copolymères telle qu'une époxydation des insaturations présentes sur la chaîne lipidique pour les rendre plus réactives lors d'une réaction thiol/époxy sous UV ou le remplacement de la fonction thiol des fluorophores par une autre fonction réactive mais non susceptible de se dimériser.

Une chaîne grasse à 18 carbones pourrait également être incorporées directement dans la structure du fluorophore lors de sa synthèse avec une extrémité permettant d'amorcer une polymérisation ultérieure.

L'approche de formulation pourrait être élargie au mélange physique d'au moins trois copolymères répondant à plusieurs stimuli différents, et ce afin d'affiner encore davantage le contrôle que l'on a de ces systèmes intelligents et de tester les limites de cette approche.

Enfin, cette approche de mixité pourrait être étendue au cœur des micelles. En effet, des copolymères amphiphiles thermosensibles à UCST pourrait éventuellement permettre la formation d'objets présentant une sensibilité dans leur cœur mixte, facilitant ainsi leur dissociation avec la température et donc le relargage d'une molécule encapsulée.



## Partie expérimentale



## I. Produits utilisés

### A. Solvants

L'acétonitrile anhydre (ACN, Acros, 99,9 %), le chloroforme anhydre ( $\text{CHCl}_3$ , Acros, 99,9 %), le dichlorométhane anhydre (DCM, Acros, 99,8 %), le diméthylformamide (DMF, Sigma Aldrich, 99,8 %) et le tétrahydrofurane (THF, Alfa Aesar, 99,8 %) ont été utilisés sans purification préalable.

Le dichlorométhane (99,9 %), le cyclohexane (> 99 %), le méthanol (MeOH, > 99,8 %), l'éther diéthylique ( $\text{Et}_2\text{O}$ , > 99,5 %), le chloroforme (> 99 %), l'acétate d'éthyle (AcOEt), l'acétonitrile (> 99,8 %) et l'éthanol (99 %) proviennent de Fisher Scientific et le diméthylformamide (99 %) d'Acros, et tous ces solvants ont été utilisés sans purification préalable.

Les solvants deutérés  $\text{CDCl}_3$  (99,8 %), DMSO (99,9 %) proviennent d'Eurisotop et  $\text{D}_2\text{O}$  (99,9 %) de VWR.

### B. Réactifs pour la synthèse du lipoamorceur de CROP

L'huile de lin fournie par Novance a été utilisée sans aucune purification préalable. Le chlorure de tosyloxy (99%) provient de Sigma Aldrich. L'Aluminohydrure de lithium ( $\text{LiAlH}_4$ ), la 4-((diméthylamino)pyridine) (DMAP) et la triéthylamine ( $\text{Et}_3\text{N}$ , 99,9 %) sont fournis par Acros.

### C. Réactifs pour la synthèse du lipoamorceur d'ATRP

L'huile de lin fournie par Novance a été utilisée sans aucune purification préalable. L'Aluminohydrure de lithium ( $\text{LiAlH}_4$ ) et la triéthylamine (99,9 %) sont fournis par Acros, et le bromure de 2-bromo-2-méthyle propionyle (97 %) par Alfa-Aesar.

### D. Réactifs pour la polymérisation CROP

La 2-éthyl-2-oxazoline (EtOx, >99%, Sigma Aldrich), la 2-isopropyl-2-oxazoline (iPrOx, Sigma Aldrich, 96,5 %), et le toluène-4-sulfonate de méthyle (98%, Sigma Aldrich) sont des produits commerciaux utilisés sans purification préalable.

#### E. Réactifs pour la polymérisation ATRP

Le monomère oligo(éthylène glycol) méthacrylate de méthyle ( $M_n \approx 300$  g/mol, Sigma Aldrich), 1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetétramine (HMTETA, Alfa Aesar), le bromure de cuivre (I) (CuBr, Acros, 98 %) et le bromure de cuivre (II) (CuBr<sub>2</sub>, Sigma Aldrich) sont commerciaux et utilisés sans purification préalable.

#### F. Réactifs pour la synthèse du fluorophore dérivé « coumarine »

Le 4-(diéthylamino)salicyaldéhyde (Alfa Aesar, 99 %), le malonate de diéthyle (99 %), la pipéridine (VWR), les pastilles d'hydroxyde de sodium NaOH (Fisher Scientific), le triphénylméthanethiol (Acros, 97 %), l'hydrure de sodium (NaH 60%, Sigma Aldrich), la 3-bromo-propylamine, bromhydrate (Acros, 98 %), le chlorure de thionyle (SOCl<sub>2</sub>, Acros, 99,7 %), la triéthylamine Et<sub>3</sub>N (Acros, 99 %), l'acide trifluoroacétique TFA (Acros, 99 %) et la triéthylsilane Et<sub>3</sub>Si (Acros, 99%) sont commerciaux et utilisés tels quels.

#### G. Réactifs pour la synthèse du fluorophore « Naphtyle »

L'anhydride 4-bromo-1,8-naphtalique (95 %), le 3-Diméthylamino-propionitrile (98 %), l'hydrure de sodium (NaH 60%) sont fournis par Sigma Aldrich, le triphénylméthanethiol (97 %) et la 3-bromo-propylamine, bromhydrate (98 %) sont fournis par Acros et le 3-méthylbutan-1-ol par Fisher Scientific.

#### H. Réactifs pour la synthèse du fluorophore « BODIPY »

Le 2,4-diméthylpyrrole (Fisher, 97 %), le chlorure de 3-bromopropionyle (Br-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COCl, Acros, 95 %), la triéthylamine (Acros, 99 %), l'éthérate de trifluorure de bore (BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>, Alfa Aesar, 98 %), le thioacétate de potassium (CH<sub>3</sub>COSK, Alfa Aesar, 98 %) et le carbonate de potassium (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, VWR) sont des produits commerciaux utilisés sans purification préalable.

### I. Réactifs pour la réaction thiol-ène

La diisopropyléthylamine (DIPEA, 99 %) a été fournie par Alfa Aesar, la 2,2-diméthoxy-2-phenylacétophénone (DMPA, 99 %) et le chlorhydrate de cystéamine (98 %) proviennent d'Acros, l'azobisisobutyronitrile (AIBN, 98 %), la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP, > 98 %) et la 7-mercapto-4-méthylcoumarine (MMC, > 97 %) ont été fournis par Sigma Aldrich. Tous ces produits commerciaux ont été utilisés sans purification préalable.

### J. Autres réactifs

L'acide chlorhydrique (37%), l'hydrogénocarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ), le chlorure de sodium (> 99,5 %), l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de sodium et le sulfate de magnésium proviennent tous de Fisher Scientific, et l'éthylène glycol bis-mercaptoacétate (EGBMA) provient de Merck.

## II. Méthodes d'analyses

### A. Chromatographie sur colonne

Les purifications par chromatographie sur colonne ont été faites sur gel de silice (40-63  $\mu\text{m}$ ) et suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque Merck de gel de silice 60 F254 prête à l'emploi. La révélation a été effectuée sous une lampe UV, par une solution de permanganate de potassium  $\text{KMnO}_4$  ou de ninhydrine.

### B. Spectroscopie Infrarouge (IR)

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés dans la région 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  avec un spectromètre Perkin Elmer Spectrum 2 FTIR équipé d'un diamant en mode ATR (Attenuated Total Reflection). Chaque analyse comptait 10 scans. Les absorptions reportées sont exprimées en nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ ).

### C. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton  $^1\text{H}$  (300 MHz) et du carbone  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) ont été enregistrés sur des appareils Bruker. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont donnés en partie par million (ppm) par rapport aux solvants deutérés. Les multiplicités sont désignées par singulet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q) et multiplet (m).

### D. Spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses en spectrométrie de masse ont été effectuées sur un appareil de GC-MS Shimadzu QP2010 SE.

### E. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

Les masses molaires et les dispersités ont été mesurées par SEC sur un appareil Varian PL50, équipé d'un four à 37,5  $^{\circ}\text{C}$ , d'une pré-colonne (Polymer Laboratories, PL gel 5  $\mu\text{m}$  Guard, 50 x 7,5 mm), de deux colonnes (Polymer Laboratories, PL gel 5  $\mu\text{m}$  MIXED-C, 300 x 7,5 mm), d'un

détecteur RI (réfractomètre Shimadzu RID-10A) et d'un détecteur UV. Le dichlorométhane est utilisé comme éluant avec un débit de 1 mL/min.

Les échantillons sont préalablement filtrés sur des filtres Millex PTFE (0,45  $\mu\text{m}$  \*13 mm, Merck), et l'étalonnage est assuré par des standards PMMA fournis par Agilent Technologies.

#### F. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les analyses ont été réalisées sur un appareil Agilent Serie 1100-DAD équipé d'un dégazeur, d'une pompe, d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV-visible. La colonne utilisée est une Luna C18 100A (5 $\mu$  250\*4,6 mm). La phase mobile est de l'acétonitrile qui circule à un débit de 1 mL/min. Le volume injecté est de 100  $\mu\text{L}$  et les longueurs d'onde de détection sont fixées à 420 et 480 nm.

#### G. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les analyses ont été réalisées sur un appareil DSC TA Instruments Q2000. L'étalonnage en température et en énergie a été fait avec de l'indium ( $T_f = 156,6$  °C et  $\Delta H_f = 28,45$  J/g). Les mesures ont été réalisées sous  $\text{N}_2$  à un débit de 50 mL.min<sup>-1</sup>, dans des capsules en aluminium fermés dans lesquelles sont pesés entre 5 et 20 mg de polymère.

#### H. Caractérisation physico-chimique

##### a. Préparation des solutions micellaires

##### ❖ Par solubilisation directe :

Les copolymères ont été solubilisés directement dans de l'eau distillée (ou milliQ si nécessaire) ou du PBS, puis les solutions ont été agitées pendant 1 nuit.

##### ❖ Par co-solvant :

Les copolymères (10 mg) ont été solubilisés dans du méthanol (1 mL) puis cette solution a été ajoutée au goutte à goutte dans 10 mL d'eau distillée (ou milliQ) ou dans du PBS. La solution a été agitée à 600 rpm pendant une nuit pour évaporer le méthanol, puis complétée avec de

l'eau ou du PBS pour obtenir une concentration finale précise. La solution a été à nouveau agitée pendant au moins 3 h avant analyse.

❖ Micelles mixtes :

Les solutions sont réalisées par le mélange physique de deux solutions distinctes de copolymères dans l'eau à la même concentration, en prélevant des volumes précis pour obtenir une solution finale avec une certaine proportion massique en chacun des copolymères et avec une concentration totale de 1 ou 2 g/L. Les différents mélanges sont ensuite agités pendant 4h minimum avant toute analyse.

*Tableau 1 : Récapitulatif des volumes prélevés pour la réalisation des micelles mixtes par mélange physique des (co)polymères*

Fractions massiques ( $w_1/w_2$ ) %	$V_{\text{total}}$ (mL)	$V_{(\text{co})\text{polymère 1}}$ (mL)	$C_{(\text{co})\text{polymère 1}}$ (g/L)	$V_{(\text{co})\text{polymère 2}}$ (mL)	$C_{(\text{co})\text{polymère 2}}$ (g/L)	$C_{\text{totale}}$ (g/L)
25/75	10	2,5	1	7,5	1	1
50/50	10	5,0	1	5,0	1	1
75/25	10	7,5	1	2,5	1	1

*b. Spectrophotométrie UV-visible*

❖ Mesure de la température de point de trouble :

Les solutions micellaires sont analysées à l'aide d'un appareil Varian Cary 100 équipé d'un bain thermostaté. La longueur d'onde fixée pour l'analyse est de 500 nm, la vitesse de balayage est de 0,5 °C et des mesures sont réalisées tous les 1 °C entre 20 et 85 °C.

Le température de point de trouble est déterminée à 10 % de l'augmentation de l'absorbance.

❖ Caractérisation des fluorophores :

Les solutions de fluorophores sont analysées à l'aide d'un appareil Cary 50 Varian. Les spectres sont enregistrés entre 200 et 800 nm à une vitesse « medium » de 600 nm/min, et des mesures sont réalisées tous les 1 nm.

*c. Spectrométrie de fluorescence*

Les analyses en fluorescence ont été réalisées avec un appareil Cary Eclipse Varian.

❖ Caractérisation des fluorophores :

Les spectres sont enregistrés entre 250 et 800 nm avec des fentes en émission et en excitation de 5 nm.

❖ Mesure de cmc :

Une solution de pyrène à  $10^{-3}$  mol/L dans l'acétone a été préparée. Un volume précis de cette solution a été prélevé et introduite dans des fioles pour obtenir une concentration finale en pyrène de  $2,5 \cdot 10^{-6}$  mol/L. L'acétone est ensuite évaporé, et un volume précis de solution mère de copolymère à 2 g/L dans le PBS est ajouté. Chaque fiole est complétée avec du PBS jusqu'au trait de jauge pour obtenir une gamme de concentration comprise entre  $5 \cdot 10^{-4}$  et 1 g/L.

Les spectres d'émission sont obtenus avec une longueur d'onde d'excitation de 334 nm ( $\lambda_{em} = [250 - 500 \text{ nm}]$ ), et les spectres d'excitation ( $\lambda_{exc} = [250 - 500 \text{ nm}]$ ) avec une longueur d'onde d'émission de 374 nm.

*d. Réfractométrie différentielle*

L'incrément d'indice de réfraction  $dn/dc$  est mesuré à  $\lambda = 633 \text{ nm}$  avec un réfractomètre différentiel Oprilab rEX (Wyatt Technology Corporation) et le logiciel Astra. Les échantillons de PiPrOx et PEtOx dans l'eau milliQ à une concentration comprise entre 1 et 5 g/L sont injectés à température ambiante avec un débit de 1 mL/min. L'indice de réfraction est tracé en fonction de la concentration, et la pente de la droite obtenue correspond au  $dn/dc$  de l'homopolymère considéré.

## e. Diffusion de la lumière

❖ Mesures effectuées à l'IMMM

Les mesures en diffusion statique de la lumière ont été réalisées à l'aide d'un appareil ALV-CGS3, ALV-Langen. La source lumineuse est un laser He-Ne de longueur d'onde 632,8 nm. La température est contrôlée par un bain thermostaté ( $\pm 0.2$  °C).

Les mesures sont effectuées pendant 60 s tous les 10 ° entre 30 ° et 150 °. Les solutions de copolymères dans l'eau milliQ sont filtrées sur des filtres seringues de 0,02 à 0,45  $\mu\text{m}$ .

Les mesures ont été faites sur une gamme de vecteurs d'onde ( $q = 4\pi n/\lambda \sin(\theta/2)$ , avec  $n$  l'indice de réfraction du solvant et  $\theta$  l'angle d'observation) entre  $6,8 \cdot 10^8$  et  $2,6 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$ .

➔ Diffusion dynamique de la lumière

L'équation de Siegert  $g_2(t) = 1 + \beta g_1^2(t)$ , où  $\beta$  est le facteur de cohérence spatial, a été utilisée pour déterminer la fonction d'autocorrélation du champ électrique,  $g_1(t)$ , à partir de la fonction d'autocorrélation normalisée mesurée,  $g_2(t)$ . Les distributions des temps de relaxation ( $\tau$ ),  $A(\tau)$ , ont été extraites de  $g_1(t)$  en utilisant le programme REPES :

$$g_1(t) = \int A(\tau) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d\tau$$

En milieu dilué, les interactions entre polymères sont négligeables donc le rayon hydrodynamique des objets peut être calculé selon l'équation de Stokes-Einstein suivante :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_c}$$

avec  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température absolue et  $\eta$  la viscosité du solvant (eau).

→ Diffusion statique de la lumière

Le rapport de Rayleigh,  $R_\theta$ , a été calculé selon la formule suivante :

$$R_\theta = \frac{I_{\text{solution}}(\theta) - I_{\text{solvant}}(\theta)}{I_{\text{toluène}}(\theta)} \left( \frac{n_{\text{solvant}}}{n_{\text{toluène}}} \right)^2 R_{\text{toluène}}$$

Où  $I_{\text{solution}}$ ,  $I_{\text{solvant}}$  et  $I_{\text{toluène}}$  sont les intensités moyennes diffusées par la solution, le solvant et le toluène (référence).

Le rapport de Rayleigh de la référence  $R_{\text{toluène}} = 1,35 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$ , et les indices de réfraction de la référence et du solvant (eau) sont respectivement  $n_{\text{toluène}} = 1,496$  et  $n_{\text{solvant}} = 1,333$ .

La masse molaire apparente ( $M_{\text{app}}$ ) du soluté a été calculée à partir du rapport de Rayleigh de la solution comme :

$$R_\theta = KCM_{\text{app}}S(q)$$

Où  $S(q)$  est le facteur de forme (considéré égal à 1 pour les petits objets) pour et  $K$  une constante :

$$K = \frac{4\pi^2 n_{\text{solvant}}^2}{\lambda^4 N_A} \left( \frac{\partial n}{\partial C} \right)^2$$

$\partial n / \partial C$  est l'incrément d'indice de réfraction du soluté et  $N_A$  est le nombre d'Avogadro.

Remarque : 1) Pour le Brij® C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>10</sub> (cf. Chapitre 3), la solution légèrement trouble après sa préparation est chauffée dans un bain thermostaté à 60 °C pendant 5 min pour la rendre parfaitement limpide avant analyse.

2) La dispersité a été calculée à partir des temps de relaxation et fréquences de relaxation obtenus par la routine REPES. Une estimation de la dispersité indique une valeur inférieure à 1,5 pour toutes les solutions analysées dans ce manuscrit.

❖ Nanosizer

Les mesures ont été faites à l'aide d'un appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) équipé d'une source laser He-Ne à 633 nm à un angle de 173 °. Les mesures ont été faites

dans des micro-cuvettes en plastique à température contrôlée. Les données sont traitées en utilisant la distribution en nombre donnée par la méthode CONTIN.

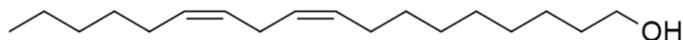
*f. Microcalorimétrie ( $\mu$ DSC)*

Les solutions de copolymères dans l'eau distillée, à une concentration de 10 g/L pour le LPiPrOx et 30 g/L pour le LPEtOx, ont été analysées à l'aide d'un appareil de microDSC III Evo Setaram équipé d'un bain thermostaté. L'analyse est un cycle chauffe/refroidissement de 10 °C à 80 °C avec une vitesse de balayage de 0,5 °C/min.

### III. Protocoles expérimentaux

#### A. Synthèse des lipoamorceurs de polymérisation

##### a. Alcool gras



Une solution d'huile de lin (4 g ; 1 éq) dans 25 mL de THF anhydre est ajoutée au goutte à goutte à un mélange de  $\text{LiAlH}_4$  (1,05 g ; 6,4 éq) dans 35 mL de THF anhydre contenu dans un ballon sous atmosphère inerte et refroidi par un bain de glace. Le mélange réactionnel est agité pendant une nuit à température ambiante.

Une fois la réaction terminée, l'excès de  $\text{LiAlH}_4$  est hydrolysée avec 20 mL d'eau déionisée, puis le mélange est filtré sur papier filtre et concentré à l'évaporateur rotatif.

Le produit brut est ensuite dilué dans 15 mL de dichlorométhane et lavé avec 15 mL d'une solution saturée de  $\text{NaCl}$ . La phase organique est enfin séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrée pour obtenir un produit huileux jaune clair avec un rendement de 80%.

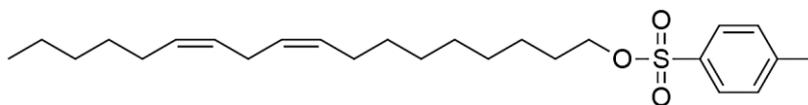
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) : 5,36 (m, 4H,  $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 3,64 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ), 2,81 (m, 2H,  $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 2,08 (m, 2H,  $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 1,56 (m, 2H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ ), 1,31 (m, 15H,  $\text{CH}_2$  aliphatiques), 0,97 (t, 3H,  $\text{CH}_3$  acide linoléique), 0,87 (m, 3H,  $\text{CH}_3$  acides oléique et linoléique).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) : 131,9 – 127,1 ( $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 63 ( $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ), 32,7 – 20,5 ( $\text{CH}_2$  aliphatiques), 14,2 ( $\text{CH}_3$  chaînes aliphatiques).

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

**IR** :  $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  = 1650 et 3010  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CH}_2, \text{CH}_3}$  = 2854 et 2924  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{OH}}$  = 3340  $\text{cm}^{-1}$ .

## b. Lipoamorceur tosylé (LTs) pour la CROP



Une solution de p-TsCl (5,82 g ; 2 éq) dans 45 mL de chloroforme anhydre est ajoutée au goutte à goutte à un mélange contenant l'alcool gras synthétisé précédemment (5,36 g ; 19,9 mmol ; 1 éq), de la TEA (6,02 g ; 3 éq), et de la DMAP (0,242 g ; 0,1 éq) dans 35 mL de chloroforme anhydre, sous atmosphère inerte.

Le mélange réactionnel est agité pendant 20h à 30°C, puis concentré, dilué dans 50 mL d'AcOEt, et lavé 6 fois avec 30 mL de NaHCO<sub>3</sub> saturé et une fois avec une solution de NaCl saturée. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub> et concentrée.

Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (silicagel pour chromatographie, 60-200 μm, 60 Å) éluée au cyclohexane/acétate d'éthyle (91/9, v/v) pour obtenir un liquide huileux avec un rendement de 52 %.

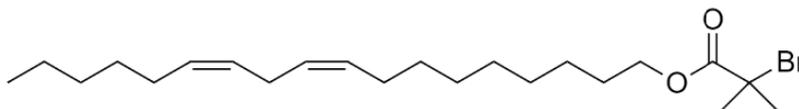
**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm): 7,77 (d, 2H aromatique), 7,35 (d, 2H aromatique), 5,34 (m, 4H, -HC=CH-), 4,01 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-OTs), 2,80 (m, 2H, -HC=CH-CH<sub>2</sub>-CH=HC-), 2,44 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,05 (m, 2H, -HC=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,60 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OTs), 1,25 (m, 16H, CH<sub>2</sub> aliphatique), 0,97 (t, 3H, CH<sub>3</sub> acide linoléique), 0,87 (m, 3H, CH<sub>3</sub> acides oléique et linoléique).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 144,8 (aromatique), 139 – 127,3 (-HC=CH-), 71 (-CH<sub>2</sub>-OTs), 32,1 – 20,9 (CH<sub>2</sub> aliphatiques), 14,6 (CH<sub>3</sub> chaînes aliphatiques).

**MS [M+ Na<sup>+</sup>]** : m/z 441 (linoléique), m/z 443 (linoléique), m/z 445 (oléique), m/z 447 (stéarique).

**IR** : ν<sub>C=C</sub> = 3007 cm<sup>-1</sup>, ν<sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub></sub> = 2852 et 2922 cm<sup>-1</sup>, ν<sub>S=O</sub> = 1361 cm<sup>-1</sup> et 1177 cm<sup>-1</sup>.

## c. Lipoamorceur bromé pour l'ATRP



Un mélange d'alcool gras (2,12 g ; 1 éq) et de la triéthylamine (3,35 mL ; 3,1 éq) sont mélangés dans 53 mL de dichlorométhane anhydre sous atmosphère inerte. Le bromure de 2-bromo-2-méthylpropionyle est ensuite ajouté au goutte à goutte au mélange refroidi par un bain de glace. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 heures.

Il est ensuite successivement lavé par 20 mL d'une solution de HCl à 0,1 M, 20 mL d'une solution d'hydrogencarbonate à 0,1 M et 20 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée. Le produit brut est purifié sur colonne de silice (silicagel pour chromatographie, 60-200 μm, 60 Å) avec l'éluant cyclohexane/diéthyléther (90/10, v/v).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 5,36 (m, 4H, -HC=CH-), 4,16 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-OCO-), 2,80 (m, 2H, -HC=CH-CH<sub>2</sub>-HC=CH-), 2,05 (m, 2H, -HC=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,93 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C-), 1,67 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>OCO-), 1,31 (m, 16H, CH<sub>2</sub> aliphatique), 0,97 (t, 3H, CH<sub>3</sub> acide linoléique), 0,88 (m, 3H, CH<sub>3</sub> acides oléique et linoléique).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 171,7 (C=O), 131,9 – 127 (-HC=CH-), 66,1 (-CH<sub>2</sub>-OCO), 55,9 (-C-Br), 31,8 – 22,6 (CH<sub>2</sub> aliphatiques), 30,7 (Br(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C-), 14,1 (CH<sub>3</sub> chaînes aliphatiques).

**MS [M+ Na<sup>+</sup>]** : m/z 421 (linoléique), m/z 423 (linoléique), m/z 425 (oléique), m/z 427 (stéarique).

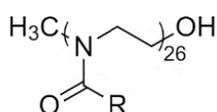
**IR** : ν<sub>C=C</sub> = 3010 et 1652 cm<sup>-1</sup>, ν<sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub></sub> = 2924 et 2853 cm<sup>-1</sup>, ν<sub>C=O</sub> = 1735 cm<sup>-1</sup>, ν<sub>C-Br</sub> = 646 cm<sup>-1</sup>.

## B. Synthèse des polymères thermo-sensibles

### a. Synthèse des poly(2-alkyl-2-oxazoline)s et lipide-b-poly(2-alkyl-2-oxazoline)s par micro-ondes

Les amorceurs LTs (lipide-*b*-poly(oxazoline)s) ou MeOTs (poly(oxazoline)s) (1 éq), les monomères EtOx ou iPrOx (26 éq) et l'acétonitrile anhydre sont introduits dans un tube à micro-ondes purgé à l'azote. La réaction de polymérisation est réalisée avec un appareil à micro-ondes CEM Discover à 140°C pendant 30 min sous pression d'environ 5 bars, puis la terminaison a lieu par ajout d'une solution méthanolique de KOH 1M en excès. Le polymère est ensuite purifié par dialyse dans l'eau milliQ (cut-off 500-1000 Da) pendant 3 jours, puis récupéré après lyophilisation.

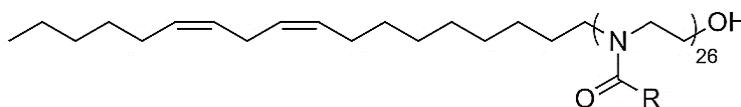
#### ❖ Synthèse d'homopolymères hydrophiles à partir de MeOTs :



R = éthyle ou isopropyle

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 3,7-3,1 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3,0 (s, 1H, -CH<sub>3</sub>), 3,0-2,5 (m, 1H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,4-2,1 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,1 (m, 9H, CH<sub>3</sub> des groupements éthyle et isopropyle).

#### ❖ Synthèse de polymères amphiphiles à partir de LTs :



R = éthyle ou isopropyle

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 5,35 (m, 2H, -HC=CH-), 3,7 – 3,1 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2,80 (m, 2H, -HC=CH-CH<sub>2</sub>-HC=CH-), 3,0 – 2,5 (m, 1H, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,4 – 2,1 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,88 (m, 2H, -HC=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,24 (m, 2H, CH<sub>2</sub> aliphatiques), 1,11 (m, 9H, CH<sub>3</sub> des groupements éthyle et isopropyle), 0,97 (t, 3H, acide linoléique), 0,87 (m, 3H, acides oléique et linoléique).

**IR** :  $\nu_{\text{O-H}} = 3455 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C=C}} = 2969 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 2931 \text{ et } 2873 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C=O (amide)}} = 1631 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C-N (amide)}} = 1200 \text{ cm}^{-1}$ .

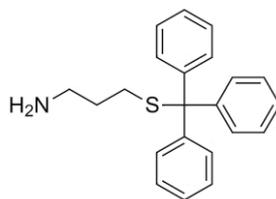
### *b. Synthèse du lipide-b-poly(oligoéthylène méthacrylate de méthyle) par ATRP*

Le bromure de cuivre (I) (1 éq) et le bromure de cuivre (II) (0,05 éq) sont introduits dans un schlenk fermé par un septum, et soumis à trois cycles vide/argon pour éliminer l'oxygène. Le lipoamorceur bromé (1 éq), le monomère OEGMA (25 éq), le catalyseur HMTETA (1 éq) et l'éthanol ( $V_{\text{ethanol}}/V_{\text{OEGMA}} = 3/1$ ) sont introduits dans un second schlenk, dégazés par trois cycles congélation/décongélation et transférés via une canule dans le premier schlenk. Le mélange est agité à température ambiante.

La cinétique de polymérisation est obtenue par plusieurs prélèvements réguliers d'une fraction du mélange réactionnel à l'aide d'une seringue dégazée. Les prélèvements pour la RMN sont ajoutés à du  $\text{CDCl}_3$  et directement analysés, tandis que les prélèvements pour la SEC sont évaporés, filtrés sur colonne d'alumine avec du THF, évaporés à nouveau puis analysés. Le polymère final est traité de la même façon et purifié par dialyse dans un mélange eau/EtOH 90 :10 avec une membrane en cellulose (Cut-off 500-1000 Da) jusqu'à ce que tout résidu de monomère ait disparu en SEC. Le copolymère final LPOEGMA est isolé par lyophilisation.

## **C. Synthèse des fluorophores pour le FRET**

### *a. Intermédiaire réactionnel commun 3-(tritylmercapto)propylamine*



Le protocole de cette synthèse est décrit par Gellerman et al. <sup>1</sup>

La verrerie (un ballon bicol 25 mL et deux ballons coniques 25 mL) a été préalablement séchée à l'étuve, puis placée sous argon avant l'introduction des réactifs.

L'hydruure de sodium NaH 60% en dispersion dans l'huile (0,11 g ; 2,2 éq) a été introduit dans le bicol et solubilisé dans 2 mL de DMF anhydre. Le trityl mercaptan (0,55 g ; 1 éq) a été pesé sur papier de pesée, introduit dans un des ballons coniques, puis solubilisé en mélangeant

bien dans 3 mL de DMF anhydre. Cette solution a ensuite été ajoutée dans le bicol au goutte à goutte à l'aide d'une seringue à 0 °C car la réaction est exothermique, et le ballon conique a été rincé avec 0,5 mL de DMF anhydre supplémentaire aussi introduits dans le bicol. Le mélange est agité pendant 10 min.

La 3-bromopropylamine bromhydrate (0,44 g ; 1 éq) est ensuite pesée puis introduite dans l'autre ballon conique, et solubilisée dans 2 mL de DMF anhydre, avant d'être ajoutée dans le bicol. Le mélange est agité 15 min supplémentaire à 0 °C sous atmosphère inerte.

L'agitation est finalement maintenue à température ambiante toute la nuit toujours sous argon.

Le lendemain, 10 mL d'eau sont ajoutés au goutte à goutte, suivi de 10 mL d'acétate d'éthyle. Une extraction liquide-liquide est réalisée et répétée 2-3 fois pour éliminer le DMF et récupérer le maximum de produit brut. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et concentrée.

Une filtration sur silice (ou colonne de silice sur verre fritté avec une pompe à vide) est ensuite effectuée pour purifier le produit. La silice (40-63 µm) est bien mouillée avec du dichlorométhane, et le produit solubilisé dans du dichlorométhane est versé sur la silice. Rincer successivement avec un mélange DCM/MeOH (environ 100 mL) avec un gradient de 100/0 à 90/10 en changeant la fiole à vide à chaque fois. Refaire cette étape de purification si nécessaire en changeant de fiole dès que la partie jaune est passée.

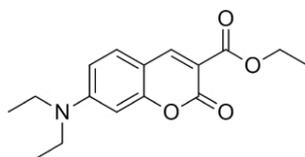
Les fractions sont ensuite concentrées, séchées et analysées en RMN <sup>1</sup>H.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 7,44 – 7,38 (m, 6H, H<sub>Ar</sub>), 7,31 – 7,18 (m, 9H, H<sub>Ar</sub>), 2,68 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,21 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

**MS [M+ H<sup>+</sup>]** : *m/z* 334

*b. Fluorophore donneur – un dérivé de la coumarine*

❖ Synthèse du 7-(diéthylamino)-2-oxo-2H-chromène-3-carboxylate d'éthyle :

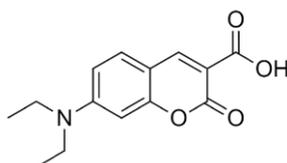


Le protocole de la synthèse de ce composé a été mis au point par Corrie<sup>2</sup>.

Le 4-(diéthylamino)salicyaldéhyde (5 g ; 26 mmol) et le malonate de diéthyle (8,46 g ; 53 mmol) sont mélangés avec la pipéridine (0,198 g ; 2,3 mmol) dans 30 mL d'éthanol. Le mélange est chauffé à reflux pendant 12 h, puis concentré à l'évaporateur rotatif. S'il reste du malonate de diéthyle liquide dans le ballon, le solide est filtré sous vide et rincé avec quelques mL d'éthanol bien froid. Le produit pur cristallise naturellement sous hotte et est obtenu avec un rendement de 70 %.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) : 8,43 (s, 1H), 7,35 (d, 1H, H<sub>Ar</sub>), 6,60 (dd, 1H, H<sub>Ar</sub>), 6,46 (d, 1H, H<sub>Ar</sub>), 4,37 (q, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3,45 (q, 4H, NCH<sub>2</sub>), 1,39 (t, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,23 (t, 6H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

❖ Synthèse de l'acide 7-(diéthylamino)-coumarine-3- carboxylique :

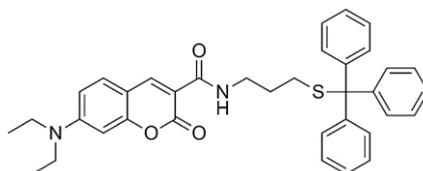


Le protocole de la synthèse de ce composé a également été mis au point par Corrie<sup>2</sup>, cette molécule dérivant directement de l'ester ci-dessus.

Le 7-(diéthylamino)-2-oxo-2H-chromène-3-carboxylate d'éthyle (5,20 g ; 18 mmol) est placé dans un ballon avec 30 mL de méthanol et chauffé à reflux jusqu'à solubilisation complète. Puis, 50 mL d'une solution de NaOH 0,5 M est ajoutée et un précipité jaune se forme rapidement. Après 10 min, le milieu réactionnel est refroidi, acidifié avec environ 15 mL d'une solution de HCl 2 M jusqu'à obtention d'un solide orange. Ce solide est filtré, rincé à l'eau jusqu'à pH neutre puis au MeOH pour éliminer l'eau. Il est ensuite séché au dessiccateur avec P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Le produit pur est obtenu avec un rendement de 84 %.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 12,35 (s, 1H, OH), 8,65 (s, 1H), 7,44 (d, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6,72 (dd, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6,53 (d, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 3,48 (q, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 1,26 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

❖ Synthèse du 7-(diéthylamino)-2-oxo-N-(3-(tritylthio)propyl)-2H-chromène-3-carboxamide (C1) :



L'acide 7-(diéthylamino)-coumarine-3- carboxylique synthétisé précédemment (0,38 mmol ; 1 éq) est dissous dans 1 mL de  $\text{SOCl}_2$  dans un ballon de petit volume (10 ou 25 mL), et le mélange réactionnel est agité pendant 2h à  $20^\circ\text{C}$ . Le  $\text{SOCl}_2$  résiduel est éliminé sous pression réduite à l'évaporateur rotatif (avec une trompe à eau) et le chlorure d'acyle obtenu est dissous dans 2 mL d'acétonitrile anhydre.

La 3-(tritylmercapto)propylamine (0,57 mmol ; 1,5 éq) et la triéthylamine ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) (0,55 mmol ; 1,45 éq) sont ensuite ajoutées successivement dans le ballon sous atmosphère inerte. La réaction est agitée pendant 2h à  $20^\circ\text{C}$ .

Le produit brut est concentré, dissous dans le dichlorométhane et lavé deux fois avec 50 mL d'eau déionisée.

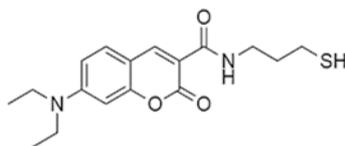
La phase organique est ensuite séchée avec du sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ), et purifié par chromatographie sur colonne par élution au mélange cyclohexane/ $\text{AcOEt}$  (70/30 –  $R_f = 0,16$  puis 60/40, v/v –  $R_f = 0,42$ ). Le produit pur obtenu, avec un rendement de 60%, est un solide jaune.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) : 8,66 (s, 1H), 7,43-7,15 (m,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6,64 (dd, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6,51 (d, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 3,47 (q, 2H,  $\text{CONHCH}_2$ ), 3,30 (q, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 2,22 (t, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 1,66 (q, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ), 1,24 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm): 163,06 et 162,66 (2C,  $\text{C}=\text{O}$ ), 157,64 ( $-\text{C}_{\text{Ar}}-\text{O}-\text{CO}$ ), 152,51 ( $-\text{C}_{\text{Ar}}-\text{N}-\text{CH}_2-$ ), 147,97 ( $-\text{C}-\text{C}-\text{CONH}-$ ), 144,91 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$  (coumarine)), 126,58-131,11 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$  trityle), 110,45 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$  (coumarine)), 109,92 ( $-\text{C}-\text{CONH}-$ ), 108,41 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$  (coumarine)), 96,62 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$  (coumarine)), 66,64 ( $-\text{S}-\text{C}(\text{Ph})_3$ ), 45,10 ( $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{N}-$ ), 38,81 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 29,48 ( $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ), 28,69 ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 12,46 ( $-\text{CH}_3$ ).

MS [M+ Na<sup>+</sup>] : m/z 599

❖ Déprotection de C1 :



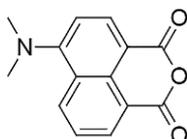
C1 (0,069 mmol ; 1éq) est dissous dans 4,6 mL de dichlorométhane. 2,3 mL d'acide trifluoroacétique (TFA), ainsi que le triéthylsilane (44  $\mu$ L ; 0,28 mmol ; 4éq) sont ajoutés successivement. Le mélange réactionnel est agité à 20°C sous atmosphère inerte pendant 1h, puis versé dans de l'eau déionisée glacée et neutralisé avec environ 20 mL d'une solution de carbonate de potassium. Le produit est extrait au chloroforme, la phase organique est ensuite lavée à l'eau et avec une solution de HCl à 5% wt, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub>. Après concentration à l'évaporateur rotatif, un solide jaune est récupéré. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne dans l'éluant cyclohexane/AcOEt (70/30, v/v) jusqu'à obtention du produit pur avec un rendement de 100%. (R<sub>f</sub> = 0,40 dans cyclohexane/AcOEt 1/1).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) : 8,86 (m, 1H, -CONH), 8,73 (s, 1H), 7,49 (d, 1H, H<sub>Ar</sub>), 6,81 (dd, 1H, H<sub>Ar</sub>), 6,67 (s, 1H, H<sub>Ar</sub>), 3,58 (q, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-), 3,45 (q, 4H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,60 (q, 2H, -CH<sub>2</sub>-SH), 1,93 (quint, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH), 1,51 (t, 1H, -SH), 1,25 (t, 6H, -CH<sub>3</sub>).

c. *Fluorophore accepteur*

- i. Dérivé du 1,8-naphtalimide

❖ Synthèse de l'anhydride 4-(N,N-diméthylamino)-1,8-naphtalique :



→ Synthèse par voie thermique :

La synthèse de ce composé est décrite par Kollár *et al.* <sup>3</sup>

Dans un bicol de 50 mL muni d'un réfrigérant, l'anhydride 4-bromo-1,8-naphtalique (1,11 g ; 4 mmol) est solubilisé dans 28 mL de 3-méthylbutan-1-ol et la solution est chauffée à 132 °C sous agitation. Le 3-diméthylaminopropionitrile (1,6 g ; 16 mmol) est ensuite ajoutée et le mélange est agité pendant 12 h. Le solide obtenu est filtré, lavé à l'eau et au cyclohexane froid et séché pour obtenir des cristaux orange avec un rendement de 72 %.

→ Synthèse par voie micro-ondes :

L'anhydride 4-bromo-1,8-naphtalique (0,56 g ; 2 mmol), le 3-diméthylaminopropionitrile (0,8 g ; 8,15 mmol) sont mélangés dans 14 mL de 3-méthylbutan-1-ol dans un tube à micro-ondes G30.

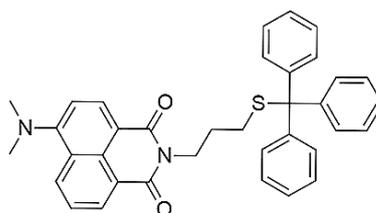
L'appareil à micro-ondes est programmé pour effectuer une montée en température jusqu'à 200 °C avec une agitation à 1000 rpm. La température de 200 °C est maintenue pendant 15 min. Puis, le tube est refroidi à température ambiante. L'agitation est maintenue pendant toute la durée de l'expérience.

Le mélange est ensuite filtré sur fritté, rincé à l'eau et à l'éther de pétrole, et enfin séché.

Le produit pur est obtenu avec un rendement de 66 %.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 8,40 – 8,60 (m, 3H, -CH-), 7,68 (t, 1H, -CH-), 7,12 (d, 1H, -CH-), 3,18 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-N).

❖ Synthèse du Naphtyle thiol protégé (N1) :



L'anhydride 4-diméthylamino-1,8-naphtalique (1,24 mmol ; 1 éq) est solubilisé dans 10 mL de DMF dans un ballon bicol équipé d'un barreau aimanté et d'un réfrigérant. La 3-

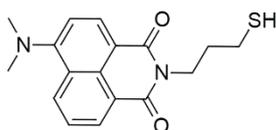
(tritylmercapto)propylamine (1,83 mmol ; 1,5 éq) est ensuite ajoutée à l'aide d'un entonnoir. Le milieu est placé sous atmosphère inerte et mis à reflux pendant une nuit. Le mélange est concentré à l'évaporateur rotatif, solubilisé dans du dichlorométhane, lavé à l'eau et avec une solution de NaCl saturée, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub>. La phase organique est finalement filtrée et concentrée sous pression réduite. Après purification sur colonne de silice dans l'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 90 :10 (Rf = 0,18), le produit pur est obtenu avec un rendement de 30 %.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8,54 (d, 1H, H<sub>Ar</sub>), 8,45 (d, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7,65 (dd, 1H, H<sub>Ar</sub>), 7,39 (d, 6H, H<sub>Ar</sub>), 7,40 – 7,08 (m, 13H, H<sub>Ar</sub>), 4,08 (t, 2H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3,11 (s, 6H, -CH<sub>3</sub>), 2,23 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-STr), 1,81 (quint., 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-STr).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm): 164,41 et 163,85 (2C, C=O), 156,94 (C<sub>Ar</sub>), 144,96 (C<sub>Ar</sub>), 123,12-132,62 (C<sub>Ar</sub>), 115,11 (C<sub>Ar</sub>), 113,35 (C<sub>Ar</sub>), 66,66 (-S-C(Ph)<sub>3</sub>), 44,83 (-CH<sub>3</sub>), 39,44 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-STr), 29,77 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-STr), 27,38 (-N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

**MS [M+ Na<sup>+</sup>]** : m/z 579

❖ Déprotection de N1 :



N1 (50 mg ; 0,09 mmol ; 1éq) est dissous dans 6 mL de dichlorométhane. 3 mL d'acide trifluoroacétique (TFA), ainsi que le triéthylsilane (58 µL ; 0,36 mmol ; 4éq) sont ajoutés successivement. Le mélange réactionnel est agité à 20°C sous atmosphère inerte pendant 1h, puis versé dans de l'eau déionisée glacée et neutralisé avec environ 20 mL d'une solution de carbonate de potassium<sup>4</sup>. Le produit est extrait au chloroforme, la phase organique est ensuite lavée à l'eau et avec une solution de HCl à 5% wt, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub>. Après concentration à l'évaporateur rotatif, un solide orangé est récupéré. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne (cyclohexane/AcOEt 80 :20 – Rf = 0,24) jusqu'à obtention du produit pur avec un rendement de 77%.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) : 8,56 (dd, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 8,46 (dd, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7,66 (dd, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7,12 (d, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 4,29 (t, 2H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 3,11 (s, 6H,  $-\text{CH}_3$ ), 2,60 (q, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{STr}$ ), 2,07 (quint., 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{STr}$ ).

**MS [ $\text{M}+ \text{H}^+$ ]** :  $m/z$  315

#### D. Greffage par réaction thiol-ène

Les réactifs appropriés (dérivés de l'huile de lin ou copolymères et fluorophores) sont ajoutés dans un tube à essai en verre fermé par un septum. Le tube est mis sous atmosphère inerte ( $\text{N}_2$ ) pendant 5 min, puis le solvant de la réaction anhydre ajouté. La solution est dégazée par bullage de  $\text{N}_2$  pendant 10 min, puis le tube positionné à environ 5 cm de la lampe avec un angle d'inclinaison de  $45^\circ$ , et protégé avec du papier aluminium.

Le photoamorceur, préalablement solubilisé dans le solvant de la réaction à une concentration de 2 g/L et mis sous atmosphère inerte, est incorporé toutes les 30 minutes (en quantités équivalentes) dans le tube à l'aide d'une seringue. La solution initiale de photoamorceur a été concentré suffisamment pour n'avoir à ajouter au total pas plus de 0,5 mL pour éviter de diluer le milieu réactionnel.

Une fois l'irradiation terminée, le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif et le produit brut analysé en RMN  $^1\text{H}$  et en SEC.

#### E. Réticulation du cœur des micelles par réaction thiol-ène

Une solution de copolymères LPiPrOx/LPEtOx 20/80 % (w/w) est préparée dans l'eau distillée à une concentration totale de 1 g/L.

Le dithiol (10 g/L) et éventuellement le photoamorceur (5 g/L) sont solubilisés individuellement dans du dichlorométhane afin de faciliter leur incorporation dans le cœur des micelles, et introduit dans la solution micellaire (environ 20-30  $\mu\text{L}$  en fonction du volume de la solution de copolymères). Le dichlorométhane est finalement évaporé par agitation de cette solution pendant 4 h minimum. Le volume d'eau est finalement ajusté pour obtenir la concentration en copolymères de 1 g/L.

## Partie expérimentale

Cette solution a ensuite été séparée en 4 vials différents avant d'être irradiée à différents temps avec une lampe monochromatique (AnalytikJena, 100 W) de longueur d'onde 365 nm. Ainsi, la solution a pu être analysée à  $t_0$ , puis après 30 min, 1h et 2h de réaction.

### Références

- (1) Gellerman, G.; Gilon, C.; Glukhov, E.; Gazal, S. Synthesis of Novel Protected N $\alpha$ ( $\omega$ -Thioalkyl) Amino Acid Building Units and Their Incorporation in Backbone Cyclic Disulfide and Thioetheric Bridged Peptides. *J. Pept. Res.* **2001**, *58* (6), 527–539.
- (2) Corrie, J. E. T. Thiol-Reactive Fluorescent Probes for Protein Labelling. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, No. 20, 2975.
- (3) Kollár, J.; Hrdlovič, P.; Chmela, Š.; Sarakha, M.; Guyot, G. Synthesis and Transient Absorption Spectra of Derivatives of 1,8-Naphthalic Anhydrides and Naphthalimides Containing 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine; Triplet Route of Deactivation. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2005**, *170* (2), 151–159.
- (4) Tanaka, M.; Sawaguchi, T.; Sato, Y.; Yoshioka, K.; Niwa, O. Synthesis of Phosphorylcholine-Oligoethylene Glycol-Alkane Thiols and Their Suppressive Effect on Non-Specific Adsorption of Proteins. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (28), 4092–4095.
- (5) Heisig, F.; Gollos, S.; Freudenthal, S. J.; El-Tayeb, A.; Iqbal, J.; Müller, C. E. Synthesis of BODIPY Derivatives Substituted with Various Bioconjugatable Linker Groups: A Construction Kit for Fluorescent Labeling of Receptor Ligands. *J. Fluoresc.* **2014**, *24* (1), 213–230.

# Annexes



### Annexe 1 - Principe de la technique de diffusion de la lumière

Les nanoparticules en solution sont principalement soumises aux chocs continus avec les molécules de solvant qui entraînent un mouvement désordonné et aléatoire, appelé mouvement Brownien, et responsable de la diffusion plus ou moins rapide des particules en solution. La vitesse de diffusion dépend principalement de la taille des particules en solution, ainsi que des paramètres tels que la température et la viscosité du solvant. Einstein a établi une relation entre le coefficient de diffusion  $D$ , le diamètre hydrodynamique des particules et les propriétés du milieu liquide, en émettant l'hypothèse que les particules en solution sont des sphères dures sans interactions les unes avec les autres. Dans ce cas, il est possible d'écrire l'équation de Stokes-Einstein :

$$d_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $\eta$  la viscosité et  $d_h$  le diamètre hydrodynamique qui représente le diamètre d'une sphère théorique ayant le même coefficient de diffusion que les particules en solution.

La diffusion de lumière est basée sur ce principe, et mesure le coefficient de diffusion des particules pour déterminer leur taille. Le principe général de la diffusion de lumière est décrit sur le schéma suivant (Figure 1).

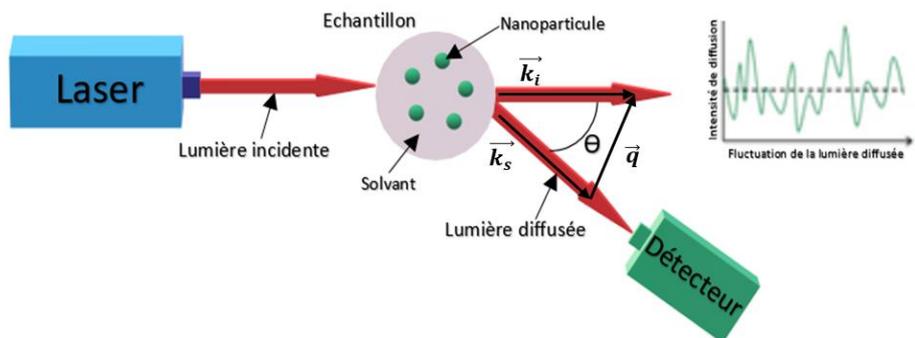


Figure 1 : Principe général de la technique de diffusion de lumière

Une source lumineuse monochromatique polarisée linéairement, éclaire l'échantillon à une longueur d'onde  $\lambda$  (632,8 nm), et la lumière incidente est diffusée par les nanoparticules en mouvement et collectée à un angle de diffusion  $\theta$  (entre le vecteur d'onde du rayonnement

incident  $\vec{k}_i$  et le vecteur du rayonnement diffusé  $\vec{k}_s$ ) par un détecteur qui compte les photons diffusés.

Le vecteur de diffusion  $\vec{q}$  est défini comme :

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_s = \frac{4\pi n}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

avec  $n$  l'indice de réfraction du milieu.

L'échelle caractéristique sondée par le rayonnement est définie par  $q$  et vaut  $q^{-1}$ . Ainsi, plus  $\theta$  est grand, plus  $q$  est grand, et plus les petits objets sont détectés.

La diffusion statique mesure l'intensité diffusée moyennée dans le temps. Elle permet de déterminer la masse molaire, la taille et les interactions existants au sein d'un échantillon.

La diffusion dynamique prend en compte les fluctuations de l'intensité diffusée, et apporte des informations sur la mobilité des particules en solution. Dans ce cas, trois étapes principales sont à considérer.

D'abord, le détecteur convertit les fluctuations d'intensité diffusée en un signal électronique. Ensuite, ce signal est traité numériquement pour générer une fonction d'auto-corrélation en intensité.

Enfin, des algorithmes sont capables d'extraire les distributions de taille des particules à partir de la fonction d'auto-corrélation <sup>1</sup>.

Ces trois étapes sont schématisées ci-dessous (Figure 2) :

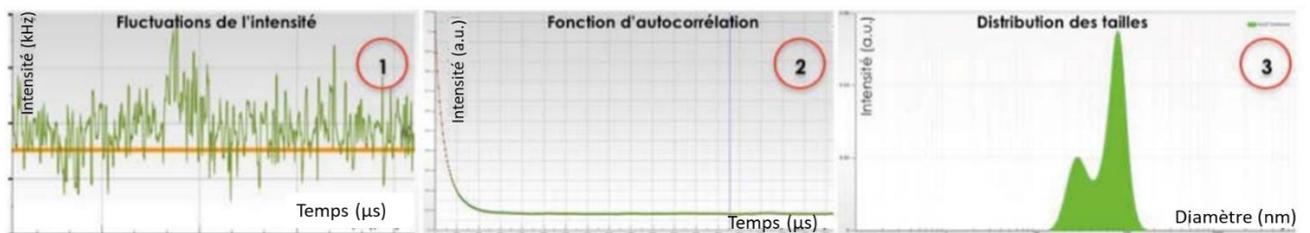


Figure 2 : Les trois étapes d'une mesure en diffusion de lumière : (1) Acquisition, (2) Corrélation, (3) Inversion <sup>1</sup>

(1) Mainard, M.; Jacob, D. Comprendre La Mesure de Taille de Nanoparticules Par Diffusion Dynamique de La Lumière. *Photoniques* **2016**, 1827 (83), 40–44.

**Annexe 2: Fonctions d'auto-corrélation des solutions de LPiPrOx et LPEtOx avant et après filtration 0,45  $\mu\text{m}$**

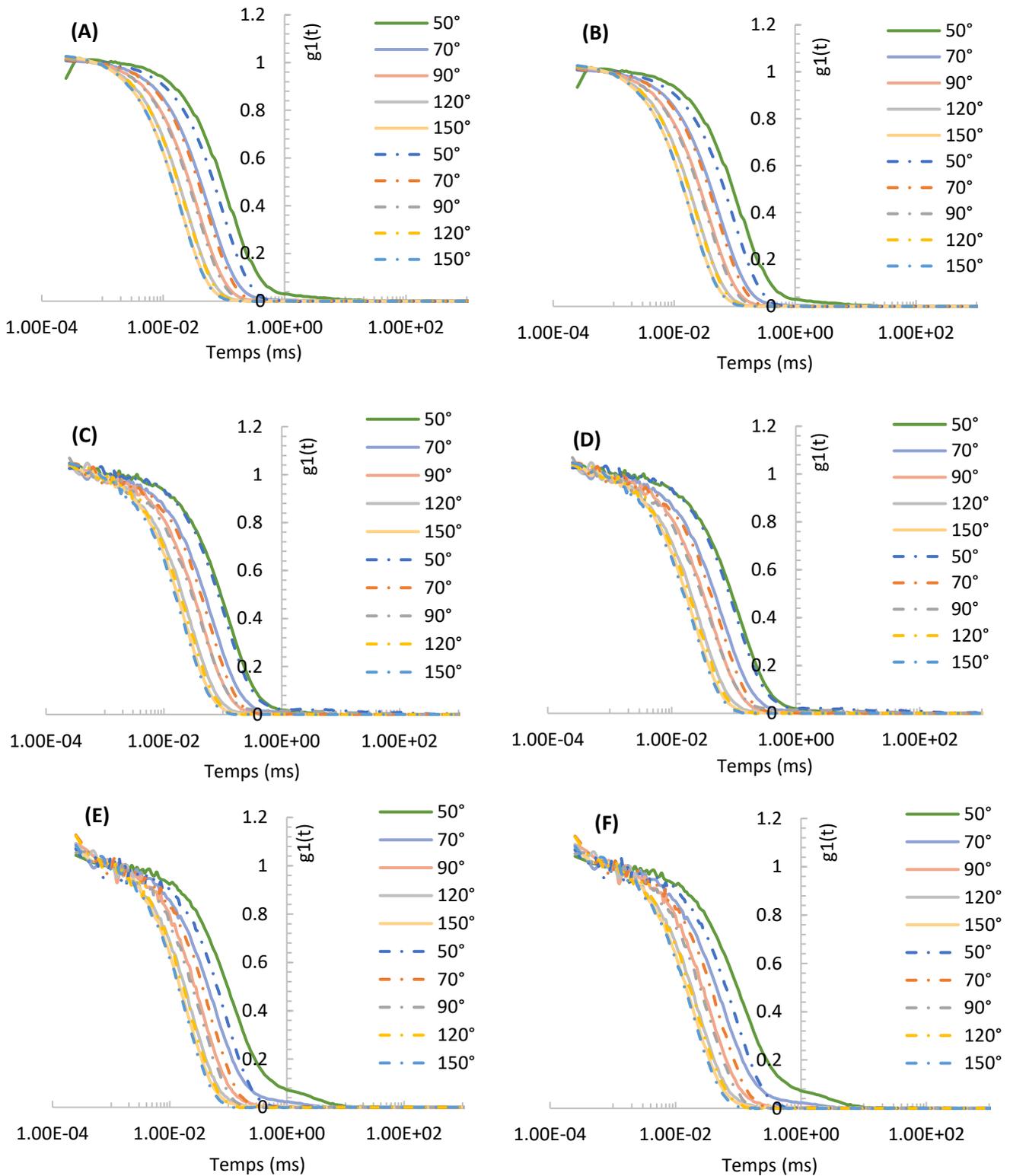


Figure 3 : Comparaison des fonctions d'autocorrélation d'une solution de (A) LPiPrOx 10 g/L, (B) LPEtOx 10 g/L, (C) LPiPrOx 1 g/L direct, (D) LPEtOx 1 g/L direct, (E) LPiPrOx 1 g/L dilution (10 g/L) et (F) LPEtOx 1 g/L dilution (10 g/L). Les lignes continues représentent les solutions non filtrées et les pointillés représentent les solutions filtrées sur 0,45  $\mu\text{m}$

**Annexe 3 - Calculs théoriques d'intensité diffusée et de rayon hydrodynamique pour des systèmes non hybridés**

Si on calcule l'intensité  $R/K$  et le  $R_h$  attendus s'il n'y avait pas hybridation aux valeurs effectivement mesurées pour le mélange, on observe :

$$R/K(LPiPrOx) + R/K(LPEtOx) \gg R/K(\text{mélange})$$

$$\frac{1}{\frac{A(LPiPrOx)}{R_h(LPiPrOx)} + \frac{A(LPEtOx)}{R_h(LPEtOx)}} \gg R_h(\text{mélange})$$

où  $A$  est l'amplitude relative de chacun des copolymères, pouvant être définie comme :

$$A = \frac{R/K(LPOx)}{R/K(LPiPrOx) + R/K(LPEtOx)}$$

Le  $R_h$  obtenu par la somme théorique des deux solutions de LPiPrOx et LPEtOx a été calculé en prenant en compte les fréquences de relaxation. En effet, plus les objets sont petits, plus leur temps de relaxation  $\tau$  est grand, donc plus la fréquence de relaxation  $\Gamma = 1/\tau$  est petite.

$$\langle R_h \rangle = A_1 R_{h1} + A_2 R_{h2} \propto A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2$$

qui est fortement influencé par les gros objets (temps de relaxation plus élevé).

$$\left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle = A_1 \frac{1}{R_{h1}} + A_2 \frac{1}{R_{h2}} \propto A_1 \Gamma_1 + A_2 \Gamma_2$$

qui est fortement influencé par les petits objets, et qui reflète donc mieux la réalité.

**Annexe 4 – Extrapolation de la masse molaire apparente pour une solution de LPiPrOx à 0,1 g/L à T = 45 °C**

Pour LPiPrOx à 0,1 g/L, il y a une forte dépendance angulaire de  $M_{app}$  car les objets sont relativement volumineux. Les petits angles (petits  $q$ ) représentent une vision plus lointaine de la solution. C'est donc aux petits angles que la mesure de taille des objets est la plus réaliste. On a pris la valeur de  $M_{app}$  extrapolée à  $q \rightarrow 0$  en traçant  $R/KC = f(q)$  en log-log (Figure 4).  $R$  est l'intensité diffusée,  $K$  la constante d'appareillage,  $C$  la concentration et  $q$  le vecteur d'onde variant avec l'angle de mesure.

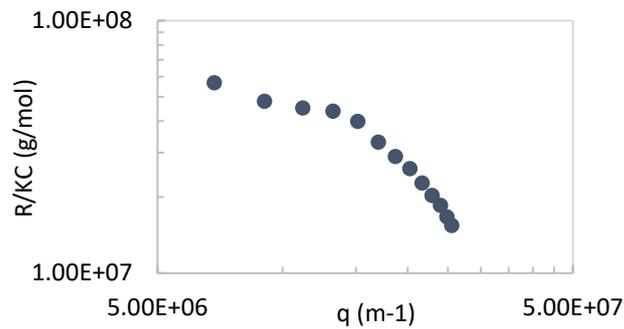


Figure 4 :  $R/KC$  en fonction de  $q$  (échelle log-log) pour une solution de LPiPrOx à 0,1 g/L dans l'eau distillée à 45°C

**Annexe 5 – Evolution du rayon hydrodynamique des mélanges LPIPrOx/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>n</sub> avec la température**

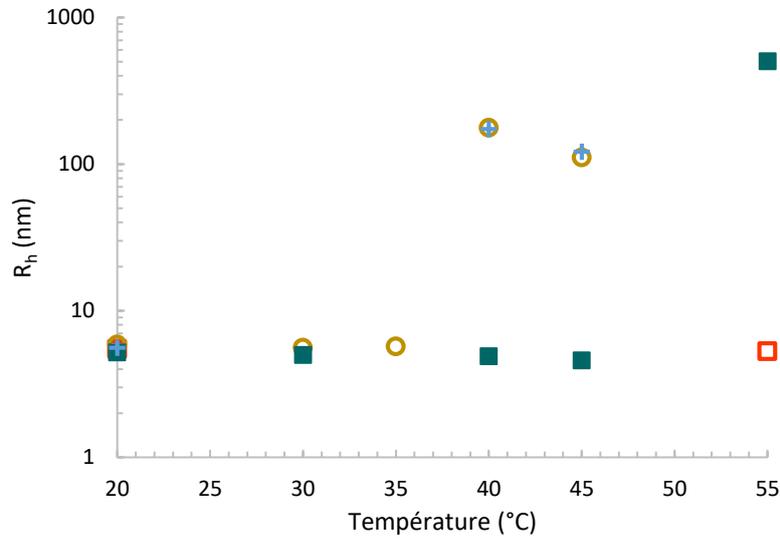


Figure 5 : Mesures en diffusion de la lumière – R<sub>h</sub> (échelle log) en fonction de la température pour (□) C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> 0,5 g/L, (○) LPIPrOx 0,5 g/L, (■) LPIPrOx/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> 50/50 % (w/w) 1 g/L et (+) LPIPrOx/PEO 50/50 % (w/w) 1 g/L dans l'eau milliQ

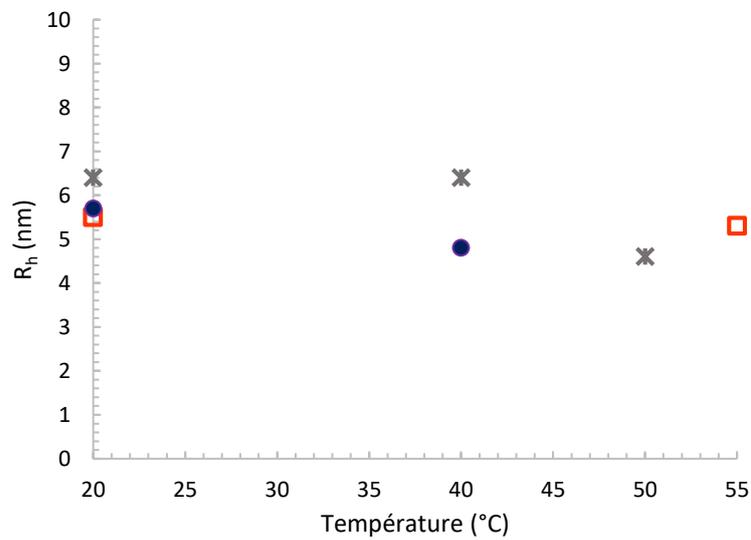


Figure 6 : Mesures en diffusion de la lumière – R<sub>h</sub> en fonction de la température pour (□) C<sub>18E19</sub> 0,5 g/L, (●) LPIPrOx/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> 75/25 % (w/w) 1 g/L et (\*) LPIPrOx/C<sub>18-b</sub>-PEO<sub>19</sub> 25/75 % (w/w) 1 g/L dans l'eau milliQ

### Annexe 6 – Caractérisations des fluorophores en solvants organiques

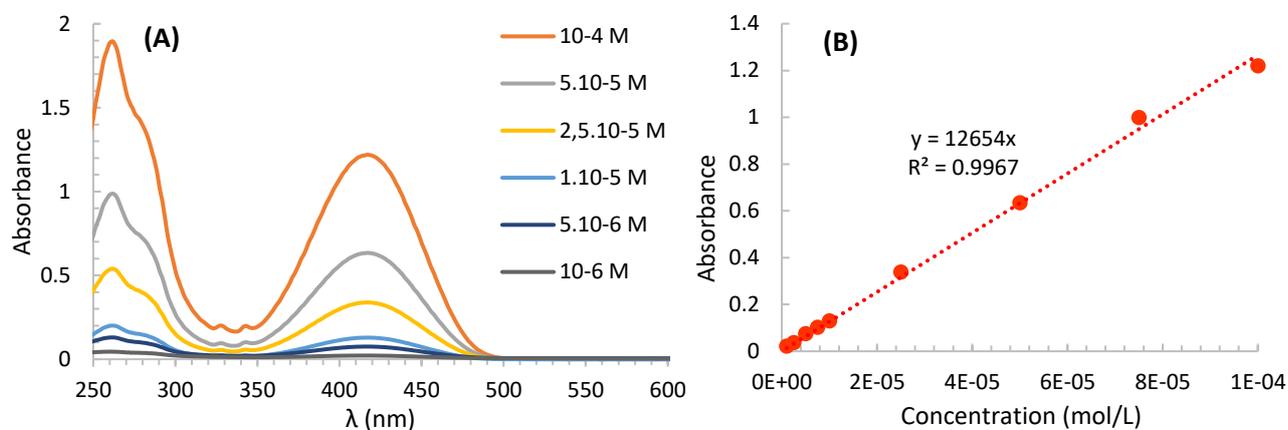


Figure 7 : (A) Spectres d'absorbance UV-visible de solutions de NaphtSTR à différentes concentrations dans le dichlorométhane et (B) droite étalon correspondante à  $\lambda = 420$  nm.

Tableau 1 : Caractéristiques des dérivés de Naphtyle mesurées en spectrophotométrie UV-visible dans le dichlorométhane.

Molécule	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\epsilon$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
Naphtyle	425	13900
Naphtyle thiol protégé	417	12500

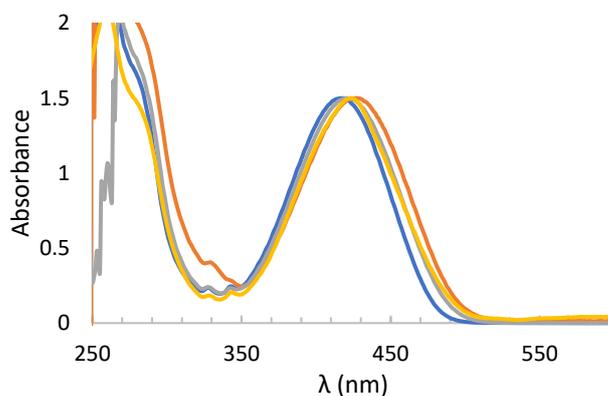


Figure 8 : Spectre d'absorption du Naphtyle thiol protégé dans (—) le dichlorométhane, (—) le diméthylformamide, (—) le méthanol et (—) le diméthylsulfoxyde.

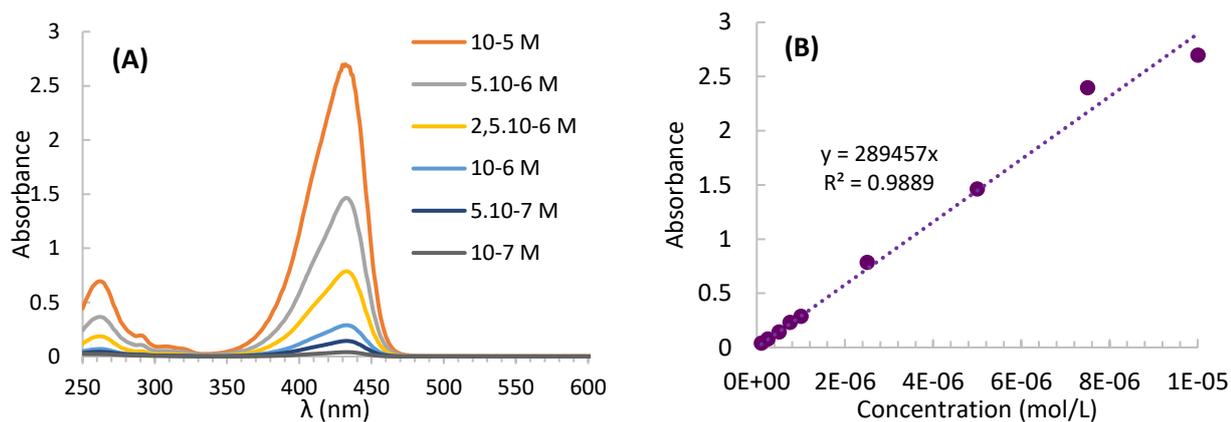


Figure 9 : (A) Spectres d'absorbance UV-visible de solutions de Coumarine (acide) à différentes concentrations dans le dichlorométhane et (B) droite étalon correspondante à  $\lambda = 435$  nm

Tableau 2 : Caractéristiques des dérivés de Coumarine mesurées en spectrophotométrie UV-visible dans le dichlorométhane

Molécule	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\epsilon$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
Coumarine (acide)	432	285300
Coumarine thiol protégé	419	/
Coumarine thiol déprotégé	418	/

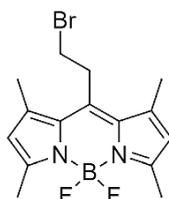
Tableau 3 : Longueur d'onde d'excitation du composé Coumarine thiol protégé dans différents solvants.

Solvants	Dichlorométhane	Diméthylformamide	Diméthylsulfoxyde	Méthanol
$\lambda_{exc}$ (nm)	419	418	421	423

<b>Annexe 7 - Protocoles des différentes étapes de la synthèse du BODIPY</b>
--

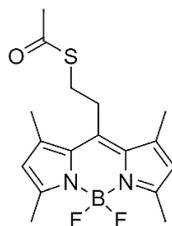
Le BODIPY thiolé est synthétisé à partir du protocole en trois étapes publié dans la littérature<sup>5</sup>.

❖ Bromopropyl-BODIPY :



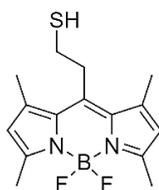
Le chlorure de 3-bromopropionyle (0,86 g ; 5 mmol) est solubilisé dans 60 mL de dichlorométhane anhydre. Le 2,4-diméthylpyrrole (0,95 g ; 10 mmol) est ajouté, et le mélange est agité sous argon pendant 1h30 jusqu'à obtention d'une solution rouge. Une analyse CCM dans l'éluant DCM/éther de pétrole 50 :50 permet de vérifier que la totalité du 2,4-diméthylpyrrole a été consommée. Le mélange est ensuite refroidi à 0 °C dans un bain de glace pendant 10 min. Puis, la triéthylamine (2,8 mL) est ajoutée et le mélange réactionnel est agité pendant 30 min en maintenant la température à 0 °C jusqu'à obtention d'une solution jaune. Après avoir retiré le bain de glace, l'éthérate de trifluorure de bore (2,5 mL ; 10 mmol) est ajouté et la solution agitée pendant 1 h à température ambiante jusqu'à obtention d'une couleur rouge légèrement foncé. Le milieu réactionnel est concentré, le produit brut est purifié sur colonne de silice dans l'éluant DCM/éther de pétrole 50 :50 et séché sous vide. Des cristaux orange sont obtenus avec toujours quelques impuretés (liquide rouge sombre). Un lavage au méthanol refroidi à 0 °C permet d'éliminer les dernières impuretés et de récupérer le produit pur avec un rendement de 4 %.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 6,09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)-CH-), 3,48 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 3,46 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 2,51 (s, 6H, -N-C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>), 2,45 (s, 6H, -N-C(C)=C-CH<sub>3</sub>).

❖ Propyl thioacétate-BODIPY :

Le bromopropyl-BODIPY (150 mg ; 0,42 mmol) et le thioacétate de potassium (106 mg ; 0,93 mmol) sont mélangés dans 18 mL d'acétone et le mélange est chauffé à reflux pendant 5 h. Le solvant est évaporé et le produit brut est purifié sur colonne de silice dans l'éluant acétate d'éthyle/éther de pétrole 15 :85. Le produit pur est obtenu avec un rendement de 34 %.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 6,08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)-CH-), 3,23 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 3,11 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 2,52 (s, 6H, -N-C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>), 2,47 (s, 6H, -N-C(C)=C-CH<sub>3</sub>), 2,38 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>).

❖ Propyl thiol-BODIPY :

Le propyl thioacétate-BODIPY (48 mg; 0,14 mmol) et le carbonate de potassium (40 mg; 0,29 mmol) sont ajoutés dans un ballon et soumis à trois cycles vide/argon. Un mélange de solvant DCM/MeOH 50 :50 (7 mL) dans lequel a préalablement bullé de l'argon est ensuite introduit dans le ballon où se trouvent les réactifs. Le mélange réactionnel est agité pendant 5 h à 30 °C sous argon. De l'acide chlorhydrique 1M est ajouté pour rendre le pH légèrement acide, puis le produit est lavé au NaCl saturé puis à l'eau, séché sur MgSO<sub>4</sub> et concentré à l'évaporateur rotatif. Le produit pur est obtenu après une purification sur colonne de silice dans l'éluant DCM/éther de pétrole 67 :33.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 6,05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)-CH-), 3,24-3,38 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 2,86 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 2,5 (s, 6H, -N-C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>), 2,43 (s, 6H, -N-C(C)=C-CH<sub>3</sub>), 1,53 (s, 1H, -SH).



## Résumé

Les copolymères amphiphiles stimuli-sensibles présentent un intérêt particulier dans de nombreux domaines (relargage de principes actifs, biotechnologies, chromatographie, etc.). Le projet vise à développer des systèmes micellaires mixtes constitués de deux copolymères thermosensibles à base d'huile de lin. Le mélange des deux copolymères possédant une température de point de trouble différente permet un ajustement simple de la stabilité finale du système micellaire *via* une modification du ratio entre les deux copolymères. La nature des blocs hydrophiles ainsi que leur architecture ont été variées afin d'étudier l'impact sur le processus de comicellisation et sur les propriétés finales. Par ailleurs, la mise au point d'une technique de caractérisation directe basée sur le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) afin de démontrer de façon directe la mixité des micelles a été étudiée.

**Mots-clés :** Copolymères amphiphiles thermo-sensibles, huile de lin, micelles mixtes, réticulation, hybridation, co-micellisation, fluorescence, FRET.

## Abstract

Stimuli-responsive amphiphilic copolymers are of great interest in many fields (drug delivery, biotechnologies, chromatography, etc.). This work aims at the development of mixed micellar systems from two thermo-responsive copolymers synthesized from linseed oil. Interestingly, when blending two thermo-responsive copolymers of close chemical composition with different cloud points, the system stability can be easily tuned depending on the proportions in each copolymer. The nature and architecture of the hydrophilic blocks were broadened to study their impact onto the co-micellization process and on the final properties. Furthermore, a novel characterization method based on FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) was studied to directly confirm the formation of mixed micelles.

**Key words:** Thermosensitive amphiphilic copolymers, linseed oil, mixed micelles, cross-linking, hybridization, co-micellization, fluorescence, FRET.