Synthèse de nouveaux vecteurs cationiques à architecture en étoile pour le transfert de gènes

Laëtitia Plet

▶ **To cite this version:**

Laëtitia Plet. Synthèse de nouveaux vecteurs cationiques à architecture en étoile pour le transfert de gènes. Polymères. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS297 . tel-03466540

HAL Id: tel-03466540
https://theses.hal.science/tel-03466540

Submitted on 6 Dec 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.

Thèse de doctorat de Sorbonne Université

Ecole doctorale 397 – Physique et Chimie des Matériaux

Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM – UMR 8232) / Equipe Chimie des Polymères

Synthèse de nouveaux vecteurs cationiques à architecture en étoile pour le transfert de gènes

Présentée par

Laetitia Plet

Pour obtenir le grade de

Docteur de Sorbonne Université

Spécialité : Physique et Chimie des Matériaux

Dirigée par Philippe Guégan et Patrick Midoux

Présentée et soutenue publiquement le 4 décembre 2019 devant un jury composé de :

Pr Laurent Fontaine	Le Mans Université	Rapporteur
Dr Sophie Guillaume	Université Rennes 1	Rapporteur
Pr Odile Fichet	Université de Cergy-Pontoise	Examinateur
Pr Dominique Hourdet	Sorbonne Université	Examinateur
Pr Philippe Guégan	Sorbonne Université	Directeur de thèse
Dr Patrick Midoux	CBM Orléans	Co-directeur de thèse
Dr Véronique Bennevault	Sorbonne Université	Encadrante

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement la Fondation pour la Recherche Médicale qui a financé mes trois années de thèse suite à l'attribution du Prix Line POMARET DELALANDE 2016. Au-delà de l'honneur que m'a fait le comité de sélection en m'attribuant ce prix, je voudrais saluer la générosité et l'altruisme de madame Sylvie Pomaret qui est à l'origine de celui-ci.

Ce travail a été réalisé à l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire au sein de l'équipe Chimie des Polymères dirigée par le Dr Laurent Bouteiller et au Centre de Biophysique Moléculaire au sein de l'équipe Biologie Cellulaire, Cibles Moléculaires et Thérapies Innovantes dirigée par le Pr Chantal Pichon.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, le Pr Philippe Guégan, mon encadrante, le Dr Véronique Bennevault et mon co-directeur de thèse, le Dr Patrick Midoux. Merci Philippe de m'avoir fait confiance il y a trois ans et de m'avoir parfaitement préparée pour porter le projet devant la FRM. Merci pour la dynamique que tu insuffles à ton équipe et pour l'attention que tu portes à chacun d'entre nous. Tu as su être à l'écoute dans les moments difficiles et je t'en remercie. C'est tellement gratifiant et motivant de travailler dans ses conditions. Véronique, merci pour ta patience et ta bienveillance : du montage de la paillasse à mon arrivée, aux corrections du manuscrit en passant par toutes les discussions scientifiques que nous avons eu pendant ces trois années, je me suis sentie soutenue tout au long de ma thèse. Je te remercie de m'avoir transmis ta rigueur, toujours avec bienveillance et d'avoir été si tolérante vis-à-vis de ma vision – un peu spéciale je l'admets – du rangement. Merci Patrick pour ton accueil au sein de l'équipe et pour le temps passé à analyser avec moi les résultats obtenus sur les cultures de cellules.

Je remercie toute l'équipe Biologie Cellulaire, Cibles Moléculaires et Thérapies Innovantes pour leur accueil, leur gentillesse et leur disponibilité. Je voudrais en particulier remercier Delphine pour la patience dont elle a fait preuve pour me former aux techniques de biologie et le temps qu'elle m'a consacrée. Merci aussi à Caroline, Amandine, Cristine, Virginie, Yoan, Rudy pour les discussions intéressantes et les pauses agréables du midi.

Quel plaisir de venir travailler chaque jour quand l'ambiance générale est si agréable. Merci à tous les membres de l'équipe Chimie des Polymères pour les bons moments partagés : les courses à pied du midi (Gaëlle et moi espérons que vous continuerez, même après notre départ !), les moments de détente autour d'un verre après une longue journée, les moments de jeux, de sport et de rigolade passés pendant les journées du labo, la course Odysséa avec David, Gaëlle, et Thomas. Merci au trio de choc : Léo, Julien et Thomas, pour leur accueil et les moments partagés pendant la première partie de ma thèse. C'était déjeuner – spectacle tous les jours avec vous! Une pensée particulière pour tous les membres de l'équipe PG : Nicolas, Véronique, Cécile, Philippe, Valentin, Gwendoline, Haiqin, Fernando, Özgül, Dihia, Soum ; vous avez été une équipe au top, soudée, entre autre, par les traditionnels déjeuners d'équipe. Nicolas, merci pour tous les moments de rigolade et de détente mais aussi merci d'avoir pris soin de mon moral (à défaut de ma ligne) pendant la rédaction !

Merci aux différents stagiaires qui ont contribué à ce travail et en particulier à Djallal, Alexandra et Angelina pour leur dynamisme et leur sérieux.

Je voudrais aussi remercier tous les experts en analyse qui m'ont aidé à caractériser les produits synthétisés. Merci Claire pour ta bonne humeur contagieuse et l'aide que tu m'as apportée pour les analyses RMN. Merci à Cédric pour les analyses de spéctrométrie de masse et à Guillaume et Özgül pour les images de cryo-microscopie. Un immense merci à Nadège et à Gaëlle pour leur collaboration à l'analyse par SEC des polymères en étoile qui a beaucoup apporté au projet. Merci aussi à Mohamed pour les longues heures qu'il a passé à résoudre les énigmes des très capricieuses lignes de SEC dans l'eau.

Ces trois années de ma vie ont été marquées par beaucoup d'émotions importantes d'un point de vue personnel et professionnel. L'équilibre entre les deux m'a permis de surmonter les épreuves que j'ai traversées grâce au soutien de ma famille, de mes amis et de mes collègues. Je suis très heureuse d'avoir partagé un moment important de ma vie avec ceux qui sont devenus plus que des collègues pour moi ! Gaëlle, Valentin, Gwendoline, Pauline (la famille Tuche!), nous avons tissés des liens d'amitié forts, vous avez été une deuxième famille pour moi pendant ces 3 ans ; nous saurons garder intacte cette amitié, j'en suis sûre.

Merci à ma famille et en particulier à mes parents, mes sœurs et Nicolas ainsi qu'à mes amis proches pour leur soutien et leur amour.

Liste des abréviations

α	Exposant de l'équation de Mark-Houwink
AAV	Virus adéno-associé / *adeno associated virus*
ACN	Acétonitrile
ADA-SCID	Déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNp	ADN plasmidique
AEM	Agence Européenne des Médicaments
AIBN	Azobisisobutyronitrile
ANSM	L'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN	Acide ribonucléique
ATRP	Polymérisation radicalaire par transfert d'atome / *atom transfer radical polymerization*
bp	paire de bases / *pair base*
***b*PEI**	Poly(éthylèneimine) branchée
CD	Cyclodextrine
CES	Chromatographie d'exclusion stérique
CME	Endocytose clathrine-dépendante / *Clathrin-mediated endocytosis*
***c*PEI**	Poly(éthylèneimine) cyclique
CROP	Polymérisation cationique par ouverture de cycle / *Cationic ring opening polymerization*
Cyo-MET	Cryo-microscopie électronique à transmission
Đ	Dispersité en masses molaires
Da	Dalton, unité de masse atomique définie comme 1/12 de la masse d'un atome de ^{12}C, utilisée en biochimie. 1kDa ≈ 1kg.mol^{-1}
DCM	Dichlorométhane
DLS	Diffusion dynamique de la lumière / *Dynamic light scattering*
DMF	Diméthylformamide
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage / *Differential scanning calorimetry*
ε	facteur de forme de la théorie de Zimm et Stockmayer
EMA	*European Marketing Authorization*
EtOTf	Trifluorométhanesulfonate d'éthyle (ou triflate d'éthyle)
EtOx	2-éthyl-2-oxazoline
f	Nombre de branches d'un polymère en étoile
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux / *Food and Drug Administration*
HepG2	Cellules d'hépatoblastome humain
I	Pour « *Initiator* », fait référence à l'amorceur
ITC	Titrage calorimétrique isotherme / *Isothermal titration calorimetry*
kbp	Kilo paire de bases
LCST	Température de solution critique inférieure / *Lower critical solution temperature*
LS	Diffusion de la lumière / *Light scattering*
***l*PEI**	Poly(éthylèneimine) linéaire
MeOx	2-méthyl-2-oxazoline
MM	Masse molaire (en g.mol^{-1}) / *Molar mass*
M_n	Masse molaire moyenne en nombre

$M_{n\ CES}$	Masse molaire moyenne en nombre mesurée par CES
$M_{n\ RMN}$	Masse molaire moyenne en nombre estimée par RMN ^{1}H
$M_{n\ theo}$	Masse molaire moyenne en nombre théorique
M_w	Masse molaire moyenne en poids
N/P	ratio molaire amines du polymère/phosphates de l'ADN
nt	nucléotides
OTC	Ornithine transcarbamylase
Ox	2-oxazoline
PEG	Poly(éthylène gycol). Synonyme : POE
PEI	Poly(éthylèneimine)
PEtOx	Poly(2-éthyl-2-oxazoline)
PMeOx	Poly(2-méthyl-2-oxazoline)
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
POE	Poly(oxyde d'éthylène). Synonyme : PEG
POx	Poly(2-oxazoline)
RAFT	Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation / *reverse addition-fragmentation chain transfer polymerization*
RI	Indice de réfraction / *Refractive index*
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
ROMP	polymérisation par ouverture de cycle par métathèse / *ring-opening metastasis polymerization*
SEC	*Size exclusion chromatography* (CES en français)
siRNA	Petit ARN interférent / *Small interfering RNA*
T_g	Température de transition vitreuse
T_f	Température de fusion
UCST	Température de solution critique supérieure / *upper critical solution temperature*
V_e	Volume d'élution
WR	Ratio massique polymère/ADNp / *polymer/pDNA weight ratio*
X_n	Degré de polymérisation moyen en nombre

Glossaire

ADN complémentaire (ADNc)
L'ADNc est la séquence codante du gène

ADN plasmidique (ADNp)
L'ADNp est un ADN double brin de grande taille qui contient, en plus de la séquence codante du gène et le promoteur, des séquences permettant sa réplication autonome et des gènes de résistance à des antibiotiques nécessaires à sa production par les bactéries

Bioluminescence
Photons émit par une source biologique

Charger
Dans le cadre des expériences de retard sur gel d'agarose, signifie introduire dans les puits les produits d'intérêt

Condensation
Réduction du volume occupé par l'ADN

Endothélium
Couche de cellules épithéliales qui tapisse l'intérieur des parois du cœur et des vaisseaux

ex vivo
Du latin « à l'extérieur du vivant », caractérise des tests biologiques menés sur des cellules hors de l'organisme dont elles proviennent

Furtivité
Capacité d'une nanoparticule à échapper au système immunitaire et ainsi à prolonger son temps de circulation dans le sang

Fusiogène
Ce dit d'un élément capable de fusionner facilement avec un autre

Hépatocyte
Cellule du foie

Homéostasie

Stabilisation, régulation chez les organismes vivants, de certaines caractéristiques physiologiques (pression artérielle, température, etc.)

in vivo

Du latin « à l'intérieur du vivant », caractérise des tests menés sur des organismes vivants

Lumière d'un endosome

Compartiment interne de l'endosome

Prévalence

La prévalence d'une maladie est le nombre de personnes atteintes de cette maladie à un instant donné sur une population donnée

Quiescente

Ce dit d'une cellule en non division

Tropisme

Le tropisme cellulaire pour un vecteur désigne le fait que ce vecteur interagit préférentiellement avec un certain type de cellule

Sommaire

Remerciements.....i

Liste des abréviations.....iii

Glossaire.....v

Introduction générale.....1

Chapitre 1 – Contexte scientifique : des polymères en étoile pour le transfert de gènes.....7

Chapitre 2 – Synthèse et caractérisation d'amorceurs multifonctionnels.....89

Chapitre 3 – Synthèse de nouveaux vecteurs cationiques en étoile.....121

Chapitre 4 – Formulation de polyplexes à base des bibliothèques de PEI et His-PEI, caractérisation et activité biologique.....197

Chapitre 5 – Techniques expérimentales.....255

Conclusion générale.....279

Introduction générale

Les maladies rares sont des maladies qui touchent une fraction très faible de la population. En Europe, on parle de maladie rare lorsque la prévalence de celle-ci est inférieure à 1/2000. 80% des maladies rares sont d'origine génétique, c'est-à-dire qu'elles sont causées par une anomalie dans le génome ou la séquence d'un gène. L'information génétique qui définit chaque individu est portée par l'ADN qui constitue les chromosomes du noyau de chaque cellule. Un gène est un fragment de la molécule d'ADN qui code une protéine. Les maladies génétiques peuvent potentiellement être traitées par une thérapie appelée « thérapie génique ».

Le principe de la thérapie génique est d'introduire du matériel génétique, c'est-à-dire un polynucléotide (ADN, ARNm, ARNsi, etc.), à l'intérieur des cellules pour remplacer ou corriger un gène défectueux ou moduler leur activité dans un but thérapeutique. Les premiers essais cliniques de thérapie génique ont commencé à la fin des années 1980 par Rosenberg (Chapitre 1 – Partie 1). Depuis, cette approche thérapeutique ne cesse de se développer. Selon la maladie d'intérêt et l'organe visé, plusieurs voies d'administration sont proposées. Parmi elles, l'injection systémique (injection dans la circulation sanguine) est la voie d'administration privilégiée pour atteindre des organes tels que le foie. Cibler spécifiquement le foie permet d'envisager des thérapies non seulement pour des maladies du métabolisme du foie (maladie de Crigler-Najjar, déficience en ornithine transcarbamylase) mais aussi pour des maladies qui ne sont pas hépatiques mais pour lesquelles l'expression d'un médicament peut être obtenue par le foie, lequel sera sécrété dans la circulation sanguine pour traiter des maladies telles que l'hémophilie A et B ou une carence en alpha1-antitrypsine.

Pour véhiculer le polynucléotide thérapeutique jusqu'aux cellules cibles, l'utilisation d'un vecteur est nécessaire. Parmi ceux-ci, les vecteurs viraux (virus recombinants non infectieux) se distinguent comme étant ceux qui permettent la meilleure efficacité de transfection. Cependant, ils sont aussi responsables de toxicité et de réactions immunitaires pouvant être très sévères. D'autres vecteurs, appelés vecteurs non-viraux ou synthétiques ou chimiques n'ayant pas ces inconvénients sont développés. Parmi eux, les polymères cationiques forment une classe de vecteurs non-viraux très étudiée de par la large palette de possibilités qu'offre leur synthèse. Des complexes ou nanoparticules, appelées polyplexes, composées de polymères cationiques et du polynucléotide d'intérêt peuvent être préparés par interactions électrostatiques entre les charges positives portées par le polymère et les charges négatives des groupements phosphate du polynucléotide. L'excès de polymère cationique lors de la formulation du polyplexe permet de dépasser la neutralité de charges, étape indispensable pour

atteindre la complexation du polynucléotide (Chapitre 1 – Partie 3). De nombreux polymères cationiques ont été développés à ce jour, se différenciant par leur composition (motifs de répétition), leur masse molaire, leur architecture, et de nombreuses post-modifications ont aussi été proposées pour améliorer leur efficacité de transfection en facilitant certaines des étapes de la transfection (Chapitre 1 – Partie 1). Parmi eux, la poly(éthylèneimine) (PEI) branchée ou linéaire est considérée comme la référence des polymères cationiques pour le transfert de gènes (en particulier la *b*PEI 25 K et la *l*PEI 22 K). Toutefois, la toxicité que présente la PEI reste une limite importante pour l'utilisation de ce polymère.

Malgré diverses études indiquant qu'une architecture en étoile (et au sens plus large, une architecture plus compacte) des polymères améliorerait leur efficacité de transfection et diminuerait leur toxicité en comparaison à des équivalents linéaires (Chapitre 1 – Partie 2), la synthèse de PEI en étoile et l'évaluation de leur efficacité de transfection n'a pas été décrite à ce jour à notre connaissance.

Dans le cadre de ce projet financé par la Fondation pour la Recherche Médicale, nous proposons de concevoir des polyplexes de taille inférieure à 100 nm à base de polymères cationiques et d'ADNp dans l'objectif d'une administration *in vivo* pour un ciblage hépatique. La taille des polyplexes constitue un enjeu majeur pour l'application visée car l'endothélium du foie est une barrière anatomique supplémentaire à la bonne transfection des cellules ciblées, les hépatocytes (cellules hépatiques). C'est pourquoi, avant de se consacrer à l'étape de formulation des polyplexes, la majeure partie de ce travail de thèse a consisté à synthétiser un polymère cationique à base de PEI d'architecture en étoile donc de plus faible volume hydrodynamique qu'un polymère linéaire de masse molaire équivalente.

Ce manuscrit de thèse est construit en cinq chapitres. Le premier chapitre est une étude bibliographique exposant le contexte dans lequel s'inscrit notre étude sur la synthèse de polymères en étoile pour le transfert de gènes. Le concept de thérapie génique sera discuté (bref historique, enjeu de l'utilisation de vecteurs pour le franchissement des étapes du transfert de gènes, vecteurs utilisés). Puis l'accent sera donné sur la poly(éthylèneimine), actuel polymère cationique de référence dans ce domaine. Nous nous intéresserons dans une deuxième partie aux enjeux de la synthèse de polymères en étoile et à l'apport d'une telle architecture en biologie. Dans une troisième partie, des caractéristiques physicochimiques des formulations d'ADN (polyplexes) ainsi que les enjeux majeurs liés à l'application *in vivo* seront abordés. Un glossaire du vocabulaire biologique est donné en début de thèse pour en faciliter la lecture.

Le second chapitre est consacré à la synthèse et à la caractérisation de molécules multifonctionnelles, potentiels amorceurs pour la polymérisation de 2-alkyl-oxazolines (Ox). De nos jours, les poly(2-oxazoline)s (POx) sont connues pour être des précurseurs pour la synthèse de PEI de structure définie. Au cours de ce travail, deux familles de molécules multifonctionnelles ont été synthétisées : une famille d'esters tosylate et une famille d'esters triflate de fonctionnalités comprises entre 3 et 6.

Dans le troisième chapitre est décrite la synthèse de vecteurs cationiques pour le transfert de gènes. En se basant sur la littérature, des poly(2-méthyl-2-oxazoline)s et poly(2-éthyl-2-oxazoline)s en étoile ont été synthétisées. Afin de confirmer l'obtention des architectures désirées, des analyses par chromatographie d'exclusion stérique et des études cinétiques ont été menées et seront présentées. L'étape d'hydrolyse des POx linéaires, abondamment décrite dans la littérature pour obtenir des *l*PEI, a été revisitée dans le but d'obtenir des PEI en étoile. La modification de *l*PEI par ajout de résidus histidine et l'amélioration de l'efficacité de transfection de ces His-*l*PEI ayant été décrites dans la littérature, l'application de ce type de modification aux PEI en étoile sera étudiée pour obtenir une seconde famille de polymères cationiques.

Dans le quatrième chapitre, l'apport en termes d'efficacité de transfection et de cytotoxicité d'une architecture en étoile pour des PEI a été évalué. Dans des travaux antérieurs il a été montré que la modification de 10 à 20% des unités EI de la *l*PEI par des résidus histidine améliorait les propriétés de transfection. Nous nous sommes donc proposés d'étudier la transfection et la cytotoxicité des His-PEI en étoile possédant ce taux de modification, avec des masses molaires variables, afin de mettre en évidence une potentielle synergie de modifications, chimique et architecturale. Enfin, afin d'envisager l'utilisation de ces polymères pour des tests *in vivo*, des conditions de formulation adaptées à l'obtention de polyplexes de taille inférieure à 100 nm et de concentration élevée seront étudiées.

Pour finir, le cinquième chapitre consiste en une partie expérimentale : les descriptions des techniques et du matériel utilisés ainsi que les détails des protocoles expérimentaux y sont rassemblés.

Chapitre 1

Contexte scientifique : Des polymères en étoile pour le transfert de gène

Sommaire

Introduction 11

Partie 1 – Thérapie génique 12

I. Généralités et historique de la thérapie génique 12

1. Définitions 12

2. Historique de la thérapie génique 13

a. De la découverte du principe de transformation des bactéries aux premiers essais de thérapie génique 13
b. La thérapie génique aujourd'hui 14

3. Etapes de la transfection 17

a. Complexation avec l'ADN 18
b. Transport extracellulaire 19
c. Internalisation cellulaire 20
d. Sortie de l'endosome 23
e. Trafic intracellulaire et entrée dans le noyau 25

II. Vecteurs 27

1. Vecteurs viraux 28

2. Méthodes physiques 31

3. Vecteurs non-viraux 31

a. Lipides cationiques 32
b. Polymères 35

III. La polyéthylèneimine : polymère cationique de référence 42

1. Caractéristiques physico-chimique de la PEI 42

2. Mode de transfection de la PEI, efficacité de transfection et toxicité 44

3. Voie de synthèse de PEI de structure contrôlée 47

4. Modifications de la PEI 51

Partie 2 – Les polymères en étoile pour le transfert de gène 54

I. Enjeux de la synthèse de polymères en étoile 54

1. Stratégies 55

a. Stratégies « arm-first » et « grafting-onto » 55
b. Stratégie « core-first » 56

2. Caractérisation des étoiles par chromatographie d'exclusion stérique 57

II. Influence de l'architecture sur les applications biologiques 59

III. PEI en étoile pour le transfert de gènes : état de l'art 61

1. Etat de l'art sur les PEI en étoile 61

2. Etat de l'art sur les POx en étoile 63

Partie 3 – Physicochimie des formulations de polyplexes à base d'ADN et de polymère cationique 65

I. Les polyélectrolytes 65

II. Formulation des polyplexes 67

1. Mode de formulation et diagramme de phase 67

2. *In vivo* vs. *in vitro* : concentrations et nature des solutions 69

Objectif de la thèse 72

Références 73

Introduction

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une macromolécule dont le rôle est vital : porter l'information génétique qui définit chaque individu. L'ADN est constitué de deux brins complémentaires. Chacun des brins peut être considéré comme un polymère naturel puisqu'il est composé de motifs de répétition : les désoxyribonucléotides. Ces derniers sont constitués de trois parties : un groupe phosphate, un sucre (le désoxyribose) et une base. Il existe quatre types de désoxyribonucléotides selon la base qui les compose : l'adénine (A), la thymine (T), la guanine (G) et la cytosine (C). L'enchaînement précis de ces quatre désoxyribonucléotides constitue l'information génétique. Les liaisons hydrogène entre les bases complémentaires (A-T et G-C) sont responsables de l'organisation de la molécule d'ADN double brin en hélice qui fut décrite pour la première fois en 1953 par Watson et Crick[1].

Certaines maladies dites génétiques sont causées par une ou plusieurs anomalies de l'ADN pouvant être localisées sur un ou plusieurs gènes. Le gène, défini comme unité de base d'hérédité, est un fragment de la molécule d'ADN codant une protéine. Lorsque la maladie est monogénique (causée par des anomalies sur un unique gène), il est envisageable de remplacer la copie défectueuse du gène par une copie saine et ainsi de rétablir la fonction manquante qui causait les symptômes de la maladie. Cette démarche est appelée « thérapie génique ».

Le premier chapitre de cette thèse a été écrit dans le but d'exposer le contexte du projet. Une première partie est consacrée à la thérapie génique : un bref historique sur l'évolution de cette thérapie, depuis ses fondements dans la deuxième moitié du XX^{e} siècle jusqu'à aujourd'hui, les grandes étapes du transfert de gènes à l'échelle cellulaire et moléculaire ainsi que les différents vecteurs développés pour amener le gène jusqu'aux cellules visées et les modes d'administration *in vivo*. Parmi les vecteurs disponibles, la polyéthylèneimine, actuellement le polymère cationique de référence pour le transfert de gènes, sera particulièrement décrite. Dans une deuxième partie, on s'intéressera aux enjeux de la synthèse des polymères en étoile et à leur caractérisation ainsi qu'à leur utilisation pour des applications biologiques et en particulier pour le transfert de gènes. Enfin, sera évoquée dans une dernière partie la physicochimie de la formulation de l'ADN avec ces polymères pour former des complexes ADN/polymères appelés polyplexes.

Partie 1 – Thérapie génique

I. Généralités et historique de la thérapie génique

1. Définitions

L'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) définit un médicament de thérapie génique comme « tout produit obtenu par un ensemble de procédés de fabrication visant au transfert d'un gène prophylactique (empêchant la survenue d'une maladie), diagnostique ou thérapeutique chez l'homme et son expression consécutive *in vivo*. Le transfert d'un gène implique un système d'expression contenu dans un système d'administration appelé vecteur qui peut être d'origine virale ou non virale »[2]. L'agence européenne des médicaments (AEM) donne, quant à elle, la définition ci-après : « Gene therapy medicinal product is a biological medicinal product (excluding vaccines) that:

(a) Contains an active substance which contains or consists of a recombinant nucleic acid used in or administered to human beings with a view to regulating, repairing, replacing, adding or deleting a genetic sequence and;
(b) Its therapeutic, prophylactic or diagnostic effect relates directly to the recombinant nucleic acid sequence it contains, or to the product of genetic expression of this sequence.

Gene therapy medicinal products shall not include vaccines against infectious diseases ».

Cette dernière définition est plus générale puisqu'au-delà des gènes, elle inclut toute autre séquence d'acides nucléiques comme par exemple les petits ARN interférents (siRNA pour small interfering RNA) dont le rôle dans la régulation de l'expression des gènes a été mis en évidence par Andrew Fire et Craig Mello en 1998[3]. Leur découverte sur l'interférence par l'ARN a été récompensée par le Prix Nobel 2006 de médecine et de physiologie.

2. Historique de la thérapie génique

a. De la découverte du principe de transformation des bactéries aux premiers essais de thérapie génique

Le concept de thérapie génique fut mentionné pour la première fois par Tatum[4] en 1966 après quatre décennies de découvertes considérables en bactériologie. Mais c'est la découverte du mode de transfert de matériel génétique dans les bactéries par transduction par Lederberg[5] en 1952 qui ouvrit un champ immense de potentielles applications. En effet, dans le cas de la transduction, c'est un bactériophage, virus spécifique des bactéries, qui est responsable de l'apport de nouveau matériel génétique chez une bactérie. Le bactériophage injecte son génome à la bactérie pour que celui-ci soit transcrit puis traduit. Cela conduit à la production de particules virales puis à la lyse de la bactérie et donc à la dispersion des particules virales qui pourront ensuite infecter d'autres bactéries. Mais lors de la lyse bactérienne, l'ADN est morcelé et un fragment d'ADN bactérien peut être emprisonné dans une capside virale, produisant ainsi un phage dit recombinant qui pourra transférer un gène bactérien à une autre bactérie, parfois d'espèce différente.

Dix ans après, Szybalski publia le premier transfert de gènes dans une lignée de cellules de mammifères, montrant non seulement qu'une anomalie génétique pouvait être corrigée grâce au transfert d'un gène fonctionnel, mais aussi que ce gène fonctionnel nouvellement hérité pouvait être transmis aux cellules filles[6].

En 1966, Edward Tatum définit l'ingénierie génétique comme « la modification de gènes existants chez un individu »[4]. Il mit en exergue que les récents progrès en biologie moléculaire faisaient de l'utilisation de l'ingénierie génétique comme outil thérapeutique une perspective réaliste pour le futur proche. Il suggéra la possibilité de soigner un patient en lui réimplantant ses propres cellules après les avoir génétiquement modifiées *ex vivo*.

Le premier essai clinique officiel visant à introduire un gène exogène à un être humain et ce, dans un but de marquage de gènes, fut proposé par Rosenberg[7] et approuvé en 1988. Il fut suivi en 1990 par le premier essai de thérapie génique approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA pour Food and Drug Administration). Cet essai, mené par Michael R. Blaese[8] visait à soigner 2 enfants souffrants de déficit en adénosine désaminase en modifiant *ex vivo* leurs globules blancs avec un gène codant pour l'adénosine

désaminase. Les résultats ne furent pas aussi bons qu'escomptés mais les essais cliniques se multiplièrent jusqu'à la tragique mort de Jesse Gelsinger[9] en 1999. Ce jeune homme de 18 ans faisait partie d'un essai clinique visant à soigner 19 personnes atteintes de déficit en ornithine transcarbamylase (OTC). Le protocole consistait en une perfusion d'un vecteur adénoviral contenant le gène OTC directement dans l'artère hépatique. Il mourut, quelques jours après l'injection, d'une très forte réponse immunitaire qui entraîna une défaillance de ses organes vitaux.

L'issue dramatique de cet essai n'empêcha pas le développement d'autres vecteurs de thérapie génique. Les études se concentrèrent momentanément sur des pathologies dont le traitement pouvait s'envisager par application loco-régionale (application locale).

b. La thérapie génique aujourd'hui

On peut différencier les stratégies *in vivo* et *ex vivo*. Pour la première, le transfert de gène se fait directement chez le patient, soit par injection systémique dans la circulation sanguine, soit par injection locale. Dans le cadre de la stratégie *ex vivo* au contraire, deux étapes sont nécessaires : les cellules du patient sont d'abord prélevées pour être mises en culture et génétiquement modifiées ; puis les cellules modifiées sont réimplantées chez le patient. Avec la Gendicine™, la Chine fut le 1er pays à approuver en 2003 la mise sur le marché d'un médicament de thérapie génique. Il s'agit d'un vecteur adénoviral porteur du gène de la protéine p53 humaine développé pour le traitement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

L'année suivante, ce fut au tour de l'Union Européenne de donner la première certification commerciale à un médicament à base de gène, le Cerepro®. Ce dernier est un vecteur adénoviral pour le traitement de tumeurs cérébrales malignes. En 2008, Cerepro® fut le premier vecteur adénoviral à passer l'étape de phase III de l'essai clinique. C'est finalement en 2012 que l'AEM approuve pour la première fois un médicament de thérapie génique : le Glybera, un vecteur viral (virus adéno-associé ou AAV) pour le traitement du déficit familial en lipoprotéine lipase.

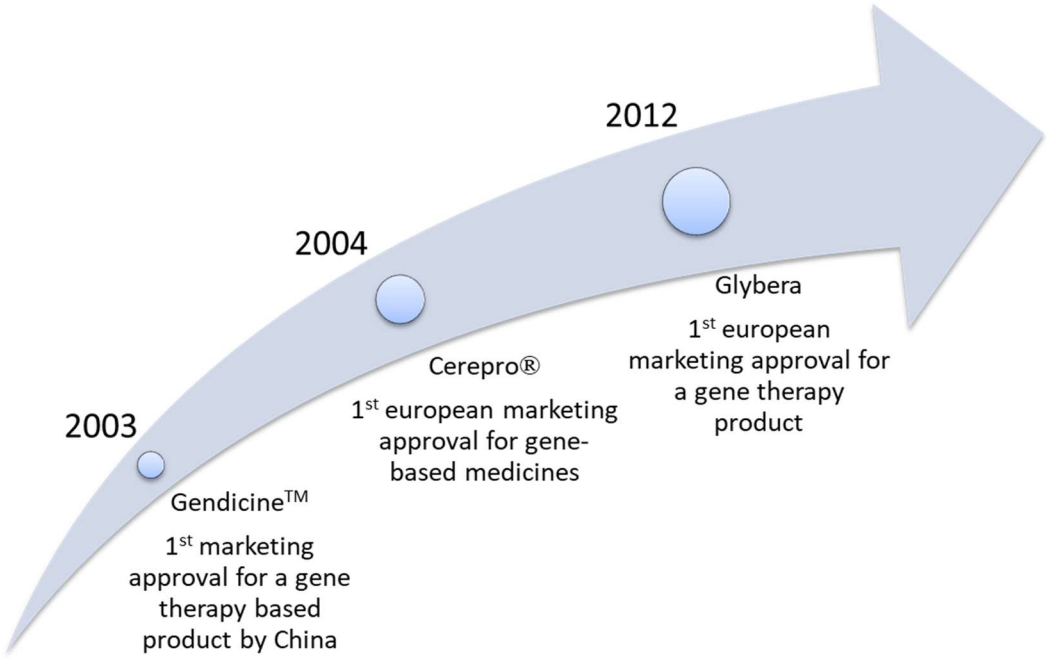


Figure 1.1. Premières grandes étapes de commercialisation de médicaments de thérapie génique[10]

En juin 2016, Strimvelis™ (GlaxoSmithKline) est la première thérapie génique *ex vivo* visant des cellules souches dont l'autorisation de mise sur le marché a été donnée par l'Union Européenne[11,12]. Strimvelis™ est indiqué dans le traitement du déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase (ADA-SCID). Les patients atteints de l'ADA-SCID ne possèdent pas l'adénosine désaminase, une enzyme du métabolisme des purines, dont le rôle est essentiel dans le développement et le fonctionnement des lymphocytes T. Les enfants atteints de l'ADA-SCID (appelés aussi bébé bulles) ont une espérance de vie faible de par leur extrême sensibilité à des infections opportunistes. Le traitement consiste à prélever des cellules souches hématopoïétiques (cellules souches responsables de la production de toutes les lignées sanguines, notamment les lymphocytes T, cellules clés du système immunitaire) des patients et à les modifier *ex vivo* avec le gène ADA en utilisant un vecteur rétroviral. La dernière étape est la réintroduction des cellules souches modifiées chez le patient. En 2017, la mise sur le marché de deux médicaments de thérapie génique, Kymriah™ (Novartis) et Yescarta™ (Gilead), appelés « CAR T-cells » (CAR pour pour Chimeric Antigen Receptor) pour traiter 2 types de cancers (voir Tableau 1.1) a été acceptée par la FDA. La thérapie génique par CAR T-cells est aussi une thérapie génique *ex vivo* dite autologue : des cellules T sont prélevées chez les patients et transformées génétiquement pour exprimer à leurs surfaces des récepteurs antigéniques anti-

CD19. L'antigène CD19 étant spécifiquement exprimé à la surface des lymphocytes B cancéreux. Les lympocytes T ainsi modifiés sont capables de reconnaître les cellules cancéreuses et de les éliminer.

Tableau 1.1. Médicaments de thérapie génique autorisés

Tradename	Date of approval	Approving agency	Indication	Vector
Gendicine™	October 2003	State Food and Drug Administration of China	Head and neck squamous cell carcinoma	Adenovirus
Glybera®	November 2012	European Marketing Authorization (EMA)	Lipoprotein lipase deficiency	AAV
Strimvelis™	June 2016	EMA	Adenosine deaminase deficiency (ADA-SCID)	Retrovirus
Kymriah™	August 2017	Food and Drug Administration (FDA)	Acute lymphoblastic leukaemia	Lentivirus
Yescarta™	October 2017	FDA	B-cell lymphoma	Retrovirus/ lentivirus
Luxturna™	December 2017	FDA	Retinal dystrophy	AAV2

En décembre 2017, le médicament génique appelé voretigene neparvovec qui est un virus adéno-associé de sérotype 2 (AAV2) contenant l'ADNc de la protéine de l'épithélium pigmentaire rétinien humain (hRPE65) a à son tour été approuvé par la FDA pour le traitement de la dystrophie rétinienne héréditaire (Tableau 1.1).

Depuis décembre 2018, un essai clinique de phase I/II est en cours pour traiter des patients atteints de la maladie de Crigler-Najjar, une maladie rare du foie, par injection par voie intraveineuse d'un AAV portant le gène UGT1A1 dans le but de rétablir la production de la bilirubine glucuronosyltransférase (GT). En décembre 2018, The Journal of Gene Therapy répertoriait 2930 essais cliniques de thérapie génique effectués, en cours, ou acceptés. La thérapie génique est utilisée pour soigner un large éventail de maladies. Les maladies

cancéreuses sont les premières pathologies visées par les traitements de thérapie génique (deux tiers des traitements), suivies par les maladies monogéniques (mucoviscidose par exemple) (11,5% des traitements) et les maladies infectieuses (SIDA par exemple) (6,3% des traitements) (Figure 1.2)[13].

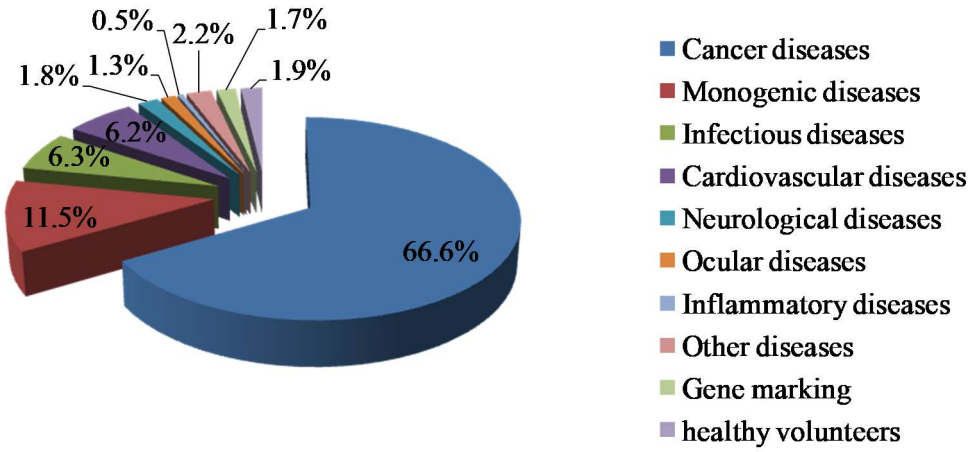


Figure 1.2. Répartition des 2930 essais cliniques de thérapie génique répertoriés en 2018 en termes de maladies traitées. Adapté de[13]

3. Etapes de la transfection

Même si en théorie le principe de la thérapie génique est simple : introduire un gène dans un organisme pour moduler les fonctions cellulaires ; en pratique, cela peut s'avérer beaucoup plus compliqué en raison de la présence d'une multitude de barrières, notamment membranaires, à franchir[14]. De par la taille importante de la macromolécule d'ADN et sa charge négative, un vecteur est nécessaire pour permettre son administration *in vivo*, son trafic extracellulaire jusqu'aux cellules d'intérêt, son entrée dans les cellules, puis le franchissement de toutes les étapes intracellulaires. Dans le cas d'un vecteur viral, le gène d'intérêt est inséré dans le génome du virus et le virus est suffisamment petit pour franchir la plupart des barrières. Cependant, quand un vecteur non viral est utilisé, le gène d'intérêt est inséré dans un plasmide ADN (ADNp) dont la taille est importante. Nous nous attacherons à détailler ci-après ces grandes étapes en considérant le cas d'un vecteur de type polymère cationique complexant un ADNp (Figure 1.3). Les différents types de vecteurs seront décrits par la suite (§ P1.II.).

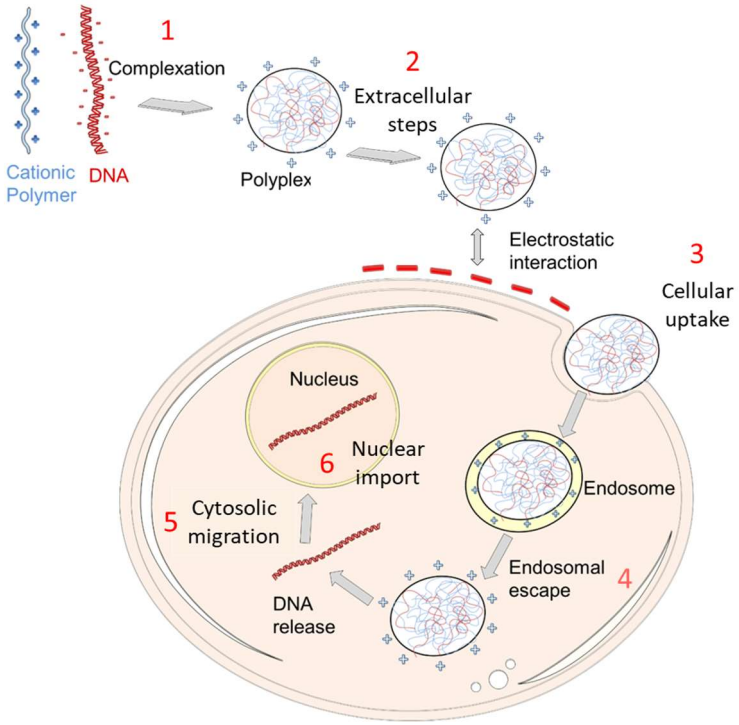


Figure 1.3. Schéma des différentes étapes du transfert de gènes : 1) la complexation du polymère cationique et de l'acide nucléique (ADN par exemple), 2) les étapes de transport extracellulaire pour atteindre les cellules cibles, 3) l'entrée dans la cellule (par endocytose), 4) la sortie de l'endosome, 5) la migration dans le cytosol et 6) l'entrée dans le noyau

a. Complexation avec l'ADN

La complexation de l'ADN avec le polymère cationique se fait par interaction électrostatique entre les charges négatives de l'ADN portées par les groupements phosphate et les charges positives du polymère, le plus souvent portées par des amines (§ P1.II.3.b). Le pK_a des amines en question a une importance considérable puisqu'il définira la proportion de charges positives du polymère à un pH donné. Cette interaction électrostatique permet la condensation de l'ADN (§ P3). Les complexes polymère/ADN ainsi formés – appelés polyplexes – ont une taille de quelques centaines de nanomètres. La condensation de l'ADN par le polymère cationique permet de protéger l'ADN de la digestion par les nucléases et permet l'interaction avec la membrane cellulaire, première étape avant l'entrée dans la cellule.

b. Transport extracellulaire

Comme cela a été évoqué dans la partie précédente, plus qu'une expérience de laboratoire sur cellules, la thérapie génique est aujourd'hui devenue une thérapie commercialisée pour le traitement de maladies chez l'homme. La question du mode d'administration à envisager et de ses contraintes se pose donc et le choix du vecteur est entre autre lié aux cellules visées et au mode d'administration choisi. Les modes d'administration envisageables pour la thérapie génique sont variables[15] : aérosol, injection intraveineuse, injection locale (intramusculaire ou intratumorale par exemple), hydrodynamique (HLV pour hydrodynamic limbe veine, technique par laquelle un volume très important est injecté dans un membre pour permettre l'entrée du vecteur dans les cellules par pression osmotique). Dans le cadre de notre travail, un mode d'administration systémique (injection dans la circulation sanguine) paraît être le plus approprié pour atteindre les hépatocytes (cellules du foie), cellules d'intérêt. Le parcours sanguin d'un vecteur (dans notre cas, un polyplexe) après injection intraveineuse est schématisé à la Figure 1.4 et est décrit par Bertrand et Leroux[14]. Après avoir été injecté, le vecteur est amené par retour veineux vers le cœur droit puis vers les poumons pour l'oxygénation du sang. Les polyplexes rencontrent ici un premier filtre puisque les capillaires pulmonaires sont parmi les plus fins de l'organisme (diamètres compris entre 2 et 13 µm[14]). Des polyplexes de taille trop importante (entre 200 et 500 nm) peuvent entraîner une thrombose et parfois même une embolie pulmonaire. La taille des objets constitue donc un facteur de toxicité primordial (il est à noter que le phénomène d'opsonisation, qui consiste en un recouvrement de l'objet par des protéines appelées opsonines, conduit à l'augmentation de la taille de l'objet et éventuellement à l'agrégation (§ P1.I.3.c)). Si cette barrière est franchie, les polyplexes sont alors distribués vers les différents organes, y compris vers le foie. Le sang y entre par l'artère hépatique puis est distribué *via* les sinusoïdes (capillaires sanguins). Les polyplexes rencontrent ici plusieurs barrières pour accéder aux hépatocytes : ils doivent échapper aux macrophages spécifiques du foie, les cellules de Kupffer ; et passer à travers les fenestrations des sinusoïdes dont le diamètre de 107 nm chez un individu sain est plus petit chez un individu malade. La formulation des nanoparticules polymère/ADN prend donc toute son importance puisque leur taille constitue un facteur de furtivité essentiel.

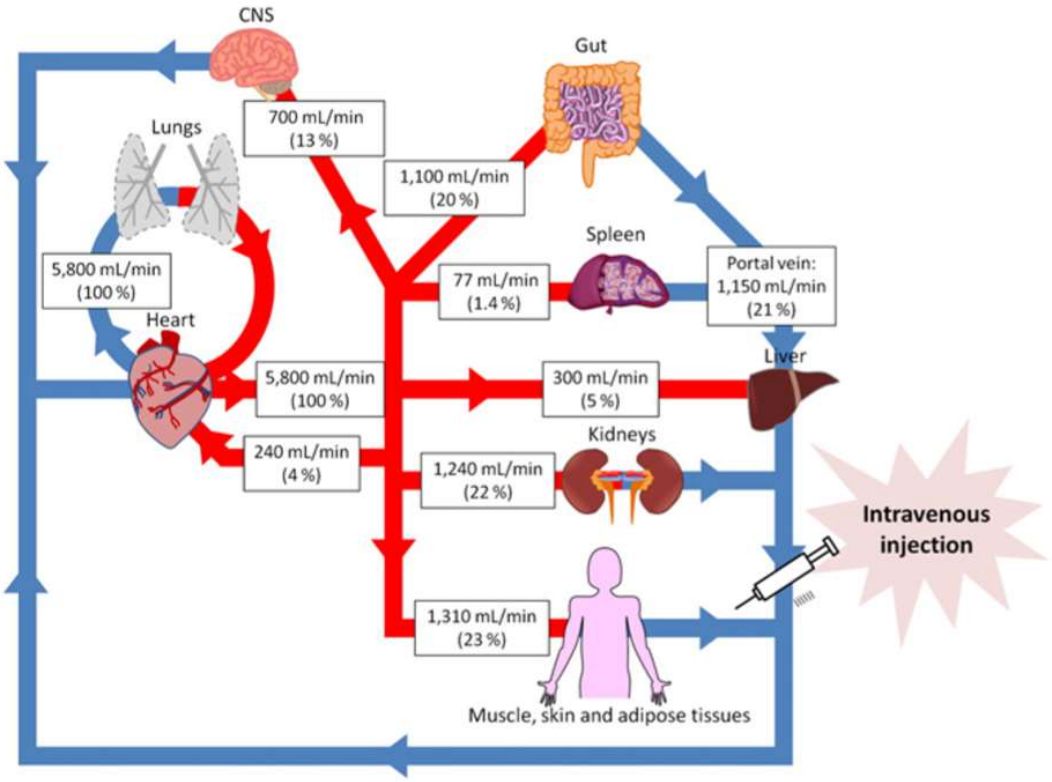


Figure 1.4. Parcours sanguin d'un polyplexe après administration par injection intraveineuse. Extrait de[14]

c. Internalisation cellulaire

Les mécanismes d'entrée dans les cellules sont variés. Les principaux sont décrits dans la Figure 1.5. La phagocytose (du grec *phagein* « manger » et *cytos* « cellule ») est le mécanisme principal pour l'internalisation de particules de taille supérieure à 500 nm et est effectuée principalement par des cellules telles que les macrophages ou les neutrophiles par exemple[16] spécialisées dans l'élimination de corps étrangers, agents pathogènes ou débris cellulaire. La phagocytose se déroule suivant trois étapes. La première étape est l'opsonisation et se déroule dans la circulation sanguine : des protéines appelées opsonines se fixent à la surface du corps étranger. Ensuite, des interactions spécifiques entre les opsonines et leurs récepteurs à la surface des macrophages ont lieu. Les pseudopodes, protubérances de la membrane cellulaire développées grâce à un squelette d'actine, entourent la particule étrangère et la dernière étape consiste en l'ingestion de la particule (Figure 1.5 II.A). Il est à noter que dans notre cas, la phagocytose n'est pas un mécanisme d'internalisation d'intérêt, bien au contraire : la furtivité des vecteurs (polyplexes dans notre cas) est une propriété essentielle pour lutter contre leur

opsonisation car leur élimination par phagocytose par les macrophages est un mécanisme qui rend l'action de transfert de gènes inefficace.

Les voies d'entrée cellulaire non phagocytaires sont rassemblées sous le terme de pinocytose (du grec *pinein* « boire » et *cytos* « cellule »), littéralement la « boisson » de la cellule. Contrairement à la phagocytose, la pinocytose peut avoir lieu dans tous types de cellules et se déroule selon quatre grands types de mécanisme : l'endocytose clathrine-dépendante (Figure 1.5 B), l'endocytose cavéole-dépendante (Figure 1.5 C), la macropinocytose (Figure 1.5 D), ou enfin les mécanismes d'endocytose clathrine- et cavéole-indépendante (endocytose Arf6-dépendante, RhoA-dépendante ou cdc-42-dépendante par exemple) (Figure 1.5 E).

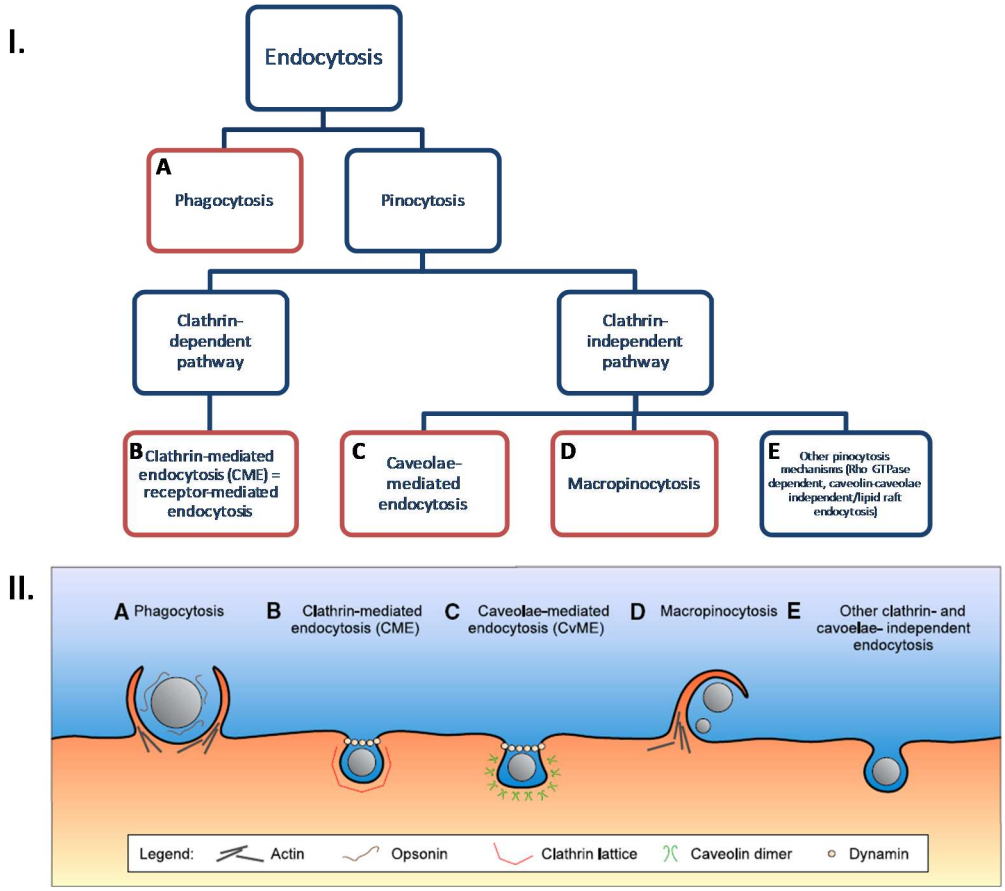


Figure 1.5. Principales voies d'internalisation cellulaire : A. Phagocytose, B. Endocytose clathrine-dépendante, C. Endocytose cavéole-dépendante, D. Macropinocytose, E. Endocytose clathrine- et cavéole-indépendante. Figure 1.5. II. extraite de [17]

L'endocytose clathrine-dépendante[16–18], peut avoir lieu de manière non spécifique dans le cas d'interactions hydrophobes ou électrostatiques mais elle peut aussi avoir lieu via des interactions spécifiques de type ligand-récepteur. Ce dernier mécanisme est le mieux connu et décrit dans la littérature et probablement le plus utilisé par les cellules pour internaliser des macromolécules et des nanomédicaments. C'est aussi une voie utilisée par certains virus pour entrer dans les cellules[17]. Après interaction du ligand avec son récepteur membranaire (Figure 1.6 A), une vésicule « mantelée » d'endocytose se forme suite à la polymérisation de la clathrine formant une cage sur la membrane de la vésicule du coté cytoplasmique (Figure 1.6 B). Une fois la vésicule mantelée fermée et internalisée (Figure 1.6 C), le manteau de clathrine se dissocie et la vésicule devient fusiogène et peut alors fusionner avec un endosome précoce dont la lumière a un pH légèrement acide (environ 6,3).

Il est admis que les polyplexes rentrent préférentiellement dans les cellules par la voie d'endocytose clathrine-dépendante qui met en jeu la formation d'un endosome précoce. La voie d'endocytose cavéole-dépendante est quant à elle la seconde voie la plus décrite pour l'entrée des polyplexes (cette voie n'implique pas la formation d'un endosome)[19,20]. Les cavéoles peuvent néanmoins rejoindre la voie des endosomes. Pour un même vecteur polymère cationique, il a été montré que la voie d'endocytose pouvait varier d'un type cellulaire à un autre[21]. Rejman *et al.*[22] ont mis en évidence que la voie d'endocytose mise en jeu dans l'entrée de particules dépendait de leur taille. L'utilisation de billes de latex fluorescentes et de taille définie a montré que la voie d'endocytose clathrine-dépendante était la plus utilisée pour les particules de diamètre inférieur à 200 nm, puis, avec l'augmentation de la taille des billes, la voie cavéole-dépendante entrait en jeu pour devenir prédominante pour des particules de diamètre supérieur à 500 nm. La quantité de particule internalisée par la voie d'endocytose clathrine-dépendante était plus importante que dans le cas de la voie cavéole-dépendante. La maturation de l'endosome précoce se fait par acidification progressive du pH luminal par les pompes à protons de type ATPAse. Le pH de l'endosome atteint progressivement 5,5. Selon le type d'interaction ligand/récepteur, des vésicules issues des endosomes précoces migrent sur les microtubules et vont fusionner avec des endosomes tardifs lesquels fusionnent avec les lysosomes dont le pH est très acide (4,7 environ) et qui contiennent des enzymes lysosomales contribuant à la dégradation du contenu des lysosomes. C'est de cette façon que la cellule trie et élimine les composants étrangers considérés comme inutiles ou dangereux pour sa viabilité.

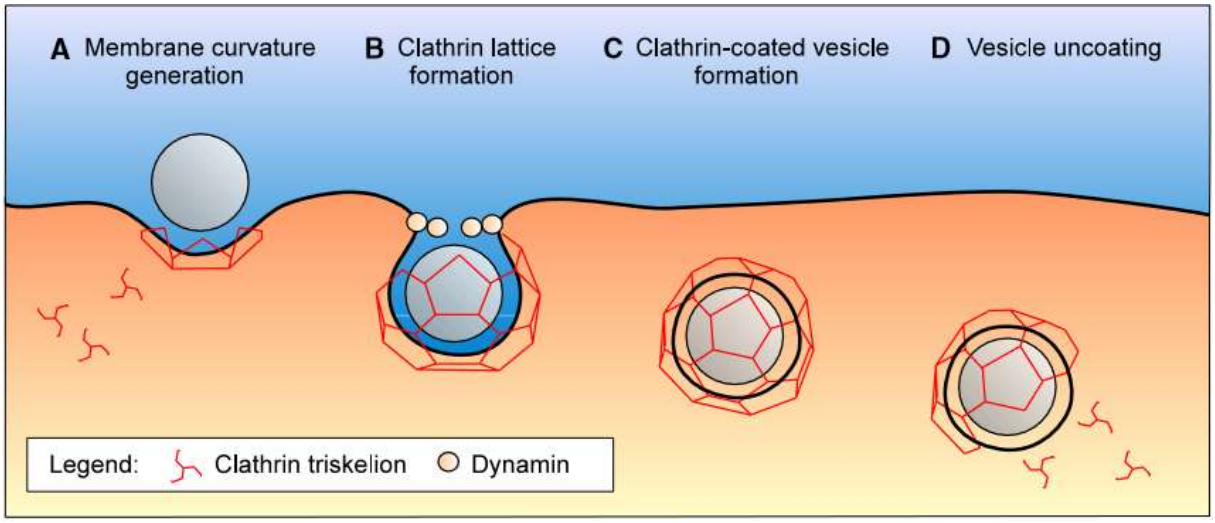


Figure 1.6. Mécanisme de l'endocytose clathrine-dépendante. Extrait de [17]

d. Sortie de l'endosome

Pour pouvoir être efficace, l'ADN thérapeutique et plus largement, le polyplexe qui le véhicule, doit échapper à ce mécanisme de tri cellulaire et pour cela, sortir de l'endosome avant sa délivrance dans les lysosomes où le polyplexe sera entièrement détruit. La sortie de l'endosome est un phénomène encore mal connu, cependant plusieurs hypothèses sont formulées dans la littérature pour expliquer la sortie des polyplexes vers le cytosol. Le plus connu est le mécanisme d'éponge à protons[23]. Comme indiqué précédemment, le pH des vésicules d'endosome s'acidifie progressivement grâce à des protéines transmembranaires appelées « ATPases » (pompes à protons) qui permettent l'entrée et l'accumulation d'ions H^+ à l'intérieur des endosomes. Ce flux entrant d'ions H^+ se fait contre leur gradient de concentration grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP (Figure 1.7). Pour équilibrer ce flux entrant de cations, deux mécanismes ont lieu parallèlement : des canaux chlorure, à proximité des pompes à protons sur les membranes, laissent entrer des anions Cl^- pour neutraliser les charges positives et des molécules d'eau traversent passivement la membrane pour maintenir l'équilibre osmotique dans l'endosome. Les vecteurs avec des polyamines[24], qu'ils soient de nature lipidique (ex : lipopolyamines) ou polymérique (ex : poly(éthylèneimine), PEI) agissent comme des « tampons » (les amines secondaires de la PEI passent de 20 à 40% de protonation[24] entre pH 7 et pH 5). Ainsi en présence de polyamines, les pompes à protons continuent à faire entrer des protons pour faire baisser le pH et autant d'ions chlorures entrent. La concentration ionique se fait très élevée à l'intérieur de l'endosome et des

molécules d'eau entrent en grande quantité. Ce gonflement entraîne alors la déstabilisation voire la rupture de la membrane permettant un passage du contenu de l'endosome dans le cytosol. Différents travaux mettent en évidence l'importance de l'excès de polymère cationique dans la sortie de l'endosome[25].

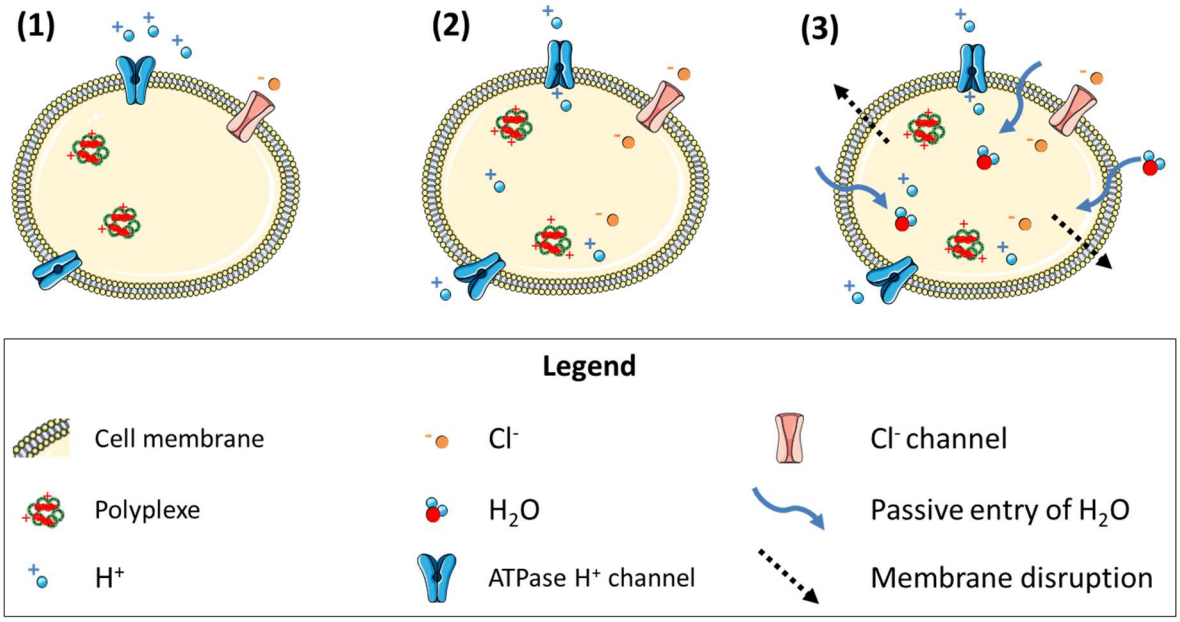


Figure 1.7. Description schématique du mécanisme de l'éponge à protons : (1) Les polyplexes sont internalisés dans l'endosome (2) Acidification progressive de l'endosome par entrée de protons grâce aux ATPases et entrée simultanée d'ions chlorures pour équilibrer les charges (3) Les protons étant tamponnés par les polymères, le flux d'ions se fait plus intense, et provoque l'entrée d'eau pour maintenir l'équilibre osmotique. L'excès de pression à l'intérieur de l'endosome provoque alors l'explosion de l'endosome et le relargage des polyplexes dans le cytosol.

Rehman et al.[23] suggèrent que les polyplexes à base de PEI branchée (*b*PEI) sont libérés par éclatement de l'endosome suite à ce mécanisme d'éponge à protons. Ils ont aussi mis en évidence que le niveau de transfection des cellules était généralement dû à l'activité d'un seul polyplexe. En effet, en utilisant des polyplexes portant les plasmides ADN (ADNp) codant à la fois pour la protéine GFP (green fluorescent protein) et la protéine RFP (red fluorescent protein), environ 24h après la transfection, la coloration jaune des cellules témoigne de l'expression simultanée des deux couleurs et donc montre que les 2 gènes ont été transcrits et traduits en protéines. Cependant, en utilisant un mélange de polyplexes portant l'ADNp codant pour la GFP et de polyplexes portant l'ADNp codant pour la RFP, la majorité des cellules étaient colorées soit en vert soit en rouge. Ceci leur a permis de mettre en évidence un procédé

plus subtil que la rupture totale de l'endosome, et qui consisterait en une déstabilisation locale de la membrane libérant un seul polyplexe[19,23,26]. Dans ce cas de figure, l'interaction du polymère cationique avec la membrane de l'endosome déstabiliserait la membrane, la rendant localement perméable et permettant la sortie de l'endosome d'un unique polyplexe.

e. Trafic intracellulaire et entrée dans le noyau

Une fois libéré, l'ADNp doit se déplacer dans le cytoplasme jusqu'au noyau de la cellule et y entrer pour être transcrit en ARNm qui pourra lui-même sortir du noyau vers le cytoplasme pour être traduit en protéine. Maury et al.[27] ont mis en évidence la présence d'ADNp libre dans le noyau et d'ADNp libre ainsi que de polyplexes dans le cytoplasme de cellules non proliférantes. L'ensemble de leur analyse a montré que la dissociation préalable du polymère et de l'ADNp était indispensable pour l'entrée dans le noyau de l'ADNp. Il est à noter qu'à ce jour la question de savoir si c'est le polyplexe ou l'ADN seul qui sort de l'endosome n'a pas été clairement élucidée.

Le cytoplasme de la cellule est traversé par un squelette de microtubules qui peut être assimilé à des « rails » sur lesquels des « véhicules » capables de transporter des nutriments se déplacent. Ces véhicules sont des moteurs moléculaires et sont constitués de dynéine et de kynésine. Parmi les stratégies développées[28] pour permettre l'interaction de l'ADNp avec la dynéine, et ainsi faciliter ce trajet intracellulaire, P. Midoux et son équipe ont démontré qu'un fragment peptidique de la protéine virale E3-14.7K était capable d'interagir avec le segment TCTEL1 de la dynéine via la protéine FIP-1 (Fourteen.7K interacting Protein 1). Ils ont plus précisément mis en évidence que la séquence des acides aminés 79 à 98 du peptide E3-14.7K, appelée P79-98, interagissait spécifiquement avec FIP-1. En conjuguant ce peptide P79-98 à un plasmide codant pour le gène eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein from yellow fish), ils ont montré que le nombre de cellules HeLa transfectées était augmenté d'un facteur 2,5 prouvant ainsi que cette étape de transport dans le cytosol était une étape clé du transfert de gène. Plus précisément, 76% des cellules HeLa exprimaient l'eGFP quand le plasmide était lié à l'ADNp par un pont disulfure (P79-98(SS)/peGFP) contre seulement 30% dans le cas du plasmide peGFP seul[29].

La dernière barrière à franchir pour permettre l'expression du gène transféré est l'enveloppe nucléaire. L'enveloppe nucléaire est une double membrane, chaque membrane étant elle-même constituée d'une bicouche lipidique, percée de pores, qui délimite le noyau dans lequel est contenu l'ADN génomique de la cellule. Dans les cellules en division, l'enveloppe nucléaire se désagrège au moment de la mitose, permettant ainsi les entrées dans le noyau, avant de se reformer autour du matériel génétique de chacune des deux cellules filles. Ce processus d'entrée des polyplexes ou du plasmide libre dans le noyau est probablement le mécanisme prépondérant pour les cellules en prolifération. Tandis que dans les cellules ne se divisant pas, les entrées dans le noyau ne peuvent se faire qu'au niveau des pores par un processus actif et régulé. Ces pores ont un diamètre intérieur de l'ordre de 30 nm et sont remplis d'un réseau de protéines appelées FGnup agissant comme un véritable filtre, et ne laissant passer que certaines molécules (nommées Nuclear Transport Factor)[30]. Le passage de l'ADNp ou de polyplexes à travers ces pores nucléaires n'a pas été démontré de façon indubitable, et l'importation de matériel génétique dans le noyau reste un véritable enjeu. Toutefois, Breuzard *et al.* ont montré que modifier un plasmide avec une séquence 3NF contenant des motifs NFκB permettait d'augmenter d'un facteur 6 le nombre de copies du plasmide présentes dans le noyau des cellules par rapport à un plasmide ne possédant pas cette séquence. En présence d'un inhibiteur de NFκB, le nombre de copies du plasmide portant la séquence 3NF chute de manière vertigineuse pour être du même ordre de grandeur que celui du plasmide sans séquence 3NF. Ceci prouve que c'est bien cette séquence 3NF, reconnue par la protéine NFκB impliquée dans l'import nucléaire, qui permet d'augmenter si drastiquement le nombre de copies du plasmide présentes dans le noyau et, par là même, l'efficacité de transfection[31].

II. Vecteurs

Comme dit précédemment, pour franchir toutes les barrières exposées ci-dessus, un transporteur est nécessaire pour véhiculer le matériel génétique d'intérêt dans les cellules souhaitées et permettre son expression. Dans le cadre de ce travail, ce transporteur sera appelé vecteur. Le vecteur peut être de nature virale ou non-virale et doit remplir un maximum des critères cités ci-après[32] :

- condenser l'ADN pour que l'objet final ADN+vecteur soit le plus petit possible et masquer la charge négative de l'ADN ;
- permettre le transport d'ADN de toute taille ;
- protéger l'ADN des enzymes de dégradation dans le milieu extracellulaire ;
- permettre un ciblage de façon à transfecter uniquement les cellules d'intérêt ;
- être peu coûteux et facile à préparer ;
- être le plus faiblement toxique possible ;
- être administrable *in vivo*, c'est-à-dire franchir les barrières inhérentes aux modes d'administration (inhalation ou injection intraveineuse par exemple).

Les vecteurs utilisés dans tous les essais cliniques à travers le monde ont été répertoriés en décembre 2018 par The Journal of Gene Therapy et leur répartition est présentée à la Figure 1.8. La très large majorité des vecteurs sont des virus mais il est aussi à noter que dans 15% des cas, l'ADNp est administré libre, à l'aide de méthodes physiques qui seront abordées ultérieurement. Les vecteurs synthétiques ou chimiques identifiés sont essentiellement des lipides cationiques utilisés sous forme de liposomes pour former des lipoplexes avec l'ADNp (lipofection) et des polymères cationiques pour former des polyplexes avec l'ADNp (polyfection). Nous proposons, dans la suite de ce travail, d'exposer l'ensemble des vecteurs utilisés en focalisant notre discussion sur les vecteurs synthétiques qui ont montré des potentiels intéressants.

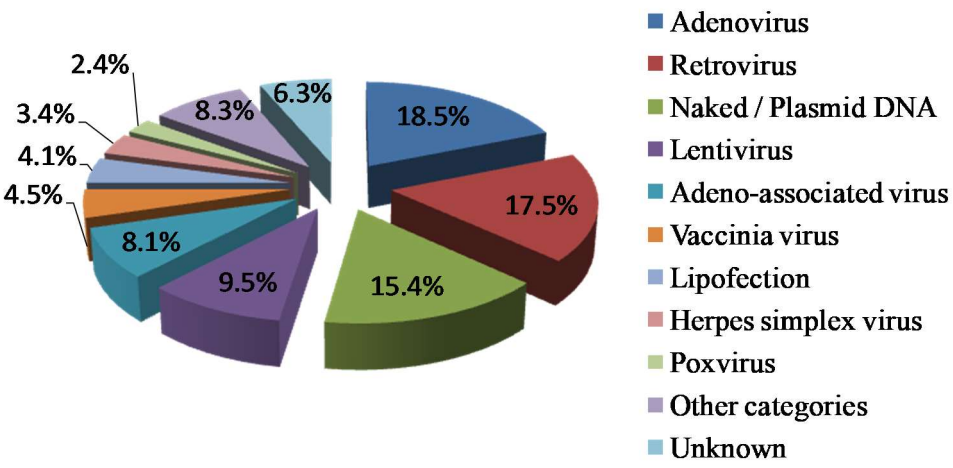


Figure 1.8. Différents vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique à travers le monde. Données mises à jour en décembre 2018. D'après[33]

1. Vecteurs viraux

Par définition, l'infection d'une cellule hôte (entrée dans la cellule hôte et utilisation de sa machinerie cellulaire) est nécessaire à la prolifération et à la réplication d'un virus. Le virus est une entité qui a acquis au cours de l'évolution des moyens sophistiqués pour entrer dans les cellules et qui, une fois modifié pour porter un gène d'intérêt plutôt que son ADN viral, devient un outil biomédical très puissant. Aujourd'hui, la majorité des vecteurs testés en phase clinique (ou sur le marché) sont des vecteurs viraux. De nombreux virus recombinants peuvent être utilisés. Selon le cas étudié, le vecteur le plus adapté sera choisi en fonction des besoins : expression du gène thérapeutique à long ou court terme ou taille de l'ADNc d'intérêt par exemple.

Les caractéristiques des principaux virus recombinants utilisés comme vecteurs en thérapie génique sont présentés dans le Tableau 1.2. Les rétrovirus intègrent l'ADN qu'ils véhiculent aux chromosomes de la cellule hôte mais uniquement dans les cellules en division à l'exception des lentivirus (autres retrovirus) qui intègrent leur génome dans les cellules quiescentes. Cela assure une expression à long terme du gène thérapeutique mais présente un risque majeur, notamment du fait d'une intégration au hasard. Le traitement par thérapie génique du déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase (ADA-SCID), réalisé avec des retrovirus, avait mené au développement de leucémie à lymphocytes T

chez certains patients[34,35]. Au contraire, certains virus comme l'adénovirus ou le virus herpès simplex[36] n'intègrent pas leur génome à celui de l'hôte. Leur génome est présent sous forme d'épisome dans le noyau de la cellule hôte, c'est à dire sous forme d'une molécule d'ADN circulaire extra-chromosomique qui peut s'auto-répliquer, à la manière d'un plasmide.

Les virus adéno-associés (AAV) sont les premiers virus à avoir été autorisés pour des applications cliniques (Glybera®)[37]. C'est un petit virus porteur d'un ADN simple brin d'environ 5 kb dont il existe neuf sérotypes différents (AAV-1 à AAV-9) ayant des tropismes cellulaires différents[38] (Figure 1.9). L'AAV possède une capside icosahédrique d'environ 25 nm de diamètre extrêmement stable qui assure la protection de son génôme[39]. Le virus de la vaccine, et au sens plus large la famille des poxvirus, est un virus qui a la particularité de se répliquer dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il a, pour cela, besoin de gènes codant pour de nombreuses enzymes et porte donc un génome d'environ 30 kbp. Les applications des poxvirus sont essentiellement tournées vers la vaccination.

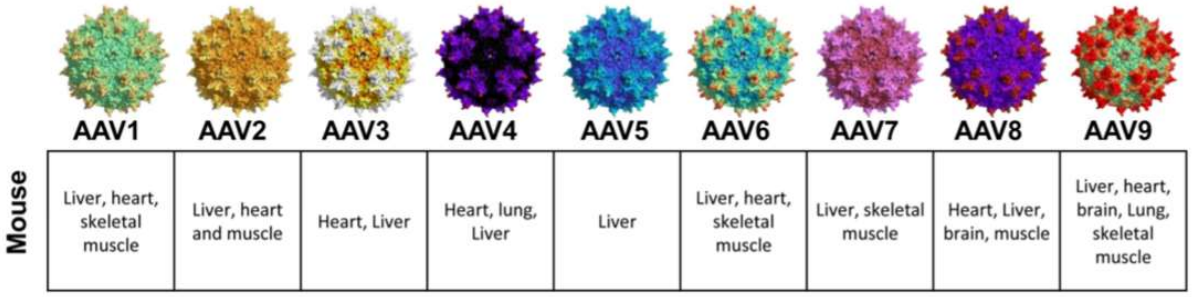


Figure 1.9. Biodistribution des AAV de sérotypes 1 à 9 chez la souris. Extrait de[38]

De manière générale, si les virus sont aujourd'hui encore les vecteurs les plus utilisés pour la thérapie génique, cela est dû à leur grande efficacité de transfection *in vivo*. Ils ont cependant des inconvénients non négligeables[40] :

- réponse immunitaire aiguë qui peut être fatale et empêche l'administration à répétition ;
- taille limitée de l'ADN thérapeutique ;
- coût élevé (1 M$ par traitement avec le Glybera®[41]).

Tableau 1.2. Caractéristiques des principaux virus utilisés comme vecteurs en thérapie génique[42,43]

Virus type	Adenovirus	Adeno-associated virus	Herpes simplex virus	Retrovirus	Lentivirus	Vaccinia virus (poxvirus)
Packaging capacity (kb)	7.5	4.7[44]	100 - 225[36] 30 - 152[43]	7.0[29]	8.0	25[45] (viral genome 200 kb)
Short- or long-term expression	Short	Long	Long	Long		
Chromosomal integration	No	Yes or No[44]	No	Randomly	Randomly	No
Advantages	Broad host range	Quite broad host range	Low toxicity		Can infect both dividing and non-dividing cells	Infects most cell lines of mammalian origin[45]
Drawbacks	Strong immune response	Immune response when repeated administration		1) Insertional mutagenesis 2) infection of dividing cells only		High immunogenicity
Solutions	Creation of 2nd and 3rd generation vectors with deletions	Use a different serotype for each new administration				

2. Méthodes physiques

Face aux inconvénients des vecteurs viraux, différentes techniques physiques ont été développées pour permettre la pénétration d'un acide nucléique dans une cellule sans l'utilisation d'un vecteur[46]. Nous nous contenterons de citer les méthodes les plus utilisées à ce jour.

L'électroporation consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires. Les membranes sont alors momentanément déstabilisées et les pores créés permettent l'entrée de l'acide nucléique environnant dans la cellule.

La sonoporation permet aussi de rendre les membranes plus perméables mais cette fois grâce aux ultrasons et à des microbulles de gaz[47].

Le bombardement de gènes aussi appelé biolistique est une méthode dans laquelle les cellules sont « bombardées » avec des particules métalliques (d'or ou de tungstène) sur lesquelles de l'ADN est absorbé. Cette méthode est essentiellement utilisée sur des cellules végétales pour obtenir des végétaux génétiquement modifiés et aussi pour la vaccination[48].

En raison du manque d'efficacité de ces méthodes et de leur difficulté de mise en œuvre *in vivo*, une dernière catégorie de vecteurs non-viraux, les vecteurs synthétiques ou chimiques, a été développée et sera exposée dans la partie suivante.

3. Vecteurs non-viraux

Les vecteurs non-viraux aussi appelés vecteurs synthétiques ont commencé à être développés à partir de la fin des années 1980[49] pour tenter d'apporter des solutions aux inconvénients des vecteurs viraux, exposés précédemment. Ces vecteurs synthétiques sont cationiques et permettent notamment de complexer toute molécule d'ADN, quelle que soit sa taille, et sont aussi supposés ne pas provoquer de réponse immunitaire, permettant ainsi un nombre de ré-administration illimité. Comme évoqué plus tôt, le rôle premier du vecteur est de complexer et de condenser l'ADN. Ce sont généralement des molécules de charge positive qui présentent l'intérêt d'interagir facilement avec les acides nucléiques chargés négativement.

Toutefois, des triblocs amphiphiles neutres (par exemple les pluronics) sont aussi utilisés pour le transfert de gènes dans le muscle[50]. Des études plus spécifiques sur la transfection par injection intramusculaire de mélange ADNp/copolymères amphiphiles ont généré quelques travaux dans le cas du traitement des dystrophies de Duchenne, mais ne seront pas développés ici. Les deux principales familles de vecteurs synthétiques cationiques seront décrites dans ce travail : les lipides cationiques et les polymères cationiques.

a. Lipides cationiques

Les lipides cationiques sont composés de 3 éléments : une tête polaire cationique, une partie hydrophobe (une ou plusieurs chaînes aliphatiques ou un dérivé du cholestérol) et un bras (souvent appelé *spacer* ou *linker*) pour relier les deux parties précédentes. Ces lipides amphiphiles s'auto-assemblent en micelle, liposome ou bicouche lipidique, en fonction de leur concentration et de leur nature, et un mélange pertinent de ces auto-assemblages avec l'ADNp permet l'encapsulation de ce dernier par interactions électrostatiques entre les charges négatives de l'ADN et les charges positives des têtes des lipides. Le complexe formé est appelé lipoplexe et présente une organisation lamellaire (structure en oignon) ou hexagonale compacte selon la structure initiale des lipides (Figure 1.10).

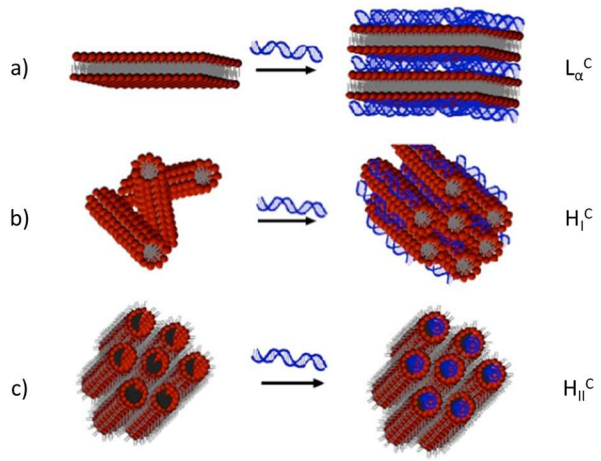


Figure 1.10. Structures possibles des lipoplexes en fonction de l'organisation initiale des lipides : a) les lipides organisés en phase lamellaire (L_α) forment un lipoplexe d'organisation multi-lamellaire dans lequel l'ADN s'intercale entre les bicouches lipidiques (L_α^C) ; b) les lipides organisés en bâtonnets (H_I) forment des lipoplexes hexagonaux (H_I^C) ; c) de la même façon, les lipides organisés en bâtonnets avec les têtes cationiques à l'intérieur, forment aussi des lipoplexes hexagonaux (H_{II}^C). Extrait de[51]

Le chlorure de N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium (DOTMA) (Figure 1.11 a)) est le premier lipide cationique synthétique à avoir été utilisé pour le transfert de gènes. Felgner et son équipe[52] publièrent en 1987 une première étude montrant des résultats positifs de transfection de cellules eucaryotes avec un mélange auto-assemblé d'ADNp et de DOTMA[53]. D'autres lipides monocationiques ont ensuite été synthétisés, tel que le méthylsulfate de N-[1-(2,3-dioléoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTAP). Les lipides cationiques sont généralement associés avec un co-lipide neutre tel que la dioléyl-phosphatidyléthanolamine (DOPE) (Figure 1.11 e)) pour diminuer leur toxicité. On peut citer les exemples de Lipofectin (DOTMA/DOPE) et Lipofectamine (DOSPA/DOPE)[54].

En parallèle de ces lipides monocationiques, des lipopolyamines (lipides cationiques dont la tête est constituée de plusieurs amines chargées positivement) furent développées. On peut notamment citer la dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS) (Figure 1.11 b)). J-P. Behr publia la synthèse de la DOGS en 1986[49] et démontra que seulement 3 des quatre fonctions amine du DOGS étaient protonées à pH physiologique (pH ≈ 7,4) (le pK_a de la 4^e fonction amine est de 5,5)[53].

Différents dérivés cationiques du cholestérol ont aussi été synthétisés comme par exemple le chlorhydrate de 3ß-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol (DC-Chol), le bis(guanidinium)-spermidine-cholestérol (BGSC) ou le bis(guanidinium)-tren-cholestérol (BGTC). La structure du BGTC est donnée dans la Figure 1.11 c) pour exemple. Il a été prouvé dès 1996 par J-M. Lehn que le BGTC permettait le transfert d'un gène rapporteur dans des cellules épithéliales *in vitro* et même le transfert *in vivo* chez la souris quand il est associé au dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE)[55].

Les lipoplexes entrent dans la cellule par des mécanismes d'endocytose (notamment par macropinocytose et endocytose clathrine- ou cavéole-dépendante[16]). Les lipoplexes sortent de l'endosome par un mécanisme de fusion[19] durant lequel les lipides du lipoplexe s'intercalent entre ceux de la membrane permettant ainsi l'entrée dans la cellule de l'ADNp contenu dans le lipoplexe (Figure 1.12).

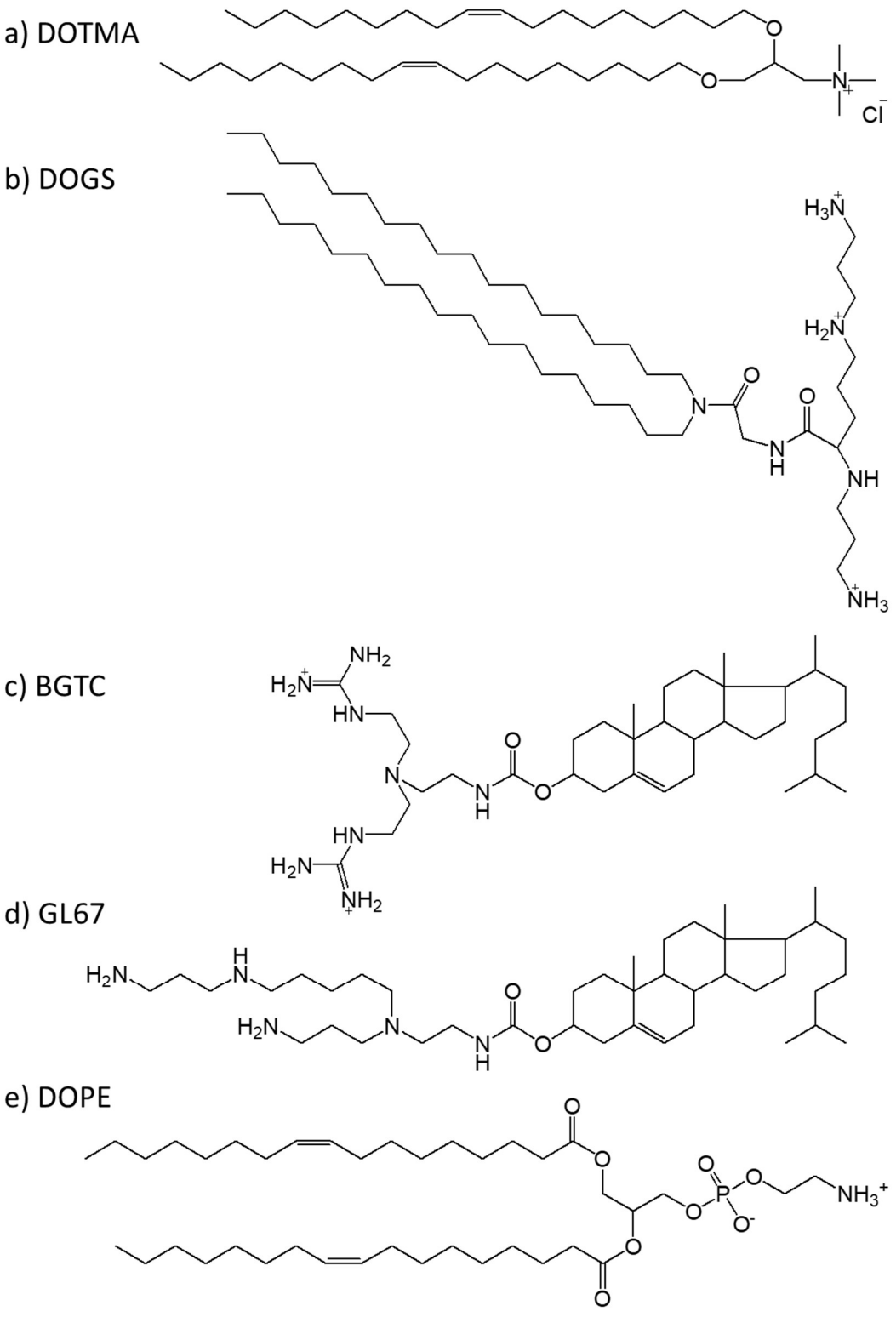


Figure 1.11. Structures de lipides : a) un lipide monocationique, le chlorure de N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium (DOTMA)[52] ; b) une lipopolyamine, la dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS)[49] ; c) un dérivé du cholestérol, le bis(guanidinium)-tren-cholestérol (BGTC)[55] ; d) le GL67, N4-spermine cholesterylcarbamate[56–58] ; e) la DiOleoylPhosphatidylEthanolamine (DOPE)[55]

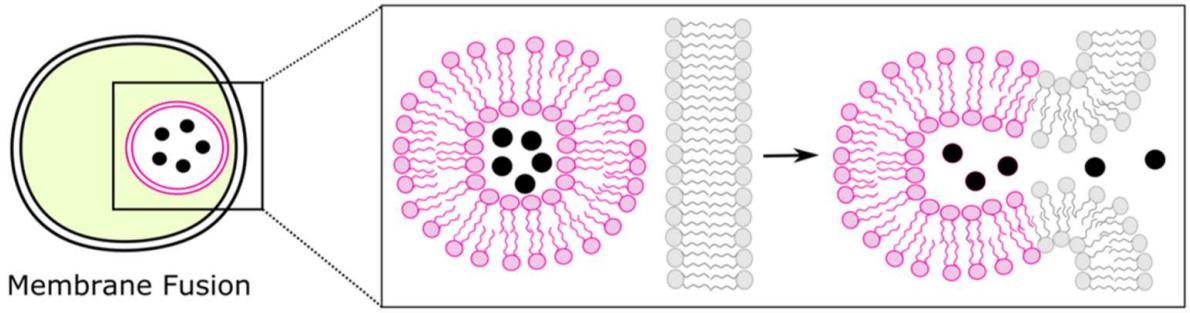


Figure 1.12. Mécanisme de fusion des membranes proposé pour la sortie de l'endosome des vecteurs à base de liposome. Extrait de[19]

Depuis 20 ans, les vecteurs lipidiques n'ont cessé d'être modifiés et améliorés. Le GL67A, de son nom complet N4-spermine cholesterylcarbamate (Figure 1.11 d)) est un lipide polycationique dérivé du cholestérol[58]. Un essai clinique de phase II a montré que le traitement de 78 patients atteints de mucoviscidose par nébulisation du lipoplexe pGM169/GL67 n'était pas dangereux. C'est un premier pas très encourageant qui permet d'envisager l'amélioration du protocole pour espérer améliorer les effets bénéfiques, assez modestes dans ce premier essai[56,57].

b. Polymères

Tout comme les lipides cationiques, les vecteurs à base de polymères cationiques, étudiés depuis quelques années, présentent des avantages par rapport aux vecteur viraux tels que la possibilité de faire varier leur structure, de véhiculer des ADNp de grande taille, et d'être produits à moindre coût. Ils sont donc, malgré une efficacité de transfection bien plus faible que les vecteurs viraux, une alternative intéressante à ces derniers. La liste donnée Figure 1.13 ne se veut pas exhaustive mais a été conçue pour donner une vision globale de la large palette de polymères développés et modifiés pour le transfert de gènes[59].

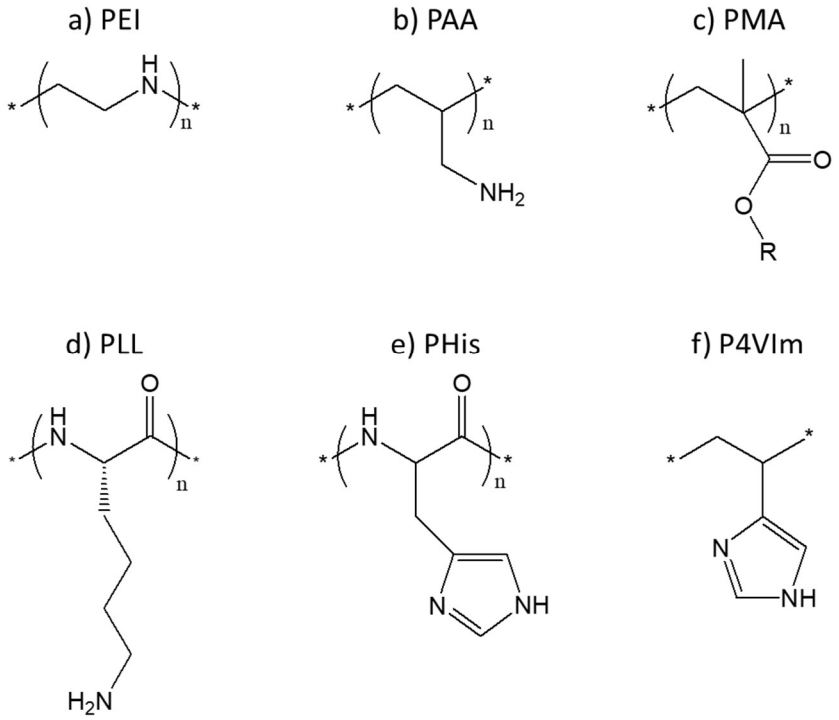


Figure 1.13. Structures des principaux vecteurs polymère décrits : a) polyéthylèneimine (PEI)[60–62], b) polyallylamine (PAA)[63–65], c) polyméthacrylate possédant une chaîne pendante aminée[66], par exemple poly(aminoéthylmethacrylate) (PAEMA) avec R=-$(CH_2)_2$-NH_2 ou poly(2-(2-aminoéthylamino)éthylmethacrylate) (PAEAEMA) avec R=-$(CH_2)_2$-NH-$(CH_2)_2$-NH_2, d) poly(L-Lysine) (PLL)[67,68], e) poly(histidine) (PHis) et f) poly(4-vinylimidazol) (P4VIm)[69,70]

i. Poly(L-lysine)

La poly(L-Lysine) (PLL ou pLK) est un homopolypeptide de lysine (Figure 1.13 d)) qui est historiquement le premier polymère à avoir été testé pour le transfert de gènes. Dès 1987, deux américains, Catherine et Georges Wu, démontrèrent que la PLL était capable de délivrer le gène de la chloramphénicol acétyltransférase spécifiquement aux hépatocytes (cellules HepG2)[67,68]. Cependant, sa structure ne lui confère pas de propriétés tampon nécessaires pour la sortie de l'endosome et limite donc son efficacité de transfection.

ii. Poly(éthylèneimine)

La polyéthylèneimine (PEI) est une polyamine composée de motifs de répétition éthylènamine (CH_2-CH_2-NH_2). C'est depuis sa première utilisation et aujourd'hui encore, la référence des polymères cationiques pour le transfert de gènes. En particulier, la polyéthylèneimine branchée de 25 kg.mol^{-1} (*b*PEI 25K) est très fréquemment utilisée comme contrôle positif dans les études sur les nouveaux vecteurs synthétiques[60–62] tout comme la PEI linéaire de 22 kg.mol^{-1} (*l*PEI 22K)[65,71–73] dont Brissault *et al.* ont montré qu'elle transfectait plus efficacement les cellules HepG2 que la *b*PEI 25K[74]. Le travail de cette thèse étant centré sur ce polymère, une partie entière lui est consacrée (cf. § P1.III).

iii. Polysaccharides

En raison de leur biocompatibilité et de leur capacité à franchir les membranes, certains polysaccharides ont été utilisés comme structure de base pour former des vecteurs non-viraux pour le transfert de gènes. Des modifications chimiques visant à améliorer leurs propriétés ont été décrites dans la littérature. Le chitosane et la cyclodextrine seront évoquées dans ce paragraphe en guise d'exemple.

Le chitosane est un polysaccharide partiellement désacétylé et provenant essentiellement de la carapace de crustacés. Il est constitué d'unités D-glucosamine (> 80%) et *N*-acetyl glucosamine reliées entre elles par des liaisons β(1→4). Cao *et al.* ont publié une revue sur les avancées récentes concernant les vecteurs non viraux à base de chitosane[75]. De par son origine biosourcée, le chitosane présente des avantages non négligeables face à la PEI, tels que sa très faible toxicité, sa biocompatibilité et sa faible immunogénicité. Cependant, son pK_a proche de 6,5 en fait un polymère assez faiblement chargé à pH physiologique (pH proche de 7,4). Sa modification ou son couplage avec un polymère plus fortement protoné ont été étudiés pour optimiser l'efficacité de transfection[75]. Par exemple, Meng *et al.*[76] ont modifié du chitosan avec de la spermine (tétraamine) et de l'acide stéarique (acide gras 18:0). Le chitosan ainsi modifié transfecte (à un ratio N/P = 10) avec la même efficacité que la *b*PEI 25K et ce, sur deux lignées cellulaires différentes (EC-1 et BEL-7402) tout en présentant une toxicité moindre.

La cyclodextrine est aussi un polysaccharide et plus précisément un oligosaccharide cyclique nommé α-, β- ou γ-cyclodextrine (CD) selon qu'elle est composée de 6, 7 ou 8 unités D-Glucose reliées entre elles par des liaisons α(1→4). Les CD ont la particularité de pouvoir accueillir une molécule invitée dans leur cavité pour former des complexes d'inclusion. Depuis la première publication de polymère cationique conjugué avec une CD[77], de nombreux exemples de copolymères à base de CD ont été proposés[78,79]. Parmi eux, Redondo *et al.* ont synthétisé deux séries de copolymères constitués d'un monomère cationique, le méthacrylamide de *N*-éthyl pyrrolidine (EPA) et d'un monomère dérivé du styrène et porteur d'un substituant CD dans lequel les alcools primaires et secondaires étaient méthylés (MeCDSt) ou non (HCDSt). L'ajout de CD perméthylées diminue la cytotoxicité et augmente l'efficacité de transfection en comparaison au PEPA tandis que l'ajout de CD hydroxylées provoque l'effet inverse : une toxicité accrue qui va de pair avec une efficacité de transfection plus faible[61].

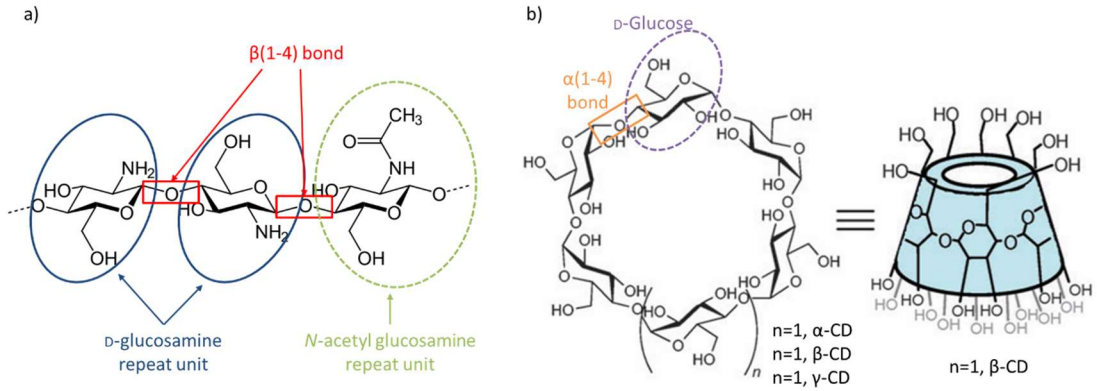


Figure 1.14. Structures de polysaccharides utilisés en transfert de gène : a) le chitosane ; b) la β-cyclodextrine. Schéma b) d'après[78]

iv. Polyvinylimidazole et polyhistidine

L'imidazole est un cycle insaturé à 5 atomes comprenant deux atomes d'azote. Il est biocompatible et est présent dans la chaîne latérale de l'acide aminé histidine. Le pK_a de la fonction imidazole se situe entre 6 et 6,5, ce qui correspond à l'intervalle de pH de l'endosome en cours d'acidification. A pH inférieur à son pK_a, l'imidazole possède une charge positive qui est délocalisée entre les deux atomes d'azote. Cette propriété tampon lui confère un intérêt de taille pour la sortie de l'endosome en favorisant l'effet d'éponge à protons. La poly(histidine) (PHis) et le poly(4-vinylimidazol) (P4VIm) (Figure 1.13 e) et f)) ont été décrits dès les années

2000 comme des polymères d'intérêt pour le transfert de gènes[69]. En 2003, Ihm *et al.* ont synthétisé le 4-vinylimidazole (P4V) et l'ont polymérisé par polymérisation radicalaire en présence d'AIBN. Après traitement du polymère par de l'acide acétique, les polyplexes sont formulés. De manière logique, ils montrent que plus le ratio massique polymère/ADN est grand, plus le potentiel zeta du polyplexe est élevé et plus les polyplexes sont petits. Cette première étude a montré qu'une formulation P4V/ADN à un ratio massique 6/1 permettait d'obtenir des particules d'environ 110 nm de diamètre présentant une transfection supérieure à celle de la PEI dans les cellules HeLa et une toxicité moindre. Les bons résultats en termes de transfection ont été attribués à la meilleure disponibilité du polyplexe dans le cytoplasme grâce au phénomène d'éponge à protons qui facilite la sortie de l'endosome et permet une plus grande disponibilité du polyplexe dans le cytoplasme[70].

v. Polyallylamine

La polyallylamine (PAA) est un polyélectrolyte qui présente une forte densité de charges puisque chaque unité de répétition porte une amine primaire pendante qui peut potentiellement être protonée en fonction du pH (Figure 1.13 b)). Cette forte densité de charges fait de la PAA un candidat idéal pour complexer l'ADN, cependant, elle est aussi responsable d'une toxicité importante. Diverses modifications de la PAA ont été proposées pour améliorer la viabilité cellulaire lors de son utilisation[63–65]. Oskuee *et al*. ont par exemple proposé de greffer des résidus acrylates hydrophobes (butyle, hexyle ou decyle acrylate) sur les amines pendantes d'une fraction des motifs de répétition. Cela eut pour effet de diminuer la toxicité (puisqu'elle est intrinsèquement liée à la présence de charges positives) mais aussi d'augmenter la taille des complexes $PAA_{modifié}$/ADN. La taille des complexes augmente avec le pourcentage de greffage et avec la longueur des résidus hydrophobes greffés. Les auteurs ont attribué ce phénomène à la diminution de la charge positive en surface du polymère et à la diminution de sa capacité de condensation de l'ADN[64]. Une autre approche proposée par Wytrwal *et al.* est de méthyler une partie des amines et/ou de substituer une partie des amines par du chlorure de glycidyltrimethylamonium. Les amines quaternaires ainsi introduites permettent de diminuer la taille des complexes et d'améliorer leur pouvoir tampon (nécessaire pour la sortie de l'endosome)[65].

vi. Polyvinylamine

Dréan *et al.* ont préparé des copolymères à base de poly(N-methylvinylamine) en synthétisant des précurseurs poly((N-vinyl acétamine)-*co*-(vinyl acétamide)) notés P(MNVA-*co*-NVA) (Figure 1.15 a)) qui, après l'hydrolyse partielle des fonctions amide donne des copolymères à quatre motifs de répétition différents qui sont nommés poly((N-vinyl amine)-*co*-(vinyl amide)) et notés P(MVAm-*co*-NVAm) (Figure 1.15 b)) pour faciliter la compréhension. Dans le but d'induire l'effet d'éponge à protons et d'améliorer l'étape de sortie de l'endosome, des résidus imidazole (Im) ont été ajoutés pour former deux copolymères : le P(MVAm-*co*-VIm) (Figure 1.15 c)) et le P(MVAm-*co*-VAm-*co*-VIm) (Figure 1.15 d))[80].

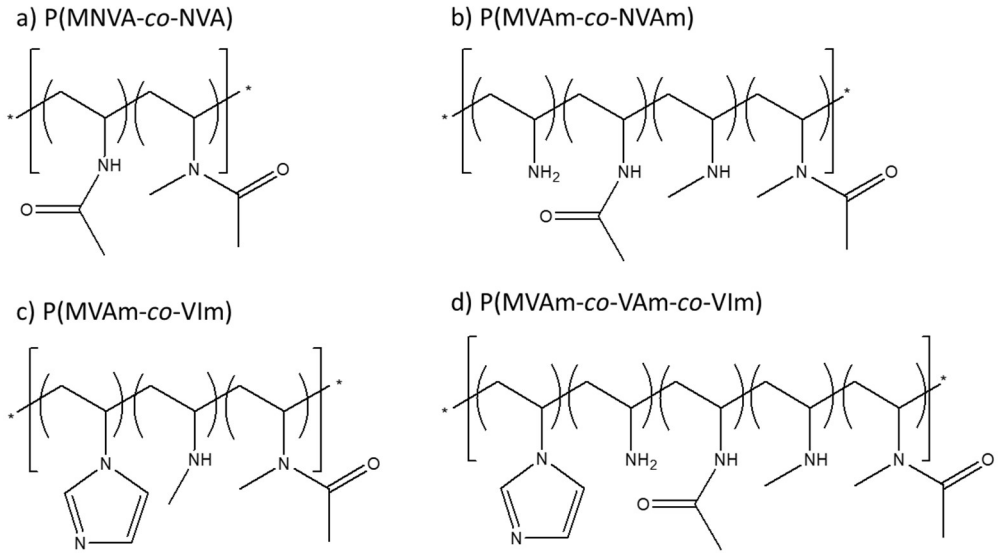


Figure 1.15. Structures des copolymères statistiques à base de poly(N-methylvinylamine) synthétisés par Dréan *et al.*[72,80]

Le potentiel en transfert de gènes d'un grand nombre de ces copolymères, avec des pourcentages d'hydrolyse variés et des proportions d'unités Im différentes a été étudié[72]. La grande majorité des polymères testés a donné d'excellents résultats en terme de cytotoxicité puisque toutes les cellules HeLa transfectées avec ces copolymères à des ratios massiques polymère/ADN (WR) variant de 1/1 à 8/1 présentent une très bonne viabilité, meilleure que les cellules transfectées avec de la *l*PEI aux WR 2/1 et 3/1. Le copolymère P(MVAm-co-VIm) hydrolysé à 80% et porteur de 20% de résidus imidazole est l'un des meilleurs candidats et présente un très bon niveau de transfection des cellules HeLa aux WR 6/1 et 8/1.

vii. Dérivés de polyacrylate et polyméthacrylate

Les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée permettent de synthétiser des polymères de structure contrôlée et aux propriétés variées. Chu *et al.* ont répertorié un grand nombre de monomères polymérisables par ces techniques et porteurs d'amines protonables, notamment le méthacrylate de 2-(2-aminoéthylamino)éthyle et le méthacrylate de 3-(2-aminoéthylamino)2-hydroxylpropyle[66].

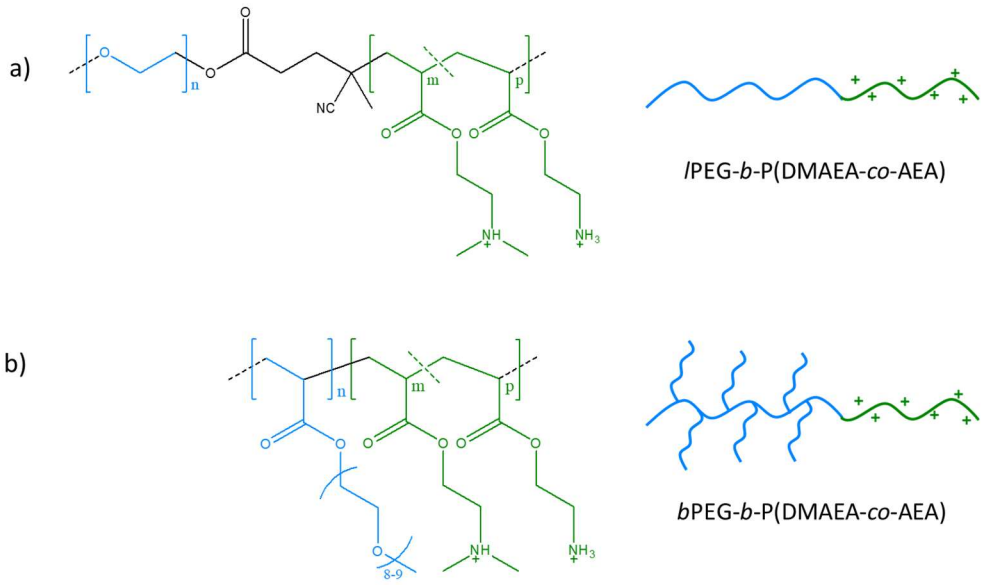


Figure 1.16. Structure des dérivés polyacrylates à base de polyacrylates d'aminoéthyle cationiques PEGylés synthétisés par Le Bohec *et al.*[81] et obtenus par copolymerisation RAFT du DMAEA et du *t*BocAEA suivi de la déprotection des amines

Le Bohec *et al.*[81] ont synthétisé des dérivés polyacrylates à base de polyacrylates d'aminoéthyle cationiques PEGylés à partir d'acrylate de *N*,*N*-dimethyl-aminoethyle (DMAEA) et d'acrylate de *tert*-butyloxycarbonylaminoéthyle (*t*BocAEA). La synthèse a été effectuée par copolymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT) à partir d'agent RAFT macromoléculaire PEGylé linéaire ou en peigne (Figure 1.16). La déprotection successive du *t*BocAEA donne accès aux polymères présentés à la Figure 1.16, possédant des résidus ammoniums primaires et tertiaires. Ils ont montré que le *l*PEG-*b*-P(DMAEA-*co*-AEA) et le *b*PEG-*b*-P(DMAEA-*co*-AEA) complexaient efficacement l'ADNp à des ratios N/P légèrement plus grand que le P(DMAEA-*co*-AEA), respectivement 3/1, 6/1 et 1/1. De plus, l'étude de la viabilité des cellules NIH-3T3 après

incubation des polyplexes met en évidence que l'ajout de PEG diminue drastiquement la toxicité du P(DMAEA-*co*-AEA). Plus intéressant encore, aux concentrations testées, le *b*PEG-*b*-P(DMAEA-*co*-AEA) induit moins de toxicité que la jetPEI (*l*PEI de 22K produite par Polyplustransfection).

III. La polyéthylèneimine : polymère cationique de référence

1. Caractéristiques physico-chimique de la PEI

La polyéthylèneimine (PEI) est un polymère aliphatique très basique et chargé positivement à pH neutre. La PEI était déjà connue depuis une cinquantaine d'années et utilisée dans divers domaines tels que la purification de l'eau, la fabrication de shampoing ou l'extraction de minerais quand Boussif *et al.* suggérèrent pour la première fois son utilisation pour des applications en transfert de gènes[82].

Les différentes architectures existantes de PEI sont présentées à la Figure 1.17. Historiquement, la PEI branchée (*b*PEI) fut la première décrite. La *b*PEI est obtenue par polymérisation cationique par ouverture de cycle (CROP) de l'aziridine (aussi appelée éthylèneimine). Lors de la polymérisation, l'amine secondaire du polymère ayant une nucléophilicité du même ordre que celle de l'amine du monomère, des réactions secondaires de transfert au monomère ont lieu. Par conséquent, un polymère branché possédant des amines primaires, secondaires et tertiaires est obtenu. Un exemple de structure de *b*PEI est présenté à la Figure 1.17 c). La composition de la *b*PEI peut varier : des ratios amines primaires/amines secondaires/amines tertiaires de 1/2/1 et de 1/1/1 ont été évoqués dans la littérature[83,84]. La présence de 3 valeurs de pK_a dans la *b*PEI (4,5 pour les amines primaires, 6,7 pour les amines secondaires et 11,6 pour les amines tertiaires[83]) lui confère un taux de protonation variable en fonction du pH.

La polyéthylèneimine de structure linéaire (*l*PEI) (Figure 1.17 a)) peut, quant à elle, être synthétisée de deux façons différentes. Il est possible de polymériser l'aziridine à basse température[85], les réactions de transfert conduisant à la formation de *bPEI* sont alors légèrement

diminuées. Godbey indique que la *l*PEI peut être obtenue dans ces conditions après une étape de précipitation pour séparer la *l*PEI de la *bPEI* et du monomère restant, par ailleurs très toxique[86]. La deuxième méthode, proposée pour la première fois par Saegusa en 1972, consiste à synthétiser un polymère précurseur, la poly(2-oxazoline), de manière contrôlée avant de procéder à son hydrolyse pour obtenir la PEI correspondante[87]. Cette méthode est aujourd'hui largement utilisée et sera exposée en détails dans le §III.3.1. Le pK_a des amines secondaires de la *l*PEI se situe entre 7,9 et 8,4.

Plus récemment, l'équipe de Grayson a synthétisé des PEI cycliques (*c*PEI) de différentes masses molaires[62]. Pour cela, un précurseur poly(2-éthyl-2-oxazoline) possédant des fonctions propargyle et azide à chacune de ses extrémités a été préparé et la réaction par chimie click de ces 2 fonctions en milieu dilué a permis la cyclisation du polymère. Après hydrolyse acide, la *c*PEI présentée à la Figure 1.17 b) est obtenue.

La *b*PEI est soluble dans l'eau. La *l*PEI quant à elle, présente une solubilité aqueuse plus variable. Quand elle est synthétisée par hydrolyse acide de PEtOx, il a été observé qu'au-delà d'un certain pourcentage d'hydrolyse (> 95%)[88], un précipité insoluble dans l'eau apparaissait et cela avait été expliqué dès 1979 par la structure cristalline engendrée par la stéréorégularité de la PEI linéaire[89].

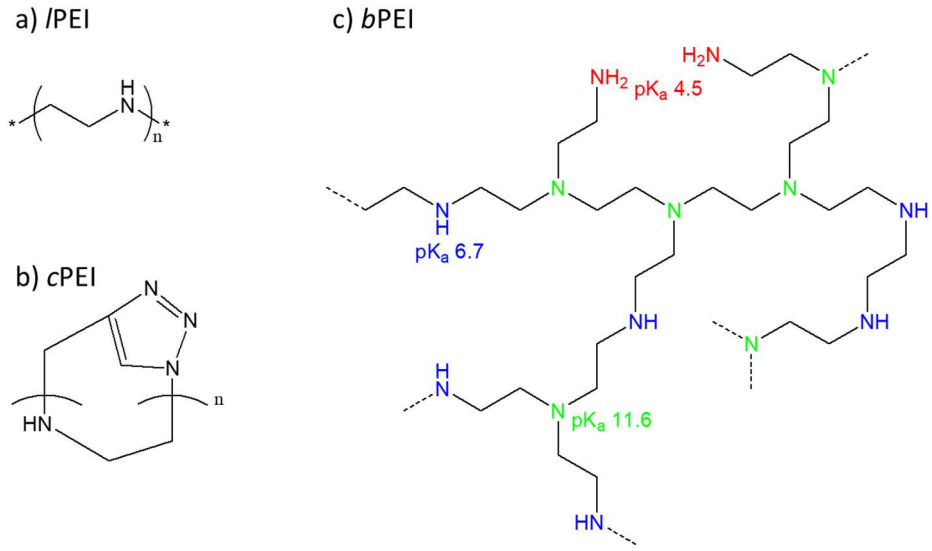


Figure 1.17. Différentes structures envisageables de la PEI : a) PEI linéaire (*l*PEI) ; b) PEI cyclique (*c*PEI)[62] ; c) PEI branchée (*b*PEI). Les valeurs des pka sont déterminées par titration[90]

2. Mode de transfection de la PEI, efficacité de transfection et toxicité

Très rapidement après sa première utilisation en transfert de gène, la polyéthylèneimine est devenue le polymère cationique de référence dans ce domaine et l'est toujours aujourd'hui. De nombreuses équipes de recherche ont travaillé et travaillent encore à comprendre le mécanisme de transfection de polyplexes à base de PEI (notamment les différentes étapes décrites dans § P1.I.3). L'étude de K. V. Gersdorff *et al.* a montré que la voie d'endocytose empruntée par les polyplexes de polyéthylèneimine (PEI) dépendait non seulement du type cellulaire mais aussi de l'architecture de la PEI. Dans les cellules HUH-7 par exemple, les *l*PEI-polyplexes entrent préférentiellement par la voie clathrine-dépendante tandis que les *b*PEI-polyplexes semblent entrer indifféremment par les voies d'endocytose clathrine-dépendante et cavéole-dépendante[91]. Il a été démontré que la masse molaire (MM)[60,92] et l'architecture[62] de la PEI influent notablement sur l'efficacité de transfection et la cytotoxicité. Brissault *et al.*[74] ont ainsi démontré que l'architecture de la PEI utilisée pour transfecter avait un rôle bien plus important que son contenu en amines primaires, secondaires et tertiaires. Les résultats sont aussi dépendants de la nature des cellules transfectées. Mais il a également été mis en évidence que trouver le vecteur polymère PEI idéal consistait à faire un compromis entre efficacité de transfection et cytotoxicité.

Influence de la masse molaire et de l'architecture sur l'efficacité de transfection

En ce qui concerne la masse molaire tout d'abord, plusieurs études ont été menées pour déterminer la masse molaire (MM) optimale. Rinkenauer *et al.*[93] ont mis en place une méthode de criblage à haut débit (high-throughput screening) qui leur a permis de comparer les propriétés d'un grand nombre de polymères en termes de taille de polyplexes formés, de force d'interaction avec l'ADN, de stabilité du polyplexe, de cytotoxicité et d'efficacité de transfection. Des *l*PEI et des *b*PEI de degrés de polymérisation 20, 200 et 600 (soit des masses molaires de 860, 8600 et 25 800 $g.mol^{-1}$) ont été préparées et comparées. Aux concentrations testées, ni la *l*PEI ni la *b*PEI ne présentait de toxicité importante mais celle-ci augmentait avec la masse molaire et la concentration. Pour les faibles MM, l'architecture semble avoir une influence sur la force d'interaction avec l'ADN : la $bPEI_{20}$ étant plus fortement liée à l'ADN que la $lPEI_{20}$. La meilleure efficacité de transfection a été obtenue pour la $lPEI_{600}$ (25,8 kDa).

Remy *et al.* ont comparé l'efficacité de transfection de différents vecteurs en utilisant notamment des polyplexes constitués de *b*PEI ou de *l*PEI de MM variables et le plasmide pCMV-Luc pour transfecter des cellules 3T3 (fibroblastes). Sur les 6 MM de *b*PEI testées (0,7 – 2 – 25 – 50 – 750 – 800 kDa), une MM minimale semble être nécessaire pour obtenir un bon niveau de transfection, puisque les *b*PEI de 0,7 et 2 kDa transfectent avec une efficacité d'un ordre de grandeur respectivement 6 et 4 fois plus faible que celui de la *b*PEI 25 kDa qui s'est avérée être la plus efficace. Cela concorde avec d'autres résultats qui ont montré qu'une MM supérieure à 5kDa était nécessaire pour obtenir la formation de polyplexes stables. Par ailleurs, parmi les 3 MM de *l*PEI testées (22 – 88 – 220 kDa), celle de 22 kDa présente la meilleure efficacité de transfection, du même ordre de grandeur que la *b*PEI 25 kDa[60].

Cependant, Blakney *et al.*[92] ont mis en évidence que le vecteur idéal dépendait de la nature de l'acide nucléique à transfecter. Ils ont synthétisé une large gamme de copolymères statistiques PEI-PEtOx en faisant varier la masse molaire de la PEtOx initiale (5, 10, 20, 50 et 200 kDa) ainsi que le pourcentage de motifs hydrolysés en EI (20, 50, 80 et 100%). Le plan d'expérience qu'ils ont utilisé leur a permis de trouver le vecteur idéal pour chacun des 3 acides nucléiques testés : un ADNp (7000 pdb), un ARNm (2000 nt) et un ARNrep (réplicon ou ARN messager capable de s'auto-répliquer) (9500 nt). Leur étude a ainsi montré que les vecteurs idéaux pour l'ARNm, l'ARNrep et l'ADN étaient, respectivement, la $PEI_{80\%}$-$PEtOx_{20\%}$ de 45 $kg.mol^{-1}$, la $PEI_{100\%}$ de 72 $kg.mol^{-1}$ et la $PEI_{100\%}$ de 83 $kg.mol^{-1}$. Parallèlement, les travaux de Jeong *et al.*[88] ont montré que parmi des PEtOx de 50 $kg.mol^{-1}$ partiellement hydrolysées, le copolymère $PEI_{88\%}$-$PEtOx_{12\%}$ était le plus efficace pour la transfection d'ADN.

Cortez *et al.*[62] ont comparé l'efficacité de transfection de cellules HFF-1 (human foreskin fibroblast cells) par des *c*PEI de 4 degrés de polymérisation (DP) différents (21, 42, 70 et 84) avec celle des *l*PEI de même DP. Le premier résultat, en accord avec la littérature, est que les PEI de plus faibles MM (900 Da, DP = 21) ne transfectent pas aux ratios N/P testés (10/1, 15/1, 20/1 et 40/1) et ce quelle que soit leur architecture. Par ailleurs, les *c*PEI de DP 70 et 84 présentent une efficacité de transfection significativement meilleure que leurs homologues linéaires respectifs aux quatre ratios N/P testés. Selon les auteurs, ce résultat proviendrait d'une conformation plus compacte de la *c*PEI qui lui confère donc une densité de charges plus grande que son analogue linéaire. Néanmoins, aucune titration n'est présentée pour étayer cette hypothèse. Enfin, les résultats ont été comparés à la *b*PEI 25 K et la $cPEI_{70}$ au ratio N/P = 40/1, la $cPEI_{84}$ aux ratios N/P = 20 ou 15 transfectent avec la même efficacité que la *b*PEI 25K tout

en présentant une toxicité moindre (respectivement 20% et 40% contre 60% de toxicité pour la *b*PEI).

Influence de la masse molaire et de l'architecture sur la toxicité

Dans leur étude sur des fibroblastes de souris NIH 3T3, Jeong *et al.* ont mis en évidence que la PEtOx partiellement hydrolysée $PEI_{88\%}$-$PEtOx_{12\%}$ (particules d'environ 300 nm) en plus de présenter une efficacité de transfection du même ordre de grandeur que la *b*PEI 25 $kg.mol^{-1}$ (référence) au même ratio N/P 20/1, présentait une cytotoxicité moindre que cette dernière (toxicité des polymères seuls)[88]. Kafil et Omidi ont, quant à eux, étudié les effets cytotoxiques de la *b*PEI et de la *l*PEI, toutes deux de MM 25 $kg.mol^{-1}$, sur des cellules épithéliales humaines, les cellules A431. Leur étude a montré que la toxicité induite par la *b*PEI était très supérieure à celle induite par la *l*PEI puisqu'ils ont déterminé que l'IC50% de la *l*PEI était de 74 µg contre 37 µg pour la *b*PEI (soit moitié moins) sur les cellules A431. L'IC50%, concentration induisant 50% de cytotoxicité est déterminée en traçant la viabilité cellulaire (mesurée par un test MTT) en fonction de la concentration croissante en polymère dans les puits. Les polyplexes à base de *l*PEI et de *b*PEI présentaient respectivement un potentiel zeta de (4,9 ± 1,2) mV et de (14,3 ± 2,1) mV sans que les ratios N/P ne soient précisés, ce qui peut expliquer une efficacité de transfection légèrement meilleure couplée à une plus grande cytotoxicité de la *b*PEI par rapport à la *l*PEI[94]. Il a en effet été mis en évidence que l'excès de PEI aidait à l'entrée dans la cellule et la sortie des endosomes permettant donc une meilleure transfection[25,95], mais que c'est aussi cet excès de charges positives qui induit de la toxicité.

Cortez *et al.* n'ont pas mis en évidence une différence de toxicité significative entre les polymères cycliques et leurs équivalents linéaires. Cependant, les *c*PEI sont significativement moins toxiques que la *b*PEI 25 kDa de référence (la $cPEI_{70}$ au ratio N/P = 40/1 présente 20% de toxicité ; la $cPEI_{84}$ aux ratios N/P = 20/1 ou 15/1 présente 40% de toxicité environ contre 60% de toxicité pour la *b*PEI 25 kDa) tout en permettant une transfection d'efficacité équivalente à celle de la *b*PEI 25 kDa et meilleure que celles des *l*PEI correspondantes[62].

3. Voie de synthèse de PEI de structure contrôlée

Comme évoqué précédemment, la méthode la plus répandue pour obtenir de la PEI de structure contrôlée est de synthétiser au préalable des poly(2-alkyl-2-oxazoline)s. Ces précurseurs peuvent dans une deuxième étape être hydrolysés, en milieu acide ou basique, permettant l'obtention d'un polymère de poly(éthylèneimine) de structure désirée.

i. Synthèse de poly(2-oxazoline)s (POx)

Les oxazolines sont des hétérocycles insaturés à 5 atomes comprenant un atome d'oxygène et un atome d'azote et peuvent être substituées sur l'un des trois atomes de carbone qui les composent (Figure 1.18). Les oxazolines substituées en positions 4 ou 5 sont difficiles à polymériser en raison de l'encombrement stérique qu'elles présentent[96]. La classe des 2-oxazolines, dont le nom IUPAC est 4,5-dihydro-oxazole, suscita un intérêt important depuis sa découverte en 1889 par S. Gabriel.

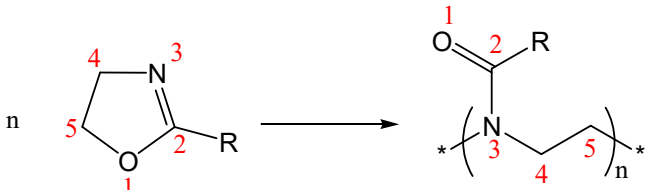


Figure 1.18. Polymérisation des 2-oxazolines

La synthèse des poly(2-oxazoline)s (POx) par polymérisation cationique par ouverture de cycle fut décrite indépendamment en 1966 par 4 groupes de recherche[97–100] et ce, 10 ans après la publication de la première polymérisation « vivante » par Szwarc[101]. La polymérisation des 2-oxazolines est une polymérisation vivante qui se déroule en trois étapes : l'amorçage, la propagation et la terminaison (Figure 1.19). L'amorçage consiste en une attaque nucléophile du doublet non liant de l'atome d'azote de l'oxazoline sur un carbone électrophile de l'amorceur. De nombreuses molécules électrophiles ont été utilisées pour l'amorçage des oxazolines notamment des acides protoniques forts ou leurs esters, des acides de Lewis ou des halogénures d'alkyle[102].

Durant la polymérisation, deux espèces propageantes, ioniques et covalentes, coexistent selon un équilibre qui dépend de la nature du monomère et de celle du contre-ion. Plusieurs études ayant permis de déterminer l'espèce propageante dominante pour des combinaisons monomère/contre-ion définies ont été menées et leurs résultats sont consignés dans le Tableau 1 de la revue faite par Verbraeken *et al.*[103] en 2017. Dans le cas des contre-ions triflate (OTf^-), Hoogenboom *et al.* ont montré que les espèces en croissance étaient majoritairement sous forme ionique, que ce soit dans le cas de la polymérisation de la 2-méthyl-2-oxazoline (MeOx), de la 2-éthyl-2-oxazoline (EtOx) ou de la 2-phenyl-2-oxazoline (PhOx)[104].

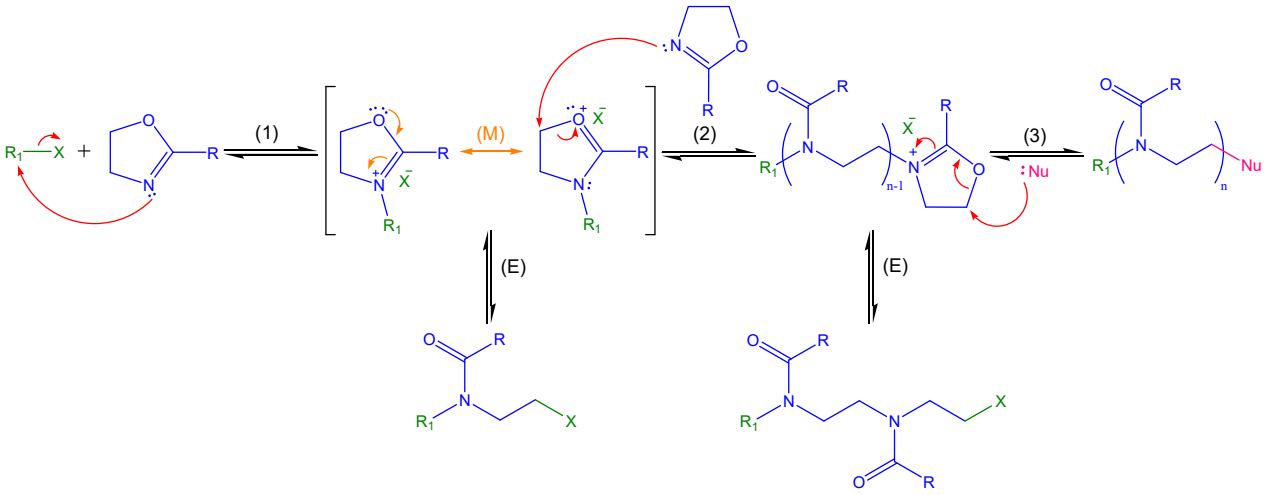


Figure 1.19. Mécanisme de la polymérisation vivante de la 2-R-2-oxazoline : (1) amorçage avec (M) équilibre de mésomérie ; (2) propagation ; (3) terminaison. A chaque étape, il existe un équilibre (E) entre une forme cationique et une forme covalente de l'espèce en croissance. L'amorceur est composé d'un bon groupe partant : X = halogène (Cl, Br, I), tosyle (OTs), ou triflate (OTf) par exemple. Nu = agent de terminaison nucléophile.

De nombreuses revues traitent de la chimie des oxazolines[103,105], de leurs propriétés[106] et de leurs applications[107,108]. En plus de permettre la synthèse de polymères de structure contrôlée en termes d'architecture et de longueur de chaîne, la CROP des oxazolines permet d'obtenir un panel de polymères aux propriétés très variables. Tout d'abord, selon la nature du substituant du monomère (groupement R de la Figure 1.18), les propriétés d'hydrophilie du polymère peuvent varier. La poly(2-méthyl-2-oxazoline) et la poly(2-éthyl-2-oxazoline) sont des polymères hydrophiles à température ambiante. Cette propriété, ajoutée à leur biocompatibilité, en fait des candidats idéaux pour des applications biomédicales. Au contraire, des monomères possédant une chaîne alkyle plus longue ou un groupe phényle conduisent à

des polymères totalement hydrophobes comme la poly(2-phényl-2-oxazoline). La copolymérisation d'un monomère hydrophile avec un monomère hydrophobe permet l'obtention de copolymères à blocs amphiphiles capables de s'auto-organiser pour former des « structures » variées (micelles,…) en fonction du solvant utilisé, de la longueur de chacun des blocs et de la concentration. Entre ces deux extrêmes, certaines poly(2-oxazoline)s possèdent une température critique de solubilité. Par exemple, la poly(2-*n*-propyl-2-oxazoline) présente une LCST (low critical solubility temperature) d'environ 27°C, c'est-à-dire qu'en dessous de cette température, le polymère est soluble dans l'eau alors qu'au-dessus de 27°C, le polymère devient hydrophobe.

Il est aussi possible d'introduire des fonctions spécifiques sur les chaînes de polymères, *via* le groupement latéral du monomère, l'amorceur ou l'agent de terminaison. L'azoture de sodium (NaN_3) peut par exemple être utilisé pour terminer la polymérisation. Volet *et al.* ont synthétisé des PMeOx-N_3 pour les greffer à des poly(3-hydroxyalkanoate)s (PHA) terminés par une fonction alcyne et ainsi obtenir un nouveau polymère dibloc : le PHA-*b*-POXZ[109]. Le groupe azoture permet d'introduire un grand nombre de fonctions par chimie click. La fonction azoture peut être introduite sur la chaîne pendante des motifs de répétition. Le Fer *et al*. ont par exemple homopolymérisé le 2-(5-azidopentyl)-2-oxazoline (N_3PentOx). Le polymère obtenu est totalement hydrophobe. Des copolymères quasi-statistiques de N_3PentOx et MeOx ont aussi été synthétisés, laissant présager d'une multitude de possibilités pour introduire des fonctions plus spécifiques ou synthétiser de nouveaux polymères greffés par une approche de grafting-onto grâce aux fonctions azotures[110].

ii. Hydrolyse des POx

Saegusa publie en 1972 la première synthèse de PEI linéaire par hydrolyse basique de poly(N-formyléthylèneimine)[87]. Dès 1979, Kem publie une étude cinétique de l'hydrolyse de poly(2-oxazoline)s en conditions acides. Il souligne la différence de propriétés de la PEI obtenue selon son pourcentage d'hydrolyse : en dessous de 70%, le polymère obtenu est un thermoplastique amorphe et vitreux, tandis qu'au-dessus de 70%, la régularité des chaînes confère au polymère une structure cristalline et le rend insoluble dans l'eau[89]. Kakuda et son équipe ont plus récemment étudié la conformation des chaînes de PEI par proche et moyen

infrarouge et ont mis en évidence que la *l*PEI était un polymère à UCST (upper critical solution temperature) dont la température critique (T_c) est de 64°C. Autrement dit, en dessous de 64°C, la *l*PEI forme des cristaux dihydratés dans l'eau et sa structure de type zig-zag plannaire conduit à la formation d'un gel. Quand ce gel est chauffé au-dessus de 64°C, l'énergie apportée par la chaleur donne une dynamique aux chaînes et la *l*PEI se solubilise. Une solution limpide est alors obtenue[111]. Hoogenboom et coll. ont comparé les cinétiques d'hydrolyse de la PMeOx et de la PEtOx et ont montré que le groupe latéral méthyle de la PMeOx, de par sa taille plus faible, était hydrolysé plus rapidement que le groupe éthyle de la PEtOx. Pour chacun des polymères, la cinétique d'hydrolyse s'est révélée être linéaire avec le temps (avec cependant un ralentissement de la réaction au-dessus de 60% d'hydrolyse en raison de la précipitation partielle de la PEI au cours de sa formation, ce qui peut surprendre compte tenu des travaux de Kakuda qui reporte la solubilisation de la PEI à 64°C[111]) et indépendante de la concentration initiale en POx et du degré de polymérisation de la POx[112].

De même que le développement des techniques de polymérisation par microonde a permis de réduire considérablement la durée de synthèse des poly(2-oxazoline)s, il a aussi permis d'accélérer les cinétiques d'hydrolyse des POx[113].

L'hydrolyse partielle de POx de différentes structures initiales permet d'envisager des structures encore plus originales et variées et d'intérêt applicatif. L'hydrolyse partielle de poly(2-éthyl-2-oxazoline) à haute température (chauffage microonde) a permis l'obtention de copolymères statistiques POx-*stat*-PEI pour des applications d'hydrogels ou de biocapteurs par exemple[113]. Lambermont-Thijs *et al*. ont étudié la possibilité d'une hydrolyse partielle, en conditions acides ou basiques, de copolymères statistiques ou à blocs à base de 2-méthyl-2-oxazoline (MeOx) et de 2-phényl-2-oxazoline (PhOx). En conditions acides (HCl 5,4 M – 2 ou 5h – chauffage conventionnel ou microondes), la MeOx est préférentiellement (mais pas sélectivement) hydrolysée, particulièrement dans le copolymère à blocs. Les conditions basiques (NaOH 2,2 M – 2, 5 ou 10h), quant à elles, hydrolysent presque parfaitement sélectivement la MeOx mais l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique dans l'héxafluoroisopropanol (HFIP) a mis en évidence la dégradation du squelette du polymère[114].

4. Modifications de la PEI

Plusieurs études récentes ont mis en évidence la cytotoxicité de la PEI (notamment la *b*PEI de 25 kDa) et la *l*PEI a été décrite agissant comme un agent apoptotique (molécule pouvant induire la mort de la cellule en amorçant le mécanisme d'apoptose)[115]. Pour remédier à ces désavantages, des modifications et/ou fonctionnalisations de la PEI ont été proposées et semblent diminuer la toxicité tout en maintenant une efficacité de transfection comparable[116]. Deux modifications seront ici développées : le greffage de PEG et l'ajout de résidus histidine.

i. Greffage de PEG

Pour diminuer la cytotoxicité de la PEI, essentiellement due à sa densité de charges et sa propension à s'agréger, plusieurs groupes ont travaillé sur l'ajout de poly(éthylène glycol) (PEG). Le PEG diminue la charge apparente du polymère. R. J. Smith *et al.* ont synthétisé une bibliothèque de 9 copolymères PEI-*graft*-PEG en faisant réagir des PEG-succinimidyl de trois masses molaires différentes (750, 2000 et 5000 $g.mol^{-1}$) et à trois ratios molaires initiaux sur de la PEI linéaire commerciale de 25 000 $g.mol^{-1}$. Des analyses par titrage calorimétrique isotherme (ITC) leur ont permis de mettre en évidence que l'affinité entre la PEI greffée et l'ADN diminuait avec la longueur des chaînes greffées ainsi qu'avec le taux de greffage. Dans leur étude, la PEI linéaire dont 3% des amines sont substituées par du PEG 5000 $g.mol^{-1}$ est le meilleur compromis puisqu'elle présente la plus forte interaction avec l'ADN et le plus faible taux d'agrégation des polyplexes entre eux[117].

Brissault *et al.*[71] ont synthétisé un copolymère à blocs poly(éthylène glycol-*b*-éthylènimine) (poly(EG-*b*-EI)) en copolymérisant un mélange MeOx/EtOx à partir d'un macroamorceur CH_3-PEG_{2kDa}-Ts puis en effectuant une hydrolyse du copolymère en conditions basiques (NaOH). Le poly(EG-*b*-EI) permet un transfert de gènes efficace dans les deux lignées cellulaires testées (cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2) et cellules embryonnaires de rein (HEK293)), du même ordre que la *l*PEI 22K bien qu'un ratio massique polymère/ADN plus élevé soit nécessaire (ratio massique 12/1). De plus, ce nouveau polymère présente une toxicité plus faible que la *l*PEI 22K aux ratios massiques élevés.

ii. Greffage de résidus histidine

Il a été montré que la présence de résidus histidine sur des polymères ou peptides améliore fortement leur efficacité de transfection[118].

Dans ce contexte, Bertrand *et al.*[73] ont développé la synthèse de polyéthylèneimines linéaires substituées avec des résidus histidine (His-*l*PEI). Au préalable la *N*-acryloyl-L-histidine (His) est synthétisée par un mécanisme d'addition – élimination de la fonction amine de l'histidine sur le chlorure d'acyle du chlorure d'acryloyle. Dans un deuxième temps, la *N*-acryloyl-L-histidine est greffée statistiquement sur la polyéthylèneimine linéaire par réaction de Michael entre la double liaison des résidus histidine et les amines secondaires de la *l*PEI (Figure 1.20).

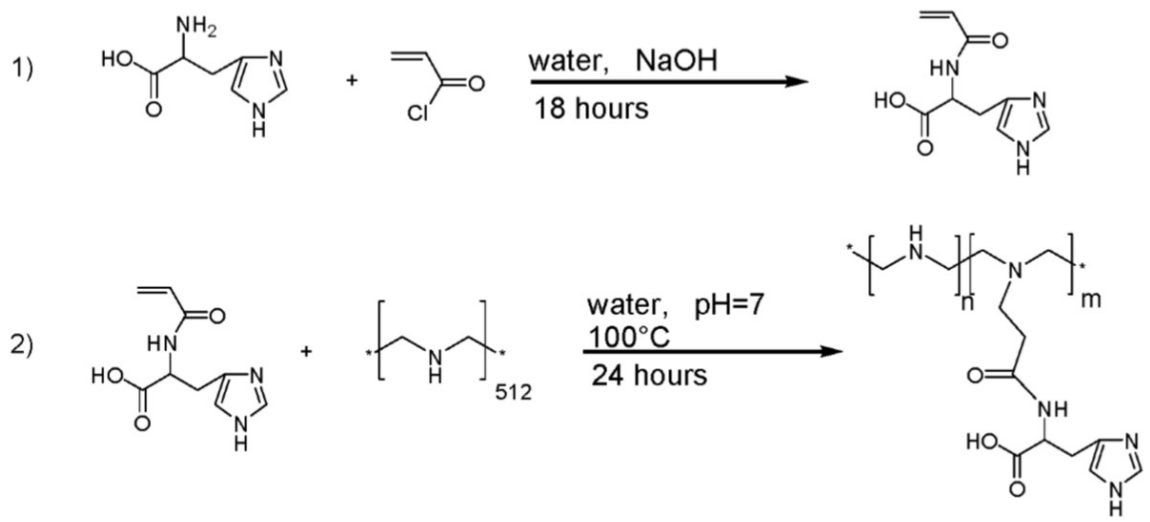


Figure 1.20. Synthèse de His-*l*PEI décrite par Bertrand *et al.*[73] : 1) Synthèse du résidu histidine, la *N*-acryloyl-histidine ; 2) Synthèse de la His-*l*PEI par greffage du résidu histidine *via* une addition de Michael.

En faisant varier la quantité de *N*-acryloyl-L-histidine pendant la réaction de greffage sur la *l*PEI (M_w = 22 kDa), des His-*l*PEI possédant des pourcentages de résidus histidine variés ont été obtenues: 7,4% ($His_{7,4}$-*l*PEI), 16% (His_{16}-*l*PEI), 19% (His_{19}-*l*PEI), 24% (His_{24}-*l*PEI), 32% (His_{32}-*l*PEI) or 67% (His_{67}-*l*PEI). Plus le pourcentage de résidus histidine est grand, plus la densité de charges globale du polymère est faible. De ce fait, plus le pourcentage de résidus histidine est grand, plus la complexation de l'ADN nécessite un ratio polymère/ADN élevé ; et pour des pourcentages de greffages élevés (32 et 67%), le polymère ne complexe plus l'ADN,

même à des ratios massiques polymère/ADN élevés (jusqu'à 8/1) à cause de l'encombrement stérique induit par les greffons qui limitent l'accessibilité des charges. En termes de transfection, les *l*PEI portant de 2 à 24% de résidus histidine présentent une meilleure efficacité de transfection des cellules HeLa que la *l*PEI au ratio 6/1. Plus intéressant encore, les auteurs ont mis en évidence que la présence de résidus histidine réduisait considérablement la cytotoxicité des polymères. En effet, alors que l'IC50% (concentration induisant 50% de cytotoxicité) de la *l*PEI est comprise entre 6,5 et 30 $\mu g.mL^{-1}$ selon la lignée cellulaire testée, l'IC50% de la His_{16}-*l*PEI s'est avérée être supérieure à 100 $\mu g.mL^{-1}$ sur les 4 lignées cellulaires testées (HeLa, HEK293T7, C2C12 et ∑CFTE). Plus précisément, au ratio 6/1, la cytotoxicité induite par His_{16}-*l*PEI était toujours plus faible que celle induite par la *l*PEI. En particulier, elle n'a induit que 22% de toxicité sur les cellules C2C12 contre 76% pour *l*PEI.

Billiet *et al.* se sont intéressés aux mécanismes liés à l'utilisation de résidus histidine, et en particulier aux mécanismes de sortie de l'endosome. En utilisant des cellules C2C12 modifiées (cellules qui expriment les protéines Rab5-EGFP ou Rab7-EGFP, caractéristiques respectivement des endosomes précoces ou tardifs de la voie d'endocytose clathrine-dépendante, ou Cav1-EGFP caractéristique de la voie d'endocytose cavéole-dépendante), l'équipe a mis en évidence que les His-*l*PEI présentant le meilleur niveau de transfection (*l*PEI modifiée avec 16 à 25% de résidus histidine) étaient internalisées par la voie d'endocytose clathrine-dépendante[119]. Les diamètres moyens des polyplexes utilisés dans cette étude[119] sont compris entre 100 et 150 nm, et les polyplexes possèdent un potentiel zéta positif.

Partie 2 – Les polymères en étoile pour le transfert de gène

I. Enjeux de la synthèse de polymères en étoile

Les polymères en étoile sont composés d'au moins trois bras linéaires qui se déploient à partir d'un cœur central dont la masse molaire doit être relativement faible en comparaison des bras. On distingue les polymères en étoile homogènes dont les bras sont de même longueur et de même nature chimique et les polymères en étoile hétérogènes. Boyer et coll.[120] différencient trois stratégies de synthèse de polymères en étoile : « arm-first », « core-first » (Figure 1.21) et « grafting-onto ». Dans cette partie, les stratégies principales[121,122] permettant la synthèse de ces polymères en étoile seront décrites. Quelle que soit la stratégie choisie, l'objectif principal est d'obtenir des polymères d'architecture contrôlée, en termes de nombre de branches et de longueurs de branches. Pour s'en assurer, une caractérisation approfondie des polymères obtenus est nécessaire. Les éventuelles difficultés rencontrées dans cette étape de caractérisation seront développées dans la deuxième partie de ce paragraphe.

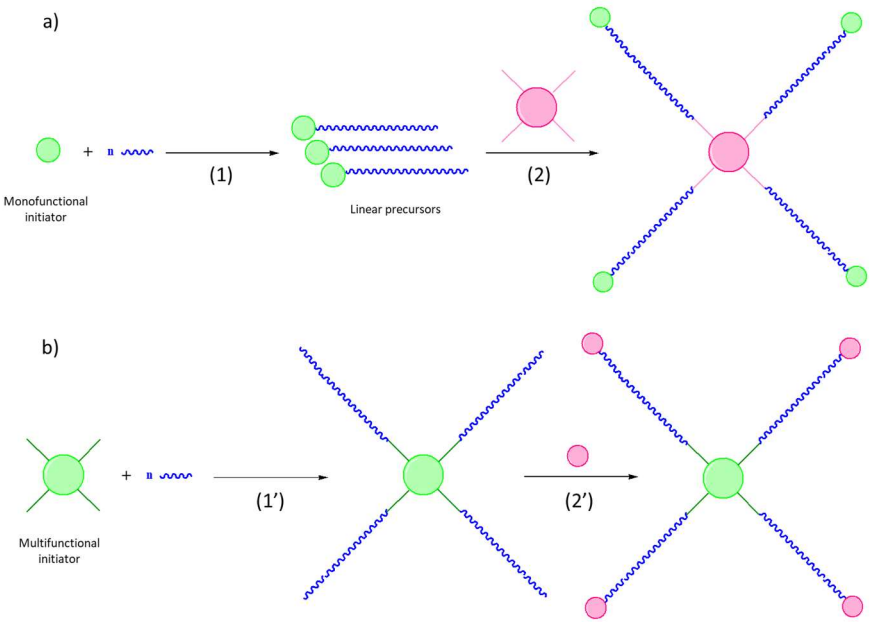


Figure 1.21. Stratégies de synthèse de polymères en étoile : a) méthode « arm-first » : (1) synthèse de précurseurs linéaires par polymérisation vivante, (2) formation des étoiles par ajout d'un agent de terminaison multifonctionnel ;
b) méthode « core-first » : (1') polymérisation d'une étoile à partir d'un amorceur multifonctionnel, (2') fonctionnalisation des extrémités de chaînes par ajout d'un agent de terminaison

1. Stratégies

a. Stratégies « arm-first » et « grafting-onto »

La stratégie convergente consiste à synthétiser dans un premier temps des polymères linéaires qui, après couplage avec une molécule cœur constitueront les branches du polymère en étoile. La synthèse des polymères linéaires par polymérisation vivante permet de garantir l'homogénéité des futures branches des étoiles en termes de masse molaire. Celle-ci est, par ailleurs, aisément vérifiée par des méthodes de caractérisation comme la chromatographie d'exclusion stérique (CES).

La formation des étoiles peut se faire soit directement au moment de l'étape de terminaison de la polymérisation, par ajout d'un agent de terminaison multifonctionnel (stratégie « arm-first »), soit par un couplage ultérieur entre les précurseurs linéaires et la molécule multifonctionnelle (stratégie « grafting-onto »). Dans ce dernier cas, une fonction particulière est introduite à l'extrémité des précurseurs linéaires au moment de la terminaison. C'est cette fonction, ou celle présente à l'autre extrémité des chaînes grâce à l'amorceur, qui permettra le couplage avec la molécule multifonctionnelle. La limitation de cette méthode convergente réside dans la difficulté d'obtenir des étoiles avec un nombre de branches élevé et/ou avec des branches de masse molaire élevée. En effet, l'encombrement stérique créé par les premières branches liées à la molécule multifonctionnelle, limite l'accroche des suivantes. De plus, une étape de purification est nécessaire pour éliminer l'excès de précurseurs linéaires et obtenir un polymère en étoile pur.

Quelques publications décrivent l'utilisation de la stratégie convergente pour obtenir des étoiles de poly(2-oxazoline)s[123–126]. Hoogenboom *et al.* ont décrit l'obtention d'étoiles de PEtOx par end-capping en utilisant des dendrimères de polyétylèneimine de 1ère (G1) et 2ème (G2) génération portant respectivement 4 et 8 fonctions amines primaires (Figure 1.22). Les auteurs montrent que l'utilisation de G2 permet l'obtention d'étoiles de plus haute masse molaire donc possédant plus de branches que lorsque G1 est utilisé. Cependant, ils montrent aussi que l'efficacité de terminaison diminue avec la fonctionnalité du dendrimère ainsi qu'avec la longueur des branches utilisées[123].

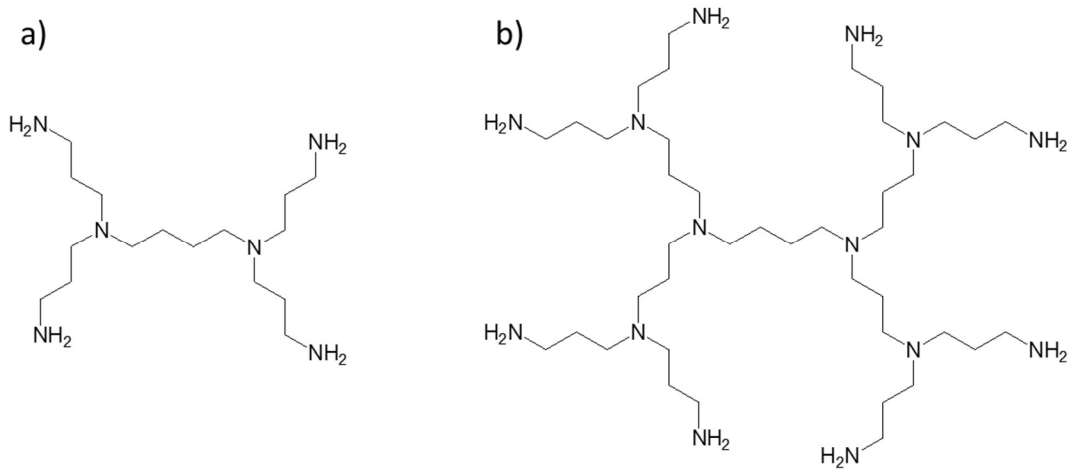
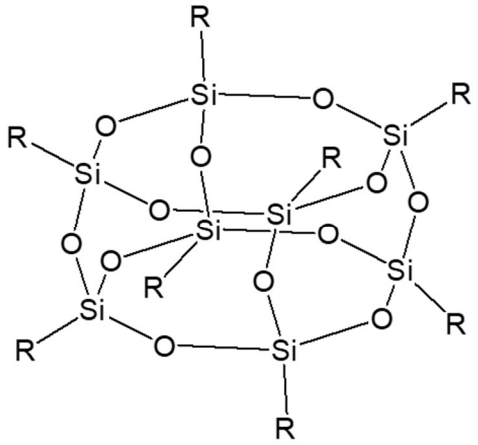


Figure 1.22. Structure des dendrimères a) de première génération (G1) et b) de deuxième génération (G2) utilisé par Hoogenboom et coll. pour amorcer la polymérisation d'EtOx[123]

b. Stratégie « core-first »

Dans le cas de la méthode « core-first », aussi appelée méthode divergente ou « grafting-from method », la polymérisation est initiée par un amorceur multifonctionnel à partir duquel vont croître les branches. Des amorceurs multifonctionnels de types variés ont été décrits pour la synthèse d'étoiles de 2-oxazolines et seront détaillés le §P2.III.2. Pour obtenir des polymères en étoile homogènes avec des branches de même masse molaire, il est nécessaire que toutes les fonctions amorçantes de l'amorceur multifonctionnel présentent la même réactivité et que la vitesse d'amorçage soit supérieure à la vitesse de propagation. Kim *et al.* ont modifié des molécules inorganiques, les POSS (polyhedral oligomeric silsesquioxanes) en introduisant à chacun des coins des cubes POSS des fonctions iodure ou tosylate (Figure 1.23). Les amorceurs octo-fonctionnels ainsi obtenus (nommés respectivement Cube-I, Cube-benzylI, selon l'espaceur utilisé, et Cube-OTs) ont été utilisés pour polymériser la 2-méthyl-2-oxazoline (MeOx). D'après l'analyse par RMN ^{1}H et CES des polymères obtenus avec l'amorceur Cube-OTs, seules 4 à 5 branches, de longueurs hétérogènes, sont présentes sur les 8 possibles. Les auteurs l'expliquent par l'encombrement stérique dû à la structure et qui résulte en des vitesses d'amorçage différentes pour chacun des sites d'amorçage. Ils l'ont confirmé en montrant que la vitesse de polymérisation de la MeOx amorcée par le p-toluène sulfonate de méthyle (MeOTs) était supérieure à celle amorcée par le Cube-OTs[127].



a) R = -$(CH_2)_3$-I

b) R = -$(CH_2)_3$-OTs

c) R = -$(CH_2)_2$-Ph-CH_2-I

Figure 1.23. Structures des POSS a) Cube-I, b) Cube-OTs et c) Cube-benzylI, synthétisés par Kim *et al.*[127]

Dans la littérature, sont parfois assimilés à des polymères en étoile, des polymères faisant intervenir un élément hyperbranché. B. Voit décrit par exemple la synthèse d'un polymère hyperbranché à partir d'acide 4,4bis (4-hydroxyphenyl) valeric, obtenu avec une dispersité de 2,9 et qui, par réaction d'estérification avec du chlorure de 3-(chloromethyl) benzoyl en présence de triéthylamine, permet l'obtention d'un macro-amorceur possédant des fonctions –O-CO-Ph-CH_2-Cl capables d'amorcer la polymérisation de la 2-méthyl-2-oxazoline[128]. Cependant, ce type de polymère ne sera pas inclus dans notre discussion dans la mesure où la nature hyperbranchée et donc mal définie de l'amorceur utilisé donne logiquement lieu à l'obtention d' « étoiles » hétérogènes.

2. Caractérisation des étoiles par chromatographie d'exclusion stérique

Les deux stratégies « arm-first » et « core-first » présentent des avantages et des inconvénients distincts. Toutefois, dans les deux méthodes, la caractérisation est un point essentiel afin de garantir la structure contrôlée des polymères en étoile, notamment pour des applications biologiques. L'inconvénient majeur de la stratégie « core-first » est qu'aucune caractérisation des branches n'est possible et que la caractérisation de l'objet final est difficile, nécessitant souvent l'emploi de méthodes indirectes[122]. La caractérisation des polymères à

architecture complexe par chromatographie d'exclusion stérique (CES) est difficile mais différentes théories permettent d'envisager cette méthode pour caractériser les polymères en étoile.

Par rapport à un polymère linéaire de même masse molaire, un polymère branché possède un volume hydrodynamique plus faible et donc une viscosité intrinsèque plus faible. En effet, le volume hydrodynamique est proportionnel à la masse molaire du polymère multipliée par sa viscosité intrinsèque. Zimm et Stockmayer[129] ont défini l'indice de ramification g comme le rapport du carré du rayon de giration du polymère ramifié sur celui du polymère linéaire, pour une même masse molaire. Selon la théorie de marche aléatoire qu'ils ont développée :

$$g = \left(\frac{R^2_{g,ramifié}}{R^2_{g,linéaire}}\right)_{MM}$$

Le rayon de giration R_g est mesurable par diffusion de la lumière. Cependant, cette mesure n'est pas possible pour des rayons de giration inférieurs à 15 nm. L'indice de ramification g' peut alors être utilisé. Il a été défini par Zimm et Kilb[130] comme le rapport des viscosités intrinsèques du polymère ramifié et du polymère linéaire, pour une même masse molaire.

$$g' = \left(\frac{[\eta]_{ramifié}}{[\eta]_{linéaire}}\right)_{MM}$$

Il a été observé expérimentalement que g et g' sont reliés par la relation suivante :

$$g' = g^{\varepsilon} \text{ avec } 0{,}5 \leq \varepsilon \leq 1{,}5$$

L'utilisation d'un détecteur viscosimétrique lors de l'analyse du polymère en étoile par chromatographie d'exclusion stérique permet d'obtenir l'indice de ramification g'. En fixant ε à la valeur appropriée, on peut ensuite calculer g, et ainsi déterminer le nombre de branches du polymère en étoile f. En effet, f et g vérifient les relations suivantes[130] :

$g = \frac{3f-2}{f^2}$ pour des étoiles ayant des branches monodisperses

$g = \frac{3f}{(f+1)^2}$ pour des étoiles ayant des branches polydisperses.

Le facteur de forme ε peut varier entre 0,5 et 1,5 et est en théorie égal à 0,5 dans le cas de polymère en étoile dans un solvant theta. Cependant, en pratique, cela peut varier. Par exemple, Jackson et al.[131] ont trouvé que ε = 0,79 était la valeur la plus adéquate dans le cas d'étoiles de polystyrène dans le THF. Comme souligné par Balke et al.[132], cette incertitude sur ε engendre une incertitude d'autant moins négligeable sur le nombre de branches *f*.

II. Influence de l'architecture sur les applications biologiques

Qiu et Bae ont mis en exergue l'importance de la topologie des polymères pour la délivrance de médicaments ("drug delivery")[133]. A ce jour, les systèmes les plus utilisés sont des micelles de polymères préparées à partir de copolymères à blocs amphiphiles dont le bloc hydrophile est le plus souvent composé de PEG, tandis que le bloc hydrophobe est de nature plus variable (poly(D-L-lactide) ou poly(ε-caprolactone) par exemple)[134]. Dans les structures de type cœur-couronne comme celles-ci, le médicament (le plus souvent une petite molécule hydrophobe) interagit avec le bloc hydrophobe qui forme le cœur de la micelle et est protégé par le bloc hydrophile (la couronne) qui permet aussi sa solubilisation dans les milieux biologiques et améliore sa stabilité. Les micelles constituées de polymères en étoile sont plus stables que celles constituées de copolymères à blocs amphiphiles et ce grâce aux points de branchements covalents qui les composent. Kovar *et al.*[135] ont mis en lumière les avantages d'une structure en étoile en synthétisant un composé constitué d'un copolymère de methacrylamide de *N*-(2-hydroxypropyl) lié à un antigène et couplé à la doxorubicine. L'action tumorale plus puissante que celle du composé linéaire correspondant a été attribuée par les auteurs à une meilleure internalisation cellulaire et à une durée de vie augmentée dans le sang. De plus, la présence des bras et de leurs points de branchement sur les polymères en étoile leur confère une flexibilité faible et réduit leur capacité de reptation à travers des pores de diamètre inférieur à leur rayon hydrodynamique. Par conséquent, les polymères en étoile passent difficilement à travers les pores glomérulaires, ce qui diminuent leur clairance rénale et augmente donc leur durée de circulation dans le sang[136].

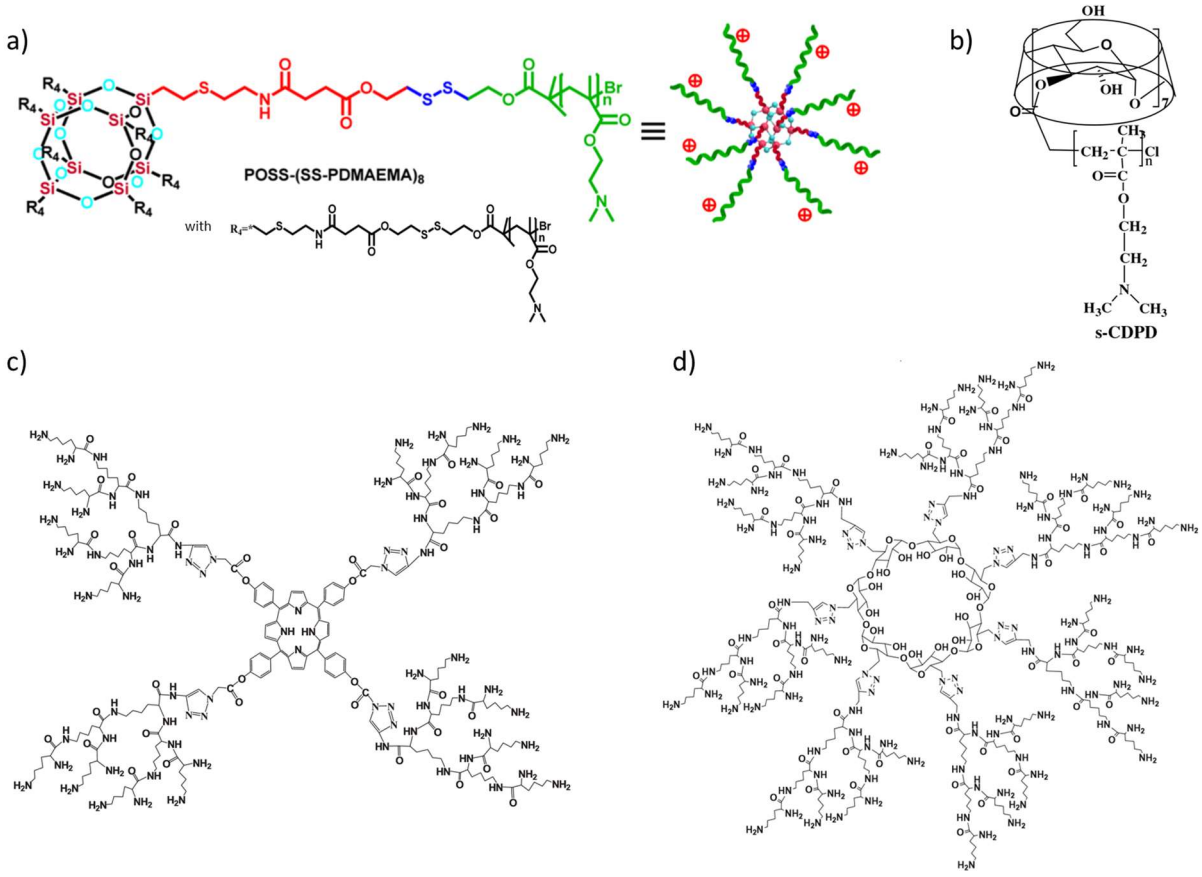


Figure 1.24. Structure de polymères en étoile utilisés en transfert de gène : a) étoile de poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyl) (PDMAEMA) à 8 branches avec un cœur POSS[138], b) étoile de PDMAEMA à 7 branches avec un cœur cyclodextrine (CD)[139], c) étoile de poly(L-lysine) (PLL) à 4 branches avec un cœur porphirine[140] et d) étoile de PLL à 7 branches avec un cœur de cyclodextrine[141]

Dans le domaine de la thérapie génique, les vecteurs synthétiques de type polymères cationiques ont l'avantage de présenter des possibilités de structure infinies, notamment en terme de fonctionnalisation et d'architecture. Des efforts considérables ont été faits ces dernières années sur la modification de polymères pour le transfert de gènes, notamment de la PEI. Les techniques de polymérisation vivante et contrôlée permettent de synthétiser des polymères à façon en maîtrisant la longueur des chaînes, leur composition (homopolymère, copolymère à blocs ou alterné), la fonctionnalisation des extrémités de chaînes, l'architecture. Dans une revue qui traite de l'influence de l'architecture des polymères sur la transfection d'ADNp *in vitro*, Rinkenauer *et al.*[137] ont répertorié les structures des cœurs et la nature des polymères cationiques utilisés pour la synthèse de polymères en étoile pour le transfert de gènes. On peut citer notamment les étoiles de poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyl)

(PDMAEMA) à 8 branches avec un cœur POSS[138], à 4, 7, 14 ou 21 branches avec un cœur cyclodextrine[139], les étoiles de poly(L-lysine) à 4 ou à 7 branches ayant un cœur respectivement de porphirine[140] ou de cyclodextrine[141] (Figure 1.24), ou encore les étoiles de PEI à 6 branches avec un cœur poly(éthylène glycol)[84] (Figure 1.25) ou celles à 5 branches possédant un cœur PEG-PCL.

III. PEI en étoile pour le transfert de gènes : état de l'art

1. Etat de l'art sur les PEI en étoile

A notre connaissance, les seules PEI en étoile décrites dans la littérature sont des copolymères dont la structure est souvent complexe. Petersen *et al.* ont synthétisé des polymères en étoile poly(éthylène glycol)-*b*-polyéthylèneimine. La structure en étoile est donnée par un cœur de PEG possédant 4 ou 8 branches sur lesquelles est greffée de la PEI branchée de faible MM (800 ou 2000 Da) (Figure 1.25). Ces structures étoilées complexaient mieux l'ADN que les *b*PEI de 800 ou 2000 Da, et de manière comparable à la *b*PEI 25 kDa en présentant l'avantage de former des complexes plus stables et peut être moins toxiques de par leur densité de charges positives moins élevée[84].

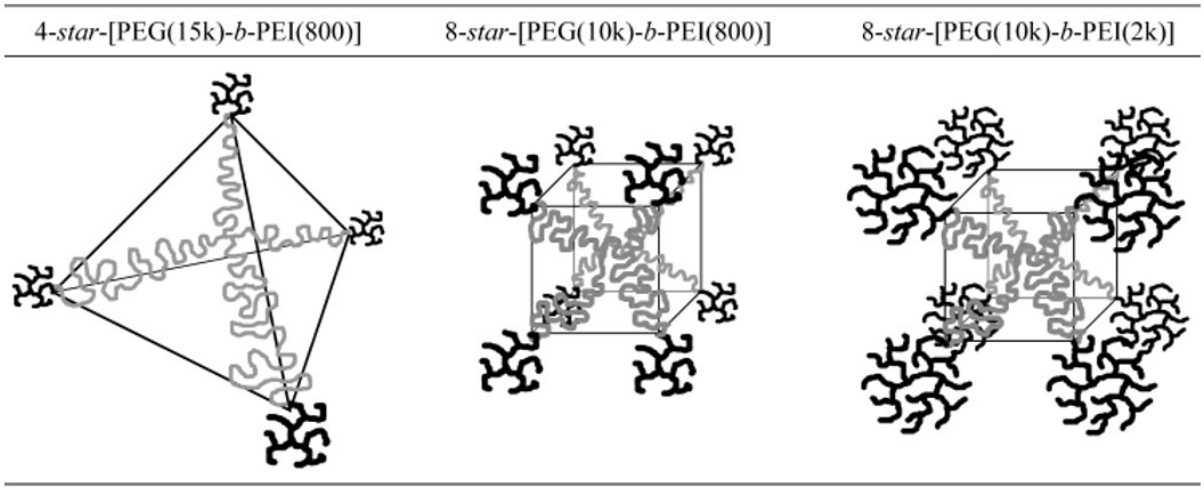


Figure 1.25. Structure des polymères en étoile synthétisés par Petersen *et al.*[84]

Yang *et al.* ont, quant à eux, synthétisé des étoiles en couplant de la PEI linéaire ou branchée à un cœur d'α-cyclodextrine. Ils ont mis en évidence que ces étoiles étaient capables de complexer l'ADN à des ratios N/P supérieurs ou égaux à 8/1 pour former des nanoparticules de taille comprise entre 100 et 200 nm et qu'elles présentaient une cytotoxicité moindre par rapport à la *b*PEI 25k et une efficacité de transfection du même ordre de grandeur[142]. Dans la continuité de ce travail, l'équipe de Huang a synthétisé des étoiles en greffant de la *b*PEI de faible MM (600 Da) sur de la 2-hydroxypropyl-γ-cyclodextrine. Ils y ont ensuite greffé l'oligopeptide MC-10 qui possède une forte affinité avec le récepteur HER2, souvent fortement exprimé à la surface des cellules cancéreuses (Figure 1.26). L'étoile de PEI ainsi synthétisée s'est avérée : complexer efficacement l'ADN pour former un polyplexe d'environ 200 nm à un ratio N/P 40, présenter une faible cytotoxicité et une bonne efficacité de transfection des cellules humaines cancéreuses de l'ovaire SKOV-3 ainsi qu'une forte affinité pour le récepteur HER2[143].

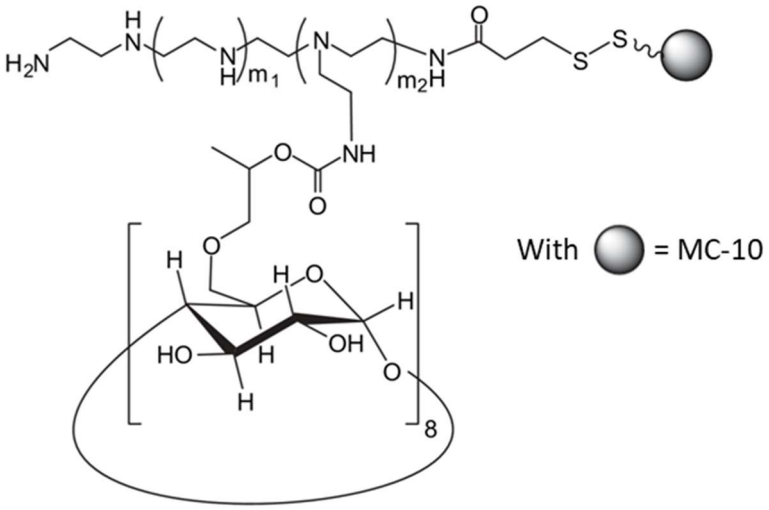


Figure 1.26. Structure de la PEI en étoile synthétisée par Huang *et al.*[143]

Dans tous les cas cités, la structure s'apparente plus à un dendrimère qu'à une étoile au nombre de branches bien défini. A notre connaissance, des PEI en étoile de structure bien définie n'ont pas été décrites jusqu'alors.

2. Etat de l'art sur les POx en étoile

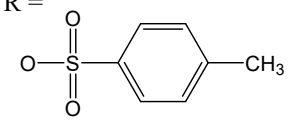
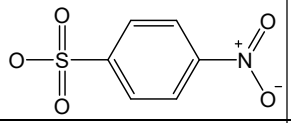
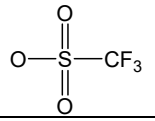
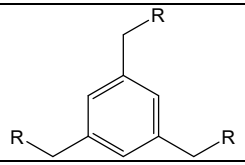
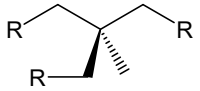
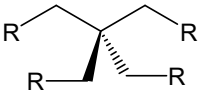
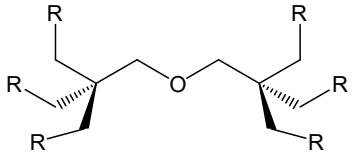
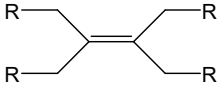
Que ce soit pour leur potentiel applicatif inhérent ou celui de leur équivalent PEI (obtenu après hydrolyse), plusieurs groupes se sont déjà attelés à la synthèse de POx en étoile.

Quelques exemples de synthèse d'étoiles de POx obtenues par la stratégie « arm-first » sont décrits dans la littérature[121]. Schacher *et al.* ont par exemple synthétisé des poly(2-éthyl-2-oxazoline) (PEtOx) linéaires fonctionnalisées par des fonctions azides. Le couplage de ces précurseurs linéaires avec une porphyrine préalablement modifiée avec 4 fonctions alcyne a permis l'obtention d'étoiles à 4 branches dont le cœur est capable de complexer le cuivre ou le fer[144].

Toutefois, la majorité des étoiles de POx a été obtenue par une voie de synthèse « core-first ». Il existe de nombreux exemples de polymérisation d'étoiles de 2-oxazolines à partir d'amorceurs multifonctionnels de type : pluritosylate[145–147], plurinosylate[148], pluritriflate[149,150], plurihalogénures[145,151–153] possédant des cœurs variés. Le Tableau 1.3 répertorie les combinaisons cœur / fonctions amorçantes décrites dans la littérature.

Luxenhofer et al.[149] ont par exemple synthétisé des PMeOx linéaires et en étoiles à 3 et 4 branches à partir d'amorceurs mono, bis, tris ou tétratriflate.

Tableau 1.3. Principaux amorceurs multifonctionnels décrits pour la synthèse divergente d'étoiles de POx

	Tosylate R = 	Nosylate R = 	Triflate R = 	Halogénure R = Cl, Br, I
	Chujo *et al.*[145] Adeli *et al.*[147]			Chujo *et al.*[145] (R=Br, I)
Cyclodextrine derivative				Pereira *et al.*[126]
			Luxenhofer *et al.*[149]	
	Hoogenboom *et al.*[146]		Luxenhofer *et al.*[149]	
	Hoogenboom *et al.*[146]	Kowalczuk *et al.*[148]		
				Kobayashi *et al.*[151]
Porphyrin derivative	Hoogenboom *et al.*[146]			Jin[154] (-Ph-CH_2-Cl)
Triphenylene derivative				Ogoshi *et al.*[153]
Metal-centered star polymers				McAlvin and Fraser[155,156] , Schubert *et al.*[157]
Hexachlorocyclotriphosphazene				Chang *et al.*[158]
Polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS)	Kim et al.[127]			Kim et al.[127] (Ph-CH_2-I)

Partie 3 – Physicochimie des formulations de polyplexes à base d'ADN et de polymère cationique

Dans l'optique de préparer les polyplexes les plus petits possibles qui seront ainsi capables de franchir les barrières préalablement présentées, l'étape de formulation a toute son importance[159]. Le but de cette courte partie est de définir dans un premier temps les polyélectrolytes (classe de polymère dont l'ADN et la PEI font partie) afin d'aborder ensuite les conditions de formulation.

I. Les polyélectrolytes

L'ADN étant un polyanion et la polyéthylèneimine un polycation, la formation d'un complexe ADN/PEI peut être étudiée comme la formation d'un complexe de 2 polyéléctrolytes de charges opposées qui implique des interactions électrostatiques entre les deux composants, la conformation des chaînes, l'entropie des contre-ions, et dépend du rapport des concentrations des deux polymères, ainsi que de celui des charges et de la concentration en sels du milieu[160].

L'ADN est un polyélectrolyte dit « fort » car la dissociation de tous les groupes ionisables est totale. L'ADN double brin possède deux charges négatives par paire de bases qui sont portées par les phosphates. Cette densité de charges élevée de 2*e* pour 3,4 Å est en partie responsable de l'étirement et de la rigidification de la chaîne par répulsion des unités de répétition entre elles. Malgré cette dissociation totale des charges, le phénomène de « condensation des contre-ions », décrit entre autre par Manning[161] diminue la charge effective d'un polyélectrolyte. La longueur de Bjerrum (l_B) est définie comme la distance entre deux charges élémentaires pour laquelle l'énergie d'interaction entre ces 2 charges est égale à l'énergie thermique k_BT.

Elle s'écrit $l_B = \frac{e_0^2}{4\pi\varepsilon_r\varepsilon_0 k_B T}$ avec e_0 la charge élémentaire ($1{,}602.10^{-19}$ A.s), ε_r la constante diélectrique relative du milieu, ε_0 la permittivité du vide ($8{,}8542.10^{-12}$ F.m^{-1}), k_B la constante de Boltzmann ($1{,}38.10^{-23}$ F.m^{-1}) et T la température en Kelvin. Si la distance entre 2 charges le long d'une chaîne polyélectrolyte est trop faible ($d < l_B$), une partie des contre-ions sont piégés

dans la chaîne polyélectrolyte par le phénomène de « condensation de Manning » pour diminuer la charge effective de la chaîne.

La polyéthylèneimine, quant à elle, est considérée comme un polyélectrolyte faible car ses groupes ionisables, les amines secondaires du squelette, sont des bases faibles. Son degré d'ionisation dépend du pH du milieu. Dans l'eau, chaque amine neutre est en équilibre avec sa forme protonée comme le formalise l'équation ci-dessous dont la constante d'équilibre est notée K_b.

$$PEI_N + H_2O \leftrightarrows PEI_{NH^+} + OH^- \qquad \text{avec } K_b = \frac{[PEI_{NH+}]\times[OH^-]}{[PEI_N]}$$

Le logarithme négatif de la constante de basicité K_b noté pK_b évolue avec le pH (Figure 1.27). En effet, plus le taux d'ionisation α est grand (*i.e.* plus le nombre d'azote protoné augmente), plus la protonation des azotes à proximité est difficile, donc plus le pK_b augmente et plus le pH devra être faible pour permettre la protonation des azotes suivants. Pour une polybase faible comme la PEI, le pH de la solution, le pK_e (logarithme négatif de la constante ionique de l'eau, $pK_e = 14$) et le pK_b (logarithme négatif de la constante de basicité de la PEI) sont liés par l'équation suivante :

$$pK_b = pK_e - pH + log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right)$$

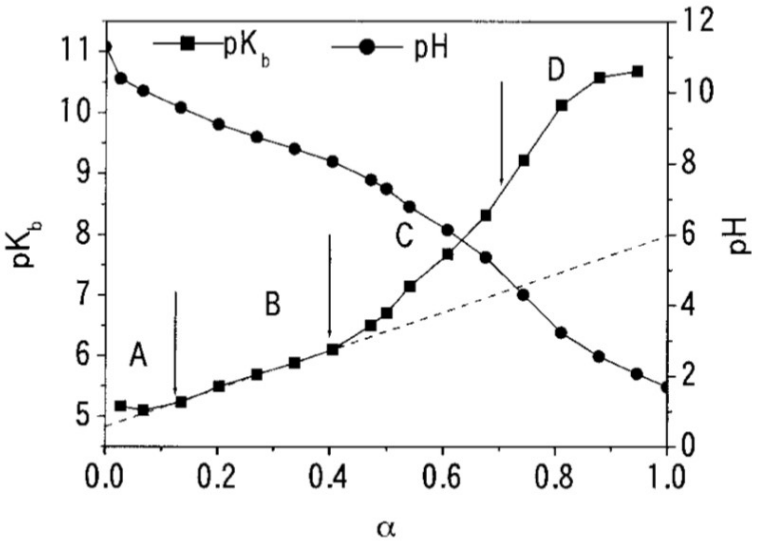


Figure 1.27. Logarithme négatif de la constante de basicité pK_b et pH en fonction du degré d'ionisation α d'une solution de PEI à 1% massique. Extrait de [162]

II. Formulation des polyplexes

1. Mode de formulation et diagramme de phase

Dans ses travaux de thèse, Valentina Mengarelli[160] s'est intéressée aux complexes de polyélectrolytes et en particulier aux complexes d'ADN (146 bp) et de *l*PEI. Pour tracer le diagramme de phase de complexation (Figure 1.28), une solution de polyéthylèneimine est ajoutée progressivement à une solution d'ADN et le rayon hydrodynamique du polyplexe est mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS). x est le rapport global du nombre de charges positives du polycation (PEI) sur le nombre de charges négatives du polyanion (ADN) (ce rapport est parfois noté N^+/P^-). On le différenciera du rapport N/P qui est le rapport du nombre d'azote de la PEI sur le nombre de phosphate de l'ADN et qui ne tient pas compte du taux de protonation des amines de la PEI). L'ADN seul a une taille d'environ 200 nm. Chaque point du diagramme est obtenu à l'équilibre et en milieu très dilué. Pour $x < 0,6$ le polyplexe possède une charge globale négative et se comporte comme une macromolécule d'ADN seule. Pour $x > 0,6$ le rayon hydrodynamique du polyplexe croît très fortement jusqu'à atteindre une valeur maximale de plusieurs µm pour $0,8 < x < 1$. Autrement dit, quand la charge du polyplexe approche de la neutralité ($x = 1$), les polyplexes s'agrègent fortement et forment des particules de très grande taille. Si on continue à ajouter de la PEI, le R_h diminue à nouveau jusqu'à se stabiliser à une valeur de l'ordre de 130 nm pour $x > 1,1$. Les polyplexes présentent alors une charge globale de surface positive et c'est par répulsion électrostatique des polyplexes chargés positivement entre eux qu'une solution colloïdale stable est à nouveau obtenue.

Il serait donc logique de choisir de formuler en ajoutant la solution d'ADN dans la solution de PEI pour contourner ce diagramme de phase. Cependant, il a été montré que les polyplexes formulés dans ce sens présentaient une efficacité de transfection bien plus faible que ceux formulés en introduisant la solution de PEI dans celle d'ADN. C'est pourquoi aujourd'hui, les formulations sont effectuées exclusivement en se déplaçant de la gauche vers la droite dans le diagramme de phase présenté à la Figure 1.28, c'est-à-dire en ajoutant la solution de PEI dans la solution d'ADN.

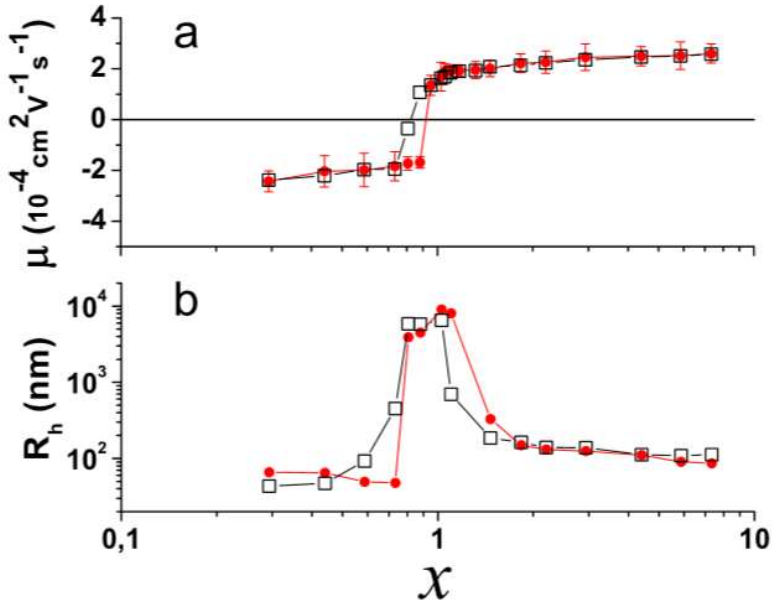


Figure 1.28. a) mobilité électrophorétique et b) rayon hydrodynamique tracés en fonction du rapport de charges *x*. Concentration en ADN c =0,01% (w/v), force ionique [I]=0,15 M et pH=7.4. Complexe ADN/*l*PEI-2,5kDa (□), complexe ADN/*l*PEI-25kDa (•). Extrait de[163]

La cinétique de formation du complexe PEI/ADN est un point important. Selon la théorie de Manning, en raison de la très grande densité de charges négatives de l'ADN, des contre-ions libres en solution s'adsorbent sur le polymère et deviennent des contre-ions liés de façon à réduire la charge négative nette de l'ADN en dessous d'une valeur seuil qui dépend uniquement de la valence du contre-ion. Les contre-ions libres interagissent avec l'ADN uniquement via l'écrantage électrostatique décrit par Debye-Hückel tandis que les contre-ions liés, peuvent eux-aussi se déplacer mais en restant dans l'environnement immédiat de l'ADN (enveloppe de 7 Å). La condensation de l'ADN (réduction du volume occupé par l'ADN) peut avoir lieu quand une fraction critique des charges négatives portées par les phosphates de l'ADN est neutralisée par les cations de la PEI adsorbés sur la molécule d'ADN. Cette fraction critique dépend uniquement de la valence du contre-ion. La cinétique de condensation est lente (de l'ordre des minutes, voire des heures) et est d'autant plus lente que la concentration en ADN est élevée[164]. Au contraire, la cinétique de décomplexation est beaucoup plus rapide. Comme expliqué par Widom et Baldwin[164], la condensation de l'ADN en structure toroïdale en phase aqueuse a lieu en présence de cations de valence supérieure ou égale à 3 qui permettent la réticulation d'hélices d'ADN adjacentes par des ponts électrostatiques.

D'un point de vue thermodynamique, l'enthalpie est favorable à la condensation de l'ADN en raison de l'attraction des charges négatives de l'ADN et positives de la PEI. L'entropie l'est également car lorsqu'une molécule d'ADN et une molécule de PEI forment un complexe, il y a libération d'un grand nombre de contre-ions[165].

2. *In vivo* vs. *in vitro* : concentrations et nature des solutions

La concentration de recouvrement d'un polymère (C*) est la concentration à partir de laquelle les chaînes de polymère se touchent sans s'interpénétrer et est définie par[166] :
$C^* \approx 4/3\pi M / N_A R_G^3$ avec R_G le rayon de giration du polymère, M la masse molaire du polymère et N_A le nombre d'Avogadro.
Quand c < C*, on parle de solution *diluée* dans laquelle les chaînes de polymères sont éloignées les unes des autres.
Quand c > C*, on parle de solution *semi-diluée* dans laquelle les chaînes de polymères assez proches pour s'interpénétrer et forment donc un pseudo-réseau.

Les valeurs de concentrations de recouvrement de l'ADN varient en fonction de sa nature et de sa taille. Yoshikawa et coll.[167] ont calculé le rayon hydrodynamique des trois formes d'un ADNp de 106 kbp par évaluation du mouvement brownien en microscopie à fluorescence. Ils ont trouvé des diamètres de 940 nm pour la forme superenroulée, 770 nm pour la forme relâchée et 580 nm pour la forme linéaire. La valeur de C* étant directement dépendante du rayon de l'ADN, elle dépend donc du type d'ADN évalué.

Le passage de l'étude *in vitro* (*in cellulo*) à l'étude *in vivo* (chez l'être vivant) apporte des contraintes spécifiques en particulier en ce qui concerne les solutions utilisées dont les compositions et concentrations devront être choisies judicieusement. Pour transfecter des cellules en culture, les polyplexes sont préparés classiquement à partir d'une solution d'ADNp à 1 $mg.mL^{-1}$ à laquelle est ajouté le volume approprié d'une solution de polymère à 0,5 $mg.mL^{-1}$ de façon à obtenir le ratio massique polymère/ADNp souhaité. Les cellules sont ensuite transfectées en ajoutant au milieu de culture le volume de solution de polyplexe nécessaire pour avoir des solutions d'ADNp finales entre 1 et 5 $\mu g.mL^{-1}$.

Dans le cas des expériences *in vivo*, des contraintes supplémentaires apparaissent. Une souris pèse en moyenne 25 g et son volume sanguin total est en moyenne de 1,8 mL. Pour maintenir l'homéostasie du corps, le volume injecté à la souris ne doit pas dépasser 0,2 mL. En se basant sur les résultats de transfection par des vecteurs viraux[168] pour lesquels une quantité de $6{,}24.10^{14}$ particules par kg est nécessaire, on peut considérer qu'une quantité minimale de 126 µg d'ADN par souris est nécessaire pour espérer avoir un niveau de transfection suffisant.

En effet, en divisant par le nombre d'Avogadro, on trouve que cette quantité de $6{,}24.10^{14}$ particules par kg correspond à 1.10^{-9} mol de particules par kg. Pour une souris dont le poids est en moyenne de 20 g, il faudrait donc 2.10^{-11} mol par souris. Pour le plasmide pTG11033 de 9600 bp (soit, en prenant 660 $g.mol^{-1}$ en moyenne pour une paire de bases, de masse molaire $6{,}33.10^{6}$ $g.mol^{-1}$), ce nombre de moles correspondent donc à une masse de 126 µg d'ADNp par souris. Il est à noter que cette masse (et donc la concentration des solutions de polyplexes à préparer) est donc dépendante de la taille du plasmide d'intérêt.

Par conséquent, pour prétendre à des applications *in vivo*, il faut être en mesure de formuler les polyplexes à des concentrations en ADN élevées, de l'ordre de 1 $mg.mL^{-1}$ au minimum et ce, tout en empêchant l'agrégation des polyplexes entre eux pour maintenir leur taille inférieure à 100 nm ce qui reste le critère majeur pour que les polyplexes puissent passer les différentes barrières biologiques.

Smith *et al.*[169] ont estimés les valeurs des rayons de giration de fragments d'ADN de phage λ linéarisé de trois tailles différentes. A partir de ces derniers, et de la formule de C* donnée ci-dessus, nous avons estimés les C* pour ces trois tailles de plasmides linéarisés (Tableau 1.4). On peut noter qu'en visant une concentration de l'ordre de 1 $mg.mL^{-1}$, nous nous plaçons à la concentration de recouvrement C* pour un ADNp linéarisé de 9,4 kbp. Nous gardons en tête que l'ADNp (cyclique) occupe un volume inférieur à son équivalent linéaire, toutefois, cela présente une difficulté supplémentaire pour obtenir des solutions parfaitement diluées.

Tableau 1.4. Calcul des C* en fonction des R_G estimés par Smith *et al.*[169] pour 3 plasmides linéarisés de taille variable

size (bp)	MM ($g.mol^{-1}$)	R_G (µm)	C* ($g.L^{-1}$)
4361	2 878 000	0.18	3.43
6557	4 328 000	0.24	2.17
9416	6 215 000	0.31	1.45

Un autre point important concerne la nature des solutions. Pour l'utilisation *in vivo* notamment dans le cas de l'administration systémique, la présence de solutés dans les solutions de polyplexes est indispensable pour respecter l'homéostasie cellulaire. Les solutions doivent donc être préparées dans du glucose 5% ou dans 150 mM NaCl, ajoutant ainsi une contrainte supplémentaire.

Objectif de la thèse

Malgré l'existence de travaux antérieurs montrant qu'une structure plus compacte du polymère cationique permettait une meilleure transfection par les nanoparticules issues de la condensation de l'ADN, la synthèse de poly(éthylèneimine)s en étoile et leur évaluation biologique n'a pas été décrite à notre connaissance. Nous proposons donc dans ce travail de nous atteler à un exercice de synthèse macromoléculaire : démontrer qu'il est possible de synthétiser des poly(2-oxazoline)s d'architecture en étoile possédant jusqu'à 6 branches dans la gamme de masses molaires d'intérêt (entre 16 et 50 $kg.mol^{-1}$) et étudier les possibilités d'hydrolyse pour obtenir des PEI en étoile. Par la suite, nous essaierons de modifier les polymères par l'ajout de résidus histidine pour faciliter la délivrance cytosolique de gènes. La taille, la stabilité, l'efficacité de transfection et la cytotoxicité des polyplexes préparés à partir des différentes familles de polymères cationiques obtenues (avec ou sans résidus histidine) seront évaluées sur des cellules hépatiques en culture, avec pour but de mettre en évidence une éventuelle synergie entre les deux types de modifications : chimique et architecturale. Enfin, dans l'objectif de pouvoir utiliser ces polymères pour des tests in vivo, des conditions de formulation adaptées à l'obtention de polyplexes de taille inférieure à 100 nm et de concentration élevée seront étudiées.

Références

(1) Watson, J. D.; Crick, F. H. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738.

(2) Médicaments de thérapie génique - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé https://ansm.sante.fr/Produits-de-sante/Medicaments-de-therapie-genique (accessed Jun 26, 2019).

(3) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA In. **1998**, *391*, 6.

(4) Tatum, E. L. Molecular Biology, Nucleic Acids, and the Future of Medicine. *Perspectives in Biology and Medicine* **1966**, *10* (1), 19–32. https://doi.org/10.1353/pbm.1966.0027.

(5) Zinder, N. D.; Lederberg, J. Genetic Exchange in Salmonella. *J Bacteriol* **1952**, *64* (5), 679–699.

(6) Szybalska, E. H.; Szybalski, W. Genetics of Human Cell Lines. IV. DNA-Mediated Heritable Transformation of a Biochemical Trait. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1962**, *48* (12), 2026–2034.

(7) Rosenberg, S. A.; Packard, B. S.; Aebersold, P. M.; Solomon, D.; Topalian, S. L.; Toy, S. T.; Simon, P.; Lotze, M. T.; Yang, J. C.; Seipp, C. A.; et al. Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* **1988**, *319* (25), 1676–1680. https://doi.org/10.1056/NEJM198812223192527.

(8) Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T. S.; Clerici, M.; Shearer, G. M.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, P. L.; et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results after 4 Years. *Science* **1995**, *270* (5235), 475–480. https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475.

(9) Stolberg, S. G. The Biotech Death of Jesse Gelsinger. *The New York Times*. November 28, 1999.

(10) Wirth, T.; Parker, N.; Ylä-Herttuala, S. History of Gene Therapy. *Gene* **2013**, *525* (2), 162–169. https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137.

(11) Aiuti, A.; Roncarolo, M. G.; Naldini, L. Gene Therapy for ADA-SCID, the First Marketing Approval of an Ex Vivo Gene Therapy in Europe: Paving the Road for the next Generation of Advanced Therapy Medicinal Products. *EMBO Mol Med* **2017**, *9* (6), 737–740. https://doi.org/10.15252/emmm.201707573.

(12) Ylä-Herttuala, S. ADA-SCID Gene Therapy Endorsed By European Medicines Agency For Marketing Authorization. *Mol Ther* **2016**, *24* (6), 1013–1014. https://doi.org/10.1038/mt.2016.98.

(13) Edelstein, M. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide - indications http://www.abedia.com/wiley/indications.php (accessed Jul 2, 2019).

(14) Bertrand, N.; Leroux, J.-C. The Journey of a Drug-Carrier in the Body: An Anatomo-Physiological Perspective. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161* (2), 152–163. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.098.

(15) Masuda, I.; Matsuo, T.; Yasuda, T.; Matsuo, N. Gene Transfer with Liposomes to the Intraocular Tissues by Different Routes of Administration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1996**, *37* (9), 1914–1920.

(16) Zhao, J.; Stenzel, M. H. Entry of Nanoparticles into Cells: The Importance of Nanoparticle Properties. *Polymer Chemistry* **2018**, *9* (3), 259–272. https://doi.org/10.1039/C7PY01603D.

(17) Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' Entry into the Cell: Relevance to Drug Delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2009**, *66* (17), 2873–2896. https://doi.org/10.1007/s00018-009-0053-z.

(18) Doherty, G. J.; McMahon, H. T. Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* **2009**, *78* (1), 857–902. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.

(19) Pei, D.; Buyanova, M. Overcoming Endosomal Entrapment in Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2019**, *30* (2), 273–283. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00778.

(20) Rehman, Z. ur; Hoekstra, D.; Zuhorn, I. S. Protein Kinase A Inhibition Modulates the Intracellular Routing of Gene Delivery Vehicles in HeLa Cells, Leading to Productive Transfection. *Journal of Controlled Release* **2011**, *156* (1), 76–84. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.015.

(21) Pichon, C.; Billiet, L.; Midoux, P. Chemical Vectors for Gene Delivery: Uptake and Intracellular Trafficking. *Current Opinion in Biotechnology* **2010**, *21* (5), 640–645. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.07.003.

(22) Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. Size-Dependent Internalization of Particles via the Pathways of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis. *Biochem J* **2004**, *377* (Pt 1), 159–169. https://doi.org/10.1042/BJ20031253.

(23) Rehman, Z. ur; Hoekstra, D.; Zuhorn, I. S. Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis. *ACS Nano* **2013**, *7* (5), 3767–3777. https://doi.org/10.1021/nn3049494.

(24) Behr, J. L'éponge à protons : un moyen d'entrer dans une cellule auquel les virus n'ont pas pensé. *médecine/sciences* **1996**, *12* (1), 5656–5659. https://doi.org/10.4267/10608/603.

(25) Yang, S.; May, S. Release of Cationic Polymer-DNA Complexes from the Endosome: A Theoretical Investigation of the Proton Sponge Hypothesis. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129* (18), 185105. https://doi.org/10.1063/1.3009263.

(26) Vaidyanathan, S.; Chen, J.; Orr, B. G.; Banaszak Holl, M. M. Cationic Polymer Intercalation into the Lipid Membrane Enables Intact Polyplex DNA Escape from Endosomes for Gene Delivery. *Mol. Pharmaceutics* **2016**, *13* (6), 1967–1978. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00139.

(27) Maury, B.; Gonçalves, C.; Tresset, G.; Zeghal, M.; Cheradame, H.; Guégan, P.; Pichon, C.; Midoux, P. Influence of PDNA Availability on Transfection Efficiency of Polyplexes in Non-Proliferative Cells. *Biomaterials* **2014**, *35* (22), 5977–5985. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.007.

(28) Midoux, P.; Pigeon, L.; Gonçalves, C.; Pichon, C. Peptides Mediating DNA Transport on Microtubules and Their Impact on Non-Viral Gene Transfer Efficiency. *Bioscience Reports* **2017**, *37* (5), BSR20170995. https://doi.org/10.1042/BSR20170995.

(29) Pigeon, L.; Gonçalves, C.; Gosset, D.; Pichon, C.; Midoux, P. An E3-14.7K Peptide That Promotes Microtubules-Mediated Transport of Plasmid DNA Increases Polyplexes Transfection Efficiency. *Small* **2013**, *9* (22), 3845–3851. https://doi.org/10.1002/smll.201300217.

(30) Jovanovic-Talisman, T.; Tetenbaum-Novatt, J.; McKenney, A. S.; Zilman, A.; Peters, R.; Rout, M. P.; Chait, B. T. Artificial Nanopores That Mimic the Transport Selectivity of the Nuclear Pore Complex. *Nature* **2009**, *457* (7232), 1023. https://doi.org/10.1038/nature07600.

(31) Breuzard, G.; Tertil, M.; Gonçalves, C.; Cheradame, H.; Géguan, P.; Pichon, C.; Midoux, P. Nuclear Delivery of NFκB-Assisted DNA/Polymer Complexes: Plasmid DNA Quantitation by Confocal Laser Scanning Microscopy and Evidence of Nuclear Polyplexes by FRET Imaging. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (12), e71. https://doi.org/10.1093/nar/gkn287.

(32) Hosseinkhani, H.; Abedini, F.; Ou, K.-L.; Domb, A. J. Polymers in Gene Therapy Technology. *Polymers for Advanced Technologies* **2015**, *26* (2), 198–211. https://doi.org/10.1002/pat.3432.

(33) Edelstein, M. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide - vectors http://www.abedia.com/wiley/vectors.php (accessed Jul 31, 2019).

(34) McCormack, M. P.; Rabbitts, T. H. Activation of the T-Cell Oncogene LMO2 after Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *New England Journal of Medicine* **2004**, *350* (9), 913–922. https://doi.org/10.1056/NEJMra032207.

(35) Hacein-Bey-Abina, S.; Garrigue, A.; Wang, G. P.; Soulier, J.; Lim, A.; Morillon, E.; Clappier, E.; Caccavelli, L.; Delabesse, E.; Beldjord, K.; et al. Insertional Oncogenesis in 4 Patients after Retrovirus-Mediated Gene Therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation* **2008**, *118* (9), 3132–3142. https://doi.org/10.1172/JCI35700.

(36) Morissette, G.; Flamand, L. Herpesviruses and Chromosomal Integration. *Journal of Virology* **2010**, *84* (23), 12100–12109. https://doi.org/10.1128/JVI.01169-10.

(37) Bryant, L. M.; Christopher, D. M.; Giles, A. R.; Hinderer, C.; Rodriguez, J. L.; Smith, J. B.; Traxler, E. A.; Tycko, J.; Wojno, A. P.; Wilson, J. M. Lessons Learned from the Clinical Development and Market Authorization of Glybera. *Human Gene Therapy. Clinical Development* **2013**, *24* (2), 55. https://doi.org/10.1089/humc.2013.087.

(38) Vance, M. A.; Mitchell, A.; Samulski, R. J. AAV Biology, Infectivity and Therapeutic Use from Bench to Clinic. *Intechopen* **2015**. https://doi.org/10.5772/61988.

(39) Samulski, R. J.; Muzyczka, N. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annual Review of Virology* **2014**, *1* (1), 427–451. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085355.

(40) Ibraheem, D.; Elaissari, A.; Fessi, H. Gene Therapy and DNA Delivery Systems. *International Journal of Pharmaceutics* **2014**, *459* (1), 70–83. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.041.

(41) Morrison, C. $1-Million Price Tag Set for Glybera Gene Therapy. *Nature Biotechnology* **2015**, *33* (3), 217–218. https://doi.org/10.1038/nbt0315-217.

(42) Lundstrom, K. Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases* **2018**, *6* (2). https://doi.org/10.3390/diseases6020042.

(43) Kay, M. A.; Glorioso, J. C.; Naldini, L. Viral Vectors for Gene Therapy: The Art of Turning Infectious Agents into Vehicles of Therapeutics. *Nat Med* **2001**, *7* (1), 33–40. https://doi.org/10.1038/83324.

(44) Jooss, K.; Chirmule, N. Immunity to Adenovirus and Adeno-Associated Viral Vectors: Implications for Gene Therapy. *Gene Therapy* **2003**, *10* (11), 955–963. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302037.

(45) Mastrangelo, M. J.; Eisenlohr, L. C.; Gomella, L.; Lattime, E. C. Poxvirus Vectors: Orphaned and Underappreciated. *J Clin Invest* **2000**, *105* (8), 1031–1034.

(46) Mehier-Humbert, S.; Guy, R. H. Physical Methods for Gene Transfer: Improving the Kinetics of Gene Delivery into Cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57* (5), 733–753. https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.12.007.

(47) Kaddur, K.; Palanchon, P.; Tranquart, F.; Pichon, C.; Bouakaz, A. Sonoperméabilisation : alternative thérapeutique par ultrasons et microbulles. */data/revues/02210363/008811-C2/1777/* **2008**.

(48) Fabrication des OGM - Les OGM Thérapeutiques http://ogmisp.canalblog.com/archives/2006/03/27/1594800.html (accessed Aug 27, 2019).

(49) Behr, J.-P. DNA Strongly Binds to Micelles and Vesicles Containing Lipopolyamines or Lipointercalants. *Tetrahedron Letters* **1986**, *27* (48), 5861–5864. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)85347-2.

(50) Lemieux, P.; Guérin, N.; Paradis, G.; Proulx, R.; Chistyakova, L.; Kabanov, A.; Alakhov, V. A Combination of Poloxamers Increases Gene Expression of Plasmid DNA in Skeletal Muscle. *Gene Ther.* **2000**, *7* (11), 986–991. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301189.

(51) Dan, N. A. Lipid-Nucleic Acid Supramolecular Complexes: Lipoplex Structure and the Kinetics of Formation; 2015. https://doi.org/10.3934/biophy.2015.2.163.

(52) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *PNAS* **1987**, *84* (21), 7413–7417. https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413.

(53) Behr, J.-P. Gene Transfer with Synthetic Cationic Amphiphiles: Prospects for Gene Therapy. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5* (5), 382–389. https://doi.org/10.1021/bc00029a002.

(54) Belmadi, N.; Midoux, P.; Loyer, P.; Passirani, C.; Pichon, C.; Gall, T. L.; Jaffres, P.-A.; Lehn, P.; Montier, T. Synthetic Vectors for Gene Delivery: An Overview of Their Evolution Depending on Routes of Administration. *Biotechnology Journal* **2015**, *10* (9), 1370–1389. https://doi.org/10.1002/biot.201400841.

(55) Oudrhiri, N.; Vigneron, J. P.; Peuchmaur, M.; Leclerc, T.; Lehn, J. M.; Lehn, P. Gene Transfer by Guanidinium-Cholesterol Cationic Lipids into Airway Epithelial Cells in Vitro and in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94* (5), 1651–1656. https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1651.

(56) Alton, E. W. F. W.; Armstrong, D. K.; Ashby, D.; Bayfield, K. J.; Bilton, D.; Bloomfield, E. V.; Boyd, A. C.; Brand, J.; Buchan, R.; Calcedo, R.; et al. Repeated Nebulisation of Non-Viral CFTR Gene Therapy in Patients with Cystic Fibrosis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2b Trial. *The Lancet Respiratory Medicine* **2015**, *3* (9), 684–691. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00245-3.

(57) Hyde, S. C.; Pringle, I. A.; Abdullah, S.; Lawton, A. E.; Davies, L. A.; Varathalingam, A.; Nunez-Alonso, G.; Green, A.-M.; Bazzani, R. P.; Sumner-Jones, S. G.; et al. CpG-Free Plasmids Confer Reduced Inflammation and Sustained Pulmonary Gene Expression. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (5), 549–551. https://doi.org/10.1038/nbt1399.

(58) Mauger, P.; Gall, T. L. E.; Montier, T. Vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes: application à la thérapie génique de la mucoviscidose. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* **2015**, *199* (6), 1001–1014. https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30874-X.

(59) Chen, J.; Wang, K.; Wu, J.; Tian, H.; Chen, X. Polycations for Gene Delivery: Dilemmas and Solutions. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (2), 338–349. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00688.

(60) Remy, J.-S.; Abdallah, B.; Zanta, M. A.; Boussif, O.; Behr, J.-P.; Demeneix, B. Gene Transfer with Lipospermines and Polyethylenimines. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *30* (1), 85–95. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00109-9.

(61) Redondo, J. A.; Martínez-Campos, E.; Plet, L.; Pérez-Perrino, M.; Navarro, R.; Corrales, G.; Pandit, A.; Reinecke, H.; Gallardo, A.; López-Lacomba, J. L.; et al. Polymeric Gene Carriers Bearing Pendant β-Cyclodextrin: The Relevance of Glycoside Permethylation on the "In Vitro" Cell Response. *Macromolecular Rapid Communications* **2016**, *37* (7), 575–583. https://doi.org/10.1002/marc.201500647.

(62) Cortez, M. A.; Godbey, W. T.; Fang, Y.; Payne, M. E.; Cafferty, B. J.; Kosakowska, K. A.; Grayson, S. M. The Synthesis of Cyclic Poly(Ethylene Imine) and Exact Linear Analogues: An Evaluation of Gene Delivery Comparing Polymer Architectures. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (20), 6541–6549. https://doi.org/10.1021/jacs.5b00980.

(63) Boussif, O.; Delair, T.; Brua, C.; Veron, L.; Pavirani, A.; Kolbe, H. V. J. Synthesis of Polyallylamine Derivatives and Their Use as Gene Transfer Vectors in Vitro. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10* (5), 877–883. https://doi.org/10.1021/bc9900439.

(64) Oskuee, R. K.; Dosti, F.; Gholami, L.; Malaekeh-Nikouei, B. A Simple Approach for Producing Highly Efficient DNA Carriers with Reduced Toxicity Based on Modified Polyallylamine. *Materials Science and Engineering: C* **2015**, *49*, 290–296. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.016.

(65) Wytrwal, M.; Leduc, C.; Sarna, M.; Goncalves, C.; Kepczynski, M.; Midoux, P.; Nowakowska, M.; Pichon, C. Gene Delivery Efficiency and Intracellular Trafficking of Novel Poly(Allylamine) Derivatives. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *478* (1), 372–382. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.053.

(66) Chu, D. S. H.; Schellinger, J. G.; Shi, J.; Convertine, A. J.; Stayton, P. S.; Pun, S. H. Application of Living Free Radical Polymerization for Nucleic Acid Delivery. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 1089–1099. https://doi.org/10.1021/ar200242z.

(67) Wu, G. Y.; Wu, C. H. Receptor-Mediated in Vitro Gene Transformation by a Soluble DNA Carrier System. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262* (10), 4429–4432.

(68) Wu, G. Y.; Wu, C. H. Evidence for Targeted Gene Delivery to Hep G2 Hepatoma Cells in Vitro. *Biochemistry* **1988**, *27* (3), 887–892. https://doi.org/10.1021/bi00403a008.

(69) Anderson, E. B.; Long, T. E. Imidazole- and Imidazolium-Containing Polymers for Biology and Material Science Applications. *Polymer* **2010**, *51* (12), 2447–2454. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.02.006.

(70) Ihm, J.-E.; Han, K.-O.; Han, I.-K.; Ahn, K.-D.; Han, D.-K.; Cho, C.-S. High Transfection Efficiency of Poly(4-Vinylimidazole) as a New Gene Carrier. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (4), 707–708. https://doi.org/10.1021/bc025611q.

(71) Brissault, B.; Kichler, A.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H.; Gau, J.; Auvray, L.; Guis, C. Synthesis, Characterization, and Gene Transfer Application of Poly(Ethylene

Glycol-b-Ethylenimine) with High Molar Mass Polyamine Block. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (10), 2863–2870. https://doi.org/10.1021/bm060499a.

(72) Dréan, M.; Debuigne, A.; Jérôme, C.; Goncalves, C.; Midoux, P.; Rieger, J.; Guégan, P. Poly(N-Methylvinylamine)-Based Copolymers for Improved Gene Transfection. *Macromol. Biosci.* **2018**, *18* (4), 1700353. https://doi.org/10.1002/mabi.201700353.

(73) Bertrand, E.; Gonçalves, C.; Billiet, L.; Gomez, J. P.; Pichon, C.; Cheradame, H.; Midoux, P.; Guégan, P. Histidinylated Linear PEI: A New Efficient Non-Toxic Polymer for Gene Transfer. *Chemical Communications* **2011**, *47* (46), 12547. https://doi.org/10.1039/c1cc15716g.

(74) Brissault, B.; Leborgne, C.; Guis, C.; Danos, O.; Cheradame, H.; Kichler, A. Linear Topology Confers in Vivo Gene Transfer Activity to Polyethylenimines. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17* (3), 759–765. https://doi.org/10.1021/bc050287v.

(75) Cao, Y.; Tan, Y. F.; Wong, Y. S.; Liew, M. W. J.; Venkatraman, S. Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery. *Mar Drugs* **2019**, *17* (6). https://doi.org/10.3390/md17060381.

(76) Meng, T.; Wu, J.; Yi, H.; Liu, J.; Lu, B.; Yuan, M.; Huang, X.; Yuan, H.; Hu, F. A Spermine Conjugated Stearic Acid-g-Chitosan Oligosaccharide Polymer with Different Types of Amino Groups for Efficient P53 Gene Therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *145*, 695–705. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.071.

(77) Gonzalez, H.; Hwang, S. J.; Davis, M. E. New Class of Polymers for the Delivery of Macromolecular Therapeutics. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10* (6), 1068–1074. https://doi.org/10.1021/bc990072j.

(78) Mellet, C. O.; Fernández, J. M. G.; Benito, J. M. Cyclodextrin-Based Gene Delivery Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (3), 1586–1608. https://doi.org/10.1039/C0CS00019A.

(79) Bennevault-Celton, V.; Urbach, A.; Martin, O.; Pichon, C.; Guégan, P.; Midoux, P. Supramolecular Assemblies of Histidinylated α-Cyclodextrin in the Presence of DNA Scaffold during CDplexes Formation. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (12), 2404–2414. https://doi.org/10.1021/bc200167p.

(80) Dréan, M.; Guégan, P.; Detrembleur, C.; Jérôme, C.; Rieger, J.; Debuigne, A. Controlled Synthesis of Poly(Vinylamine)-Based Copolymers by Organometallic-Mediated Radical Polymerization. *Macromolecules* **2016**, *49* (13), 4817–4827. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b00992.

(81) Bohec, M. L.; Kenzo, K. B.; Piogé, S.; Mura, S.; Nicolas, J.; Casse, N.; Forcher, G.; Fontaine, L.; Pascual, S. Structure-PDNA Complexation and Structure–Cytotoxicity Relationships of PEGylated, Cationic Aminoethyl-Based Polyacrylates with Tunable Topologies. *Polym. Chem.* **2019**, *10* (15), 1968–1977. https://doi.org/10.1039/C8PY01776J.

(82) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92* (16), 7297–7301. https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297.

(83) Demadis, K. D.; Paspalaki, M.; Theodorou, J. Controlled Release of Bis(Phosphonate) Pharmaceuticals from Cationic Biodegradable Polymeric Matrices. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2011**, *50* (9), 5873–5876. https://doi.org/10.1021/ie102546g.

(84) Petersen, H.; Kunath, K.; Martin, A. L.; Stolnik, S.; Roberts, C. J.; Davies, M. C.; Kissel, T. Star-Shaped Poly(Ethylene Glycol)-Block-Polyethylenimine Copolymers Enhance DNA Condensation of Low Molecular Weight Polyethylenimines. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (5), 926–936. https://doi.org/10.1021/bm025539z.

(85) Gembitskii, P. A.; Chmarin, A. I.; Kleshcheva, N. A.; Zhuk, D. S. The Polymerization of Ethylenimine to Give Linear Polyethylenimine. *Polymer Science U.S.S.R.* **1978**, *20* (7), 1695–1702. https://doi.org/10.1016/0032-3950(78)90424-0.

(86) Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G. Poly(Ethylenimine) and Its Role in Gene Delivery. *Journal of Controlled Release* **1999**, *60* (2–3), 149–160. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00090-5.

(87) Saegusa, T.; Ikeda, H.; Fujii, H. Crystalline Polyethylenimine. *Macromolecules* **1972**, *5* (1), 108–108. https://doi.org/10.1021/ma60025a029.

(88) Jeong, J. H.; Song, S. H.; Lim, D. W.; Lee, H.; Park, T. G. DNA Transfection Using Linear Poly(Ethylenimine) Prepared by Controlled Acid Hydrolysis of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline). *Journal of Controlled Release* **2001**, *73* (2–3), 391–399. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00310-8.

(89) Kem, K. M. Kinetics of the Hydrolysis of Linear Poly[(Acylimino)-Ethylenes]. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* **1979**, *17* (7), 1977–1990. https://doi.org/10.1002/pol.1979.170170708.

(90) Willner, I.; Eichen, Y.; Frank, A. J.; Fox, M. A. Photoinduced Electron-Transfer Processes Using Organized Redox-Functionalized Bipyridinium-Polyethylenimine-Titania Colloids and Particulate Assemblies. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (28), 7264–7271. https://doi.org/10.1021/j100130a024.

(91) von Gersdorff, K.; Sanders, N. N.; Vandenbroucke, R.; De Smedt, S. C.; Wagner, E.; Ogris, M. The Internalization Route Resulting in Successful Gene Expression Depends on Both Cell Line and Polyethylenimine Polyplex Type. *Molecular Therapy* **2006**, *14* (5), 745–753. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.07.006.

(92) Blakney, A. K.; Yilmaz, G.; McKay, P. F.; Becer, C. R.; Shattock, R. J. One Size Does Not Fit All: The Effect of Chain Length and Charge Density of Poly(Ethylene Imine) Based Copolymers on Delivery of PDNA, MRNA, and RepRNA Polyplexes. *Biomacromolecules* **2018**. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00429.

(93) Rinkenauer, A. C.; Vollrath, A.; Schallon, A.; Tauhardt, L.; Kempe, K.; Schubert, S.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Parallel High-Throughput Screening of Polymer Vectors for Nonviral Gene Delivery: Evaluation of Structure–Property Relationships of Transfection. *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15* (9), 475–482. https://doi.org/10.1021/co400025u.

(94) Kafil, V.; Omidi, Y. Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells. *BioImpacts : BI* **2011**, *1*, 23–30. https://doi.org/10.5681/bi.2011.004.

(95) Hanzlíková, M.; Ruponen, M.; Galli, E.; Raasmaja, A.; Aseyev, V.; Tenhu, H.; Urtti, A.; Yliperttula, M. Mechanisms of Polyethylenimine-Mediated DNA Delivery: Free Carrier Helps to Overcome the Barrier of Cell-Surface Glycosaminoglycans. *J Gene Med* **2011**, *13* (7–8), 402–409. https://doi.org/10.1002/jgm.1587.

(96) Saegusa, T.; Kobayashi, S. Polymerization of Cyclic Imino Ethers. *International Review of Science Physical Chemistry Series 2* **1975**, *8*, 153–190.

(97) Tomalia, D. A.; Sheetz, D. P. Homopolymerization of 2-Alkyl-and 2-Aryl-2-Oxazolines. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1966**, *4* (9), 2253–2265.

(98) Seeliger, W.; Aufderhaar, E.; Diepers, W.; Feinauer, R.; Nehring, R.; Thier, W.; Hellmann, H. Recent Syntheses and Reactions of Cyclic Imidic Esters. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1966**, *5* (10), 875–888. https://doi.org/10.1002/anie.196608751.

(99) Bassiri, T. G.; Levy, A.; Litt, M. Polymerization of Cyclic Imino Ethers. I. Oxazolines. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **1967**, *5* (9), 871–879. https://doi.org/10.1002/pol.1967.110050927.

(100) Kagiya, T.; Narisawa, S.; Maeda, T.; Fukui, K. Ring-Opening Polymerization of 2-Substituted 2-Oxazolines. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **1966**, *4* (7), 441–445. https://doi.org/10.1002/pol.1966.110040701.

(101) Szwarc, M. 'Living' Polymers. *Nature* **1956**, *178* (4543), 1168–1169. https://doi.org/10.1038/1781168a0.

(102) Aoi, K.; Okada, M. Polymerization of Oxazolines. *Progress in Polymer Science* **1996**, *21*, 151–208.

(103) Verbraeken, B.; Monnery, B. D.; Lava, K.; Hoogenboom, R. The Chemistry of Poly(2-Oxazoline)s. *European Polymer Journal* **2017**, *88*, 451–469. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.11.016.

(104) Hoogenboom, R.; Fijten, M. W. M.; Schubert, U. S. Parallel Kinetic Investigation of 2-Oxazoline Polymerizations with Different Initiators as Basis for Designed Copolymer Synthesis. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, *42* (8), 1830–1840. https://doi.org/10.1002/pola.20024.

(105) Guillerm, B.; Monge, S.; Lapinte, V.; Robin, J.-J. How to Modulate the Chemical Structure of Polyoxazolines by Appropriate Functionalization. *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33* (19), 1600–1612. https://doi.org/10.1002/marc.201200266.

(106) Glassner, M.; Vergaelen, M.; Hoogenboom, R. Poly(2-Oxazoline)s: A Comprehensive Overview of Polymer Structures and Their Physical Properties. *Polym. Int* **2018**, *67*, 32–45. https://doi.org/10.1002/pi.5457.

(107) Adams, N.; Schubert, U. S. Poly(2-Oxazolines) in Biological and Biomedical Application Contexts. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59* (15), 1504–1520. https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.018.

(108) Lorson, T.; Lübtow, M. M.; Wegener, E.; Haider, M. S.; Borova, S.; Nahm, D.; Jordan, R.; Sokolski-Papkov, M.; Kabanov, A. V.; Luxenhofer, R. Poly(2-Oxazoline)s Based Biomaterials: A Comprehensive and Critical Update. *Biomaterials* **2018**, *178*, 204–280. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.022.

(109) Lemechko, P.; Renard, E.; Volet, G.; Colin, C. S.; Guezennec, J.; Langlois, V. Functionalized Oligoesters from Poly(3-Hydroxyalkanoate)s Containing Reactive End Group for Click Chemistry: Application to Novel Copolymer Synthesis with Poly(2-Methyl-2-Oxazoline). *Reactive and Functional Polymers* **2012**, *72* (2), 160–167. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2011.12.005.

(110) Le Fer, G.; Amiel, C.; Volet, G. Copolymers Based on Azidopentyl-2-Oxazoline: Synthesis, Characterization and LCST Behavior. *European Polymer Journal* **2015**, *71*, 523–533. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.08.028.

(111) Kakuda, H.; Okada, T.; Hasegawa, T. Temperature-Induced Molecular Structural Changes of Linear Poly(ethylene imine) in Water Studied by Mid-Infrared and Near-Infrared Spectroscopies https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp9048204 (accessed Dec 4, 2018). https://doi.org/10.1021/jp9048204.

(112) Lambermont-Thijs, H. M. L.; van der Woerdt, F. S.; Baumgaertel, A.; Bonami, L.; Du Prez, F. E.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R. Linear Poly(Ethylene Imine)s by Acidic Hydrolysis of Poly(2-Oxazoline)s: Kinetic Screening, Thermal Properties, and Temperature-Induced Solubility Transitions. *Macromolecules* **2010**, *43* (2), 927–933. https://doi.org/10.1021/ma9020455.

(113) de la Rosa, V. R.; Bauwens, E.; Monnery, B. D.; De Geest, B. G.; Hoogenboom, R. Fast and Accurate Partial Hydrolysis of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) into Tailored Linear Polyethylenimine Copolymers. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (17), 4957–4964. https://doi.org/10.1039/C4PY00355A.

(114) Lambermont-Thijs, H. M. L.; Heuts, J. P. A.; Hoeppener, S.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Selective Partial Hydrolysis of Amphiphilic Copoly(2-Oxazoline)s as Basis for Temperature and PH Responsive Micelles. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (2), 313–322. https://doi.org/10.1039/C0PY00052C.

(115) Moghimi, S. M.; Symonds, P.; Murray, J. C.; Hunter, A. C.; Debska, G.; Szewczyk, A. A Two-Stage Poly(Ethylenimine)-Mediated Cytotoxicity: Implications for Gene

Transfer/Therapy. *Molecular Therapy* **2005**, *11* (6), 990–995. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.02.010.

(116) Vicennati, P.; Giuliano, A. E.; Ortaggi, G.; Masotti, A. Polyethylenimine in Medicinal Chemistry. *Current medicinal chemistry* **2008**, *15* (27), 2826–2839. https://doi.org/10.2174/092986708786242778.

(117) Smith, R. J.; Beck, R. W.; Prevette, L. E. Impact of Molecular Weight and Degree of Conjugation on the Thermodynamics of DNA Complexation and Stability of Polyethylenimine-Graft-Poly(Ethylene Glycol) Copolymers. *Biophysical Chemistry* **2015**, *203–204*, 12–21. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2015.04.005.

(118) Pichon, C.; Gonçalves, C.; Midoux, P. Histidine-Rich Peptides and Polymers for Nucleic Acids Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *53* (1), 75–94. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00221-6.

(119) Billiet, L.; Gomez, J.-P.; Berchel, M.; Jaffrès, P.-A.; Le Gall, T.; Montier, T.; Bertrand, E.; Cheradame, H.; Guégan, P.; Mével, M.; et al. Gene Transfer by Chemical Vectors, and Endocytosis Routes of Polyplexes, Lipoplexes and Lipopolyplexes in a Myoblast Cell Line. *Biomaterials* **2012**, *33* (10), 2980–2990. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.027.

(120) Ren, J. M.; McKenzie, T. G.; Fu, Q.; Wong, E. H. H.; Xu, J.; An, Z.; Shanmugam, S.; Davis, T. P.; Boyer, C.; Qiao, G. G. Star Polymers. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (12), 6743–6836. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00008.

(121) Wilson, P.; Ke, P. C.; Davis, T. P.; Kempe, K. Poly(2-Oxazoline)-Based Micro- and Nanoparticles: A Review. *European Polymer Journal* **2017**, *88*, 486–515. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.09.011.

(122) Yang, D.-P.; Oo, M. N. N. L.; Deen, G. R.; Li, Z.; Loh, X. J. Nano-Star-Shaped Polymers for Drug Delivery Applications. *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*. https://doi.org/10.1002/marc.201700410.

(123) Lambermont-Thijs, H. M. L.; Fijten, M. W. M.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R. Star-Shaped Poly(2-Oxazoline)s by Dendrimer Endcapping. *Australian Journal of Chemistry* **2011**, *64* (8), 1026. https://doi.org/10.1071/CH11128.

(124) Fijten, M. W. M.; Haensch, C.; Lankvelt, B. M. van; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Clickable Poly(2-Oxazoline)s as Versatile Building Blocks. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2008**, *209* (18), 1887–1895. https://doi.org/10.1002/macp.200800226.

(125) Zhang, C.; Liu, S.; Tan, L.; Zhu, H.; Wang, Y. Star-Shaped Poly(2-Methyl-2-Oxazoline)-Based Films: Rapid Preparation and Effects of Polymer Architecture on Antifouling Properties. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3* (27), 5615–5628. https://doi.org/10.1039/C5TB00732A.

(126) Pereira, G.; Huin, C.; Morariu, S.; Bennevault-Celton, V.; Guégan, P. Synthesis of Poly(2-Methyl-2-Oxazoline) Star Polymers with a β-Cyclodextrin Core. *Aust. J. Chem.* **2012**, *65* (8), 1145–1155. https://doi.org/10.1071/CH12232.

(127) Kim, K.-M.; Ouchi, Y.; Chujo, Y. Synthesis of Organic-Inorganic Star-Shaped Polyoxazolines Using Octafunctional Silsesquioxane as an Initiator. *Polymer Bulletin* **2003**, *49* (5), 341–348. https://doi.org/10.1007/s00289-002-0113-0.

(128) Weberskirch, R.; Hettich, R.; Nuyken, O.; Schmaljohann, D.; Voit, B. Synthesis of New Amphiphilic Star Polymers Derived from a Hyperbranched Macroinitiator by the Cationic 'Grafting from' Method. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1999**, *200* (4), 863–873. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3935(19990401)200:4<863::AID-MACP863>3.0.CO;2-N.

(129) Zimm, B. H.; Stockmayer, W. H. The Dimensions of Chain Molecules Containing Branches and Rings. *The Journal of Chemical Physics* **1949**, *17* (12), 1301–1314. https://doi.org/10.1063/1.1747157.

(130) Zimm, B. H.; Kilb, R. W. Dynamics of Branched Polymer Molecules in Dilute Solution. *Journal of Polymer Science* **1959**, *37* (131), 19–42. https://doi.org/10.1002/pol.1959.1203713102.

(131) Jackson, C.; Frater, D. J.; Mays, J. W. Dilute Solution Properties of Asymmetric Six-Arm Star Polystyrenes. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **1995**, *33* (15), 2159–2166. https://doi.org/10.1002/polb.1995.090331507.

(132) Balke, S. T.; Mourey, T. H.; Robello, D. R.; Davis, T. A.; Kraus, A.; Skonieczny, K. Quantitative Analysis of Star-Branched Polymers by Multidetector Size-Exclusion Chromatography. *Journal of Applied Polymer Science* **2002**, *85* (3), 552–570. https://doi.org/10.1002/app.10539.

(133) Qiu, L. Y.; Bae, Y. H. Polymer Architecture and Drug Delivery. *Pharm Res* **2006**, *23* (1), 1–30. https://doi.org/10.1007/s11095-005-9046-2.

(134) Yasugi, K.; Nagasaki, Y.; Kato, M.; Kataoka, K. Preparation and Characterization of Polymer Micelles from Poly(Ethylene Glycol)-Poly(d,l-Lactide) Block Copolymers as Potential Drug Carrier. *Journal of Controlled Release* **1999**, *62* (1), 89–100. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00028-0.

(135) Kovár, M.; Strohalm, J.; Etrych, T.; Ulbrich, K.; Ríhová, B. Star Structure of Antibody-Targeted HPMA Copolymer-Bound Doxorubicin: A Novel Type of Polymeric Conjugate for Targeted Drug Delivery with Potent Antitumor Effect. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13* (2), 206–215.

(136) Gillies, E. R.; Dy, E.; Fréchet, J. M. J.; Szoka, F. C. Biological Evaluation of Polyester Dendrimer: Poly(Ethylene Oxide) "Bow-Tie" Hybrids with Tunable Molecular Weight and Architecture. *Molecular Pharmaceutics* **2005**, *2* (2), 129–138. https://doi.org/10.1021/mp049886u.

(137) Rinkenauer, A. C.; Schubert, S.; Traeger, A.; Schubert, U. S. The Influence of Polymer Architecture on in Vitro PDNA Transfection. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (38), 7477–7493. https://doi.org/10.1039/C5TB00782H.

(138) Yang, Y.-Y.; Wang, X.; Hu, Y.; Hu, H.; Wu, D.-C.; Xu, F.-J. Bioreducible POSS-Cored Star-Shaped Polycation for Efficient Gene Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (2), 1044–1052. https://doi.org/10.1021/am404585d.

(139) Xiu, K. M.; Yang, J. J.; Zhao, N. N.; Li, J. S.; Xu, F. J. Multiarm Cationic Star Polymers by Atom Transfer Radical Polymerization from β-Cyclodextrin Cores: Influence of Arm Number and Length on Gene Delivery. *Acta Biomaterialia* **2013**, *9* (1), 4726–4733. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.020.

(140) Ma, D.; Zhao, Y.; Zhou, X.-Y.; Lin, Q.-M.; Zhang, Y.; Lin, J.-T.; Xue, W. Photoenhanced Gene Transfection by a Star-Shaped Polymer Consisting of a Porphyrin Core and Poly(L-Lysine) Dendron Arms. *Macromol Biosci* **2013**, *13* (9), 1221–1227. https://doi.org/10.1002/mabi.201300139.

(141) Ma, D.; Zhang, H.-B.; Chen, Y.-Y.; Lin, J.-T.; Zhang, L.-M. New Cyclodextrin Derivative Containing Poly(L-Lysine) Dendrons for Gene and Drug Co-Delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* **2013**, *405*, 305–311. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.05.017.

(142) Yang, C.; Li, H.; Goh, S. H.; Li, J. Cationic Star Polymers Consisting of Alpha-Cyclodextrin Core and Oligoethylenimine Arms as Nonviral Gene Delivery Vectors. *Biomaterials* **2007**, *28* (21), 3245–3254. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.033.

(143) Huang, H.; Yu, H.; Tang, G.; Wang, Q.; Li, J. Low Molecular Weight Polyethylenimine Cross-Linked by 2-Hydroxypropyl-Gamma-Cyclodextrin Coupled to Peptide Targeting HER2 as a Gene Delivery Vector. *Biomaterials* **2010**, *31* (7), 1830–1838. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.012.

(144) Rudolph, T.; Crotty, S.; Schubert, U. S.; Schacher, F. H. Star-Shaped Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) Featuring a Porphyrin Core: Synthesis and Metal Complexation. *e-Polymers* **2015**, *15* (4), 227–235. https://doi.org/10.1515/epoly-2015-0041.

(145) Chujo, Y.; Sada, K.; Kawasaki, T.; Saegusa, T. Synthesis of Non-Ionic Hydrogel from Star-Shaped Polyoxazoline. *Polym. J.* **1992**, *24* (11), 1301–1306. https://doi.org/10.1295/polymj.24.1301.

(146) Hoogenboom, R.; Fijten, M. W. M.; Kickelbick, G.; Schubert, U. S. Synthesis and Crystal Structures of Multifunctional Tosylates as Basis for Star-Shaped Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)s. *Beilstein J Org Chem* **2010**, *6*, 773–783. https://doi.org/10.3762/bjoc.6.96.

(147) Adeli, M.; Zarnegar, Z.; Kabiri, R. Amphiphilic Star Copolymers Containing Cyclodextrin Core and Their Application as Nanocarrier. *European Polymer Journal* **2008**, *44* (7), 1921–1930. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.03.028.

(148) Kowalczuk, A.; Kronek, J.; Bosowska, K.; Trzebicka, B.; Dworak, A. Star Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)s-Synthesis and Thermosensitivity. *Polymer International* **2011**, *60* (7), 1001–1009. https://doi.org/10.1002/pi.3103.

(149) Luxenhofer, R.; Bezen, M.; Jordan, R. Kinetic Investigations on the Polymerization of 2-Oxazolines Using Pluritriflate Initators. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29* (18), 1509–1513.

(150) Rasolonjatovo, B.; Pitard, B.; Haudebourg, T.; Bennevault, V.; Guégan, P. Synthesis of Tetraarm Star Block Copolymer Based on Polytetrahydrofuran and Poly(2-Methyl-2-Oxazoline) for Gene Delivery Applications. *European Polymer Journal* **2017**, *88*, 689–700. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.09.042.

(151) Kobayashi, S.; Uyama, H.; Narita, Y.; Ishiyama, J. Novel Multifunctional Initiators for Polymerization of 2-Oxazolines. *Macromolecules* **1992**, *25* (12), 3232–3236.

(152) Jeerupan, J.; Ogoshi, T.; Hiramitsu, S.; Umeda, K.; Nemoto, T.; Konishi, G.; Yamagishi, T.; Nakamoto, Y. Star-Shaped Poly(2-Methyl-2-Oxazoline) Using by Reactive Bromoethyl Group Modified Calix[4]Resorcinarene as a Macrocyclic Initiator. *Polymer Bulletin* **2008**, *59* (6), 731–737. https://doi.org/10.1007/s00289-007-0809-2.

(153) Ogoshi, T.; Hiramitsu, S.; Yamagishi, T.; Nakamoto, Y. Columnar Stacks of Star- and Tadpole-Shaped Polyoxazolines Having Triphenylene Moiety and Their Applications for Synthesis of Wire-Assembled Gold Nanoparticles. *Macromolecules* **2009**, *42* (8), 3042–3047. https://doi.org/10.1021/ma900169j.

(154) Jin, R.-H. Controlled Location of Porphyrin in Aqueous Micelles Self-Assembled from Porphyrin Centered Amphiphilic Star Poly(Oxazolines). *Advanced Materials* **2002**, *14* (12), 889–892.

(155) McAlvin, J. E.; Fraser, C. L. Metal-Centered Star Block Copolymers: Amphiphilic Iron Tris(Bipyridine)-Centered Polyoxazolines and Their Chemical Fragmentation to Bipyridine-Centered BAB Triblock Copolymers. *Macromolecules* **1999**, *32* (5), 1341–1347. https://doi.org/10.1021/ma981396q.

(156) McAlvin, J. E.; Scott, S. B.; Fraser, C. L. Synthesis of Thermochromic Iron(II) Tris(Bipyridine)-Centered Star-Shaped Polyoxazolines and Their Bipyridine-Centered Macroligand Counterparts. *Macromolecules* **2000**, *33* (19), 6953–6964. https://doi.org/10.1021/ma000024q.

(157) Schubert, U. S.; Nuyken, O.; Hochwimmer, G. Polymers with Metal Binding Units: Bipyridine and Terpyridine Containing Polyoxazolines. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **2000**, *37* (6), 645–658. https://doi.org/10.1081/MA-100101115.

(158) Chang, J. Y.; Ji, H. J.; Han, M. J.; Rhee, S. B.; Cheong, S.; Yoon, M. Preparation of Star-Branched Polymers with Cyclotriphosphazene Cores. *Macromolecules* **1994**, *27* (6), 1376–1380. https://doi.org/10.1021/ma00084a015.

(159) *Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology*; Boisseau, P., Houdy, P., Lahmani, M., Eds.; Springer: Berlin, 2010.

(160) Mengarelli, V. Complexes de polyélectrolyres de charge opposée : des polymères synthétiques à la thérapie génique, Université de Paris 11 - Laboratoire de Physique des Solides, Orsay, 2009.

(161) Manning, G. S. Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties. *The Journal of Chemical Physics* **1969**, *51* (3), 924–933. https://doi.org/10.1063/1.1672157.

(162) Zhu, X.; Tang, F.; Suzuki, T. S.; Sakka, Y. Role of the Initial Degree of Ionization of Polyethylenimine in the Dispersion of Silicon Carbide Nanoparticles. *Journal of the American Ceramic Society* **2003**, *86* (1), 189–191. https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2003.tb03302.x.

(163) Mengarelli, V.; Auvray, L.; Pastré, D.; Zeghal, M. Charge Inversion, Condensation and Decondensation of DNA and Polystyrene Sulfonate by Polyethylenimine. *Eur. Phys. J. E* **2011**, *34* (11), 127. https://doi.org/10.1140/epje/i2011-11127-3.

(164) Widom, J.; Baldwin, R. L. Cation-Induced Toroidal Condensation of DNA. *Journal of Molecular Biology* **1980**, *144* (4), 431–453. https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90330-7.

(165) Bloomfield, V. A. DNA Condensation by Multivalent Cations. *Biopolymers* **1997**, *44* (3), 269–282. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)44:3<269::AID-BIP6>3.0.CO;2-T.

(166) Robertson, R. M.; Smith, D. E. Self-Diffusion of Entangled Linear and Circular DNA Molecules: Dependence on Length and Concentration. *Macromolecules* **2007**, *40* (9), 3373–3377. https://doi.org/10.1021/ma070051h.

(167) Araki, S.; Nakai, T.; Hizume, K.; Takeyasu, K.; Yoshikawa, K. Hydrodynamic Radius of Circular DNA Is Larger than That of Linear DNA. *Chemical Physics Letters* **2006**, *418* (1), 255–259. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.10.115.

(168) Yue, Y.; Pan, X.; Hakim, C. H.; Kodippili, K.; Zhang, K.; Shin, J.-H.; Yang, H. T.; McDonald, T.; Duan, D. Safe and Bodywide Muscle Transduction in Young Adult Duchenne Muscular Dystrophy Dogs with Adeno-Associated Virus. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24* (20), 5880–5890. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv310.

(169) Smith, D. E.; Perkins, T. T.; Chu, S. Dynamical Scaling of DNA Diffusion Coefficients. *Macromolecules* **1996**, *29* (4), 1372–1373. https://doi.org/10.1021/ma951455p.

Chapitre 2

Synthèse et caractérisation d'amorceurs multifonctionnels

Sommaire

Introduction 93

Partie 1 – Synthèse d'amorceurs multitosylates 95

I. Réaction de tosylation des alcools 95

II. Synthèse de molécules tétra- et hexatosylates 96

1. Synthèse et caractérisation du pentaérythritol tétratosylate 96

2. Synthèse et caractérisation du di(triméthylolpropane) tétratosylate 99

3. Synthèse et caractérisation du dipentaérythritol hexatosylate 101

III. Essais de tosylation et de mésylation de l'EDTE 102

1. Essais de tosylation de l'EDTE 102

2. Essais de mésylation de l'EDTE 103

Partie 2 – Synthèse d'amorceurs multitriflates 104

I. Réaction de triflatation des alcools 104

II. Synthèse de molécules tri-, tétra- et hexatriflate 105

1. Synthèse et caractérisation du pentaérythritol tétratriflate 105

2. Synthèse et caractérisation du 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane tristriflate 106

3. Synthèse et caractérisation du di(triméthylolpropane) tétratriflate 107

4. Synthèse et caractérisation du dipentaérythritol hexatriflate 108

III. Essais de triflatation infructeux 110

1. EDTE 110

2. Calix[4]arène 111

Conclusion 114

Références 115

Annexes 116

Introduction

L'amorçage de la polymérisation des 2-alkyl-2-oxazolines (Ox) est décrit à la Figure 2.1. Il consiste en une attaque nucléophile du doublet non-liant de l'atome d'azote du monomère oxazoline sur un site électrophile de l'amorceur. Il se forme alors un adduit ionique (sel d'oxazolinium) qui est en équilibre avec un adduit covalent (équilibre réversible ou irréversible), induisant deux mécanismes de polymérisation possibles (ionique ou covalent). La prédominance d'une forme devant l'autre dépend de la nucléophilie du contre-ion et du monomère[1]. Si le contre-ion X^- est plus nucléophile que le monomère, celui-ci attaque le carbone en α de l'oxygène, entraînant un clivage de la liaison C-O du cycle et la formation de l'adduit covalent. Un bon amorceur doit posséder un site suffisamment électrophile. Les alcools ne peuvent pas amorcer la polymérisation des oxazolines. Cependant, ils peuvent être transformés en bon groupe partant, créant ainsi un carbone électrophile en alpha de ces derniers. Dans le but d'obtenir une famille homogène d'amorceurs portant 3, 4 ou 6 fonctions amorçantes, des familles d'esters tosylates et triflates ont été synthétisées à partir d'alcools multifonctionnels commerciaux.

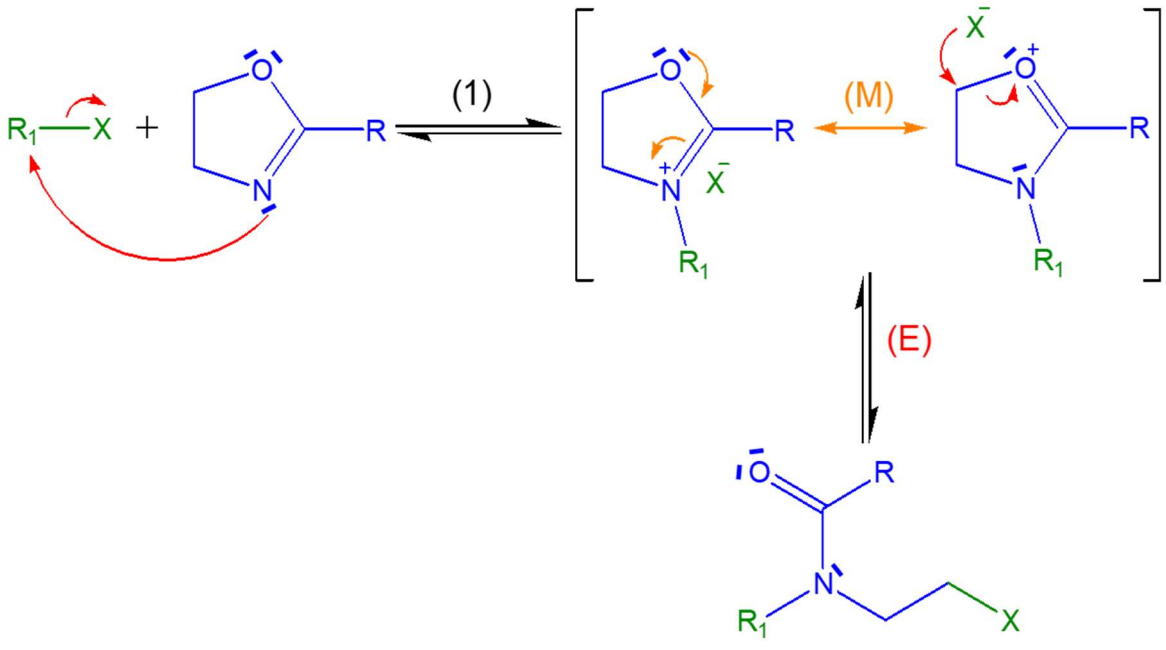


Figure 2.1. Mécanisme d'amorçage de la polymérisation des 2-alkyl-2-oxazolines : (1) attaque nucléophile du doublet non-liant de l'azote du monomère sur un site électrophile de l'amorceur (R_1). L'amorceur est composé d'un bon groupe partant : X = halogène (Cl, Br, I), tosylate (OTs), ou triflate (OTf) par exemple ; (M) équilibre des formes ioniques mésomères ; (E) équilibre entre une forme cationique et une forme covalente de l'espèce en croissance.

Dans l'objectif de réaliser une étude comparative de polymères en étoile à 3, 4 et 6 branches, des amorceurs trifonctionnel, tétrafonctionnel et hexafonctionnel ont été synthétisés respectivement à partir du 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane, du pentaérythritol, du di(triméthylolpropane) et du dipentaérythritol (Figure 2.2). Le di(triméthylolpropane) a été utilisé car cette molécule présente différents intérêts. Jusqu'à présent, ses homologues triflate ou tosylate n'ont jamais été utilisés pour amorcer la polymérisation des 2-oxazolines. De plus, sa structure quasi identique à celle du dipentaérythritol permettra d'étudier l'impact du nombre de branches (4 pour le di(triméthylolpropane) tétratriflate et 6 pour le dipentaérythritol hexatriflate) sur la polymérisation de 2-alkyl-2-oxazoline mais également l'impact de la structure du cœur de l'amorceur (et notamment de la distance entre les charges) sur le contrôle de la synthèse des étoiles à 4 branches en comparant l'amorçage par le pentaérythritol tétratriflate et le di(triméthylolpropane) tétratriflate. Enfin, les groupes éthyle de cette molécule devraient faciliter la caractérisation des polymères par RMN.

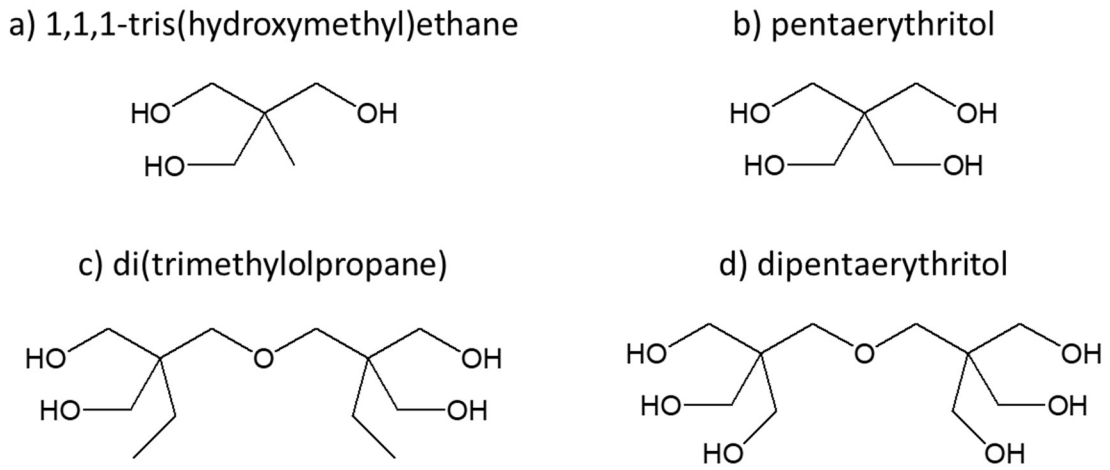


Figure 2.2. Structures chimiques des alcools multifonctionnels a) 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane, b) pentaérythritol, c) di(triméthylolpropane), d) dipentaérythritol

Partie 1 – Synthèse d'amorceurs multitosylates

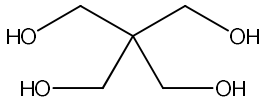
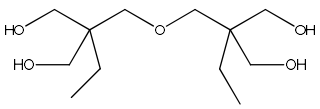
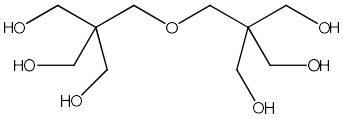
Dans un premier temps, la stratégie choisie a consisté à modifier les fonctions alcool de trois molécules multifonctionnelles par tosylation.

I. Réaction de tosylation des alcools

Les esters de tosyle (aussi appelés tosylates) peuvent être formés par réaction entre un alcool et du chlorure de tosyle en présence d'une base. Les protocoles les plus courants sont réalisés dans le dichlorométhane en utilisant la triéthylamine comme base ou dans la pyridine, qui sert alors à la fois de solvant et de base.

Les molécules de pentaérythritol et de dipentaérythritol étant insolubles dans le dichlorométhane, la réaction de tosylation a été faite dans la pyridine. Les conditions de réaction décrites par Schubert et coll.[2] pour la tosylation de ces deux molécules ont été reproduites et également appliquées pour l'essai avec le di(triméthylolpropane). Les différents essais de réactions de tosylation sont regroupés dans le Tableau 2.1 ci-dessous. Dans les trois cas, les molécules tosylées sont obtenues avec un rendement compris entre 60 et 70% après purification. Le détail des synthèses et la caractérisation des molécules sont présentés dans les paragraphes suivants.

Tableau 2.1. Tosylation de différents alcools multifonctionnels

Expérience	Réactif	Masse engagée (g)	Rendement (%)
PLL27	Pentaerythritol 	1,36	62
PLL28	Di(triméthylolpropane) 	2,50	71
PLL22	Dipentaerythritol 	2,54	67

1,25 éq de chlorure de tosyle par fonction alcool

II. Synthèse de molécules tétra- et hexatosylates

1. Synthèse et caractérisation du pentaérythritol tétratosylate

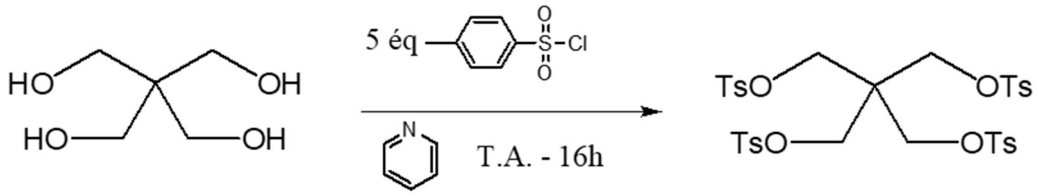


Figure 2.3. Schéma réactionnel de la tosylation du pentaérythritol

La réaction de tosylation du pentaérythritol est effectuée en utilisant le chlorure de tosyle comme agent tosylant et la pyridine comme base et solvant. Le schéma réactionnel est présenté à la Figure 2.3. A la fin de la réaction, le produit est purifié en versant le milieu réactionnel dans une solution de HCl à 6 M, ce qui conduit à la précipitation du produit. Celui-ci est ensuite purifié par recristallisation dans un mélange éthanol/acétone (1/1). La solubilisation du produit dans le dichlorométhane (DCM) permet d'entraîner les traces d'éthanol et d'acétone restantes par évaporation à l'évaporateur rotatif.

Le produit ainsi obtenu est caractérisé par RMN ^{1}H (Figure 2.4 et Figure 2.5), RMN ^{13}C (Figure 2.6) et RMN 2D proton-carbone (HSQCed) (Figure 2.7). Comme le montre la superposition des spectres RMN ^{1}H du pentaérythritol avant et après tosylation (Figure 2.4), le signal large des protons alcool à 4,15 ppm a totalement disparu après réaction. De plus, le signal des protons méthylène en alpha des alcools initialement à 3,36 ppm a disparu au profit d'un signal plus déblindé (à 3,81 ppm) attribué aux protons méthylène en alpha de la fonction tosylate. La présence des signaux caractéristiques du groupe tosylate (protons aromatiques 4 et 5 et protons méthyle 7) confirment la tosylation des fonctions alcool. Un pic d'intensité très faible à 3,22 ppm pouvant correspondre à des protons méthylène 2' résiduels est observé. Cependant, le respect de la proportion attendue entre les intensités des signaux des groupes tosylates et des protons méthylène 2 appartenant au cœur de la molécule indique une fonctionnalisation des fonctions alcool proche de 100%.

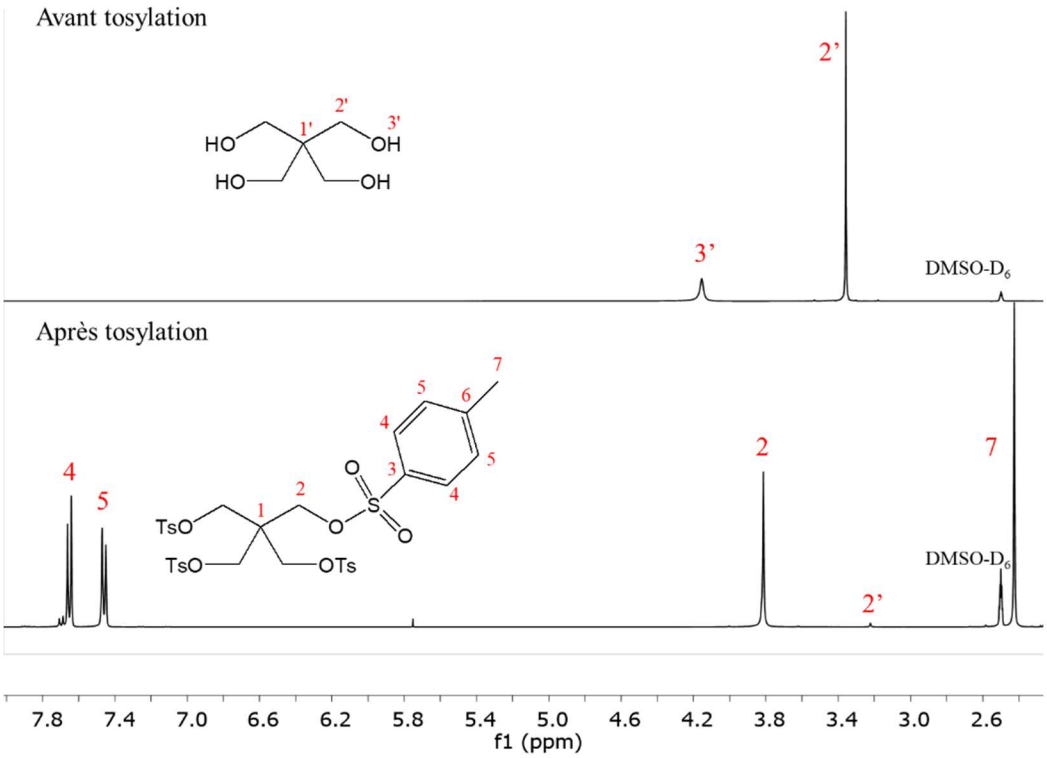


Figure 2.4. Superposition des spectres RMN ^{1}H du pentaérythritol *avant* et *après* tosylation dans le DMSO-D_6 à 20°C

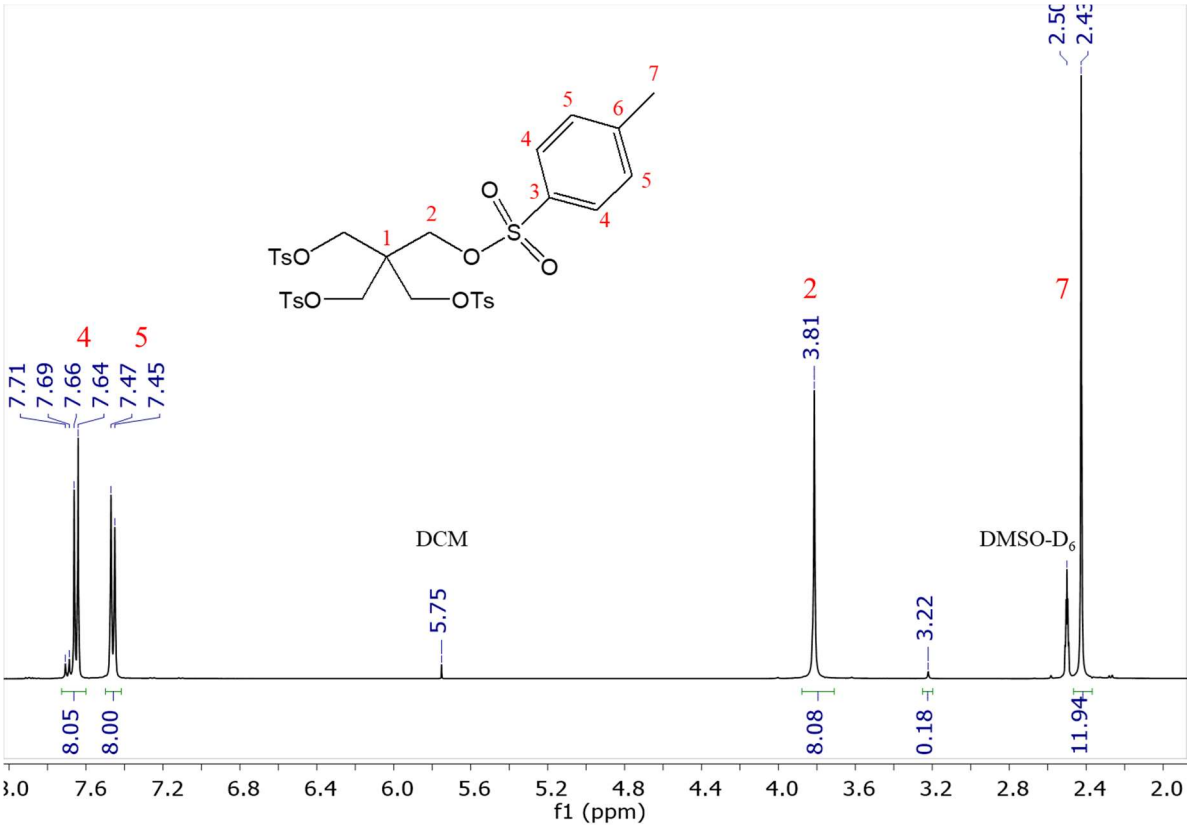


Figure 2.5. Spectre RMN ^{1}H du pentaérythritol tétratosylate dans le DMSO-D_6 à 20°C

La caractérisation complète du produit par RMN ^{13}C (Figure 2.6) et RMN 2D proton-carbone (HSQCed) (Figure 2.7) conforte les attributions précédentes et permet de conclure que le composé souhaité a bien été obtenu avec une pureté permettant son utilisation pour la polymérisation des oxazolines.

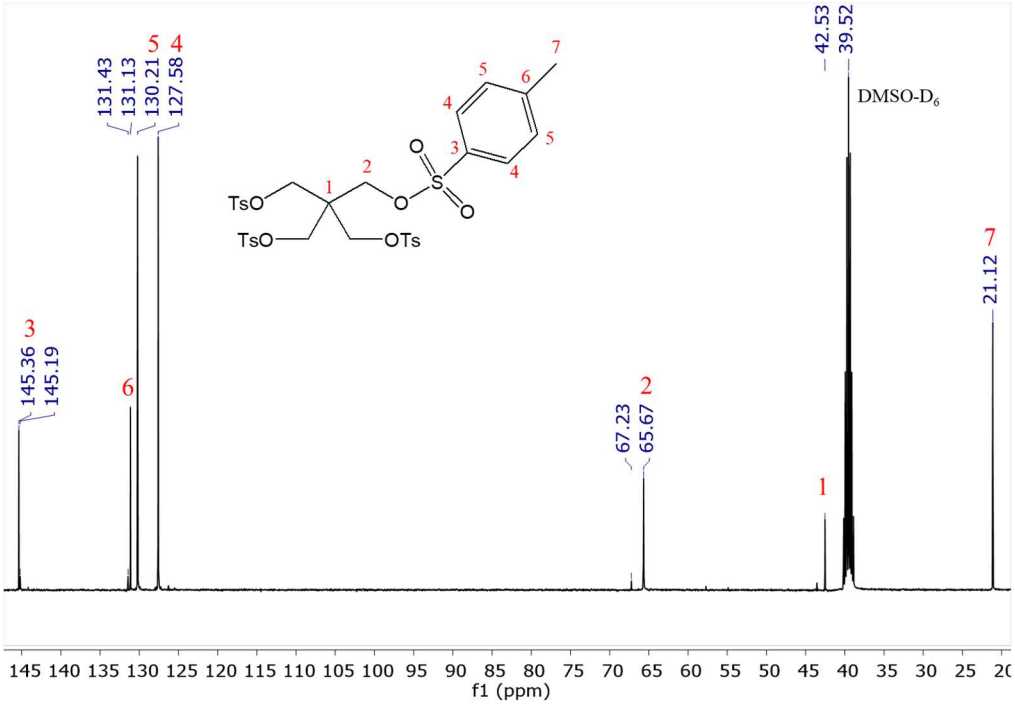


Figure 2.6. RMN ^{13}C du pentaérythritol tétratosylate dans le DMSO-D_6 à 20°C

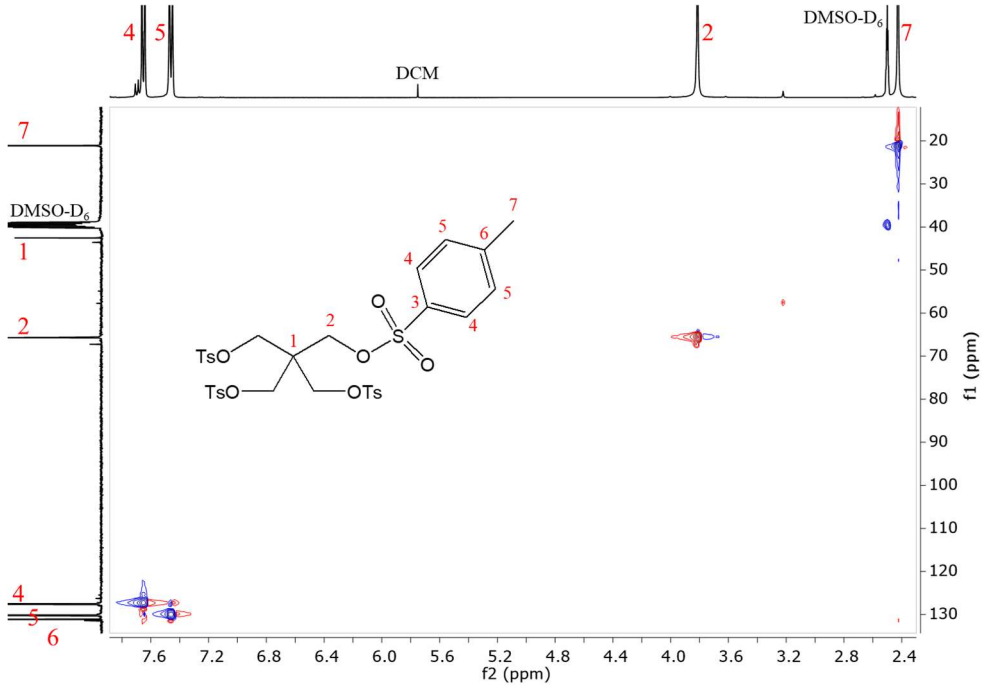


Figure 2.7. RMN-2D proton-carbone (HSQC) du pentaérythritol tétratosylate dans le DMSO-D_6 à 20°C

2. Synthèse et caractérisation du di(triméthylolpropane) tétratosylate

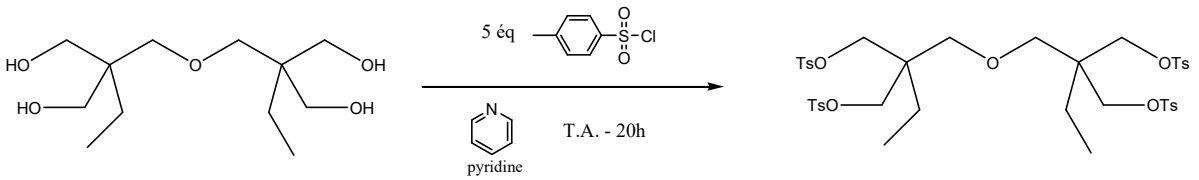


Figure 2.8. Schéma réactionnel de la tosylation du di(triméthylolpropane)

Dans le cas du di(triméthylolpropane), la réaction est faite dans les mêmes conditions que précédemment, avec 1,25 équivalent de chlorure de tosyle par fonction alcool (Figure 2.8), cependant le protocole de purification a dû être adapté car le produit ne recristallisait pas dans un mélange éthanol/acétone (1/1). Ainsi, après précipitation dans HCl 6M, le solide blanc visqueux est séché à l'évaporateur rotatif puis à l'étuve sous vide à 35°C durant une nuit. Une analyse RMN^{1}H du produit à ce stade de la purification a montré qu'une grande quantité de pyridine était encore présente. Le produit est donc repris dans du DCM et la phase organique est lavée avec de l'eau. De nombreux lavages sont nécessaires pour obtenir un produit exempt de pyridine. Le spectre RMN ^{1}H du produit après purification est présenté à la Figure 2.9. Il est à noter que des traces d'eau et de solvants (acétone et dichlorométhane) sont encore présentes. En plus des signaux des groupes tosylates (7, 8 et 10), les signaux caractéristiques des groupes éthyles pendants sont observés avec la multiplicité, l'intégration et le déplacement chimique attendus : un quadruplet à 1,07 ppm intégrant pour quatre protons méthylène et un triplet à 0,51 ppm intégrant pour six protons méthyle sont obtenus en ayant au préalable normalisé l'intégrale des protons 7 à 8H. L'adéquation entre les intensités des signaux des protons correspondant aux groupes tosylates et des protons méthylène 2 appartenant au cœur de la molécule indique une fonctionnalisation des fonctions alcool proche de 100%.

Le produit a aussi été analysé par un spectromètre de masse haute résolution équipé d'une source d'ionisation électrospray (HRMS-ESI). La comparaison du spectre théorique du di(triméthylolpropane) tétratosylate (Figure 2.10 en bas) et du spectre expérimental du produit obtenu après tosylation du di(trimethylolpropane) (Figure 2.10 en haut) révèle une différence de 2,5 ppm sur le pic principal, soit une différence très faible permettant d'affirmer que le

produit souhaité est obtenu. Aucune autre population n'est détectée, ce qui confirme la pureté du produit obtenu.

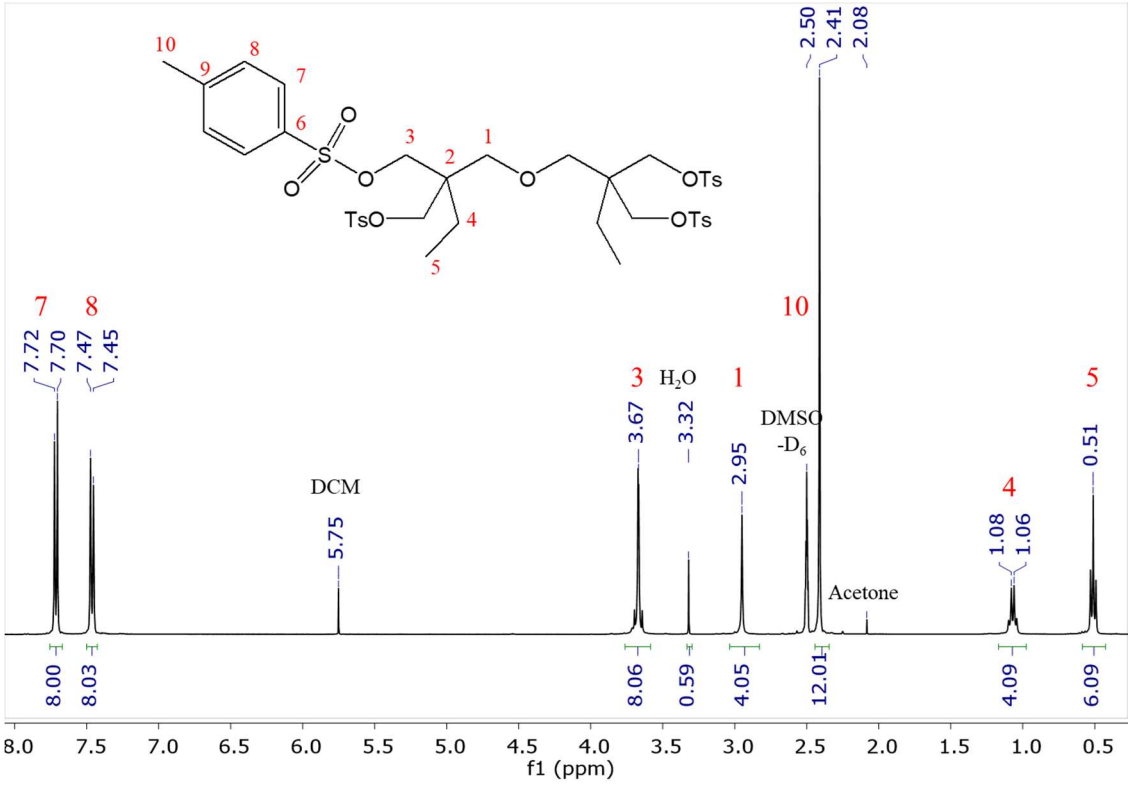


Figure 2.9. Spectre RMN ^{1}H du di(triméthylolpropane) tétratosylate dans le DMSO-D_6 à 20°C

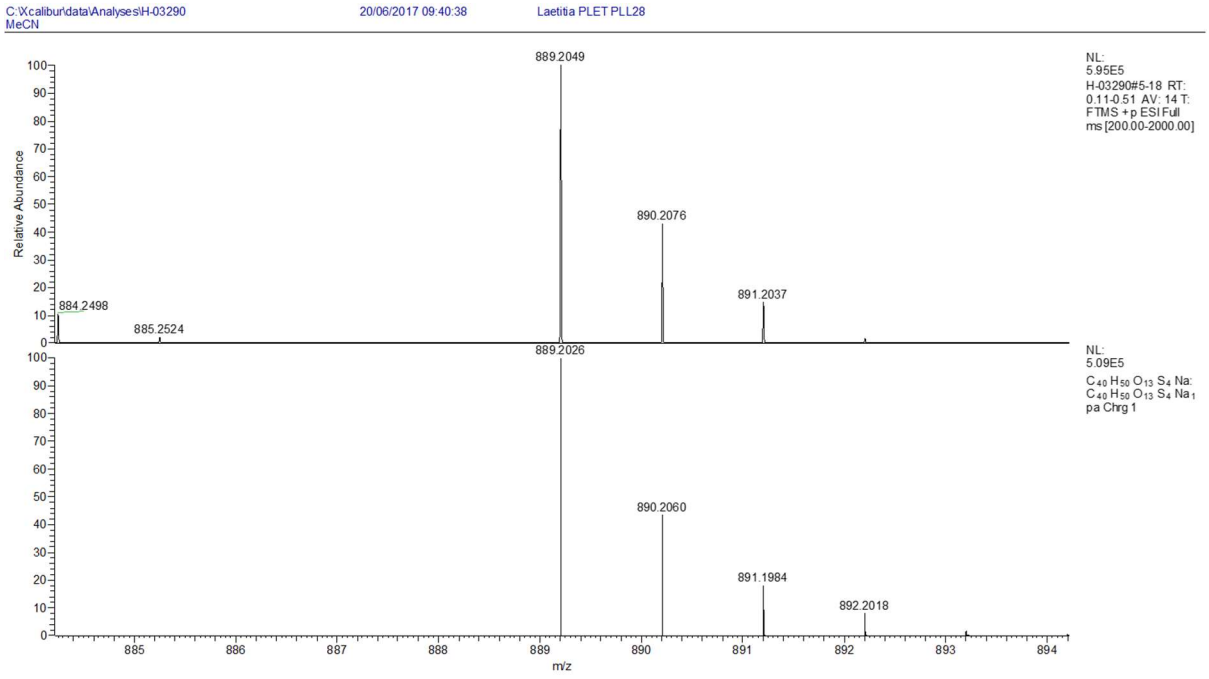


Figure 2.10. Superposition du spectre HRMS-ESI théorique (en bas) et du spectre expérimental (en haut) du di(triméthylolpropane) tétratosylate à 10 µg.mL^{-1} dans CH_3CN

3. Synthèse et caractérisation du dipentaérythritol hexatosylate

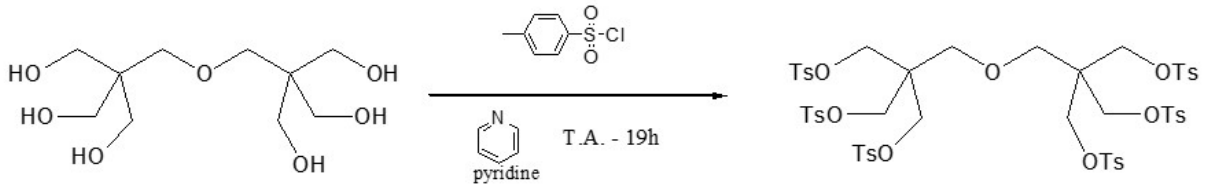


Figure 2.11. Schéma réactionnel de la tosylation du dipentaérythritol

Le dipentaérythritol est tosylé selon le même protocole de réaction et de purification que le pentaérythritol (Figure 2.11). Le spectre RMN ^{1}H du produit obtenu est présenté Figure 2.12 et les spectres RMN ^{13}C et RMN HSQC en Annexe 2.1 et Annexe 2.2. Différentes observations permettent de confirmer que le dipentaérythritol a été quantitativement tosylé : d'une part, le signal des CH_2 porteur des fonctions tosyle est plus déblindé (3,73 ppm) que celui des CH_2 initialement liés aux OH (3,35 ppm), d'autre part, les intégrations des signaux des protons aromatiques à 7,67 et 7,45 ppm et méthyle à 2,41 ppm des groupements tosylates sont cohérentes avec les intégrations des protons des groupes méthylène 3 et 1 respectivement à 3,73 et 3,01 ppm.

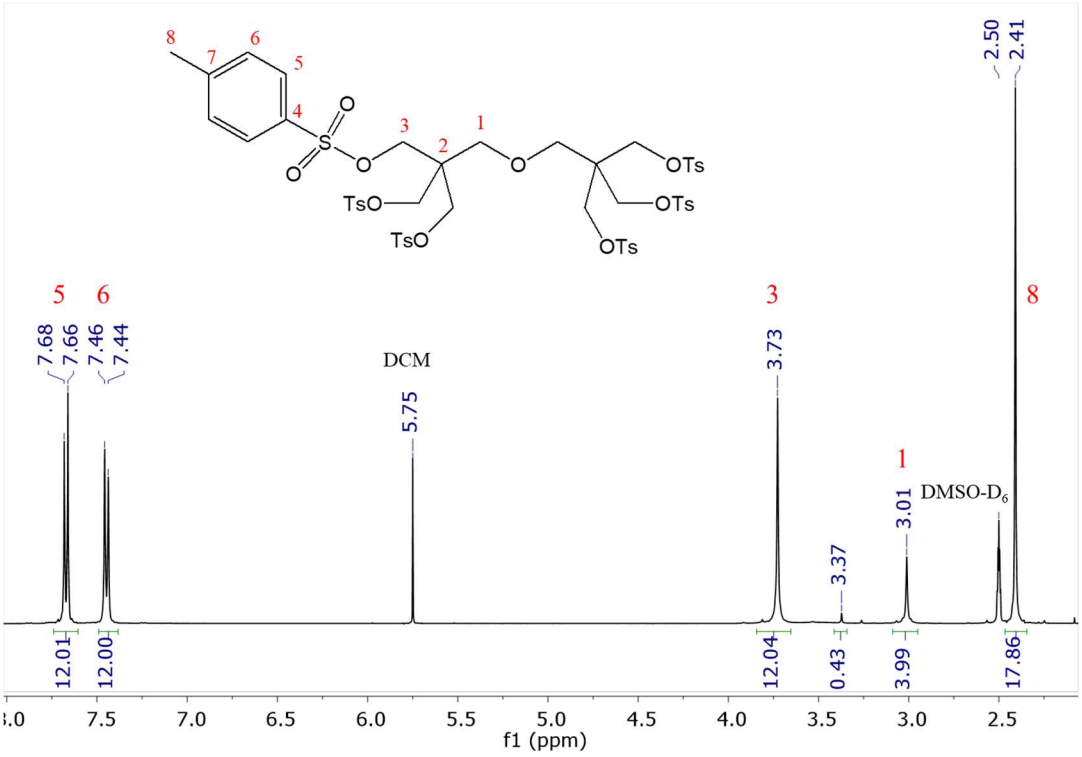


Figure 2.12. Spectre RMN^{1}H du dipentaerythritol hexatosylate dans le DMSO-D_6 à 20°C

III. Essais de tosylation et de mésylation de l'EDTE

1. Essais de tosylation de l'EDTE

Plusieurs essais de tosylation du N,N,N',N'-tetrakis(2-hydroxyéthyl)éthylène diamine (EDTE) ont été menés.

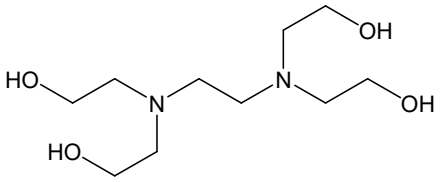


Figure 2.13. Structure de l'EDTE

Un premier essai de tosylation est fait dans le dichlorométhane en utilisant la triéthylamine pour déprotoner les fonctions alcools. Pour cela, l'EDTE est dissout dans du DCM puis la triéthylamine est ajoutée lentement à froid. Enfin, le chlorure de tosyle (solide blanc) est ajouté lentement au milieu réactionnel. Le milieu réactionnel est placé sous azote à la fin de l'ajout. Après 24h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est repris dans du DCM et cette phase organique est lavée avec de l'eau saturée en NaCl puis séchée. L'analyse par RMN ^{1}H du solide marron obtenu n'a pas permis de mettre en évidence la formation du produit désiré.

La même réaction est reproduite dans des conditions de séchage plus drastique : l'EDTE est d'abord séché sous vide pendant 20 minutes, puis le ballon est placé sous atmosphère inerte (azote) avant l'ajout de DCM anhydre. Parallèlement, une solution de chlorure de tosyle dans du DCM anhydre est préparée dans des conditions inertes. À froid, la triéthylamine (préalablement séchée sur tamis moléculaire 3Å) puis la solution de chlorure de tosyle sont ajoutées progressivement au milieu réactionnel. La réaction est poursuivie pendant 48h à température ambiante. Après la même procédure de purification que précédemment, il nous a été impossible d'isoler le produit d'intérêt, ni même de dire s'il a été effectivement formé.

Un essai de tosylation dans la pyridine en utilisant le protocole utilisé pour le pentaérythritol, le di(triméthylolpropane) et du dipentaérythritol (cf § II) n'a pas non plus été concluant pour obtenir l'EDTE tétratosylé.

Un dernier essai a été effectué dans le chloroforme en utilisant la soude comme base, selon le protocole décrit par Waschinsky et Tiller[3]. Là encore, le produit n'a pas pu être isolé.

2. Essais de mésylation de l'EDTE

Face à ces échecs, il a été proposé de mésyler les fonctions alcool de l'EDTE. Le protocole utilisé est en tout point le même que pour la tosylation de l'EDTE dans le DCM : après dissolution de l'EDTE dans du DCM, de la triéthylamine puis le chlorure de mésyle (liquide) sont ajoutés lentement à froid (Figure 2.14). Après quelques minutes d'agitation en atmosphère inerte, il se forme un précipité si conséquent que l'agitation du milieu n'est plus possible. Du dichlorométhane est alors ajouté, conduisant à la formation d'un milieu hétérogène pouvant être agité. Des prélèvements du milieu réactionnels sont faits à 24 et 48h et analysés par RMN ^{1}H. Seuls le DCM et la triéthylamine en excès sont identifiables sur les spectres RMN ^{1}H. Après filtration et séchage, le produit n'est identifiable ni dans le précipité, ni dans le filtrat.

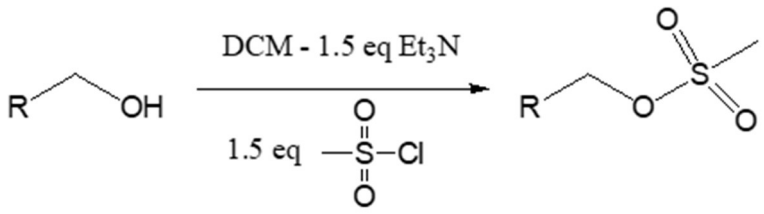


Figure 2.14. Schéma réactionnel de la mésylation d'alcool

La présence d'atomes d'azote au sein de la molécule d'EDTE rend difficile l'obtention des produits de la tosylation ou de la mésylation de l'EDTE.

Partie 2 – Synthèse d'amorceurs multitriflates

Nous avons rapporté dans le paragraphe précédent la synthèse d'une famille d'amorceurs de polymérisation de l'oxazoline, possédant 4 et 6 sites d'amorçage. Le caractère électrophile de ces composés est assuré par la présence d'ester de tosyle. La littérature reporte que les triflates sont généralement de meilleurs groupes partants que les tosylates[4], ce qui peut permettre des cinétiques d'amorçage plus rapide de la polymérisation des 2-alkyl-2-oxazoline, et donc un meilleur contrôle des polymérisations. Pour s'assurer de ce point, nous avons complété la première famille d'amorceurs multifonctionnels par la synthèse d'une seconde série d'amorceurs, issue de la triflatation de ces mêmes molécules multifonctionnelles commerciales ainsi que d'une nouvelle molécule tri-fonctionnelle.

I. Réaction de triflatation des alcools

Menger et Migulin décrivent en 1999 la triflatation du pentaérythritol selon le protocole suivant[5] : à une suspension de pentaérythritol à 0,6 M dans un mélange pyridine/acétonitrile (1/1,6) est ajoutée goutte à goutte l'anhydride triflique (4,8 équivalents soit 1,2 équivalent par fonction alcool) à froid. Après 3h de réaction à température ambiante, le produit est purifié par précipitation dans une solution de HCl 6M puis recristallisé à partir d'un mélange eau/ACN. Nous avons tenté d'appliquer ce protocole à la triflatation des différents alcools multifonctionnels de cette étude (1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane, pentaérythritol, dipentaérythritol, di(triméthylolpropane), EDTE, calixarène). Les résultats obtenus sont présentés dans les deux parties suivantes.

II. Synthèse de molécules tri-, tétra- et hexatriflate

1. Synthèse et caractérisation du pentaérythritol tétratriflate

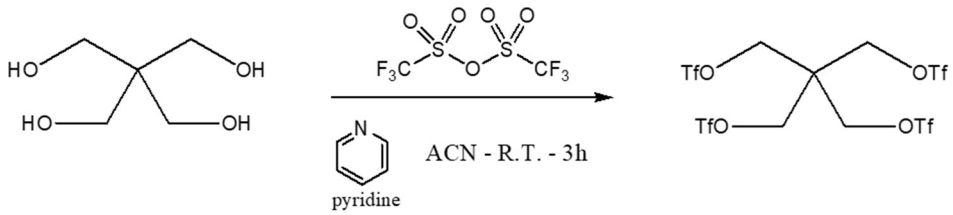


Figure 2.15. Schéma réactionnel de la triflatation du pentaérythritol

Le pentaerythritol est triflaté dans les conditions de Menger[5] selon le schéma réactionnel présenté à la Figure 2.15. La poudre blanche obtenue est analysée par RMN. Le spectre RMN ^{1}H du produit obtenu est présenté en Annexe 2.3. Les protons méthylène 2 en alpha du groupe triflate résonnent à 5,17 ppm tandis que ceux du même groupe méthylène, en alpha de l'alcool dans la molécule initiale résonnent à 3,64 ppm. L'absence de signal à 3,64 ppm sur le spectre du produit obtenu révèle que les 4 fonctions alcool du pentaérythritol ont été quantitativement triflatées. Le spectre RMN ^{13}C (présenté à la Figure 2.16) confirme que le produit est pur car seulement trois signaux sont présents : les singulets des carbones 1 et 2 respectivement à 45,61 et 72,40 ppm et le quadruplet du carbone 3, lié aux trois atomes de fluor à 119,38 ppm dont la fréquence de couplage $J_{C\text{-}F}$ = 319,2 Hz est cohérente avec la littérature[5,6].

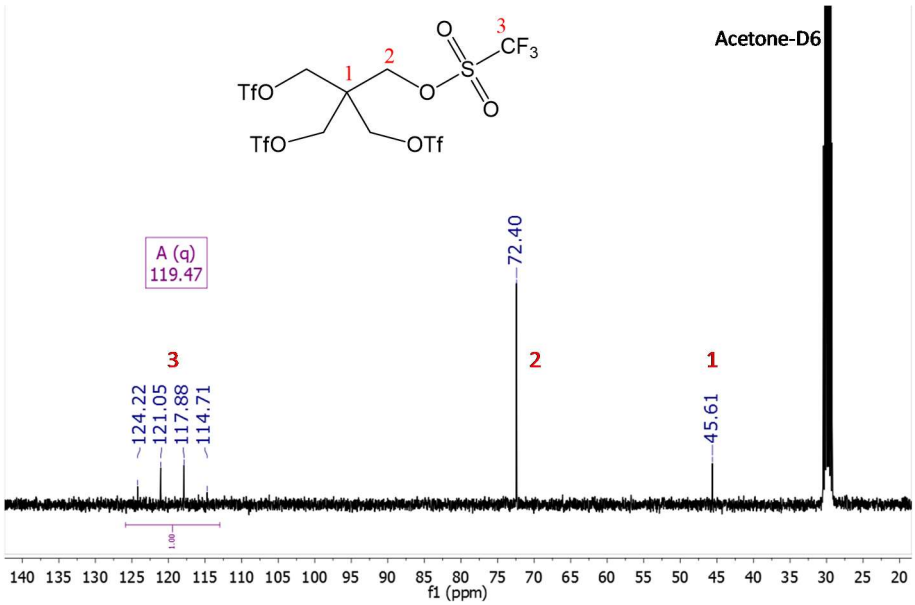


Figure 2.16. Spectre RMN ^{13}C du pentaerythritol tétratriflate

2. Synthèse et caractérisation du 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane tristriflate

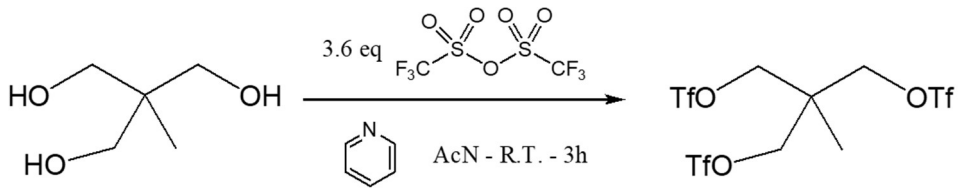


Figure 2.17. Schéma réactionnel de la triflatation du 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane

Le 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane (alcool trifonctionnel) est triflaté en utilisant le protocole utilisé pour le pentaérythritol. Une différence est cependant observée : l'addition du milieu réactionnel à une solution d'HCl 6M conduit, non pas à la formation d'un précipité, mais à la formation d'une seconde phase liquide, visqueuse, de densité plus élevée et de couleur rouge – marron. Les deux phases sont ensuite séparées par utilisation d'une ampoule à décanter et après séchage de la phase dense, un solide orangé est obtenu et analysé par RMN ^{1}H (Annexe 2.5), RMN ^{13}C (Figure 2.18), HRMS-ESI (Annexe 2.6). Le spectre RMN ^{13}C est en tous points semblable à celui du pentaérythritol tétratriflate (Figure 2.16), avec comme attendu, un signal supplémentaire à 15,50 ppm, attribué aux carbones 4 du CH_3. L'analyse par spectrométrie de masse confirme la présence du produit souhaité avec un pic à m/z 538,9161 pour une valeur théorique de m/z 538,9157 ($C_8H_9F_9O_9S_3 + Na^+$), soit une erreur relative très faible, de 0,7 ppm (Annexe 2.6).

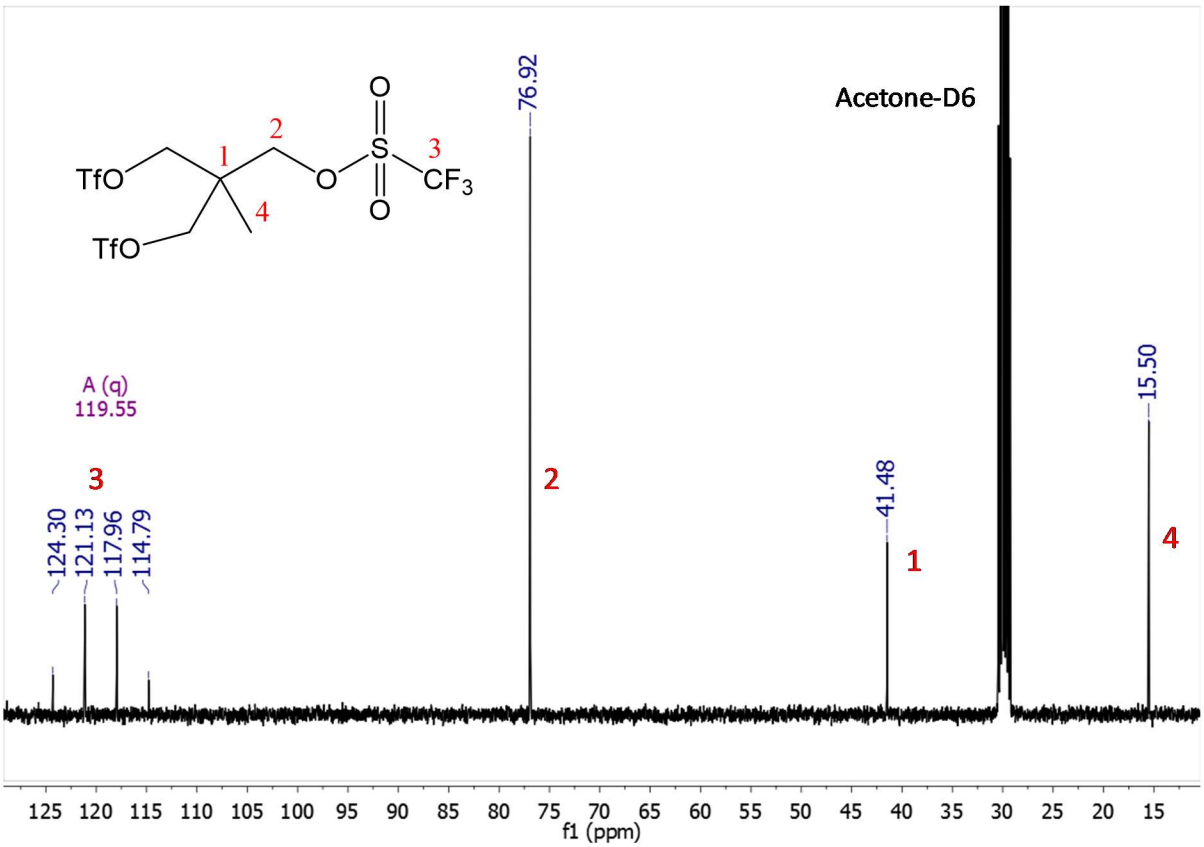


Figure 2.18. Spectre RMN ^{13}C du 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane tristriflate dans l'acétone-D_6

3. Synthèse et caractérisation du di(triméthylolpropane) tétratriflate

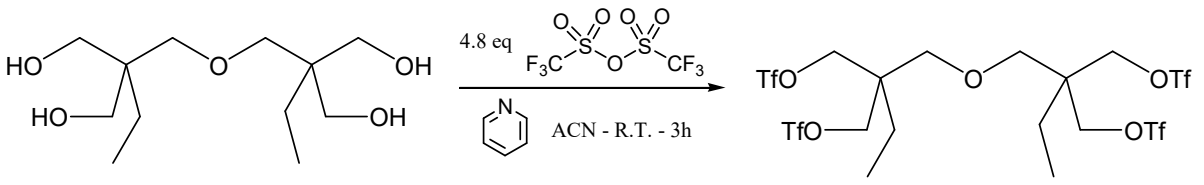


Figure 2.19. Schéma réactionnel de la triflatation du di(trimethylolpropane)

A notre connaissance, la triflatation de cet alcool tétrafonctionnel n'a jamais été décrite dans la littérature. La réaction est menée dans les mêmes conditions que pour le pentaérythritol tétratriflate (Figure 2.19). Un solide jaune est obtenu après précipitation du milieu réactionnel dans une solution d'acide chlorhydrique 6 M. Après séchage, la poudre jaune pâle obtenue est

analysée par RMN ^{1}H (Annexe 2.7). La présence d'un seul singulet pour les protons méthylène 3 en alpha des groupes triflates à un déplacement chimique déblindé (4,80 ppm) et la très bonne cohérence entre le spectre de masse théorique et le spectre expérimental avec seulement 2,9 ppm d'erreur relative (Annexe 2.8) confirme l'obtention du produit pur. L'attribution des signaux du spectre RMN ^{1}H est confortée par le spectre RMN 2D proton – carbone présenté à la Figure 2.20.

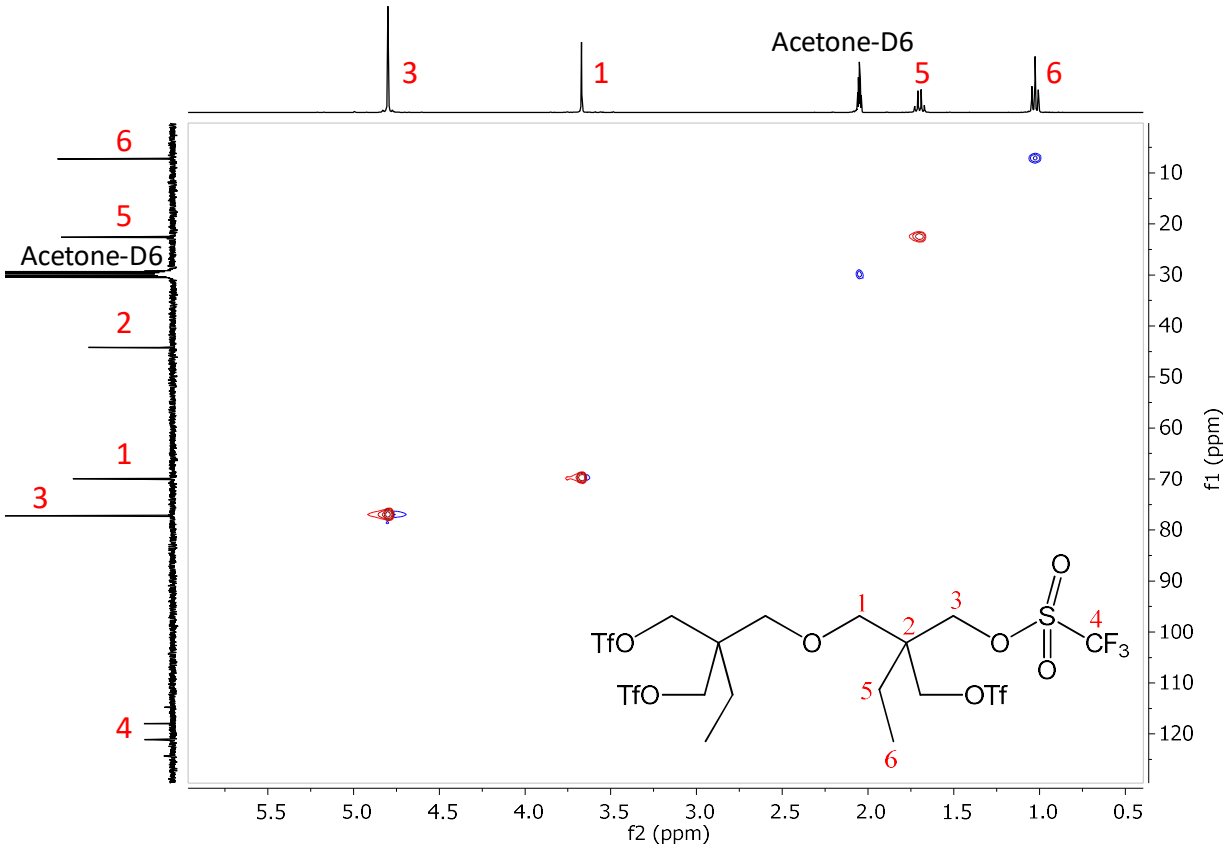


Figure 2.20. Spectre RMN HSQCed du di(triméthylolpropane) tétratriflate dans l'acétone-D_6

4. Synthèse et caractérisation du dipentaérythritol hexatriflate

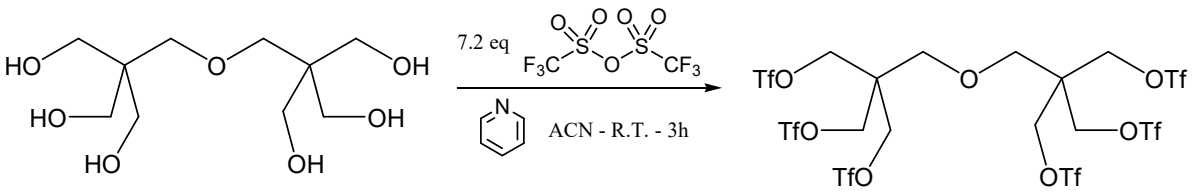


Figure 2.21. Schéma réactionnel de la triflatation du dipentaérythritol

Ce même protocole a été appliqué pour synthétiser le dipentaérythritol hexatriflate. Le produit obtenu a été analysé par RMN ^{1}H (Annexe 2.9). La présence d'un singulet à 5,06 ppm correspondant aux protons méthylène 3 et l'absence de signal à 3,35 ppm (déplacement chimique des protons méthylène en alpha des alcools du réactif initial) démontre que la triflatation des fonctions alcool est totale. Le spectre RMN HSQCed, présenté en Figure 2.22 a permis de valider l'attribution des signaux. L'analyse HRMS-ESI (Annexe 2.10) confirme la présence de la molécule d'intérêt de m/z 1068,8257.

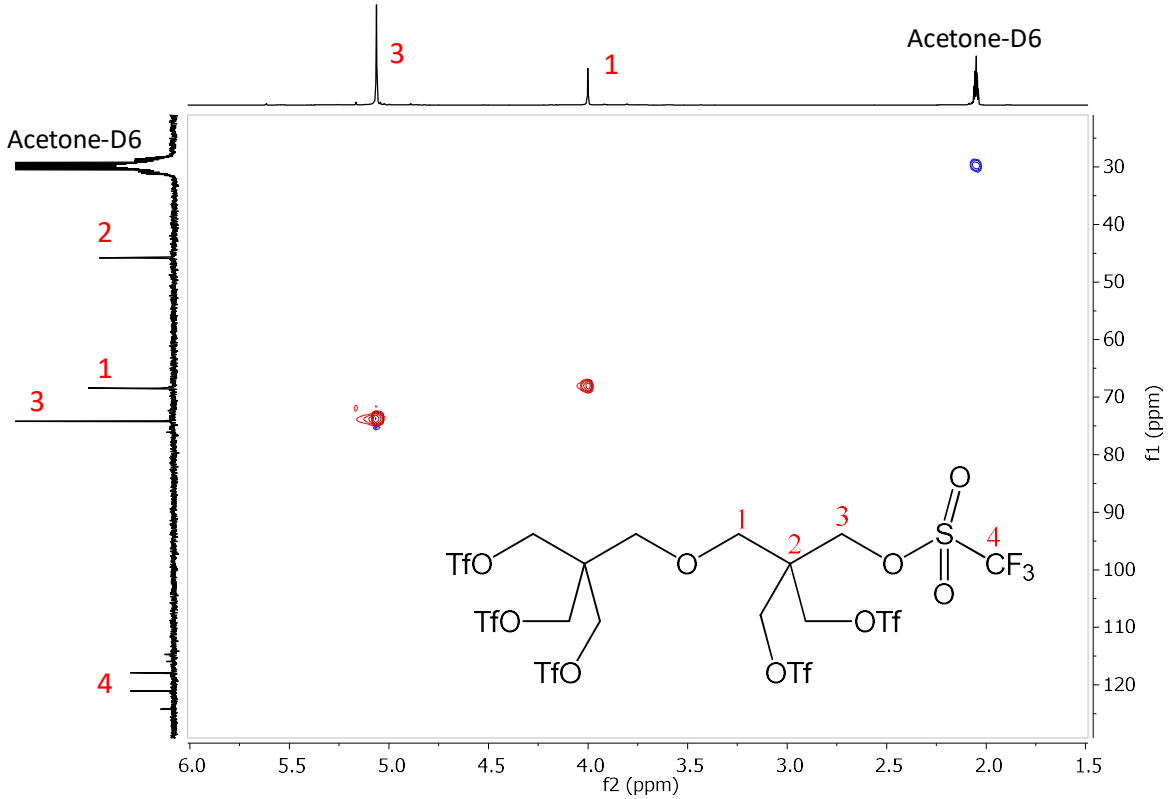


Figure 2.22. Spectre RMN HSQCed du dipentaérythritol hexatriflate dans l'acétone-D_6 à 20°C

Pour conclure cette partie, le Tableau 2.2 rassemble toutes les données concernant les molécules multitriflate obtenues avec succès : pentaérythritol tétratriflate, 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane, di(triméthylolpropane) tétratriflate, et dipentaérythritol hexatriflate.

Tableau 2.2. Triflatation de différents alcools multifonctionnels

Molécule synthétisée	Expérience	Masse engagée (mg)	Rendement (%)	Aspect
pentaérythritol tétratriflate	PLL42	540	22	poudre blanche
	PLL104	509	35	
1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane	PLL54	591	95	solide orange
	PLL65	590	100	
di(triméthylolpropane) tétratriflate	PLL47	925	81	solide orange
	PLL129	924	100	
dipentaérythritol hexatriflate	PLL46	627	29	solide orange
	PLL128	626	27	

III. Essais de triflatation infructeux

1. EDTE

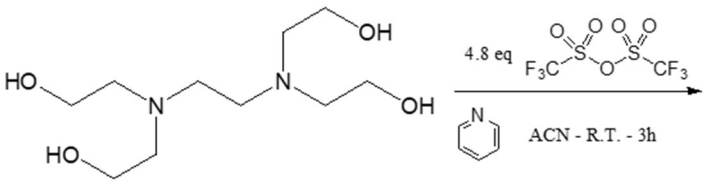


Figure 2.23. Schéma réactionnel de la triflatation de l'EDTE

La triflatation de l'EDTE a été menée dans les conditions décrites précédemment pour les autres alcools multifonctionnels. Une solution limpide et incolore d'EDTE dans l'ACN est préparée de façon à obtenir une concentration en fonctions alcool de 1,5 mol.L^{-1}. Puis la pyridine est ajoutée pour déprotoner les fonctions alcool avant l'ajout progressif de l'anhydride triflique. A la différence des réactions précédentes, à la fin de la réaction, l'ajout d'une solution de HCl à 6 M ne provoque pas l'apparition d'un précipité. Après extraction de la phase aqueuse par du DCM, les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ puis les solvants sont évaporés et le produit obtenu est analysé par RMN ^{1}H. D'une part, l'extraction n'a pas permis

d'éliminer toute la pyridine (pics présents dans la zone 8,0-9,5 ppm) et d'autre part, les signaux des protons méthylène du cœur de l'EDTE (Figure 2.13) ne sont pas identifiables (aucun signal autour de 2,5 ppm). Le produit souhaité, EDTE tétratriflate, n'a pas été isolé et il est même difficile de conclure quant à sa formation.

Nous avons observé dans la littérature que l'EDTE traité par l'anhydride triflique permet l'obtention de produit permettant l'amorçage de la polymérisation du THF, pour conduire à des polymères en étoile à 4 branches[7]. Aucune purification de l'amorceur n'est reportée, mais les travaux reportent différents éléments permettant de conclure à la formation de pTHF en étoile. Nos résultats, associés à ceux publiés dans ces travaux, nous conduisent à penser que la purification de l'EDTE après modification par anhydride triflique est impossible, et l'utilisation de ce composé sera donc abandonnée dans le cadre de ce travail.

2. Calix[4]arène

Nous nous sommes intéressés à la triflatation du calix[4]arène pour le potentiel que sa cavité présente pour l'encapsulation de molécules. Préalablement, un composé modèle, le 1,4-benzenediméthanol, a été triflaté en utilisant le protocole de triflatation précédemment utilisé avec les alcools multifonctionnels (Figure 2.24).

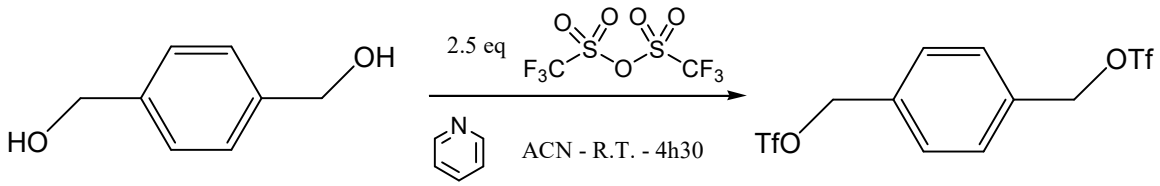


Figure 2.24. Schéma réactionnel de la triflatation du 1,4-benzenediméthanol

Le traitement post-réaction (précipitation du milieu réactionnel dans de l'acide chlorhydrique 6M à froid) a permis d'obtenir une poudre fine jaune pâle après centrifugation. L'analyse RMN ^{1}H de la poudre a révélé à ce stade la présence de pyridine en grande quantité. Le rinçage à l'eau de la poudre sur un papier filtre a permis de diminuer la quantité de pyridine de moitié environ mais pas de l'éliminer totalement, tout en perdant une grande quantité de produit. L'analyse RMN ^{1}H (Figure 2.25) a permis de conclure que le produit désiré a été obtenu

(shift des protons méthylène 3 de 4,60 ppm à 6,13 ppm) mais avec un rendement très faible de 10% et des traces non négligeables de pyridine entre 8,0 et 9,5 ppm sont identifiées.

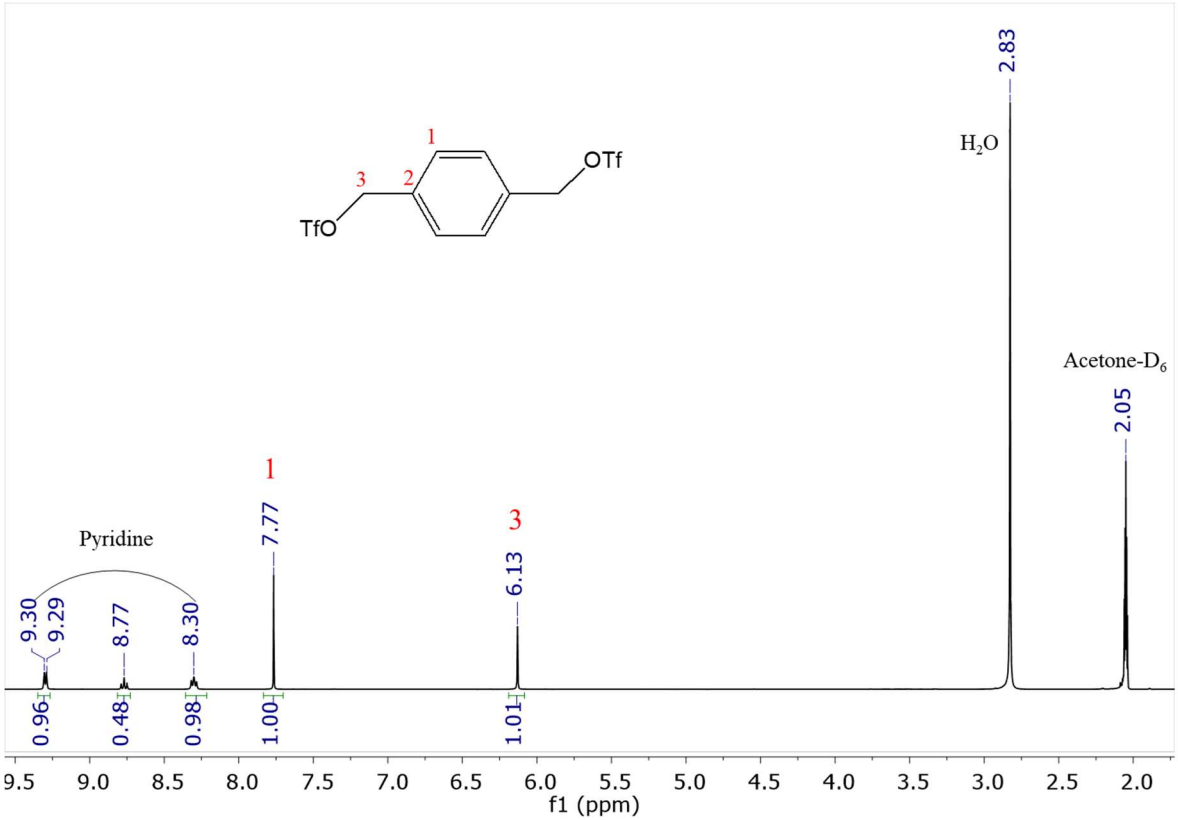


Figure 2.25. Spectre RMN ^{1}H du 1,4-benzenediméthanol dans l'acétone-D_6.

Ces résultats étant prometteurs, il a été tenté de triflater le calix[4]arène. Après purification, l'analyse RMN ^{1}H du produit obtenu (solide jaune) révèle de nombreux signaux, notamment quatre doublets entre 3,46 et 4,33 ppm et des triplets et doublets dans la zone des protons aromatiques (6,60 et 7,70 ppm). La structure rigide de la molécule confère probablement des déplacements chimiques différents à des protons pourtant équivalents. Il est donc difficile de conclure quant à la triflatation quantitative des fonctions alcool. Le calix[4]arène peut exister dans quatre conformations : cône, cône partiel, alterné-1,3 ou alterné-1,2, caractérisés par des signaux différents en RMN[8]. La complexité du spectre RMN du calix[4]arène modifié ne nous a pas permis une attribution sans ambiguïté : nous n'avons pas pu discriminer les effets de conformation du calix[4]arène d'une triflatation partielle. Par manque de temps, cette étude n'a pu être poursuivie.

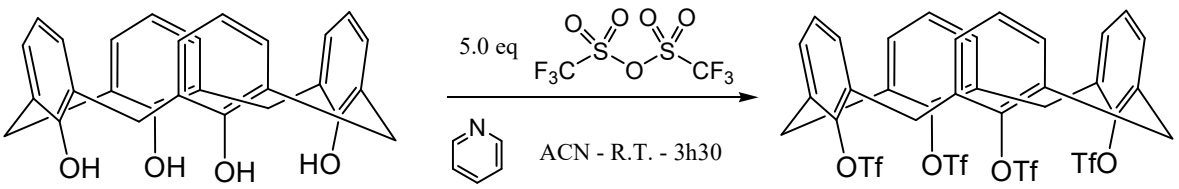


Figure 2.26. Schéma réactionnel de la triflatation du calix[4]arène

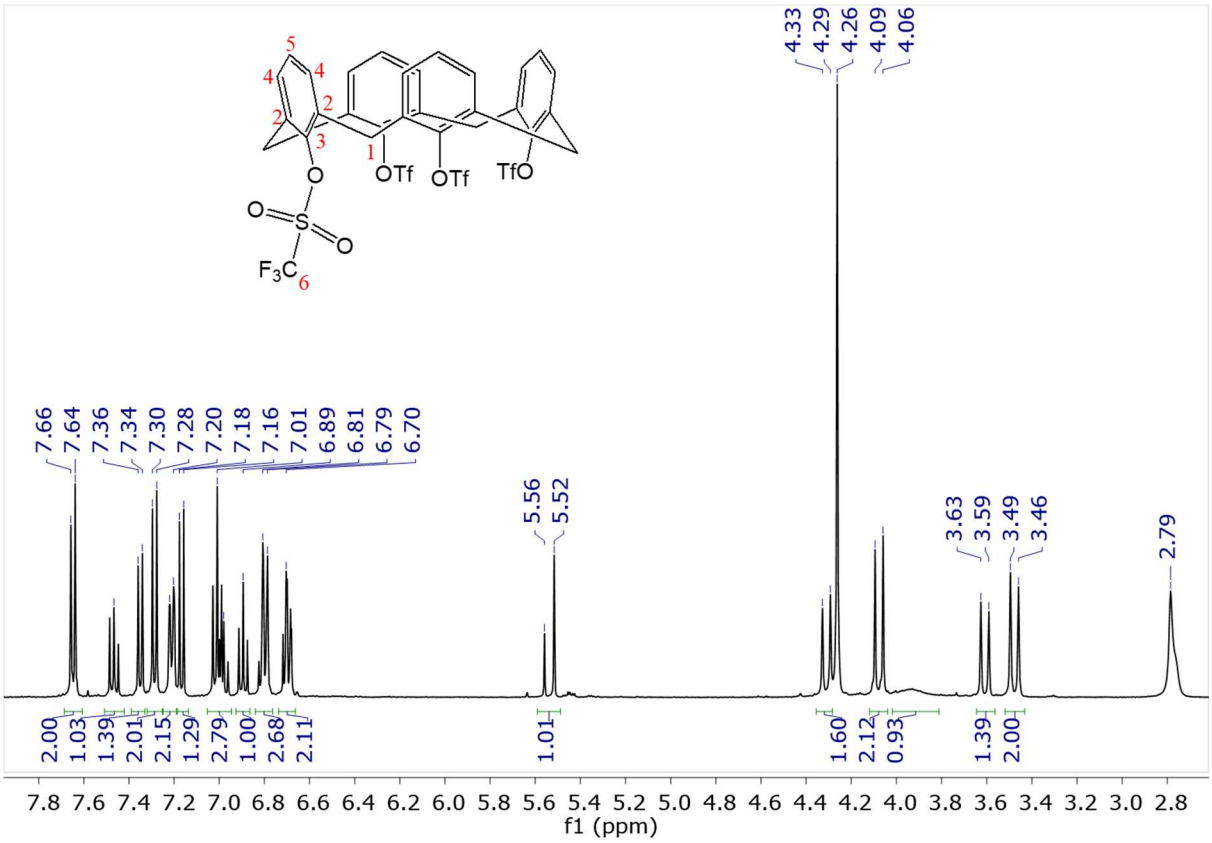


Figure 2.27. Spectre RMN ^{1}H du calix[4]arène après triflatation dans l'acétone-D_6 à 20°C

Conclusion

Dans ce chapitre, la synthèse de diverses molécules multifonctionnelles, potentiels amorceurs pour la polymérisation des 2-oxazolines, a été présentée. Dans un premier temps, trois molécules multitosylates ont été synthétisées et caractérisées avec succès. Une autre famille d'esters, des esters triflates, bien connus pour amorcer efficacement la polymérisation des 2-oxazolines, a été également préparée. La triflatation de sept alcools multifonctionnels a été étudiée, parmi lesquels quatre molécules multitriflates ont été synthétisées et caractérisées avec succès par RMN (^{1}H, ^{13}C, HSQCed et COSY). Ont ainsi été obtenus :

- une molécule tristriflate, le 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane tristriflate
- deux molécules tétratriflate, le pentaérythritol tétratriflate et le di(triméthylolpropane) tétratriflate
- une molécule hexatriflate, le dipentaérythritol hexatriflate

Leur aptitude à amorcer la polymérisation des 2-oxazolines sera explorée dans le chapitre suivant.

Références

(1) Dworak, A. The Role of Cationic and Covalent Active Centers in the Polymerization of 2-methyl-2-oxazoline Initiated with Benzyl Bromide. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1998**, *199* (9), 1843–1849. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3935(19980901)199:9<1843::AID-MACP1843>3.0.CO;2-I.

(2) Hoogenboom, R.; Fijten, M. W. M.; Kickelbick, G.; Schubert, U. S. Synthesis and Crystal Structures of Multifunctional Tosylates as Basis for Star-Shaped Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)s. *Beilstein J Org Chem* **2010**, *6*, 773–783. https://doi.org/10.3762/bjoc.6.96.

(3) Waschinski, C. J.; Tiller, J. C. Poly(Oxazoline)s with Telechelic Antimicrobial Functions. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (1), 235–243. https://doi.org/10.1021/bm049553i.

(4) Hoogenboom, R.; Fijten, M. W. M.; Schubert, U. S. Parallel Kinetic Investigation of 2-Oxazoline Polymerizations with Different Initiators as Basis for Designed Copolymer Synthesis. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, *42* (8), 1830–1840. https://doi.org/10.1002/pola.20024.

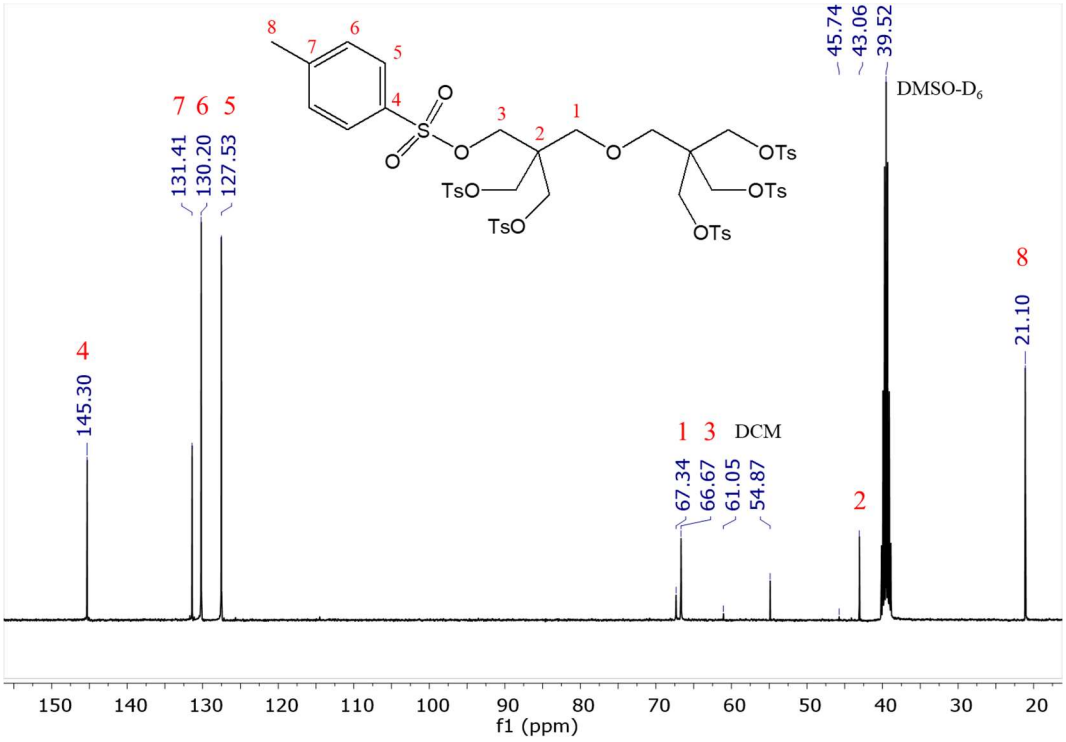
(5) Menger, F. M.; Migulin, V. A. Synthesis and Properties of Multiarmed Geminis. *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64* (24), 8916–8921. https://doi.org/10.1021/jo9912350.

(6) Chang, J. W. W.; Chia, E. Y.; Chai, C. L. L.; Seayad, J. Scope of Direct Arylation of Fluorinated Aromatics with Aryl Sulfonates. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10* (11), 2289. https://doi.org/10.1039/c2ob06840k.

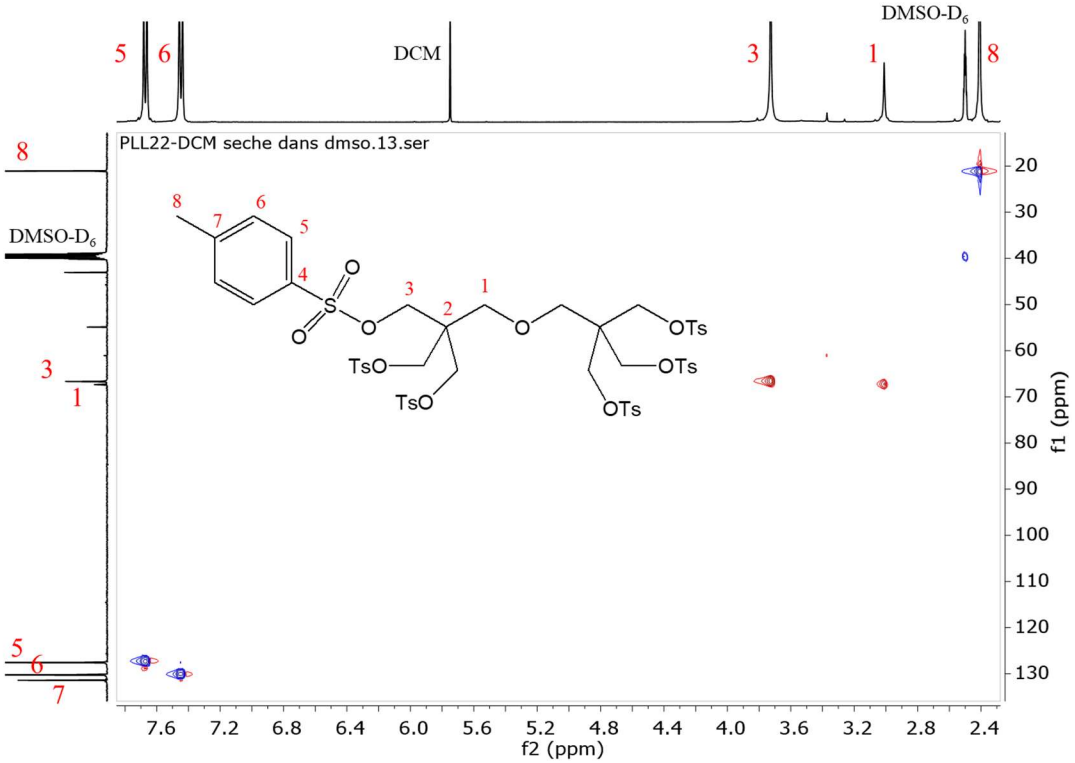
(7) Rasolonjatovo, B.; Pitard, B.; Haudebourg, T.; Bennevault, V.; Guégan, P. Synthesis of Tetraarm Star Block Copolymer Based on Polytetrahydrofuran and Poly(2-Methyl-2-Oxazoline) for Gene Delivery Applications. *European Polymer Journal* **2017**, *88*, 689–700. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.09.042.

(8) Jaime, C.; De Mendoza, J.; Prados, P.; Nieto, P. M.; Sanchez, C. Carbon-13 NMR Chemical Shifts. A Single Rule to Determine the Conformation of Calix[4]Arenes. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (10), 3372–3376. https://doi.org/10.1021/jo00010a036.

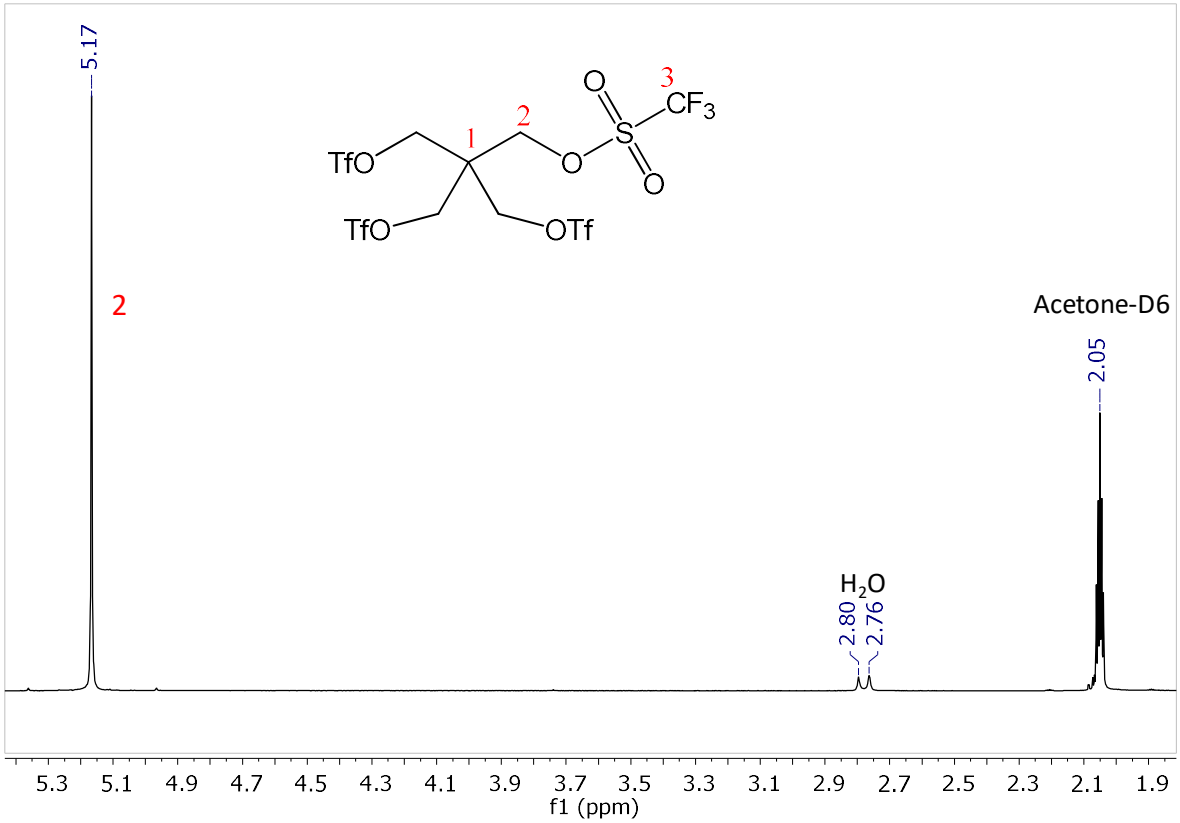
Annexes



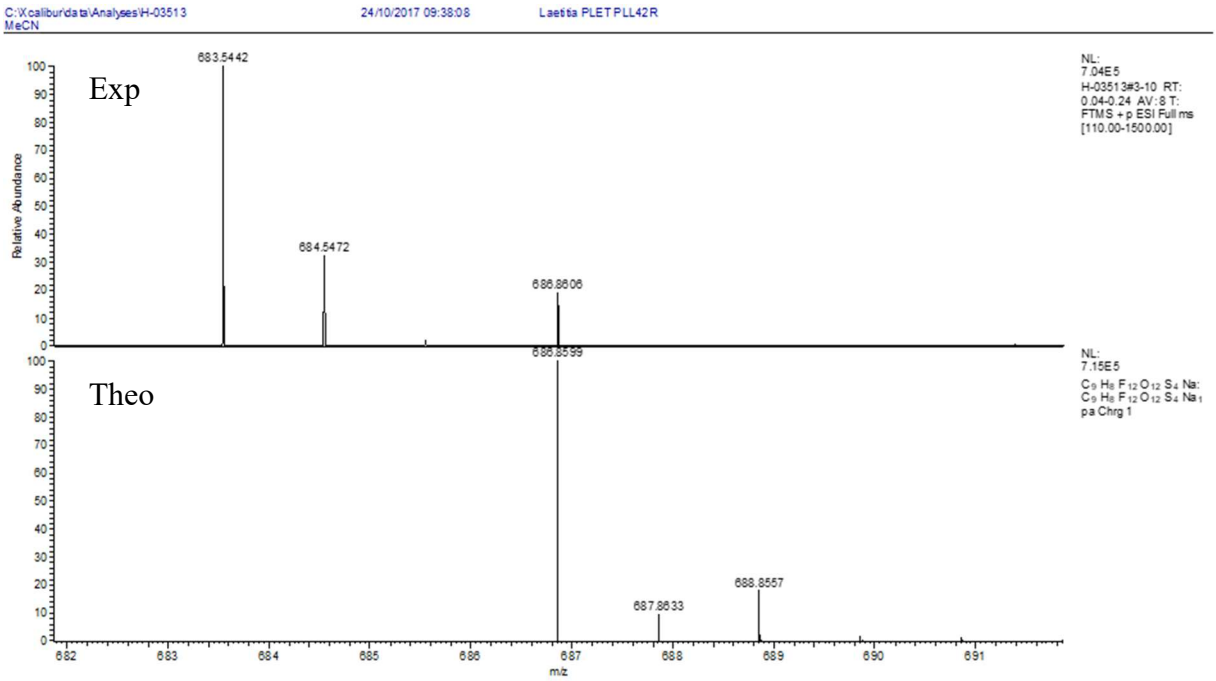
Annexe 2.1. Spectre RMN ^{13}C du dipentaérythritol hexatosylate dans le DMSO-D_6 à 20°C



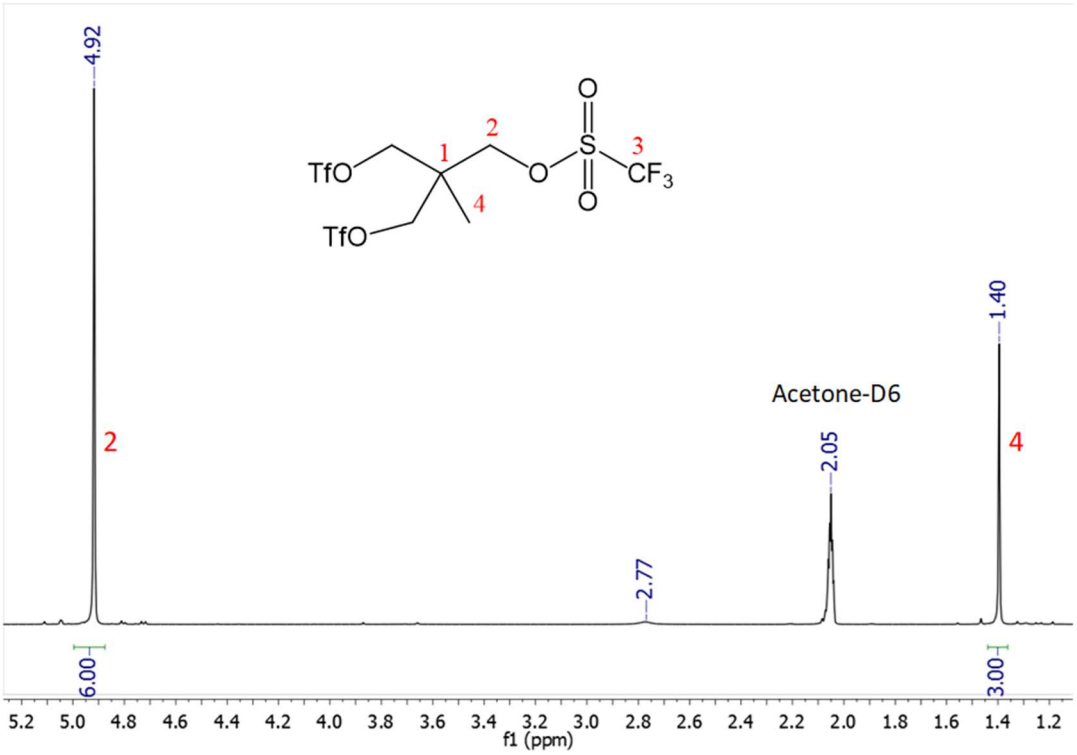
Annexe 2.2. Spectre RMN HSQCed du dipentaerythritol hexatosylate dans le DMSO-D_6 à 20°C



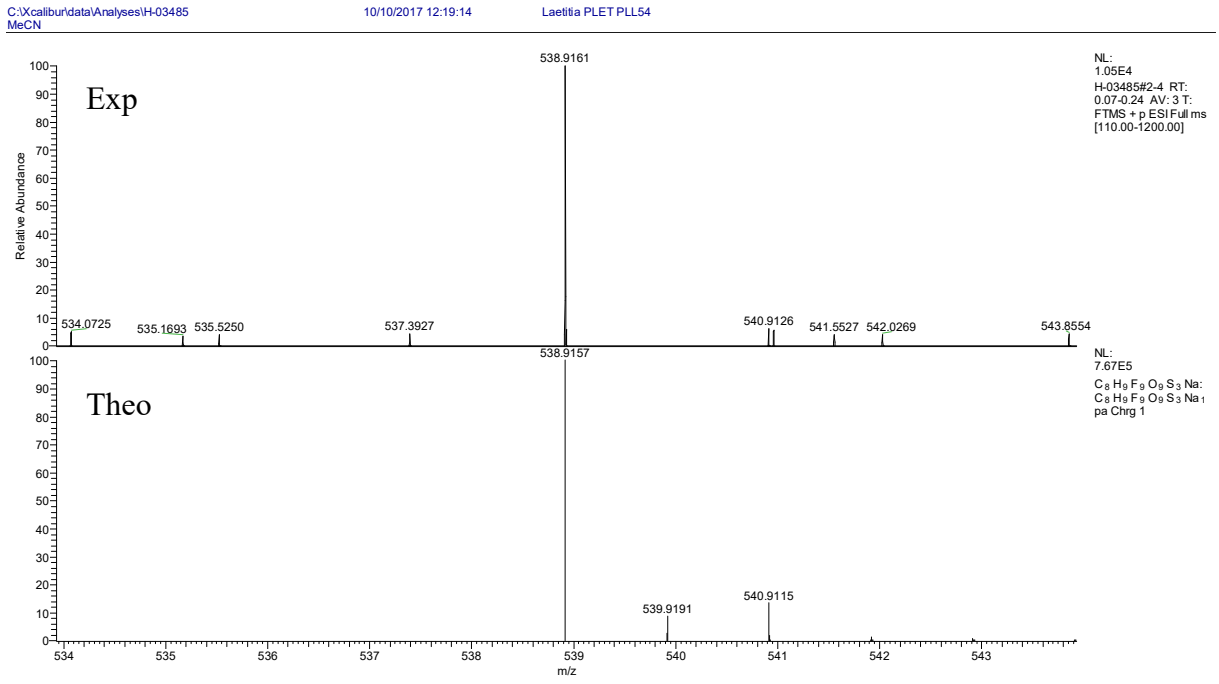
Annexe 2.3. Spectre RMN ^{1}H du pentaérythritol tétratriflate dans l'acétone-D_6 à 20°C



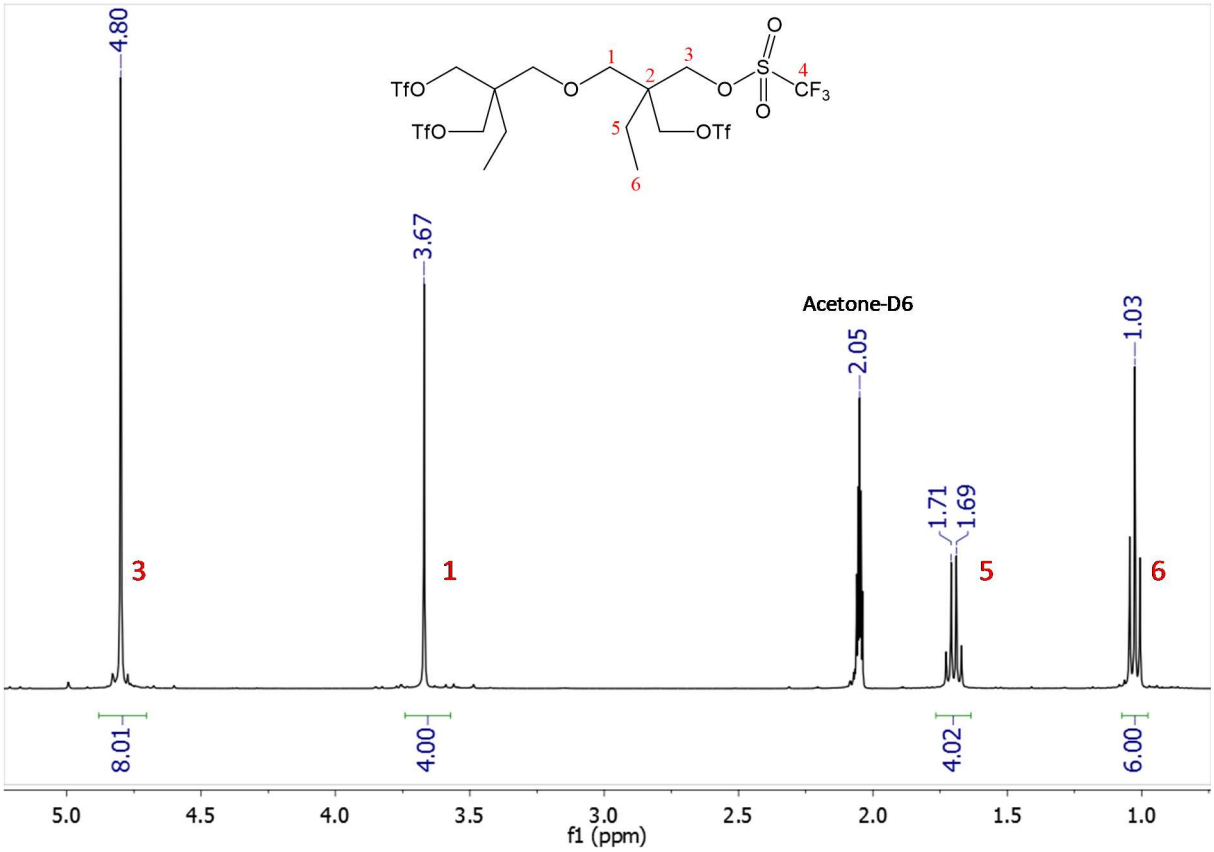
Annexe 2.4. Spectre HRMS-ESI du pentaerythritol tétratriflate à 1 mg/mL dans l'ACN



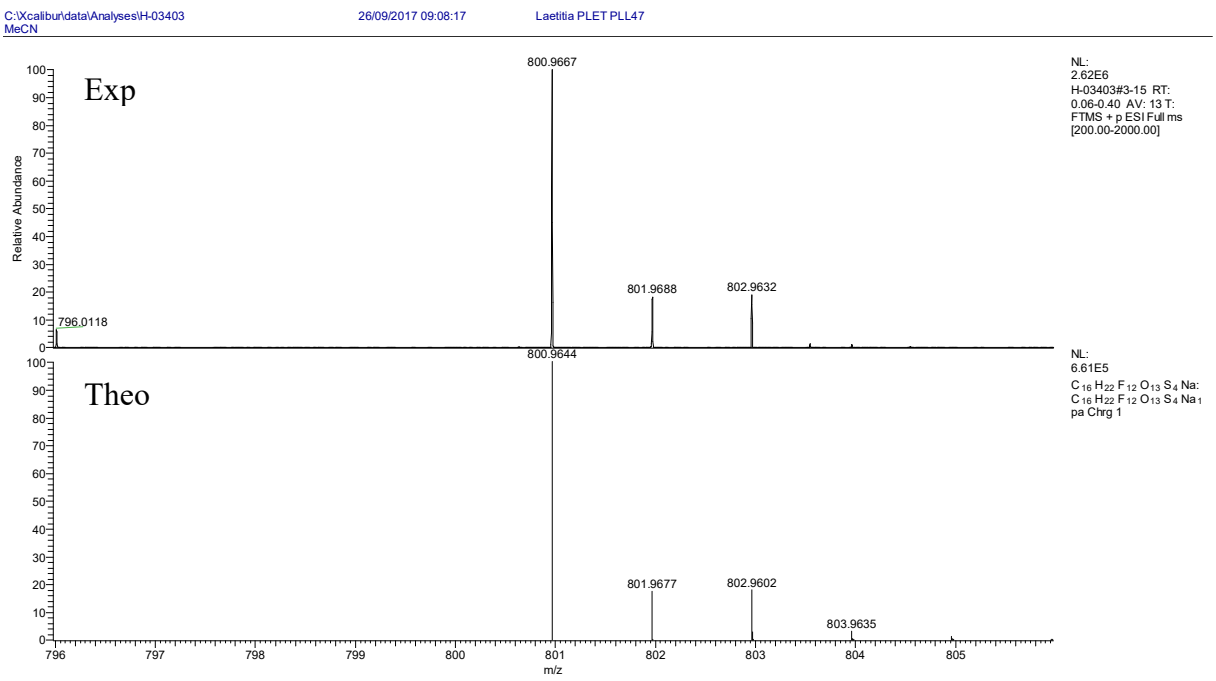
Annexe 2.5. Spectre RMN ^{1}H du 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane tristriflate



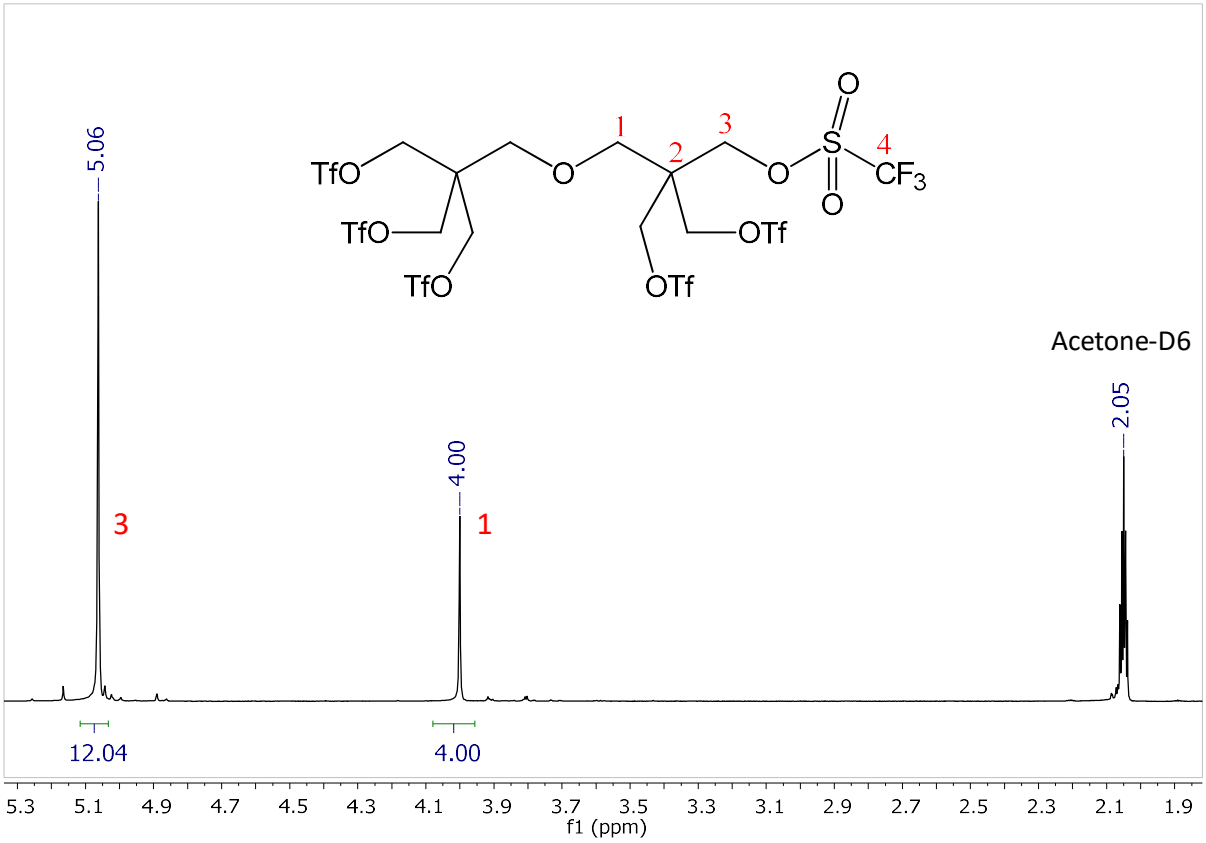
Annexe 2.6. HRMS-ESI du 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane tristriflate à 10 µg/mL dans l'ACN



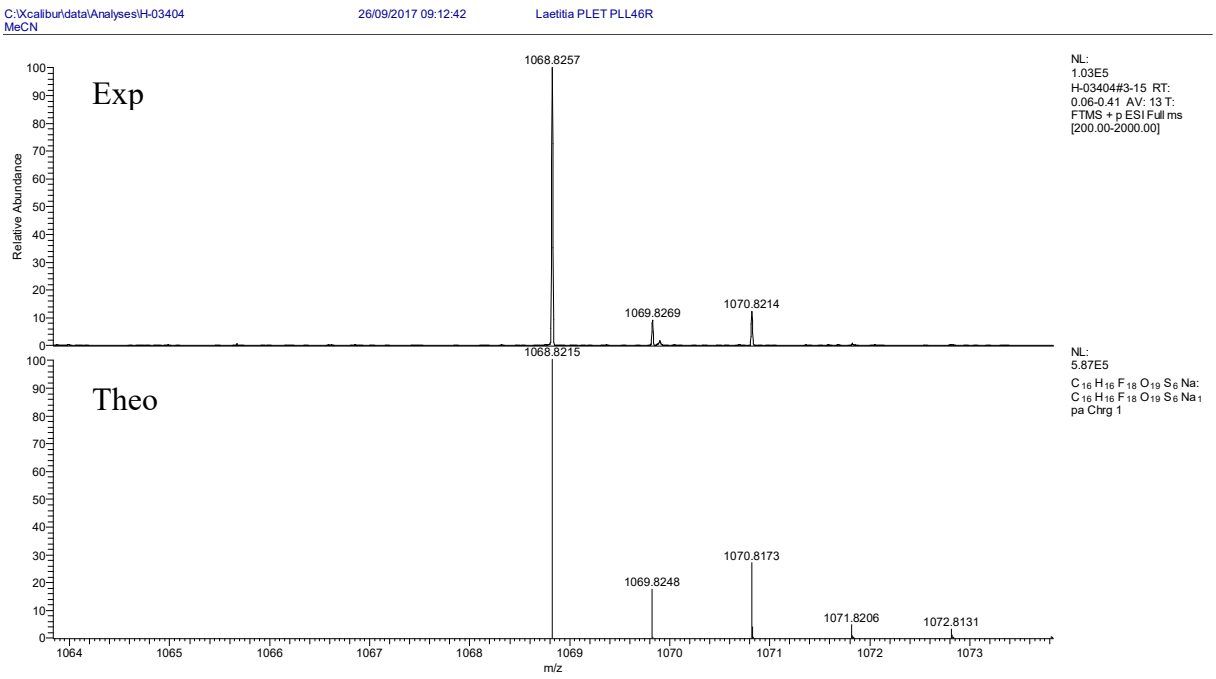
Annexe 2.7. Spectre RMN ^{1}H du di(triméthylolpropane) tétratriflate dans l'acétone-D_6 à 20°C



Annexe 2.8. HRMS-ESI du di(triméthylolpropane) tétratriflate à 10 µg/mL dans l'ACN



Annexe 2.9. RMN ^{1}H du dipentaerythritol hexatriflate dans l'acétone-D_6 à 20°C



Annexe 2.10. Spectre HRMS-ESI du dipentaerythritol hexatriflate à 10 µg/mL dans l'ACN

Chapitre 3

Synthèse de nouveaux vecteurs cationiques en étoile

Sommaire

Introduction 125

Partie 1 – Synthèse des précurseurs poly(2-oxazoline)s 126

I. Synthèse de poly(2-oxazoline)s linéaires 126

1. Conditions de séchage du solvant 126

2. Synthèse de poly(2-méthyl-2-oxazoline)s linéaires 127

a. Amorceurs utilisés 127
b. Etude de la terminaison 127
c. Synthèse de PMeOx de haute masse molaire 133

3. Synthèse de poly(2-éthyl-2-oxazoline)s linéaires 136

II. Utilisation des amorceurs multitosylates pour la polymérisation de MeOx 138

III. Utilisation des amorceurs multitriflates pour la polymérisation de MeOx et d'EtOx. 140

1. Synthèse de poly(2-méthyl-2-oxazoline)s en étoile 141

a. Synthèse 141
b. Etude du taux de branchement des PMeOx en étoile 146
c. Etude cinétique de la polymérisation de MeOx à partir d'amorceurs multitriflates (I_3, I_{e4} et I_{e6}) 151

2. Synthèse de poly(2-éthyl-2-oxazoline)s en étoile 154

a. Synthèse 154
b. Etude du taux de branchement des PEtOx en étoile 159
c. Etude cinétique 159

Partie 2 – Synthèse des poly(éthylèneimine)s 167

I. Hydrolyse basique 167

1. Hydrolyse basique des PMeOx 167

2. Hydrolyse basique des PEtOx 169

II. Hydrolyse acide 172

III. Comparaison des hydrolyses acide et basique 174

Partie 3 – Post-modification de la PEI 177

I. Synthèse du L-histidine-*N*-acryloyle (HNA) 177

II. Modification de PEI par l'HNA 182

Conclusion 186

Références 188

Annexes 191

Introduction

Ce chapitre est consacré à la synthèse, la caractérisation et à la modification de nouveaux polymères cationiques, potentiels vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes.

Dans une première partie, nous décrirons la synthèse des précurseurs poly(2-oxazoline)s (POx). Après avoir défini les conditions optimales de synthèse dans le cas de POx linéaires, la synthèse de poly(2-méthyl-2-oxazoline)s (PMeOx) et poly(2-éthyl-2-oxazoline)s (PEtOx) en étoile sera étudiée en utilisant les amorceurs multifonctionnels tosylates et triflates précédemment synthétisés. La caractérisation des polymères obtenus par des méthodes directes (chromatographie d'exclusion stérique, RMN) et indirectes (études cinétiques) sera particulièrement développée.

Dans une deuxième partie, l'hydrolyse des POx en étoile sera étudiée en vue d'obtenir une bibliothèque de PEI. Les hydrolyses effectuées en conditions basiques et en conditions acides seront présentées puis comparées.

Enfin, dans une troisième partie, au vu de l'apport de la modification des *l*PEI par des résidus histidine sur la transfection[1], la post-modification des PEI en étoile par greffage de résidus histidine sera développée.

Partie 1 – Synthèse des précurseurs poly(2-oxazoline)s

I. Synthèse de poly(2-oxazoline)s linéaires

Dans le but d'optimiser les conditions de polymérisation, des polymères linéaires ont d'abord été synthétisés. Dans cette première partie sont exposées : une étude préliminaire sur les conditions de séchage du solvant, la mise au point de conditions efficaces de terminaison et les possibilités d'obtention de POx de masse molaire élevée via la polymérisation de MeOx et d'EtOx.

1. Conditions de séchage du solvant

Dans un premier temps, les conditions de séchage de l'acétonitrile (ACN), solvant de polymérisation, ont été étudiées. La quantité d'eau contenue dans l'acétonitrile a été dosée à l'aide d'un titreur Karl Fischer. Cette mesure a été réalisée au préalable sans sécher le solvant puis en séchant ce dernier sur du tamis moléculaire 3 Å (tamis préalablement activé par chauffage à 150°C sous vide pendant 10h), ou sur de l'hydrure de calcium (CaH_2). Dans les deux derniers cas, après avoir été mis en contact avec le desséchant pendant 24h, l'ACN a été cryodistillé dans un réacteur, puis prélevé en boîte à gants avec une seringue et injecté dans l'appareil de mesure très rapidement après la sortie de la boîte à gants. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.1.

Tableau 3.1. Quantité d'eau contenue dans l'ACN (titration Karl Fischer)

Type de séchage	Quantité d'eau (ppm)	Quantité d'eau ($mol.L^{-1}$)
Aucun (bouteille)	117,9	$5{,}1.10^{-3}$
Tamis 3Å activé puis cryodistillation	5,8	$2{,}5.10^{-4}$
CaH_2 puis cryodistillation	2,5	$1{,}0.10^{-4}$

Cette courte étude a permis de justifier qu'une étape de séchage du solvant était indispensable pour diminuer d'un ordre de grandeur la concentration en eau dans celui-ci. En effet, il est répertorié[2] que la présence d'eau favorise les réactions de transfert et limite les masses molaires qu'il est possible d'obtenir. L'hydrure de calcium étant plus efficace que le tamis moléculaire pour éliminer l'eau, c'est par cette technique que le solvant, ainsi que les monomères et amorceurs liquides, seront séchés dans toutes les polymérisations présentées par la suite, dans l'objectif de cibler des masses molaires élevées.

2. Synthèse de poly(2-méthyl-2-oxazoline)s linéaires

a. Amorceurs utilisés

Dans cette thèse, deux amorceurs monofonctionnels ont été utilisés. Tout d'abord, le bromure d'allyle pour son efficacité d'amorçage et la caractérisation aisée de la fonction allylique par RMN ^{1}H. Les protons allyliques résonnent à 5,73 ppm et 5,17 ppm dans les spectres des poly(2-méthyl-2-oxazoline)s amorcées par le bromure d'allyle. D'autre part, le trifluorométhanesulfonate d'éthyle (ou triflate d'éthyle, noté EtOTf) a aussi été utilisé pour polymériser des POx linéaires qui serviront de référence pour les étoiles. Pour faciliter la lecture « I » fera référence à l'amorceur (initiator).

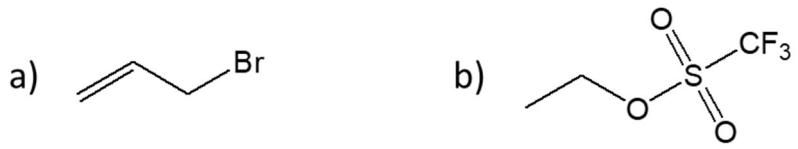


Figure 3.1. Amorceurs monofonctionnels utilisés pour la synthèse de POx linéaires :
a) bromure d'allyle, b) triflate d'éthyle.

b. Etude de la terminaison

L'étape de terminaison est une étape clé de la polymérisation. Mettre en place des conditions de terminaison efficaces permettrait de pouvoir utiliser les fonctions terminales pour vérifier la structure du polymère (détermination de la masse molaire par RMN par exemple). D'un point de vue applicatif, pouvoir fonctionnaliser les polymères (vecteur potentiel en thérapie génique) par une molécule d'intérêt (ligand) permettrait de cibler spécifiquement les

cellules souhaitées via des récepteurs spécifiques et donc d'améliorer la sélectivité des traitements. La fonctionnalisation des PMeOx par différents nucléophiles a été répertoriée par Robin[3], qui signale que la nucléophilie des réactifs utilisés ne semble pas affecter le taux de fonctionnalisation. Afin de confirmer cela, nous avons décidé d'investiguer la réaction d'oxazolinium avec différentes amines (primaires et secondaires) (Figure 3.2), puis la purification des polymères obtenus sera étudiée dans cette partie.

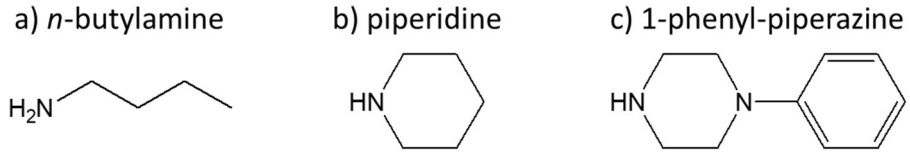


Figure 3.2. Structures des amines primaires ou secondaires utilisées pour désactiver les polymérisations

Les premières polymérisations de PMeOx linéaires ont été désactivées par l'ajout d'une amine primaire, la *n*-butylamine dans des conditions inspirées de la littérature[4–6] : température ambiante pendant 1h, 15 équivalents par centre actif (PLL7P2, Tableau 3.2). Les polymères ainsi obtenus ont été purifiés par précipitation dans le diéthyléther. Cependant, nous avons montré que cette méthode de purification ne permettait pas d'éliminer efficacement l'excès de *n*-butylamine. Sur le spectre RMN ^{1}H du produit purifié par deux précipitations successives dans le diéthyléther (Figure 3.3), les signaux caractéristiques des motifs de répétition sont visibles à 3,42 et 2,11 ppm avec les proportions relatives attendues. En utilisant le signal du proton allylique à 5,75 ppm et celui des protons méthylène du motif de répétition à 3,42 ppm, une masse molaire RMN a été calculée ($M_{n\ RMN}$ = 2800 g.mol^{-1}). Cette valeur est très proche de la masse molaire théorique ($M_{n\ théo}$ = 2500 g.mol^{-1}) et de la masse molaire obtenue par chromatographie d'exclusion stérique (CES) dans le diméthylformamide (DMF) ($M_{n\ CES}$ = 2400 g.mol^{-1}). Les signaux de la *n*-butylamine sont, quant à eux, identifiés à 1,62, 1,39 et 0,91 ppm. Leurs intégrations respectives, deux fois supérieures à celles attendues, mettent en évidence l'inefficacité de la méthode de purification par précipitation dans le diéthyléther pour éliminer l'excès de *n*-butylamine (aucune diminution des intégrations des signaux entre la première précipitation et deuxième précipitation). Au contraire, l'utilisation de la dialyse contre l'eau, une autre technique de purification, dans un travail mené en parallèle au laboratoire, a permis d'éliminer toute la *n*-butylamine en excès, montrant ainsi que la

fonctionnalisation des chaînes par cette amine primaire n'avait pas lieu malgré le très large excès utilisé (Figure 3.4).

Tableau 3.2. Conditions de terminaison des polymérisations de PMeOx linéaires

Run	[I] ($mol.L^{-1}$)	[M] ($mol.L^{-1}$)	polym time (h)	Quencher	eq	Quenching time (h)	Purification	p (%)[1]	M_n theo ($kg.mol^{-1}$)[2]	$M_{n\ SEC}$ ($kg.mol^{-1}$)[3]	Đ[3]	$M_{n\ RMN}$ ($kg.mol^{-1}$)[4]	F (%)[5]
PLL7P2	0.0014	3.0	24	*n*-butylamine	15	1	Et_2O (2)*	100	2.5	2.4	1.24	2.8	0
PLL40D	0.100	3.0	21	piperidine	5	24	H_2O (1)**	94	2.4	2.6	1.23	3.0	99.8
PLL53D2	0.118	3.5	24	1-phenylpiperazine	5	24	H_2O (2)**	100	2.5	2.6	1.17	3.0	83
PLL75D6	0.123	3.5	24	1-phenylpiperazine	10	24	H_2O (2) +MeOH (4)**	100	2.4	2.5	1.19	2.9	99.3

[1] Conversion calculated from the reaction medium analysis by ^{1}H NMR
[2] $M_{n\ theo}$ = $[M]_0$ /$[I]_0$ × p × M_{MeOx}. $[M]_0$, $[I]_0$, p and M_{MeOx} correspond respectively to the initial monomer and initiator concentration, conversion and molar mass of repeat unit
[3] determined by SEC in DMF after dialysis against H_2O, RI detector, PMMA calibration
[4] determined by ^{1}H NMR after dialysis
[5] functionalization, effective percentage of polymer chain ended by the expected quencher, calculated by ^{1}H NMR after purification
*Purified by precipitation and ** purified by dialysis. The number of precipitation or dialysis done is specified under bracket

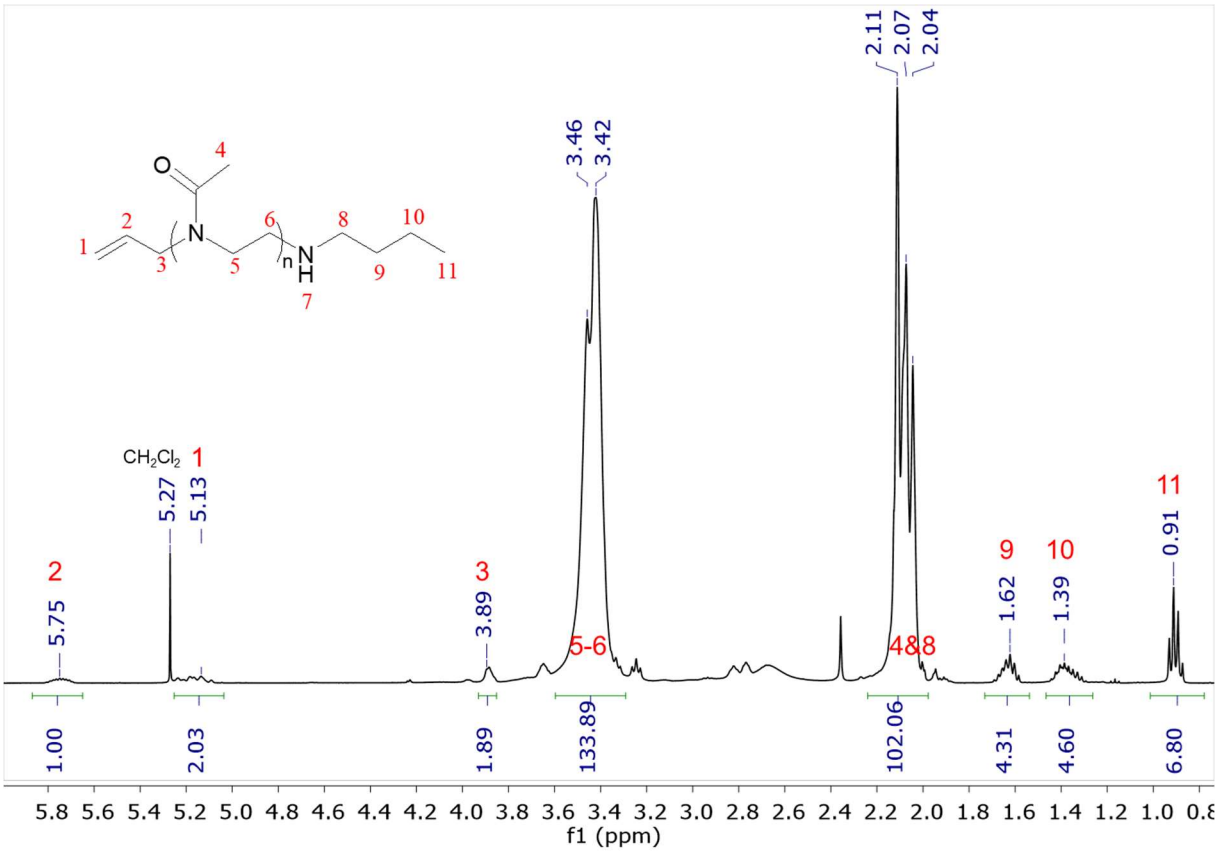


Figure 3.3. Spectre RMN ^{1}H de PLL7P2 dans le $CDCl_3$ à 20°C

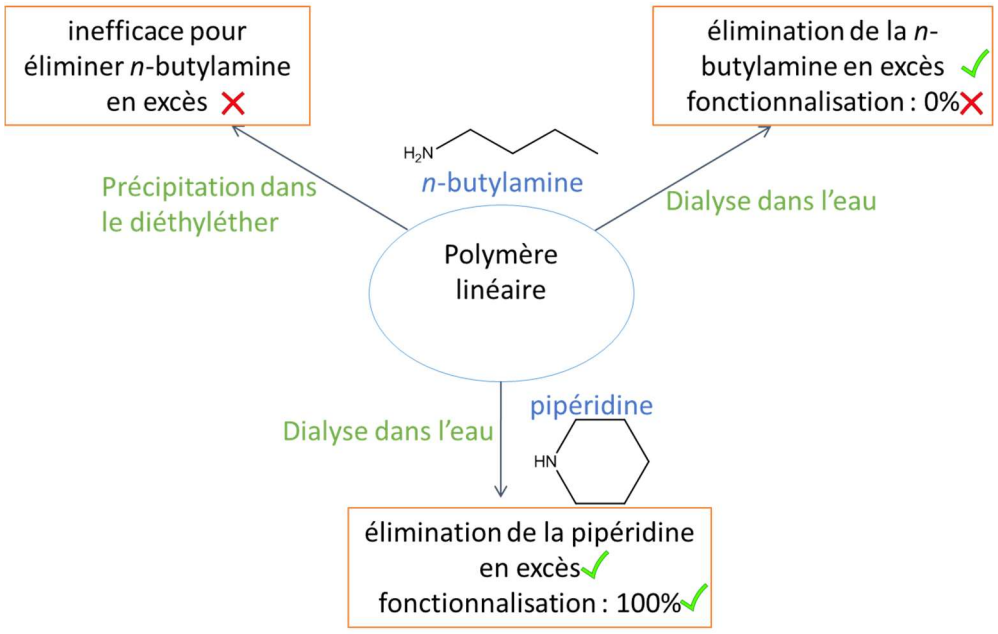


Figure 3.4. Essais de fonctionnalisation de PMeOx linéaires

Par la suite, une amine secondaire, la pipéridine, a été utilisée pour désactiver les centres actifs en fin de polymérisation[7]. Dans les conditions suivantes : 5 équivalents, 24h à température ambiante et après purification du polymère par dialyse contre l'eau, une fonctionnalisation totale des extrémités de chaîne a été obtenue (PLL40D, Tableau 3.2). Sur le spectre RMN ^{1}H de PLL40D présenté à la Figure 3.5, les protons méthylène 9 et 10 de la pipéridine résonnent à 1,51 et 1,38 ppm tandis que le signal des protons méthylène 8 en alpha de l'amine tertiaire est plus déblindé (2,36 ppm). L'utilisation des protons allyliques de l'amorceur permettent de calculer une $M_{n\ RMN}$ de 3000 g.mol^{-1}, cohérente avec la $M_{n\ CES}$ de 2600 g.mol^{-1} et la $M_{n\ théo}$ de 2400 g.mol^{-1}. Après dialyse, un taux de fonctionnalisation de 100% est calculé en utilisant le signal des protons méthylène 9 à 1,51 ppm et celui du proton allylique 2 à 5,73 ppm. L'expérience DOSY (Figure 3.6) permet de mesurer un coefficient de diffusion des protons de chacun des signaux du spectre RMN ^{1}H. Le coefficient de diffusion moyen calculé est $D = (1.87 \pm 0.1).10^{-10}$ m^2.s^{-1}. Le très faible écart type prouve que les signaux des protons 8, 9 et 10 de la pipéridine utilisés pour calculer le taux de fonctionnalisation appartiennent bien au polymère. La caractérisation complète par RMN est présentée en annexes (RMN ^{13}C en Annexe 3.1 et RMN HSQCed en Annexe 3.2).

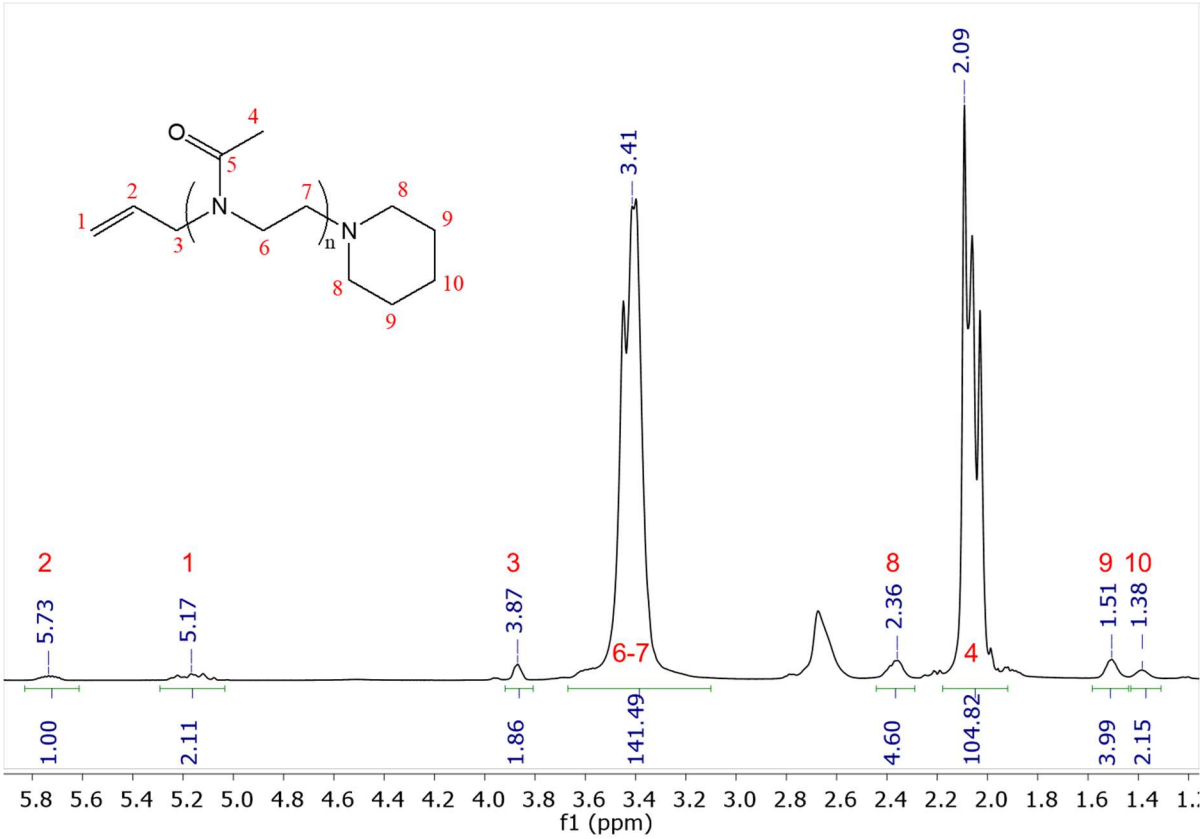


Figure 3.5. Spectre RMN ^{1}H de PLL40D dans le $CDCl_3$ à 20°C

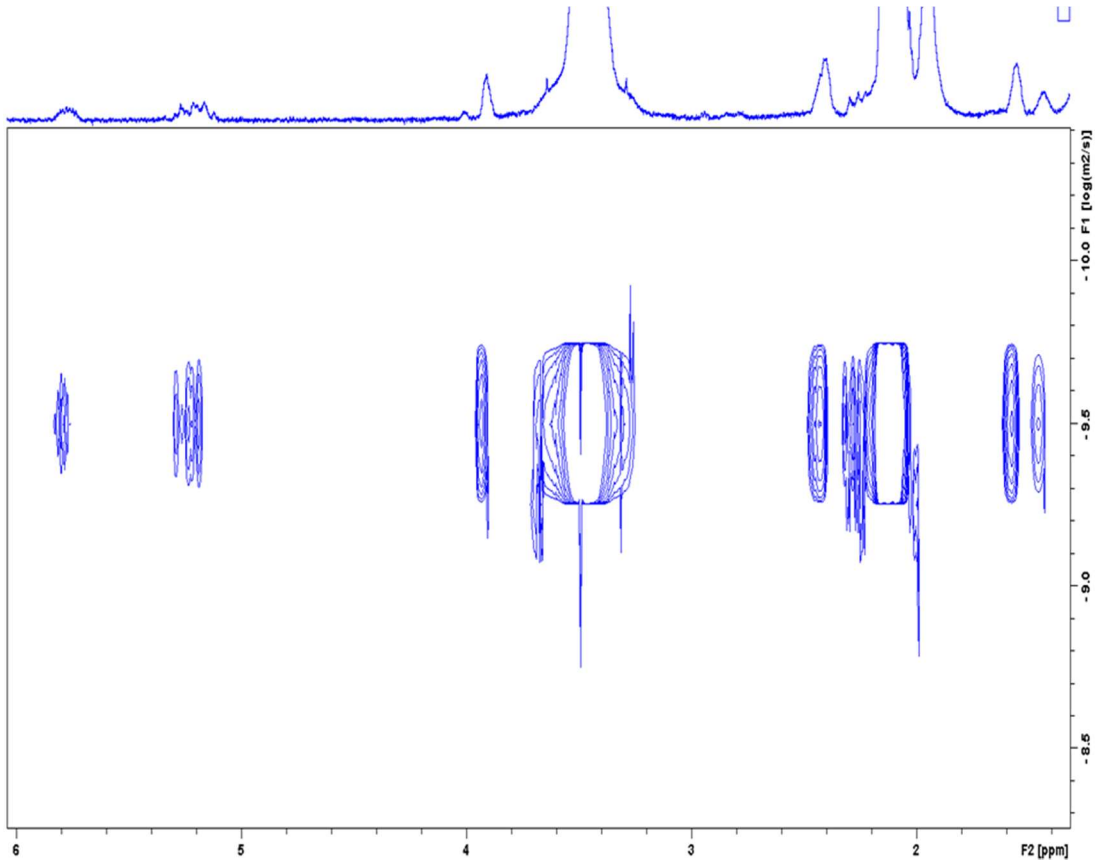


Figure 3.6. Spectre RMN DOSY de PLL40D dans $CDCl_3$ à 25°C

La fonctionnalisation par un dérivé de la pipéridine, la 1-phényl-pipérazine, a aussi été étudiée. Ce composé, plus hydrophobe et de masse molaire plus élevée, est un modèle pour d'autres molécules qui pourraient être utilisées dans un objectif de synthèse de polymère fonctionnel. Une première synthèse (PLL53D2, Tableau 3.2) a été faite en appliquant les conditions de désactivation définie pour la pipéridine : 5 équivalents d'agent de terminaison, 24h de réaction à température ambiante. Après deux dialyses successives contre l'eau, un pourcentage de fonctionnalisation de 83% a été calculé par RMN ^{1}H pour ce polymère. Pour tenter d'améliorer ce résultat, une deuxième synthèse de PMeOx de masse molaire identique (PLL75D6, Tableau 3.2) a été effectuée, en augmentant cependant l'excès de 1-phényl-pipérazine (10 équivalents) lors de la désactivation des centres actifs. Six dialyses (2 contre l'eau et 4 contre le méthanol) ont été nécessaires pour éliminer avec succès l'excès de 1-phényl-pipérazine. Le spectre du polymère ainsi obtenu, noté PLL75D6, est présenté Figure 3.7. L'attribution des signaux a été faite grâce aux analyses RMN complémentaires (RMN ^{13}C en Annexe 3.3 et RMN COSY en Annexe 3.4 et HSQCed en Annexe 3.5).

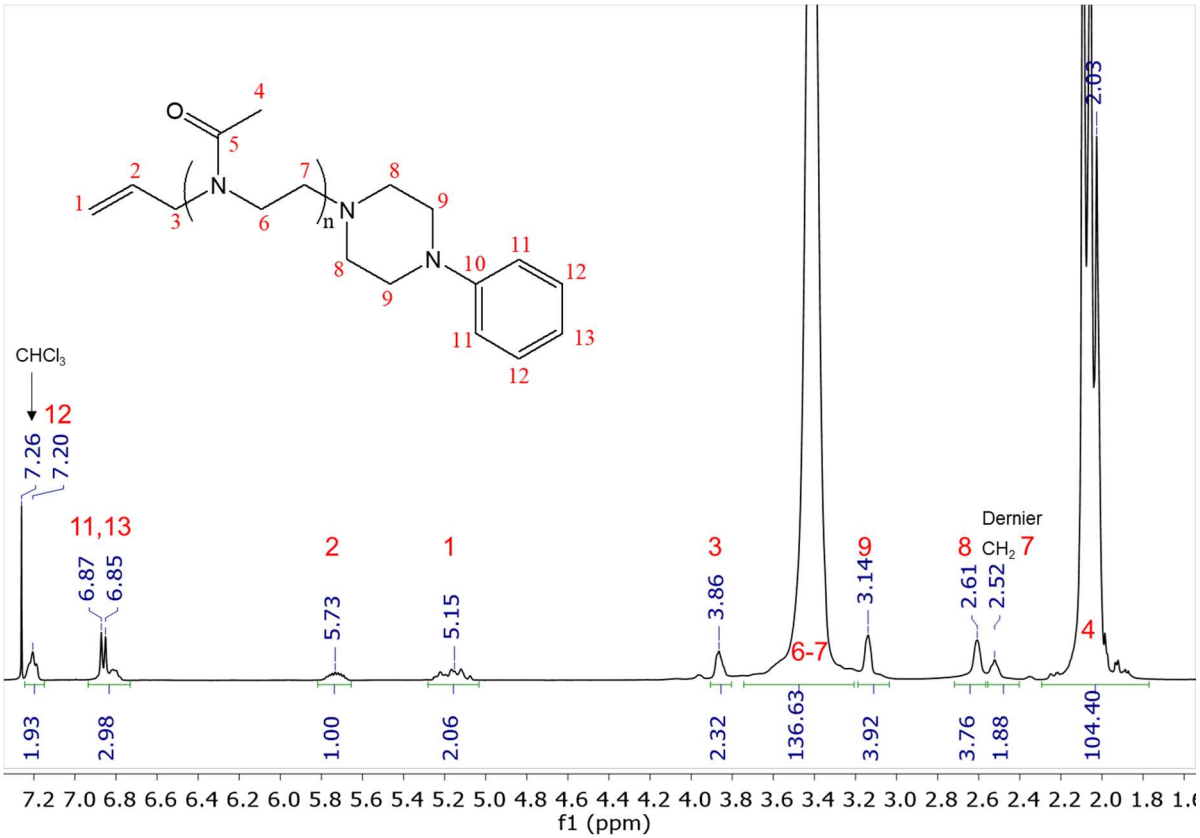


Figure 3.7. Spectre RMN ^{1}H de PLL75D6 dans le $CDCl_3$ à 20°C

Cette étude met en évidence l'efficacité des dérivés de la pipéridine pour désactiver les centres actifs en fin de polymérisation, comparés aux dérivés moins nucléophiles tels que les amines primaires. La 1-phénylpipérazine est un agent de terminaison intéressant pour quantifier les extrémités des chaînes des polymères grâce aux signaux des protons aromatiques facilement identifiables en RMN ^{1}H, et représente un bon modèle de molécules encombrées pouvant être utilisés pour fonctionnaliser les POx. Cependant son utilisation nécessite de nombreuses étapes de purification du polymère pour s'affranchir de l'excès de 1-phénylpipérazine. Cette étude permet de sélectionner les dérivés de la pipéridine pour la fonctionnalisation des POx en étoile. Par ailleurs, la morpholine, dérivé hydrosoluble de la pipéridine sera également étudiée. La caractérisation détaillée d'un polymère en étoile de faible masse molaire sera présentée dans le paragraphe III.1.a) pour évaluer l'efficacité de ce composé.

c. Synthèse de PMeOx de haute masse molaire

Pour l'application visée, des poly(2-oxazoline)s de masse molaire élevée ($X_{n\ visé} \approx 590$ soit PMeOx d'environ 50 000 g.mol^{-1} ou PEtOx d'environ 58 000 g.mol^{-1}) doivent pouvoir être synthétisées dans des conditions contrôlées afin d'obtenir des poly(éthylèneimine)s de masse molaire 25 000 g.mol^{-1} et de structure contrôlée. Dans ce but, la polymérisation de la MeOx a été étudiée dans les conditions habituelles : dans l'acétonitrile à 80°C (chauffage conventionnel) à partir des deux amorceurs préalablement évoqués, le bromure d'allyle (PLL59D, Tableau 3.3) et le triflate d'éthyle (PLL58D, Tableau 3.3) en visant une masse molaire de 50 kg.mol^{-1}. Plusieurs prélèvements du milieu réactionnel, à la seringue à travers le septum du réacteur, sont faits au cours de la polymérisation dans le but de suivre la conversion en monomère. Dans les deux cas, au bout d'environ 2 jours de polymérisation, un premier prélèvement est fait et le milieu réactionnel, parfaitement limpide permet d'estimer la conversion avec une bonne fiabilité. Toutefois, dès le deuxième prélèvement, à 95h et 140h respectivement pour PLL59 et PLL58, le milieu est trouble et lors du 3^{e} prélèvement, le milieu étant blanc opaque, les polymérisations sont arrêtées. L'hétérogénéité du milieu conduit à une incertitude importante dans la détermination de la conversion à tel point que les conversions déterminées à environ 160h sont inférieures à celles déterminées à partir du prélèvement précédent (Figure 3.8). Il semblerait donc que dans une gamme de masses molaires comprises entre 28 et 38 kg.mol^{-1}, une précipitation ait lieu, comme l'a aussi décrit Sedlacek *et al.*[8] récemment.

Tableau 3.3. Synthèse de PMeOx linéaires de masse molaire élevée

Run	Initiator	T (°C)	Polymerization time (h)	Quenching time (h)[1]	p (%)[2]	$M_{n\ theo}$ (kg.mol^{-1})[3]	$M_{n\ SEC}$ (kg.mol^{-1})[4]	Đ[4]
PLL59D	AlBr	80	163	28	>75*	>35.9	8.7	1.9
PLL58D	EtOTf	80	166	28	>69*	>34.2	8.5	1.33
PLL67D	EtOTf	MW 140	1.5	15	100	49.2	31.4	2.54

[MeOx] ≈ 3.5 M, [I] = 6.0 mM, $M_{n\ aimed}$ ≈ 50 kg.mol^{-1}
[1]Polymer quenched by piperidine (5 eq)
[2] Conversion calculated from the reaction medium analysis by ^{1}H NMR
[3] $M_{n\ theo} = [M]_0 /[I]_0 \times p \times M_{MeOx}$. $[M]_0$, $[I]_0$, p and M_{MeOx} correspond respectively to the initial monomer and initiator concentration, conversion and molar mass of repeat unit
[4] determined by SEC in DMF after dialysis against H_2O, RI detector, PMMA calibration
*Unsoluble (reaction medium + NMR sample)

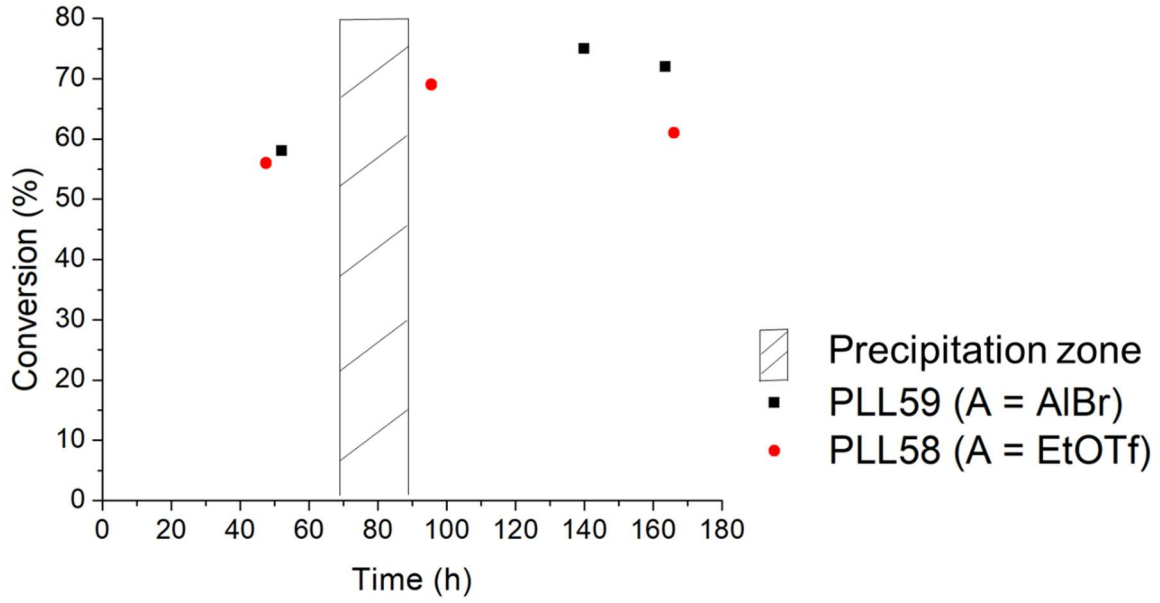


Figure 3.8. Conversion estimée par RMN ^{1}H en fonction du temps pour les polymérisations de MeOx amorcées par le bromure d'allyle (■) ou le triflate d'éthyle (●) ; $M_{n\ visée}$ 50 kg.mol^{-1}

L'analyse par CES des polymères après dialyse contre l'eau conduit à des $M_{n\ CES}$ très faibles par rapport aux $M_{n\ theo}$ (Tableau 3.3). L'allure des chromatogrammes est présentée à la Figure 3.9.

Pour tenter de remédier à ce problème de solubilité, une polymérisation de MeOx de $M_{n\ visée}$ 50 kg.mol^{-1} a été menée en utilisant les microondes comme source d'énergie, permettant

ainsi de régler la température à 140°C (PLL67D, Tableau 3.3). Ce mode de synthèse, abondamment décrit pour la synthèse de POx présente l'avantage de réduire considérablement les temps de réaction[9]. Dans ce cas précis, après 1h30 de réaction, la conversion en monomère est totale et le milieu réactionnel est toujours limpide, remédiant ainsi au problème d'hétérogénéité du milieu réactionnel qui apparaît avant même la conversion totale du monomère dans le cas des polymérisations réalisées par chauffage conventionnel à 80°C. La masse molaire du polymère obtenue par CES dans le DMF est plus élevée dans le cas de cette synthèse (31,4 kg.mol^{-1}), mais reste éloignée de la $M_{n\ théo}$ (49,2 kg.mol^{-1}). Cependant, le polymère obtenu présente une dispersité très élevée de 2,54 (Tableau 3.3 et Figure 3.9). La thermodynamique ne justifie pas une meilleure solubilité des POx lors de synthèse par chauffage micro-onde que lors de synthèse par chauffage conventionnel. Nous supposons donc que la cinétique de polymérisation des oxazolines dans le cas d'un chauffage micro-onde est très supérieure à la cinétique de précipitation de ce dernier, permettant l'obtention de masses molaires élevées. Toutefois, comme nous l'avons vu, la forte dispersité peut être expliquée par une augmentation des réactions secondaires durant la polymérisation.

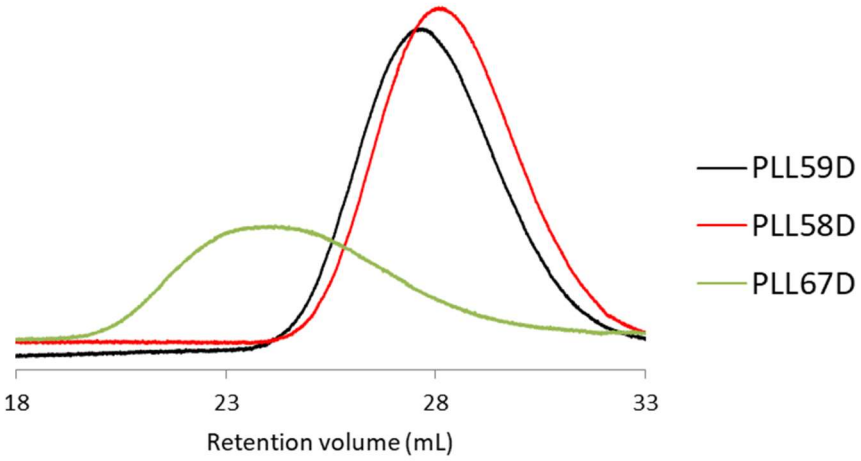


Figure 3.9. Allure des chromatogrammes CES (DMF, détection RI) des PMeOx de hautes $M_{n\ visées}$

En conclusion, bien que le mode de chauffage par microondes résolve le problème de la précipitation du polymère au cours de la synthèse, il semble être propice à des réactions secondaires et conduire à la synthèse de polymère de structure peu contrôlée pour l'application visée. Par conséquent, nous n'utiliserons pas cette technique pour la suite du projet.

3. Synthèse de poly(2-éthyl-2-oxazoline)s linéaires

La polymérisation de la 2-éthyl-2-oxazoline (EtOx) est décrite dans la littérature comme contrôlée, permettant la synthèse de PEtOx de masses molaires élevées[3,10]. Nous avons synthétisé trois PEtOx linéaires de $M_{n\ visée}$ croissantes. La concentration initiale en EtOx dans le milieu réactionnel est fixée à 3,5 mol.L^{-1} et la concentration en bromure d'allyle est ajustée pour obtenir le ratio $[M]_0/[I]_0$ souhaité (Tableau 3.4). Les polymérisations sont effectuées à 80°C pendant un temps suffisant pour atteindre une conversion en monomère proche de 100%. Les polymérisations ont été amorcées par le bromure d'allyle et les conditions de terminaison et de purification des polymères obtenus sont précisées dans le Tableau 3.4. Les trois polymères synthétisés ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique sur deux lignes : une ligne dans le diméthylformamide (DMF) équipée d'un détecteur à indice de réfraction (RI) et une ligne dans l'eau équipée d'une triple détection (détecteurs à indice de réfraction (RI), de diffusion de la lumière (LS) et viscosimétrique). Les valeurs des masses molaires obtenues ainsi que les indices de polydispersité sont consignés dans le Tableau 3.4. L'allure des chromatogrammes diffère selon la ligne CES utilisée (Figure 3.10). Les analyses dans l'eau conduisent à des pics monomodaux de dispersité étroite ($1{,}12 < Đ < 1{,}22$), tandis que les analyses dans le DMF révèlent un épaulement aux fortes masses molaires (MM). Ce phénomène est plus marqué pour le polymère de masse molaire élevée. Ce résultat pourrait être attribué à la formation d'agrégats ; cette interprétation sera discutée dans le paragraphe dédié aux polymères en étoile. La traînée aux faibles MM sur le chromatogramme de PLL97D semble révéler la présence d'une quantité non négligeable de réactions de transfert, qui peuvent être expliquées par les trois prélèvements du milieu réactionnel faits pendant la polymérisation (à travers le septum) pour évaluer la conversion. Une quantité d'eau suffisante pour provoquer du transfert au monomère a dû être introduite lors de ces prélèvements. Les deux autres polymérisations ont, quant à elles, été faites dans un réacteur fermé, sans aucun prélèvement. La masse molaire de PLL97D, PEtOx de plus faible masse molaire ($M_{n\ theo}$ = 17,6 kg.mol^{-1}), a aussi été évaluée par RMN ^{1}H en utilisant les signaux des protons allyliques et des protons méthylène des motifs de répétition. Une $M_{n\ RMN}$ de 19,6 kg.mol^{-1} tout à fait cohérente avec la $M_{n\ theo}$ a été calculée.

En conclusion, utiliser l'éthyl-2-oxazoline semble être plus approprié qu'utiliser la 2-méthyl-2-oxazoline pour synthétiser des POx de haute masse molaire de structure suffisamment contrôlée pour l'application visée. Cette observation est en accord avec la littérature[3,10].

Tableau 3.4. Synthèse de PEtOx linéaires

Run	$[M]_0/[I]_0$	t (h)	p[1] (%)	$M_{n\ theo}$[2] (kg.mol^{-1})	$M_{n\ NMR}$[3] (kg.mol^{-1})	$M_{n\ SEC\ DMF}$[4] (kg.mol^{-1})	Đ[4]	$M_{n\ SEC\ H2O}$[5] (kg.mol^{-1})	Đ[5]
PLL97D#	186.5	72	95.3	17.6	19.6	12.1	1.67	14.5	1.18
PLL110D*	370.3	118	100	36.7	-	22.1	2.00	31.3	1.12
PLL111D*	589.8	279	100	58.5	-	34.9	2.03	45.2	1.22

$[M]_0$ = 3.5 mol.L^{-1}, polymerization initiated by allyl bromide
polymer quenched by aniline at room temperature for 4 days and dialyzed once in MeOH (1h + 1h + 16h)
* polymer quenched by morpholine at room temperature for 5 days and dialyzed once in H_2O (1 h + 2h + 16h + 5h)
[1] Conversion calculated from the reaction medium analysis by ^{1}H NMR
[2] $M_{n\ theo} = [\mathbf{M}]_0 / [\mathbf{I}]_0 \times p \times M_0$
[3] determined by ^{1}H NMR after dialysis
[4] determined by SEC in DMF after dialysis, RI detector, PMMA calibration
[5] determined by SEC in H_2O after dialysis, M_n^{LS}

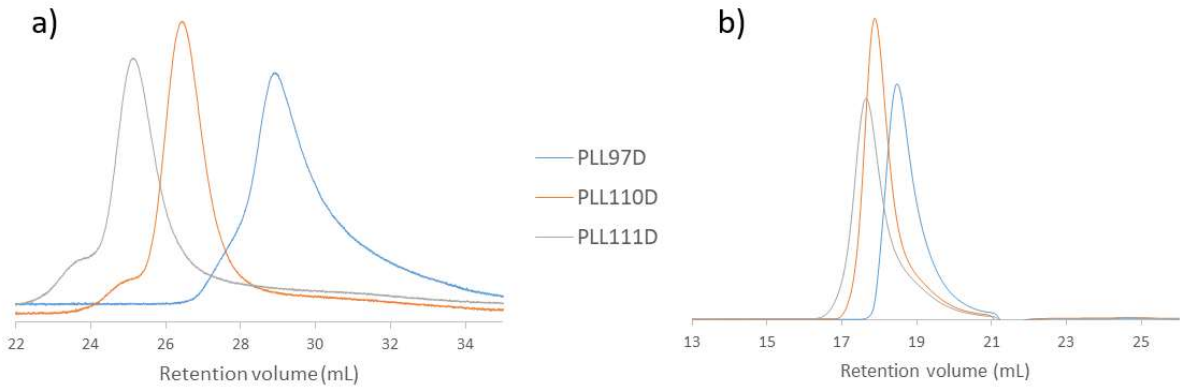


Figure 3.10. Chromatogrammes CES des PEtOx linéaires : a) DMF détection RI, et b) H_2O détection RI

II. Utilisation des amorceurs multitosylates pour la polymérisation de MeOx

Dans le but d'obtenir des PMeOx en étoile, les amorceurs tétra- et hexafonctionnels, respectivement le di(triméthylolpropane) tétratosylate noté TOS_4 et le dipentaérythritol hexatosylate noté TOS_6 (Figure 3.11), ont été utilisés pour amorcer la polymérisation de la 2-méthyl-2-oxazoline (MeOx). Les différentes réactions de polymérisation menées sont présentées dans le Tableau 3.5. Hoogenboom *et al.*[11] ont réussi à obtenir des étoiles de poly(2-éthyl-2-oxazoline) en utilisant le pentaérythritol tétratosylate et le dipentaérythritol hexatosylate (TOS_6) en effectuant la polymérisation à 140°C dans l'ACN sous irradiations microondes. Nous nous intéressons ici à savoir s'il est possible de polymériser la MeOx à partir de ces amorceurs multifonctionnels dans des conditions de chauffage conventionnel (bain d'huile à 80°C) pour éviter les réactions secondaires induites par le chauffage microonde. Les conditions de polymérisation ont préalablement été mises au point pour la synthèse de PMeOx linéaires : polymérisation dans l'acétonitrile (ACN) à 80°C (bain d'huile), [MeOx] ≈ 3,5 M, ACN et MeOx séchés sur CaH_2 et fraîchement cryodistillés avant la polymérisation.

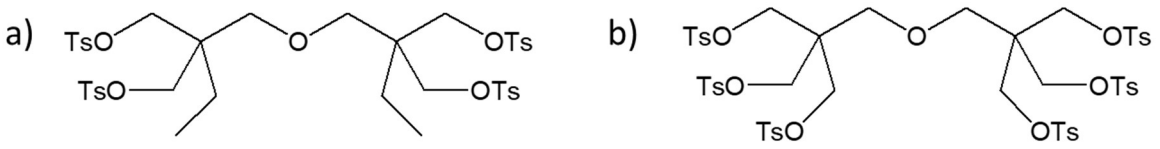


Figure 3.11. Structures chimiques des amorceurs multitosylate a) di(triméthylolpropane) tétratosylate, noté TOS_4, b) dipentaerythritol hexatosylate, noté TOS_6

Tableau 3.5. Essais de polymérisation menés avec des amorceurs multitosylates

Run	$[M]_0/[I]_0$	I	$[I]_0$ (mmol/L)	$[M]_0$ (mol/L)	T (°C)	Solvent	time (h)	Quencher	Quenching time (h)	mass conversion (%)	p[1] (%)
PLL24	62	TOS_6	53	3,3	80	ACN	50	*n*-butylamine	96 (80°C)	0	0
PLL35	194	TOS_4	17	3,3	80	ACN	48	piperidine	120 (25°C)	0	0
PLL36	194	TOS_4	18	3,5	80	ACN	312	piperidine	39 (25°C)	0	0
PLL31	184	TOS_4	19	3,5	100	DMAc	122	piperidine	20h (25°C)	0	0

TOS_6 = dipentaerythritol hexatosylate ; TOS_4 = di(trimethylolpropane) tetratosylate
[1] conversion evaluated by ^1H NMR

Un premier essai est mené en utilisant TOS_6 comme amorceur et en fixant un degré de polymérisation (X_n) théorique de 62, soit une masse molaire d'environ 5 300 $g.mol^{-1}$ (expérience PLL24, Tableau 3.5). Après 50h de polymérisation et désactivation du milieu réactionnel, une analyse RMN ^1H du milieu réactionnel final est faite. Les signaux de la MeOx (triplets à 4,16 et 3,72 ppm et un singulet à 1,88 ppm – spectre calibré sur le pic de l'ACN à 1,96 ppm) sont présents mais aucun signal caractéristique du polymère n'est visible. Après évaporation d'une majorité de composés volatils, une nouvelle analyse RMN ^1H confirme l'absence de polymère.

Trois essais sont ensuite réalisés avec TOS_4 en visant une masse molaire plus élevée (de l'ordre de 16 $kg.mol^{-1}$). Le premier (PLL35), effectué dans les mêmes conditions que précédemment, n'a pas permis l'obtention de polymère. Pour le deuxième essai (PLL36), la durée de polymérisation a été multipliée par 6. Même après 13 jours (312h), aucun polymère n'a été obtenu. Bien que la polymérisation des oxazolines soit le plus souvent réalisée dans l'ACN[12–14], l'utilisation d'autres solvants comme par exemple le *N*,*N*-diméthylacétamide (DMAc)[15,16] est aussi décrite. Un dernier essai de polymérisation en utilisant l'amorceur TOS_4 (PLL31) a été mené dans le DMAc à 100°C mais n'a pas conduit à l'obtention de polymère. Entre temps, le sulfolane, un solvant aprotique, a été décrit comme permettant d'augmenter la constante de propagation de la polymérisation de MeOx et EtOx[17]. Il aurait donc été intéressant de tester la polymérisation de la MeOx à partir des amorceurs multitosylates dans ces conditions.

Pour conclure, les trois amorceurs multitosylates (deux tétra- et un hexafonctionnel) synthétisés et caractérisés avec succès n'ont pas permis la polymérisation de la 2-méthyl-2-oxazoline dans les conditions testées (chauffage conventionnel, 80°C dans l'acétonitrile). C'est la raison pour laquelle des amorceurs multitriflates ont été synthétisés et utilisés dans la suite de ce travail. En effet, selon des études précédentes, l'utilisation d'amorceurs pluritriflates[18] a mené à un amorçage rapide et quantitatif contrairement à des amorceurs plurihalogénures ou pluritosylates[19].

III. Utilisation des amorceurs multitriflates pour la polymérisation de MeOx et d'EtOx

Quatre amorceurs tri-, tétra- et hexafonctionnels : le 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane tristriflate (I_3), le pentaérythritol tétratriflate (I_4), le di(triméthylolpropane) tétratriflate (I_{e4}) et le dipentaérythritol hexatriflate (I_{e6}) ont été synthétisés et caractérisés avec succès (Chapitre 2). Dans cette partie, seront décrites les polymérisations de la 2-méthyl-2-oxazoline et de la 2-éthyl-2-oxazoline menées avec ces amorceurs multifonctionnels ainsi qu'avec le triflate d'éthyle (amorceur monofonctionnel commercial) utilisé comme référence (Figure 3.12).

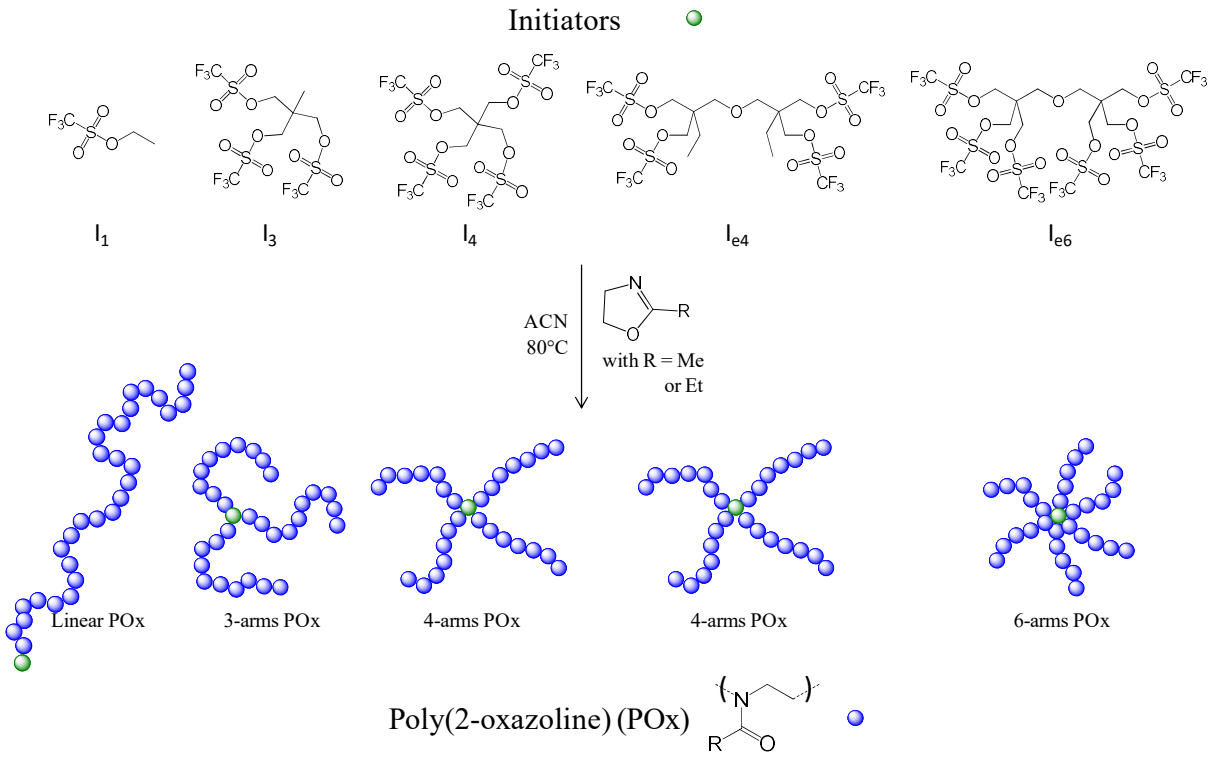


Figure 3.12. Structure des 5 amorceurs utilisés pour synthétiser des POx linéaire et en étoile contenant 3, 4 ou 6 branches

1. Synthèse de poly(2-méthyl-2-oxazoline)s en étoile

a. Synthèse

Les quatre amorceurs I_3, I_4, I_{e4} et I_{e6} ont été utilisés pour synthétiser des étoiles de poly(2-méthyl-2-oxazoline) respectivement à 3, 4 et 6 branches. Un polymère linéaire de référence a aussi été synthétisé en utilisant le triflate d'éthyle (I_1) comme amorceur. Les polymérisations ont toutes été réalisées à une concentration en monomère de 3,5 mol.L^{-1} et les centres actifs ont été désactivés en fin de polymérisation par l'ajout de 5 équivalents d'aniline pendant au moins 37h. Cet agent de terminaison est décrit comme efficace pour la fonctionnalisation des chaînes de POx[6]. Dans notre étude, il a été utilisé dans le but de se servir des signaux caractéristiques des fonctions phényle en RMN ^{1}H pour estimer la masse molaire des POx en étoile. Cette famille d'étoiles de PMeOx a été préparée en visant une masse molaire théorique de 16 kg.mol^{-1} ; le ratio initial [monomère]$_0$/[amorceur]$_0$ ([M]$_0$/[I]$_0$) a donc été fixé à 188. La conversion en monomère p a été évaluée à partir des spectres RMN ^{1}H de divers prélèvements du milieu réactionnel faits au cours du temps, en utilisant les pics des protons méthylène du monomère résiduel à δ = 4,12 et 3,69 ppm et le pic des protons méthylène du squelette du polymère à δ = 3,37 ppm. Les polymérisations ont toutes été arrêtées à conversion presque totale. Les caractéristiques des polymères obtenus sont listées dans le Tableau 3.6.

Tableau 3.6. Synthèses de PMeOx amorcées par I_1, I_3, I_{e4} et I_{e6}

Run	Initiator	time (h)	p[1] (%)	$M_{n\ theo}$[2] (kg.mol^{-1})	$M_{n\ SEC\ DMF}$[3] (kg.mol^{-1})	Đ[3]	$M_{n\ SEC\ H2O}$[4] (kg.mol^{-1})	Đ[4]
PLL98D[#]	I_1	27.7	97.0	15.5	14.2	1.57	14.3	1.20
PLL80D[#]	I_3	6.5	96.6	15.4	7.3	1.43	8.1	1.22
PLL93D[#]	I_{e4}	6	98.5	15.8	6.6	1.34	7.0	1.15
PLL82D[#]	I_{e6}	5.25	100	16.0	5.1	1.65	6.3	1.24

[M]$_0$ = 3.5 mol.L^{-1} and [M]$_0$/[I]$_0$ = 188

[#] polymer quenched with aniline at room temperature then dialyzed once against methanol (solvent changed after 1h, 2h and 16h)

[1] Conversion calculated from the reaction medium analysis by ^{1}H NMR

[2] $M_{n\ theo}$ = [M]$_0$ /[I]$_0$ × p × M_{MeOx}. [M]$_0$, [I]$_0$, p and M_{MeOx} correspond respectively to the initial monomer and initiator concentration, conversion and molar mass of repeat unit

[3] determined by SEC in DMF after dialysis, RI detector, PMMA calibration

[4] determined by SEC in H_2O after dialysis, M_n^{LS}

Les polymères ont été analysés par CES sur les deux lignes accessibles dans le but de confirmer leur architecture en étoile. Le calcul des masses molaires apparentes de tous les polymères en utilisant la calibration conventionnelle faite avec des étalons de PMMA et un détecteur RI sur la ligne de CES dans le DMF a été fait pour mettre en évidence la compacité des étoiles. La masse molaire apparente de la PMeOx linéaire (14,2 kg.mol^{-1}) est cohérente avec la valeur théorique ($M_{n\ theo}$=15,5 kg.mol^{-1}). Comme attendu, la masse molaire apparente des PMeOx en étoile est inférieure à la masse molaire théorique. Ce phénomène peut être expliqué aisément par la structure compacte des étoiles qui induit un volume hydrodynamique plus faible que leurs équivalents linéaires. De plus, selon la théorie, à masse molaire constante, le volume hydrodynamique des étoiles diminue avec l'augmentation du nombre de branches de l'étoile. Ce phénomène est observé puisque la masse molaire CES des PMeOx décroît lorsque l'on compare successivement les valeurs de $M_{n\ CES}$ des polymères amorcés respectivement avec I_3, I_{e4} et I_{e6} ($M_{n\ CES}$=7300 g.mol^{-1}, 6600 g.mol^{-1}, 5100 g.mol^{-1}), la conversion en monomère étant identique pour chaque expérience (≈100%). Les masses molaires des polymères en étoile ont également été mesurées en utilisant la ligne CES dans l'eau, équipée d'une triple détection : détecteurs à indice de réfraction (RI), de diffusion de la lumière (LS) et viscosimétrique. De manière inattendue, ces analyses CES triple détection ont donné des valeurs de M_n inférieures aux valeurs théoriques. Néanmoins, les PMeOx amorcées avec I_1, I_3, I_{e4} et I_{e6} présentent des distributions de MM étroites, monomodales et des pics symétriques (à l'exception de PLL82D amorcé avec I_{e6}) avec de relativement bonnes dispersités (Đ) autour de 1,20 (Figure 3.13). Un épaulement aux fortes masses est observé pour la PMeOx amorcée avec I_{e6}. La proportion varie en fonction de la ligne SEC, variable par la nature des colonnes et le solvant. Une population nouvelle de forte masse signifierait la présence de réactions de couplage entre polymère et oxazolinium. Ces réactions ont été suspectées en très faibles proportion, de ce fait, cet épaulement a été attribué à la présence d'agrégats de polymère. Pour confirmer cette interprétation, une expérience RMN DOSY de ce polymère a été menée dans un solvant pour lequel la PMeOx présente une forte affinité : le méthanol deutéré. Il a été montré par le passé que cette technique, quoique peu sensible, permet de discriminer les agrégats de polymères de macromolécules isolées[20]. Le spectre pseudo 2D obtenu est présenté à la Figure 3.14 a. Un coefficient de diffusion égal à (1.54±0.04).10^{-10} m^2.s^{-1} a été déterminé à partir des différents signaux du spectre RMN. Le faible écart type obtenu suggère que l'étoile PMeOx possède une structure bien définie. De plus, pour tous les diffusants étudiés ici, une décroissance monoexponentielle a été observée, indiquant que les coefficients d'auto-diffusion sont monodisperses et donc que les échantillons analysés sont bien homogènes. Le graphe du

logarithme de l'intensité du signal des protons méthyle à 2,10 ppm *versus* $\gamma^2g^2\delta^2(\Delta-\delta/3)$ est donné en exemple à la Figure 3.14 b. Cette analyse montre aussi que l'aniline utilisée pour désactiver les chaînes en croissance à la fin de la polymérisation est bien liée de façon covalente au polymère puisque les protons de l'aniline diffusent avec le même coefficient de diffusion que les protons du squelette du polymère.

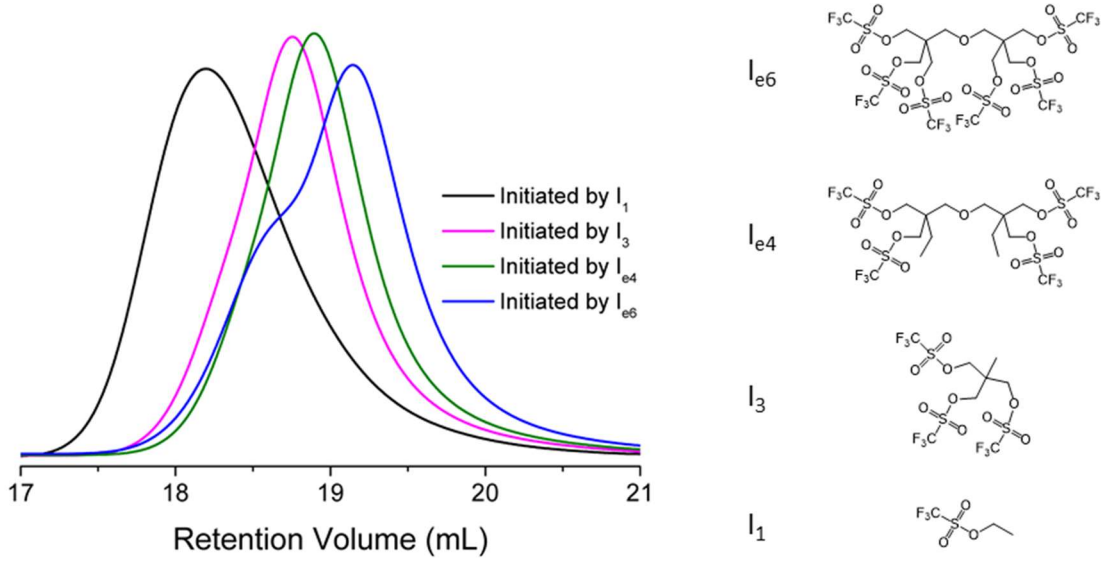


Figure 3.13. Chromatogrammes CES (H_2O, détection RI) des PMeOx amorcées avec les amorceurs mono- (I_1), tri- (I_3), tetra- (I_{e4}) et hexa- (I_{e6}) fonctionnels

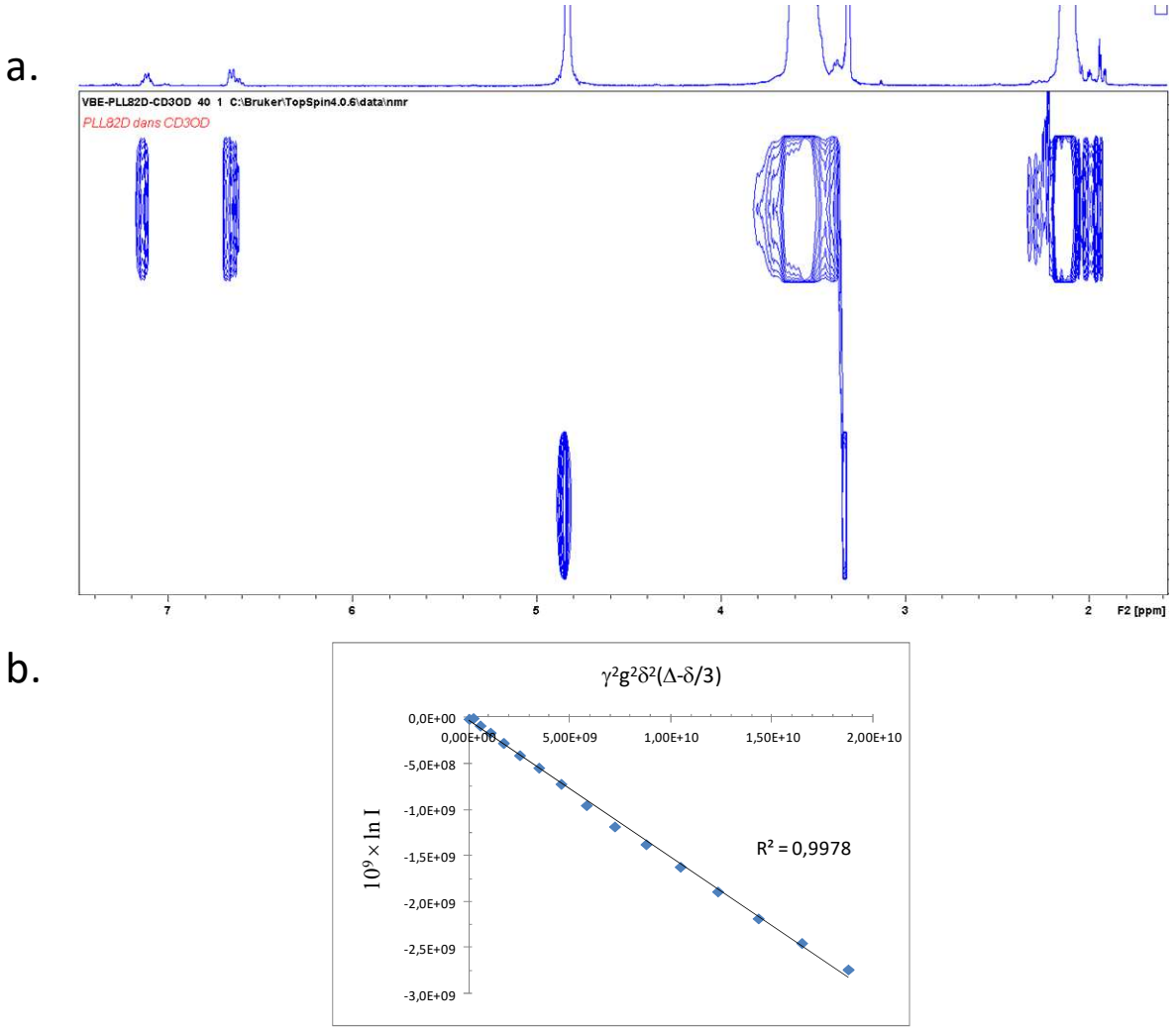


Figure 3.14. Expérience RMN DOSY de PLL82D. **a.** spectre pseudo 2D de PLL82D dans le CD_3OD à 25°C ; **b.** Tracé de ln I *versus* $\gamma^2g^2\delta^2(\Delta-\delta/3)$ pour les protons méthyle des motifs de répétition du polymère PLL82D à 2,1 ppm

Les polymères dialysés ont été aussi analysés par RMN ^{1}H. Le spectre RMN ^{1}H de PLL93D est présenté en Figure 3.15 en guise d'exemple. Les protons méthylène et méthyle du squelette du polymère résonnent respectivement à 3,46 et 2,10 ppm. Concernant les signaux des protons appartenant au cœur de l'étoile (protons 1, 3, 4 et 5), nous n'avons pas réussi à les identifier. Différentes hypothèses ont été émises : les signaux des C*H*$_2$-O (1) et C*H*$_2$-N (3) sont probablement masqués par ceux des motifs de répétition polymère C*H*$_2$-N à 3,46 ppm et la rigidité du cœur de l'étoile pourrait entraîner l'étalement des signaux des protons (4) et (5), rendant impossible leur détection. Dans cette série d'expériences, les centres actifs ont été désactivés en fin de polymérisation en ajoutant un excès d'aniline (5 équivalents) dans l'objectif de déterminer par RMN la masse molaire des polymères. Les signaux caractéristiques des

protons benzéniques sont aisément identifiables entre 6,50 et 7,50 ppm. Cependant, le calcul de la masse molaire de l'échantillon en prenant l'aniline comme référence d'extrémité de chaine mène à des valeurs 1,5 fois plus grandes que les valeurs théoriques. Ceci peut être expliqué par une fonctionnalisation partielle des branches des étoiles. La même tendance est observée pour la PMeOx linéaire PLL98D : $M_{n\,RMN}$ = 22.5 kg.mol^{-1}, $M_{n\,th}$ = 15.5 kg.mol^{-1}. En conclusion, les spectres RMN 1H ne présentent pas de signaux permettant d'établir de façon indubitable les masses molaires des échantillons, puisque les protons du cœur de l'étoile ne sont pas identifiables et la fonctionnalisation des fins de chaines incomplète.

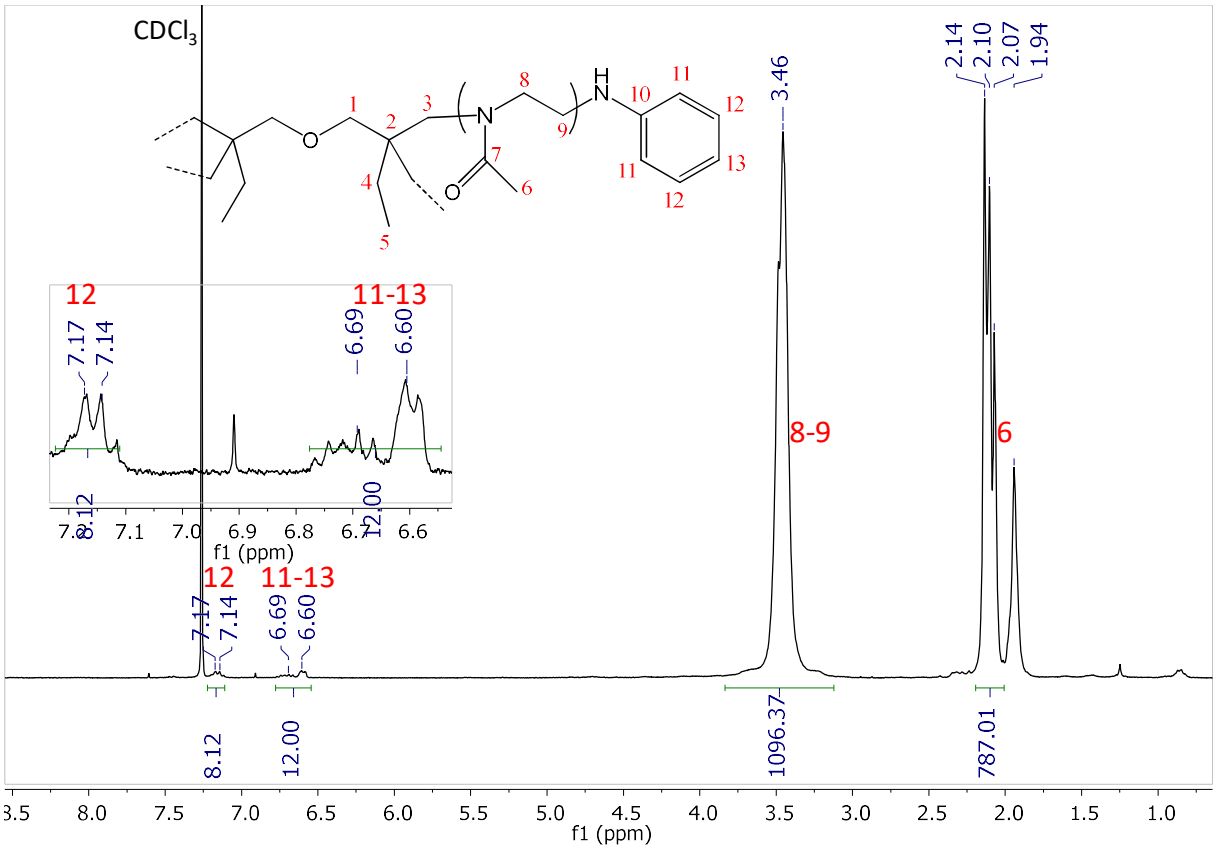


Figure 3.15. Spectre RMN^{1}H de PLL93D dans $CDCl_3$ à 20°C

b. Etude du taux de branchement des PMeOx en étoile

Puisqu'il n'était pas possible d'évaluer le nombre de branches des PMeOx en étoile par RMN, il a été décidé d'utiliser la théorie de Zimm et Stockmayer[21,22] (préalablement exposée dans le Chapitre 1) pour démontrer l'architecture en étoile des PMeOx.

i. CES dans l'eau

Les viscosités intrinsèques des différentes étoiles PMeOx et de la PMeOx linéaire (référence) ont été mesurées grâce au détecteur viscosimétrique de la ligne CES dans l'eau équipée d'une triple détection, permettant ainsi le calcul de l'indice de ramification g' défini par Zimm et Kilb comme le rapport des viscosités intrinsèques du polymère ramifié et du polymère linéaire, pour une même masse molaire : $g'_{exp} = ([\eta]_{ramifié}/[\eta]_{linéaire})_{MM}$. Le détecteur viscosimétrique permet d'obtenir la viscosité intrinsèque de chaque polymère sur toute la distribution de masses molaires. Comme prévu par l'équation de Mark-Houwink ($[\eta] = KM^{\alpha}$) les courbes du log [η] en fonction du log MM sont linéaires et la viscosité intrinsèque des étoiles est plus faible que celle du PMeOx linéaire, d'autant plus faible que le polymère en étoile a un nombre de branches élevé (Figure 3.16). Dans l'équation de Mark-Houwink, l'exposant α dépend de la contraction du polymère en solution. Selon la tendance attendue l'exposant α diminue avec le nombre de branches ; nous avons obtenu dans notre étude: α = 0,75 pour la PMeOx amorcée par I_1, α = 0,71 pour celle amorcée par I_3, α = 0,65 pour celle amorcée par I_{e4} et α = 0,56 pour celle amorcée par I_{e6}. La linéarité des graphes du log de la viscosité intrinsèque en fonction du log de la masse molaire est cohérente avec le fait que les étoiles possèdent un nombre de branches constant sur toute la gamme de masses molaires (Figure 3.16). Ceci argumente le fait que l'analyse en DMF provoque une agrégation que l'on n'observe pas dans le cas présent (analyse dans l'eau).

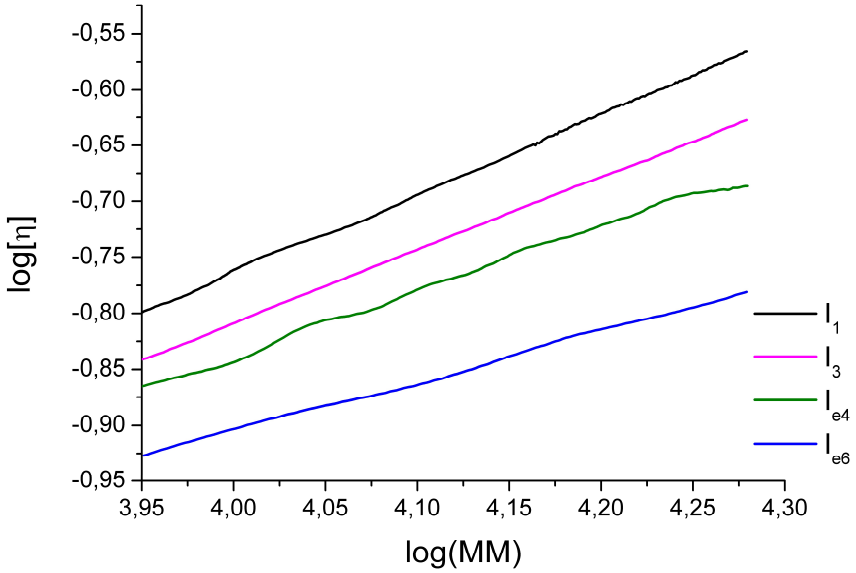


Figure 3.16. Graphe du log [η] en fonction du log MM des PMeOx synthétisées obtenu par CES dans l'eau

Pour aller plus loin, le nombre de branches *f* peut être calculé en fixant une valeur appropriée de ε. ε est un facteur de forme dont les valeurs sont comprises entre 0,5 et 1,5 en fonction de l'architecture du polymère. Pour un polymère en étoile dans un solvant theta, la valeur théorique de ε est de 0,5. Cependant, il a été montré expérimentalement que cette valeur pouvait varier[23]. Dans la présente étude, le nombre de branches des polymères en étoile a été initialement déterminé en fixant ε = 0,5 mais les valeurs obtenues étaient significativement supérieures aux valeurs théoriques (*f* = 3,7 pour la PMeOx amorcée avec I_3, *f* = 4,9 pour la PMeOx amorcée avec I_{e4} et *f* = 9,4 pour la PMeOx amorcée avec I_{e6}). Etant donné l'allure monomodale des chromatogrammes CES des PMeOx amorcées par I_3 et I_{e4}, et les résultats de la RMN DOSY de la PMeOx amorcée par I_{e6} (PLL82D), l'hypothèse de réactions de couplage a été écartée. Par ailleurs, les valeurs de α obtenues à partir de la Figure 3.16 démontrent que l'eau n'est pas un solvant thêta dans nos conditions (dans un solvant thêta, α = 0,5) et ce qui remet en cause le choix de la valeur de 0,5 pour ε. Pour déterminer la valeur la plus adaptée de ε et permettre au logiciel (OmniSEC) de calculer un nombre de branches *f* le plus proche de la réalité, la méthode décrite ci-après a été utilisée. Selon la nature monodisperse ou polydisperse des bras du polymère en étoile, l'indice de ramification *g* peut être calculé théoriquement respectivement à l'aide de l'équation (1) ou l'équation (2). Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 3.7.

$$g_{theo} = \frac{3f-2}{f^2} \quad (1)$$

$$g_{theo} = \frac{3f}{(f+1)^2} \quad (2)$$

A partir du g'_{exp} et du g_{theo} en prenant l'équation 1 ou l'équation 2, des valeurs « semi-expérimentales » de ε peuvent être calculées ($g' = g^{\varepsilon}$). Les valeurs de ε obtenues en utilisant le g_{theo} calculé avec l'équation (1) en faisant l'hypothèse d'étoiles avec des branches monodisperses, sont élevées (supérieure à la plage théorique ($0,5 < \varepsilon < 1,5$) pour l'étoile à 3 branches) et varient très fortement. Dans leur étude, Jackson *et al.*[23] ont synthétisé des polystyrènes en étoile de 6 branches par couplage entre une molécule hexafonctionnelle et des branches longues (100 K) ou courtes (20 K), très bien définies (Đ < 1,02), préalablement synthétisées. Ayant pu mesurer les valeurs de la viscosité intrinsèque, du R_G et de la MM pour chacun des polymères linéaires et en étoile, ils ont pu calculer des valeurs expérimentales de ε, égales à 0,79 dans le cas des étoiles homogènes (6 branches courtes ou 6 branches longues) et variant entre 0,68 et 0,87 pour les étoiles possédant un mélange de branches courtes et longues). Nous avons donc considéré l'hypothèse d'étoiles possédant des branches polydisperses comme la plus adéquate dans le cadre de notre étude et les valeurs de ε calculées à partir de cette formule (0,84 pour la PMeOx amorcée avec I_3, 0,85 pour la PMeOx amorcée avec I_{e4} et 0,74 pour la PMeOx amorcée avec I_{e6}) ont été introduites dans le logiciel de CES (OmniSEC) pour obtenir des valeurs du nombre de branches f_{exp} les plus proches de la réalité sur toute la gamme de masses molaires *(*Tableau 3.7). Ces valeurs de ε sont tout à fait en accord avec celles déterminées par Jackson *et al.*[23] pour les étoiles de polystyrène dans le THF, confortant ainsi l'hypothèse que nous avons faite initialement. De plus, pour chacune des étoiles, le nombre de branches f_{exp} déterminé par cette méthode est proche de la valeur théorique.

Tableau 3.7. Calculs de ε et de f_{exp}

f_{theo}	g'_{exp}	g_{theo} considering monodisperse arms star[1]	g_{theo} considering polydisperse arms star[2]	ε considering monodisperse arms star	ε considering polydisperse arms star	f_{exp} considering polydisperse arms star
3	0.616	0.778	0.562	1.93	0.84	2.9
4	0.536	0.625	0.480	1.33	0.85	3.7
6	0.476	0.444	0.367	0.91	0.74	6.6

[1] calculated with *Equation (1)*
[2] calculated with *Equation (2)*

ii. CES dans le DMF

Les PMeOx ont également été analysées sur la ligne de CES dans le DMF équipée d'une multidétection. Nous nous concentrerons pour cette étude sur la comparaison entre la PMeOx linéaire (PLL98D) et la PMeOx en étoile à 6 branches (PLL82D). Le graphe logarithmique de la viscosité intrinsèque mesurée par le détecteur viscosimétrique en fonction de la masse molaire est tracé à la Figure 3.17. La PMeOx synthétisée à partir de l'amorceur hexafonctionnel I_{e6} (PLL82D) présente bien une viscosité plus faible que celle de la PMeOx linéaire (PLL98D). De plus, la pente de la droite (qui est l'exposant α de l'équation de Mark-Houwink) est de α = 0,5 pour la PMeOx linéaire PLL98D et α = 0,26 pour la PMeOx amorcée par I_{e6} (PLL82D). Ce résultat traduit une augmentation de la compacité de la PMeOx amorcée par I_{e6} par rapport à son homologue linéaire ce qui témoigne la présence de branchements.

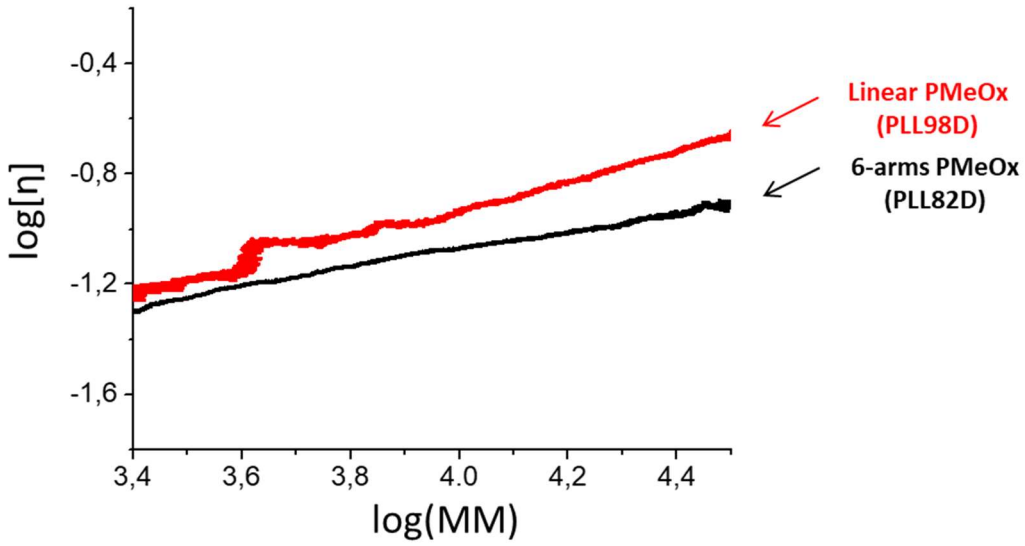


Figure 3.17. Graphe du log[η] en fonction du log(MM) des PMeOx synthétisées obtenu par CES dans le DMF

L'allure du chromatogramme obtenu pour PLL82D par CES dans le DMF est présentée Figure 3.18 a). La déconvolution du signal RI à l'aide du logiciel Origin a permis d'identifier trois pics dont les proportions sont les suivantes : 38%, 54% et 8% (proportions de l'aire du pic considéré sur la sommes des aires des trois pics déconvolués). Pour le traitement des données, nous avons initialement choisi d'utiliser la valeur théorique de ε et donc de fixer ε = 0,5 dans le logiciel OmniSEC. L'indice de ramification *g*' et le nombre de branches *f* calculés par le

logiciel sont superposés au signal RI à la Figure 3.18 b). En ce qui concerne le pic majoritaire (pic N°2), *g*' et *f* sont constants sur la plage de V_e qui correspond à la population N°2 seule. *g*' est inférieur à 1 et le nombre de branchements *f* calculé par le logiciel et correspondant au sommet du pic N°2 est de 5. Ce résultat est proche de la valeur théorique de 6 ce qui est en faveur de la présence de notre population d'intérêt. Le pic N°1 aux volumes d'élution plus faibles correspond à un degré d'association plus élevé. Nous pouvons remarquer que dès lors que le pic N°1 se superpose au pic N°2, la valeur de *g*' diminue et la valeur de *f* augmente assez fortement. La proportion entre le pic N°1 et le pic N°2 est constante pour différentes analyses de PLL82D faites à des concentrations décroissantes. Cependant, les analyses de RMN DOSY de ce polymère dans le méthanol deutéré ont donné des résultats correspondant à un polymère de structure bien définie. C'est pourquoi il nous est difficile de conclure quant à la nature covalente ou non de ces degrés d'association plus élevés. Pour les volumes d'élution plus élevés (pic N°3) correspondant aux faibles masses, le logM chute et la valeur de *g*' augmente (*g*' > 1). Le pic N°3 est donc attribué à une population de PMeOx linéaire, probablement issu de réaction de transfert. Toutefois, le résultat de la déconvolution du signal RI indique que cette 3^e population représente 8% en poids de l'échantillon total, ce qui reste acceptable.

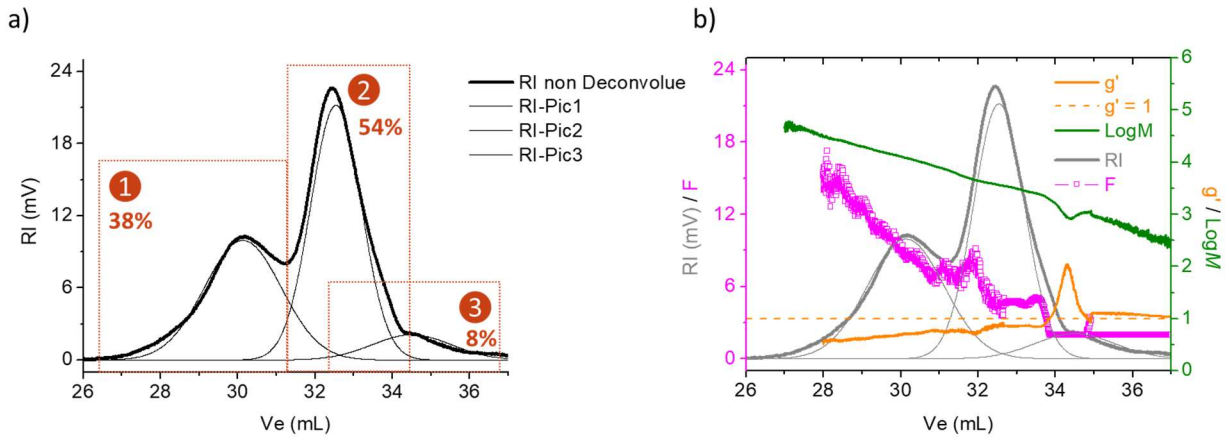


Figure 3.18. Analyse de PLL82D par CES dans le DMF : a) déconvolution du signal RI, b) superposition du signal RI, du logM, de g' et de *f* (noté F) en fonction du volume d'élution

c. Etude cinétique de la polymérisation de MeOx à partir d'amorceurs multitriflates (I_3, I_{e4} et I_{e6})

Démontrer par des analyses physico-chimiques que le nombre de bras des polymères en étoile correspond exactement à celui attendu reste un défi et Luxenhofer *et al.*[18] ont proposé d'utiliser des analyses cinétiques pour appuyer la caractérisation physico-chimique des polymères en étoile. Ils ont synthétisé des poly(2-méthyl-2-oxazoline)s en étoile possédant 3 et 4 branches à partir d'amorceurs multifonctionnels triflates et ont montré que la conversion en monomère était complète et que la polymérisation était contrôlée : cinétique du premier ordre en monomère *i.e.* $\ln([M]_0/[M]_t)$ croît linéairement avec le temps ce qui prouve qu'il n'y a pas de réaction de terminaison et M_n croît linéairement avec la conversion, ce qui indique l'absence de réactions de transfert. En faisant l'hypothèse que la concentration en centres actifs est égale à celle de résidus triflate de l'amorceur, les auteurs ont pu déterminer une constante cinétique apparente de propagation. Ils observent que la constante apparente de polymérisation par fonction amorçante est la même pour les polymères obtenus à partir des amorceurs mono-, bi-, tri- et tétratriflate. La constante apparente de polymérisation pour la polymérisation amorcée par le tétratriflate (k_p^{app} = 19,65.10^{-3} L.mol^{-1}.s^{-1}) est ainsi 4 fois plus grande que celle pour la polymérisation amorcée par le triflate de méthyle (k_p^{app} = 5,16.10^{-3} L.mol^{-1}.s^{-1}).

Nous avons conduit une étude similaire dans le but de compléter ces résultats et d'étudier la polymérisation de la MeOx à partir d'un nouvel amorceur tétratriflate (I_{e4}) et d'un amorceur hexatriflate (I_{e6}), présentant un encombrement stérique supérieur. Pour chaque polymérisation, des prélèvements ont été faits régulièrement pour être analysés par RMN ^{1}H après avoir mis l'échantillon en présence d'un excès d'aniline (5 équivalents par fonction amorçante) pendant 3 minutes pour désactiver les centres actifs, puis la conversion a été déterminée. Les quatre graphes de $\ln([M]_0/[M]_t)$ en fonction du temps sont linéaires (R^2 > 0,976) ce qui indique que le nombre de centres actifs est constant durant toute la polymérisation (Figure 3.19). Ce résultat suggère également que l'étape d'amorçage est rapide, ainsi toutes les branches commencent à croître en même temps. En conséquence, la vitesse de polymérisation est régie par l'étape de propagation. La constante apparente de polymérisation k_p^{app} est calculée selon l'équation suivante, en faisant l'hypothèse que la concentration en centres actifs est égale à la concentration initiale en résidus triflate :

$\ln\left(\frac{[M]_0}{[M]_t}\right) = k_p^{app} \times [I]_0 \times t$ avec $[I]_0$ la concentration initiale en amorceur, $[M]_0$ la concentration initiale en monomère et $[M]_t$ la concentration en monomère au temps t.

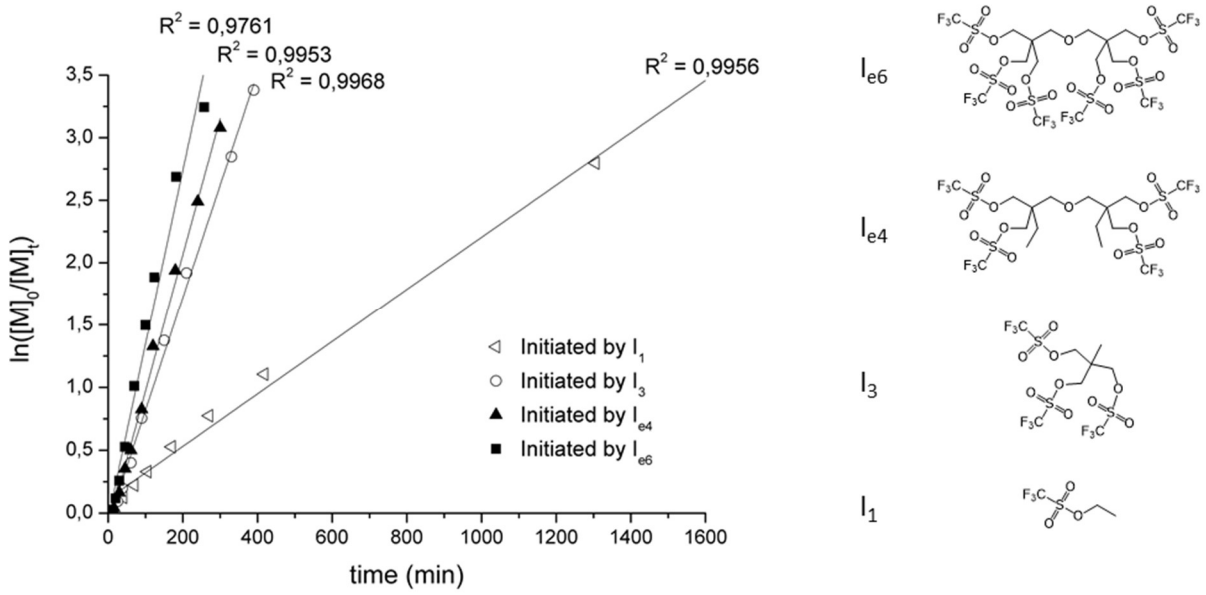


Figure 3.19. Graphes de $\ln([M]_0/[M]_t)$ en fonction du temps pour les polymérisations de MeOx à partir des amorceurs I_1, I_3, I_{e4}, et I_{e6} avec $[MeOx]_0/[I]_0 = 188$, [MeOx] = 3,5 M et terminées par l'ajout de 5 éq d'aniline par fonction amorçante

Le k_p^{app} extrait des graphes $\ln([M]_0/[M]_t)$ en fonction du temps augmente avec la fonctionnalité de l'amorceur utilisé. Cette constante de vitesse de propagation a été tracée en fonction du nombre de fonctions amorçantes portées par l'amorceur utilisé (Figure 3.20). La linéarité de ce graphe indique que tous les groupes triflates des molécules I_3, I_{e4}, et I_{e6} possèdent la même réactivité, ce qui suggère un amorçage quantitatif et donc l'obtention de polymères en étoile PMeOx de structure bien définie. Les valeurs de k_p mesurées (Annexe 3.6) sont du même ordre que celles mesurées par Luxenhofer *et al.*[18]. La différence peut être expliquée par les conditions différentes (les polymérisations de l'étude de Luxenhofer ont été menées à 85°C avec $[MeOx]_0 = 0,8$ mol.L^{-1} alors que les nôtres ont été faites à 80°C avec $[MeOx]_0 = 3,5$ M). De plus, tous les échantillons prélevés durant la polymérisation ont été séchés et analysés par chromatographie d'exclusion stérique dans le DMF. Une augmentation linéaire de M_n en fonction de la conversion est observée pour les quatre polymérisations (Figure 3.21), montrant qu'aucune réaction de transfert significative n'a lieu pendant la polymérisation. Comme attendu, toutes les M_n mesurées pour les étoiles sont plus faibles que les valeurs théoriques puisque les M_n ont été déterminées en utilisant une calibration standard avec des étalons de PMMA. En ce qui concerne le polymère linéaire par contre, la masse molaire théorique est en bon accord avec la valeur expérimentale.

Pour conclure, tous ces résultats suggèrent que la polymérisation de la 2-méthyl-2-oxazoline à partir de ces amorceurs mono et multitriflates est vivante.

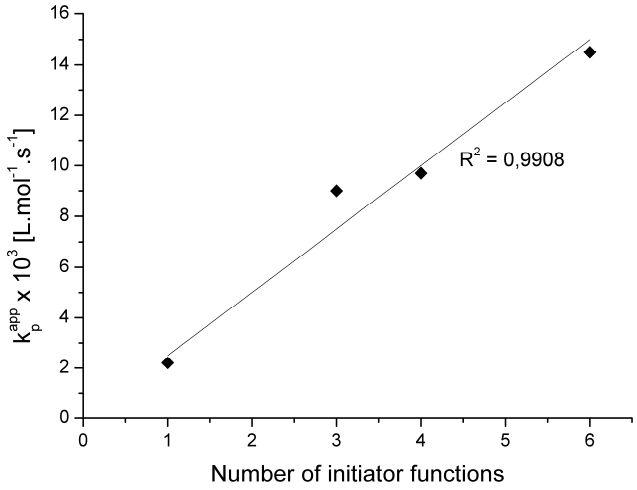


Figure 3.20. Polymérisation de MeOx : relation linéaire entre le nombre de fonction triflate par molécule d'amorceur et la constante apparente de propagation k_p^{app}

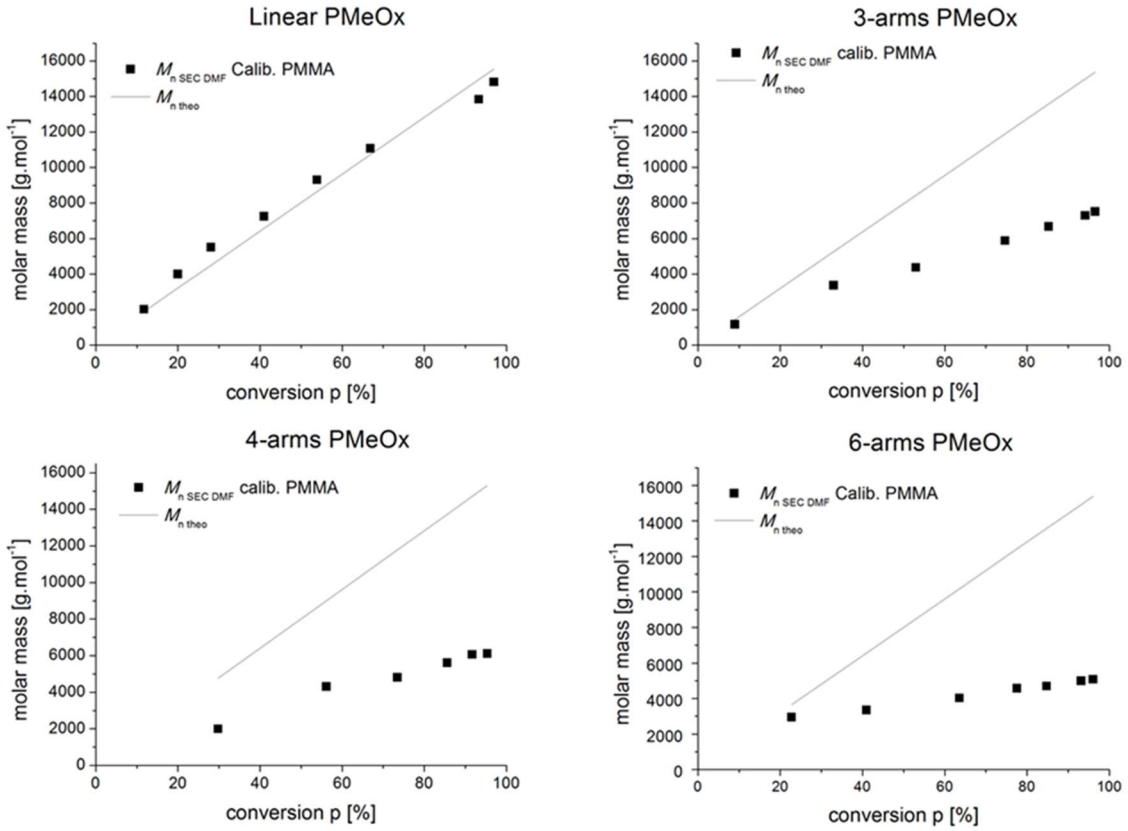


Figure 3.21. Masse molaire des PMeOx linéaire et en étoile contenant 3, 4 et 6 branches en fonction de la conversion (avec $[MeOx]_0/[I]_0 = 188$), [MeOx] = 3,5 M et terminées par l'ajout de 5 éq d'aniline par fonction amorçante

2. Synthèse de poly(2-éthyl-2-oxazoline)s en étoile

a. Synthèse

Dans ce travail, l'EtOx a été polymérisée à partir des amorceurs décrits à la Figure 3.12 en faisant varier le ratio initial monomère sur amorceur dans le but de viser trois degrés de polymérisation moyen en nombre : $X_{n\ visé}$ = 590, 370 et 188. Le $X_{n\ visé}$ de 188 permettra d'avoir un point de comparaison avec les synthèses de PMeOx décrites précédemment. La concentration initiale en monomère $[M]_0$ est fixée à 3,5 mol.L^{-1}. L'étape de terminaison de la polymérisation d'EtOx a été effectuée par l'ajout de 10 équivalents d'une nouvelle amine secondaire, la morpholine (dérivé de la pipéridine §I), à température ambiante, dans le but d'obtenir une fonctionnalisation plus efficace des espèces en croissance. La présence de l'atome d'oxygène devrait aussi apporter une meilleure solubilité des polymères par rapport à la pipéridine. Les signaux caractéristiques de la morpholine en RMN ^{1}H seront utilisés pour calculer la masse molaire des polymères, sauf pour les polymères de forte masse molaire en raison de la trop grande incertitude. Les caractéristiques des polymérisations sont consignées dans le Tableau 3.8. Comme pour la polymérisation de la MeOx, des conversions presque totales en monomère ont été obtenues. Les conversions sont déterminées à partir du spectre RMN ^{1}H du milieu réactionnel final en utilisant les signaux du monomère à δ = 4,16 et 3,73 ppm et le signal des protons méthylène des motifs polymère à δ = 3,34 ppm.

Sur le spectre RMN ^{1}H de PLL108D* (polymère purifié par dialyse), Figure 3.22, nous observons les signaux des protons méthylène et méthyle des substituants éthyle à δ = 2,28-2,19 ppm et δ = 0,99 ppm, ainsi que les signaux des protons méthylène adjacents aux fonctions amine et éther de la morpholine liée aux extrémités de chaîne à δ = 2,35 et 3,55 ppm. Cette attribution a été confirmée par des analyses RMN COSY et DOSY présentées aux Figure 3.23 et Figure 3.24. En effet, le spectre RMN DOSY montre que les signaux à 2,35 et 3,55 ppm correspondent aux protons de la morpholine liée de façon covalente aux chaînes de polymère, puisque ces derniers présentent le même coefficient de diffusion que celui des protons des motifs du polymère. Des signaux correspondant à de la morpholine libre résiduelle sont aussi présents à 2,97 ppm et 3,70 ppm. En considérant tous les signaux du polymère, un coefficient de diffusion de (1,68±0,09).10^{-10} m^2.s^{-1} a été calculé. Le faible écart type obtenu et l'observation d'une décroissance monoexponentielle pour tous les diffusants tendent à indiquer une structure bien définie du polymère en étoile.

Tableau 3.8. Polymérisation de l'EtOx amorcée par I_3, I_4, I_{e4}, et I_{e6}

Run	Initiator	$[M]_0/[I]_0$	t (h)	p[1] (%)	$M_{n\ theo}$[2] (kg.mol^{-1})	$M_{n\ RMN}$[3] (kg.mol^{-1})	$M_{n\ SEC\ DMF}$[4] (kg.mol^{-1})	Đ[4]	$M_{n\ SEC\ H2O}$[5] (kg.mol^{-1})	Đ[5]
PLL108D*	I_3	188.0	15	100	18.6	18.0	7.6	1.31	7.4	1.09
PLL106D*	I_3	370.5	24	100	36.7	-	12.9	1.27	12.2	1.06
PLL85D#	I_3	585.0	28	99	57.4	-	17.0	1.53	17.6	1.15
PLL109D*	I_4	188.0	15	100	18.6	13.0	6.8	1.39	6.9	1.14
PLL105D*	I_4	374.4	24	100	37.1	-	11.5	1.33	10.6	1.1
PLL103D*	I_4	591.0	42	100	58.6	-	17.7	1.39	16.9	1.11
PLL84D#	I_{e4}	589.3	28	97	56.5	-	16.2	1.64	16.3	1.21
PLL83D#	I_{e6}	588.4	28	100	58.0	-	12.8	1.52	12.4	1.22

$[M]_0$ = 3.5 mol.L^{-1}
polymer quenched by aniline at room temperature for 4 days and dialyzed once in MeOH (1h + 1h + 16h)
* polymer quenched by morpholine at room temperature for 5 days and dialyzed once in H_2O (1 h + 2h + 16h + 5h)
[1] conversion calculated from the reaction medium analysis by ^{1}H NMR
[2] $M_{n\ theo} = [M]_0/[I]_0 \times p \times M_0$
[3] determined by ^{1}H NMR after dialysis
[4] determined by SEC in DMF after dialysis, RI detector, PMMA calibration
[5] determined by SEC in H_2O after dialysis, Triple (RI/LS/viscosimetric) detector, M_n^{LS}

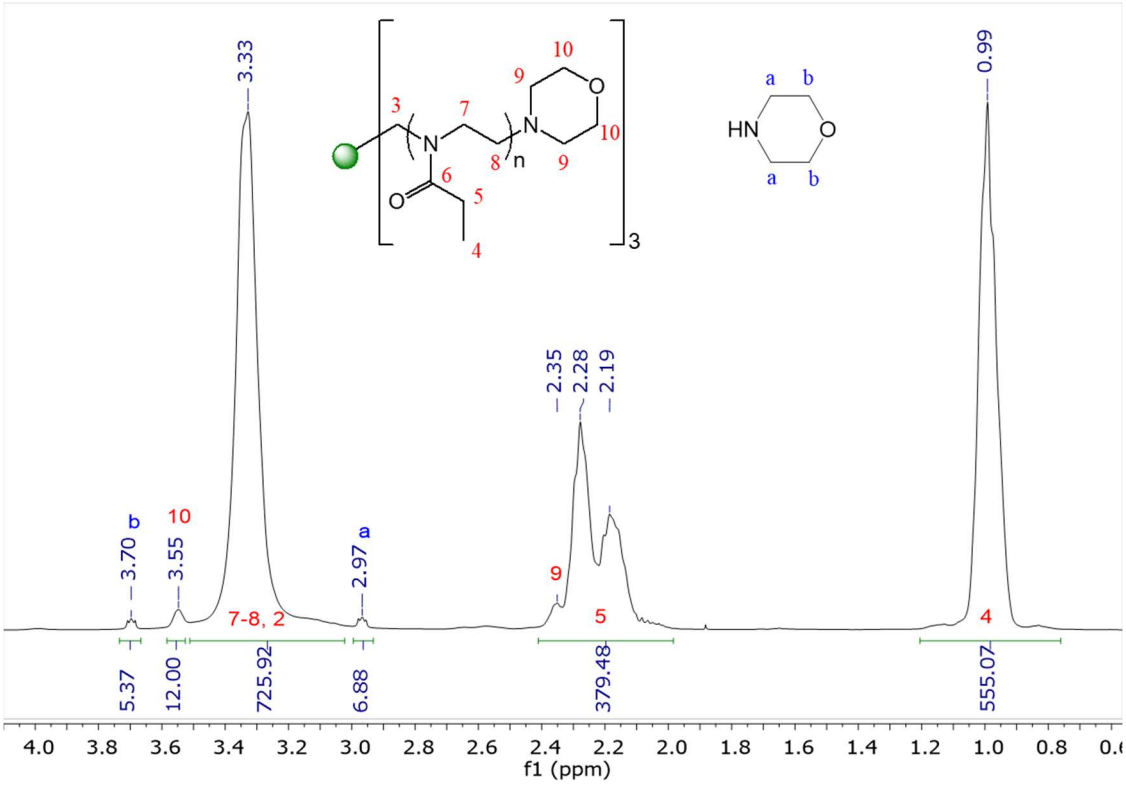


Figure 3.22. RMN ^{1}H de PLL108D* dans le $CDCl_3$ à 20°C

En ce qui concerne les polymères de plus faible masse molaire amorcés par I_3 et I_4 (respectivement PLL108D* et PLL109D*), les $M_{n\ RMN}$ des polymères ont été déterminées à partir des signaux des protons méthylène du squelette polymère (δ = 3,33 ppm) et de la morpholine située aux extrémités de chaîne (δ = 3,55 ppm) et sont en relativement bon accord avec les $M_{n\ theo}$. Ce résultat suggère que la réaction de désactivation des espèces active par la morpholine est quantitative.

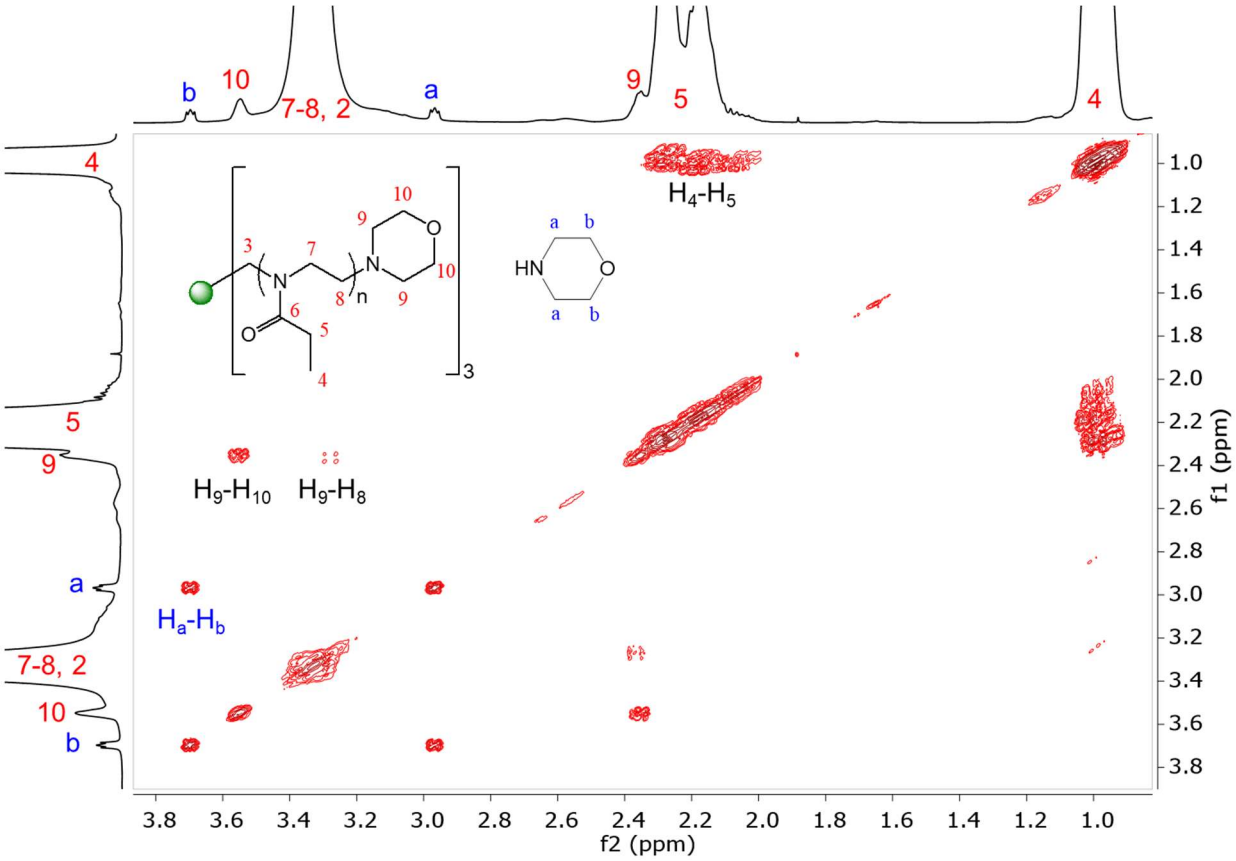


Figure 3.23. RMN-2D proton-proton (COSY) de PLL108D* dans le $CDCl_3$ à 20°C

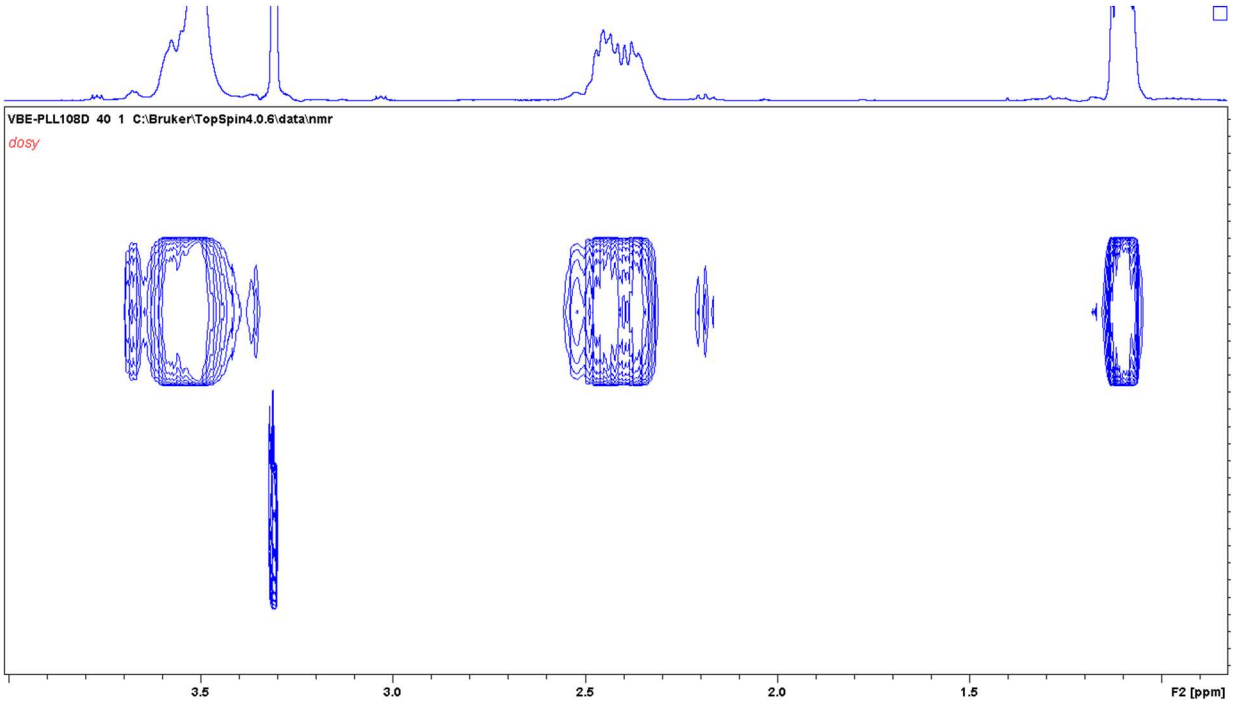


Figure 3.24. Spectre RMN DOSY de PLL108D* dans CD_3OD à 25°C

Comme les PMeOx, les PEtOx synthétisées ont été analysées sur les deux lignes CES : dans le DMF et dans l'eau. Pour tous les polymères en étoile présentés dans le Tableau 3.8, une distribution plus étroite est obtenue lorsque les polymères sont analysés dans l'eau. Les chromatogrammes obtenus sont présentés à la Figure 3.25. Pour chaque série ($[EtOx]_0/[I]_0$ = 188, $[EtOx]_0/[I]_0$ = 370, et $[EtOx]_0/[I]_0$ = 590), un décalage du signal vers les volumes d'élution plus élevés est observé avec l'augmentation du nombre de branches des étoiles. Les chromatogrammes de tous les polymères en étoile présentent une distribution des masses molaires étroite avec Đ < 1,22 même pour la PEtOx amorcée par I_{e6} avec $[EtOx]_0/[I]_0 \approx 590$ (PLL83D$^{\#}$) qui présente toutefois un léger épaulement. Ce polymère a été analysé par RMN DOSY dans le méthanol deutéré (Figure 3.26) pour essayer de déterminer si l'épaulement du chromatogramme était dû à des réactions secondaires lors de la polymérisation ou à la formation d'agrégats dans les conditions de l'analyse. Le traitement mathématique de tous les signaux RMN du polymère conduit à une valeur moyenne du coefficient de diffusion égale à $(9,5\pm0,2).10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$. En accord avec l'obtention écart type relativement faible, les graphes lnI *versus* $\gamma^2g^2\delta^2(\Delta-\delta/3)$ tracés pour chacun des signaux sont linéaires. Ce résultat confirme que le polymère en étoile possède une structure bien définie et que l'épaulement en CES dans l'eau résulte de la formation d'une faible proportion d'agrégats dans ce solvant. La comparaison entre les analyses des polymères PLL103D* et PLL84D$^{\#}$ montre, comme on

pouvait s'y attendre, que la différence de structure entre les deux amorceurs tétratriflates utilisés (notamment la présence du pont éther dans la structure de I_{e4}) n'a pas d'influence sur la polymérisation de l'EtOx.

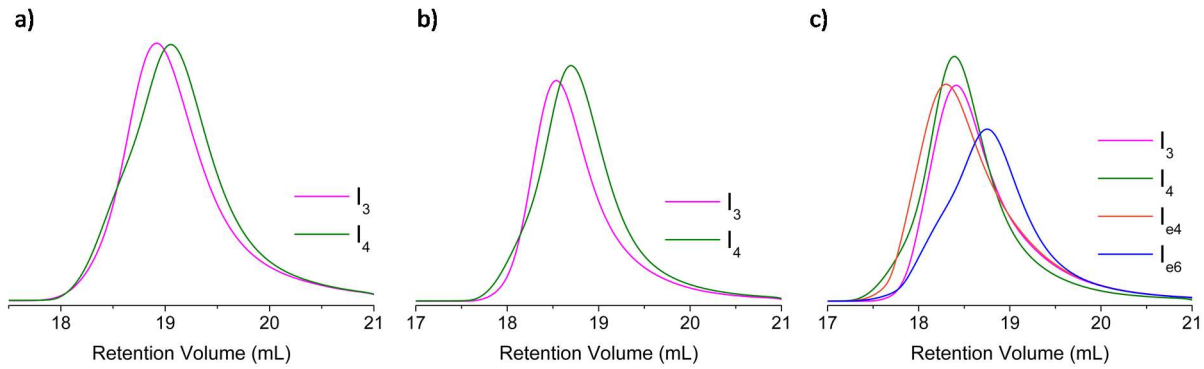


Figure 3.25. Chromatogrammes CES (H_2O, détection RI) des PEtOx synthétisées en utilisant un ratio a) $[EtOx]_0/[A]_0 = 188$, b) $[EtOx]_0/[A]_0 = 370$, et c) $[EtOx]_0/[A]_0 = 590$

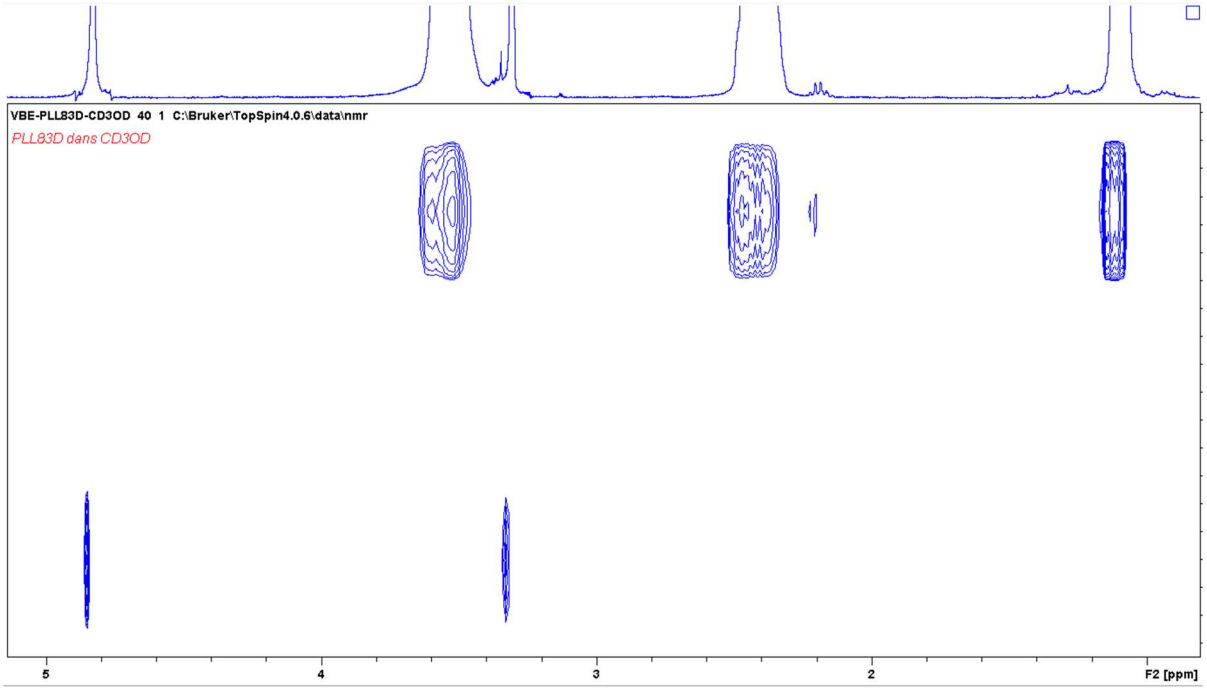


Figure 3.26. Spectre RMN DOSY de PLL83D$^{\#}$ dans CD_3OD à 25°C

Les caractérisations par RMN et CES des poly(2-éthyl-2-oxazoline)s en étoile synthétisées à partir de différents amorceurs multitriflates suggèrent que ces derniers possèdent une structure bien définie. Cependant, l'homogénéité des branches peut être discutée à ce stade et l'étude cinétique, qui a été menée et qui est présentée ci-après, a permis d'éclaircir ce point.

b. Etude du taux de branchement des PEtOx en étoile

Comme précédemment pour les PMeOx en étoile, les polymères PEtOx ont été analysées dans l'eau sur la ligne CES équipée d'une triple détection. La viscosité intrinsèque de chaque polymère est obtenue sur toute la distribution de masse molaire grâce au détecteur viscosimétrique et permet donc de tracer le log de la viscosité intrinsèque en fonction du log de la masse molaire (Figure 3.27). Pour $[EtOx]_0/[I]_0$ = 188, la viscosité intrinsèque de la PEtOx amorcée par I_4 est bien inférieure à celle de la PEtOx amorcée par I_3 sur toute la gamme de masses molaires. Cependant, pour chacune des séries $[EtOx]_0/[I]_0$ = 370 et 590, des résultats surprenants ont été obtenus : la viscosité intrinsèque des PEtOx synthétisées à partir de l'amorceur I_3 est plus faible que celle des PEtOx synthétisées à partir des amorceurs tétratriflate (I_4 ou I_{e4}). Nous n'avons pas su expliquer ce comportement.

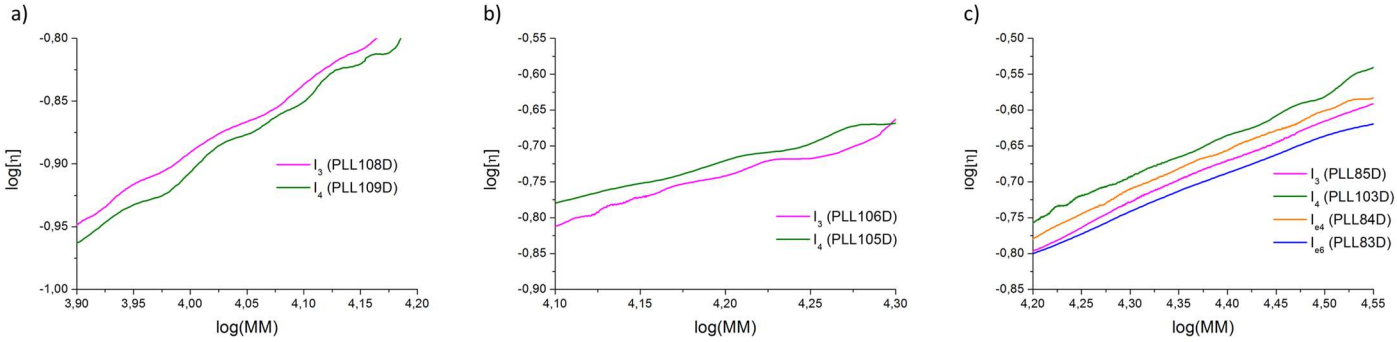


Figure 3.27. graphes du log [η] en fonction du log MM des PEtOx synthétisées avec a) $[EtOx]_0/[I]_0$ = 188, b) $[EtOx]_0/[I]_0$ = 370, et c) $[EtOx]_0/[I]_0$ = 590

c. Etude cinétique

Deux études cinétiques de la polymérisation d'EtOx ont été menées en utilisant des ratios molaires $[EtOx]_0/[I]_0$ égaux à 590 et 188, dans les mêmes conditions que celles présentées dans le Tableau 3.8. Dans un premier temps, le ratio molaire $[EtOx]_0/[I]_0$ est fixé à 590. Les graphes de $\ln([M]_0/[M]_t)$ en fonction du temps sont présentés à la Figure 3.28 pour les polymérisations amorcées par I_1, I_3, I_4, et I_{e6}. Pour les quatre polymérisations, la relation linéaire attendue est obtenue avec un $R^2 > 0{,}994$ indiquant que le nombre de centres actifs propageants est constant au cours de la polymérisation. Les constantes de vitesse de propagation k_p^{app} sont tracées en fonction du nombre de fonctions amorçantes portées par l'amorceur utilisé dans chacun des cas (Figure 3.29). Comme dans le cas de la polymérisation de MeOx, une relation linéaire entre k_p^{app} et le nombre de sites amorçants est observée, démontrant ainsi que quel que

soit l'amorceur utilisé, tous les groupes triflates présentent la même réactivité. Ceci suggère que l'étape d'amorçage est rapide dans ces conditions de polymérisation.

Il est intéressant de comparer les constantes de vitesse obtenues dans cette étude à celles publiées dans la littérature obtenues dans des conditions expérimentales similaires, mais pas strictement identiques. La valeur de k_p^{app} de $2{,}2.10^{-3}$ $L.mol^{-1}.s^{-1}$ que nous avons obtenu en amorçant la polymérisation de EtOx avec I_1 (EtOTf) est tout à fait cohérente avec les valeurs publiées par Hoogenboom *et al.*[15] à 80°C dans le DMAC obtenues pour des polymérisations réalisées avec $[Ox]_0$ = 1,25 $mol.L^{-1}$, à savoir $(2{,}5\pm3{,}9).10^{-3}$ $L.mol^{-1}.s^{-1}$ pour la MeOx et $(1{,}6\pm4{,}2).10^{-3}$ $L.mol^{-1}.s^{-1}$ pour l'EtOx. Une étude plus récente dans laquelle les polymérisation ont été faites par chauffage microonde a été faite par Hoogenboom et coll.[24]. Ils y rapportent un k_p^{app} de $4{,}35.10^{-3}$ $L.mol^{-1}.s^{-1}$ for une polymérisation faite à 80°C dans l'acétonitrile avec une concentration initiale d'EtOx de 4 $mol.L^{-1}$ pour un $X_{n\ visé}$ = 50. Dans notre étude, les valeurs de k_p^{app} obtenues diffèrent légèrement et celles obtenues pour la polymérisation de MeOx sont très proches de celles obtenues pour la polymérisation d'EtOx : nous n'observons pas une réactivité plus élevée pour MeOx. Il est possible que ce résultat soit dû à un effet de polarité du solvant couplé à l'utilisation d'une concentration élevée en monomère qui, de ce fait, modifie aussi la polarité du milieu réactionnel.

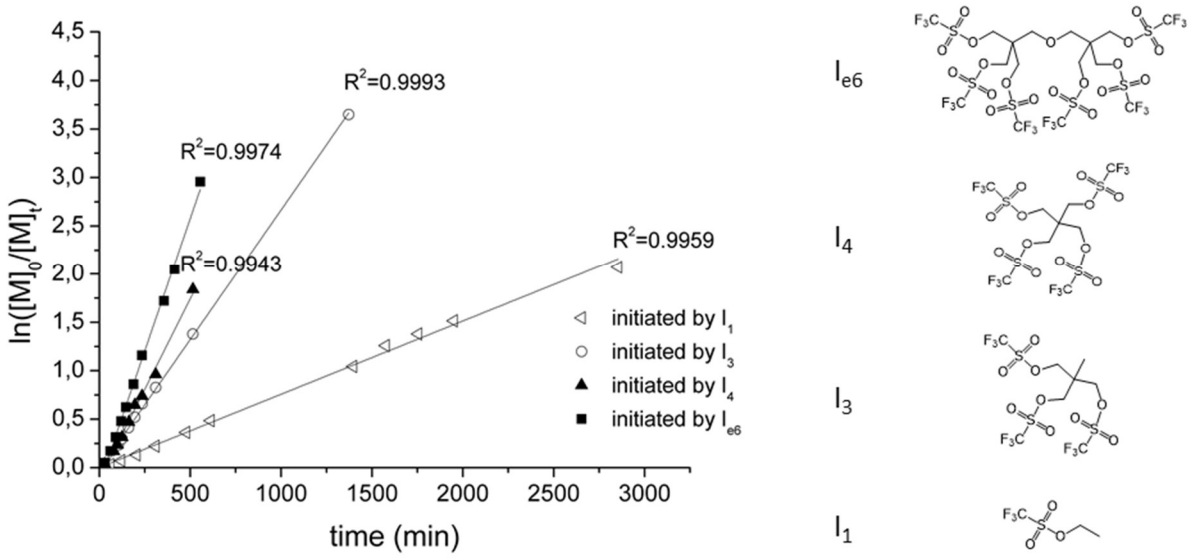


Figure 3.28. Graphes de $\ln([M]_0/[M]_t)$ en fonction du temps pour les polymérisations d'EtOx à partir des amorceurs I_1, I_3, I_4, et I_{e6} avec $[EtOx]_0/[I]_0 = 590$, [EtOx] = 3,5 M et terminées par ajout de 5 éq de morpholine par fonction amorçante

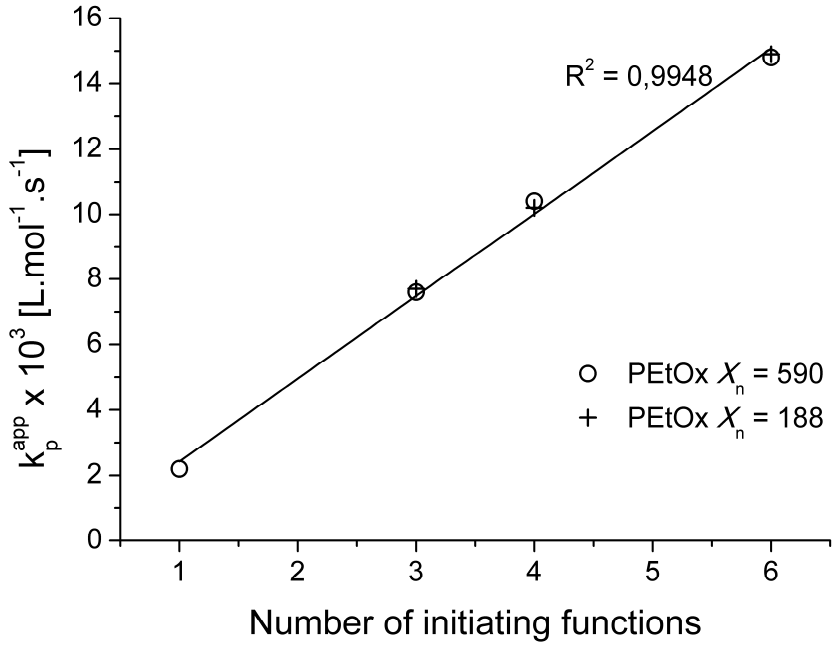


Figure 3.29. Relation linéaire entre le nombre de fonction triflate par molécule d'amorceur et la constante apparente de propagation k_p^{app} de la polymérisation d'EtOx à partir des amorceurs I_1, I_3, I_4, et I_{e6} avec $[EtOx]_0/[I]_0 = 590$ (○) ou à partir des amorceurs I_3, I_{e4}, et I_{e6} avec $[EtOx]_0/[I]_0 = 188$ (+)

Tous les prélèvements ont ensuite été séchés et analysés par CES dans le DMF. Comme dans le cas de la polymérisation de MeOx, une augmentation linéaire de M_n en fonction de la conversion est observée pour les polymérisations d'EtOx amorcées par I_3, I_4 et I_{e6} (Figure 3.30), suggérant une polymérisation sans réaction de transfert. A nouveau, toutes les M_n mesurées sont inférieures aux valeurs théoriques et ce, en raison de l'utilisation d'une calibration standard faite avec des étalons PMMA.

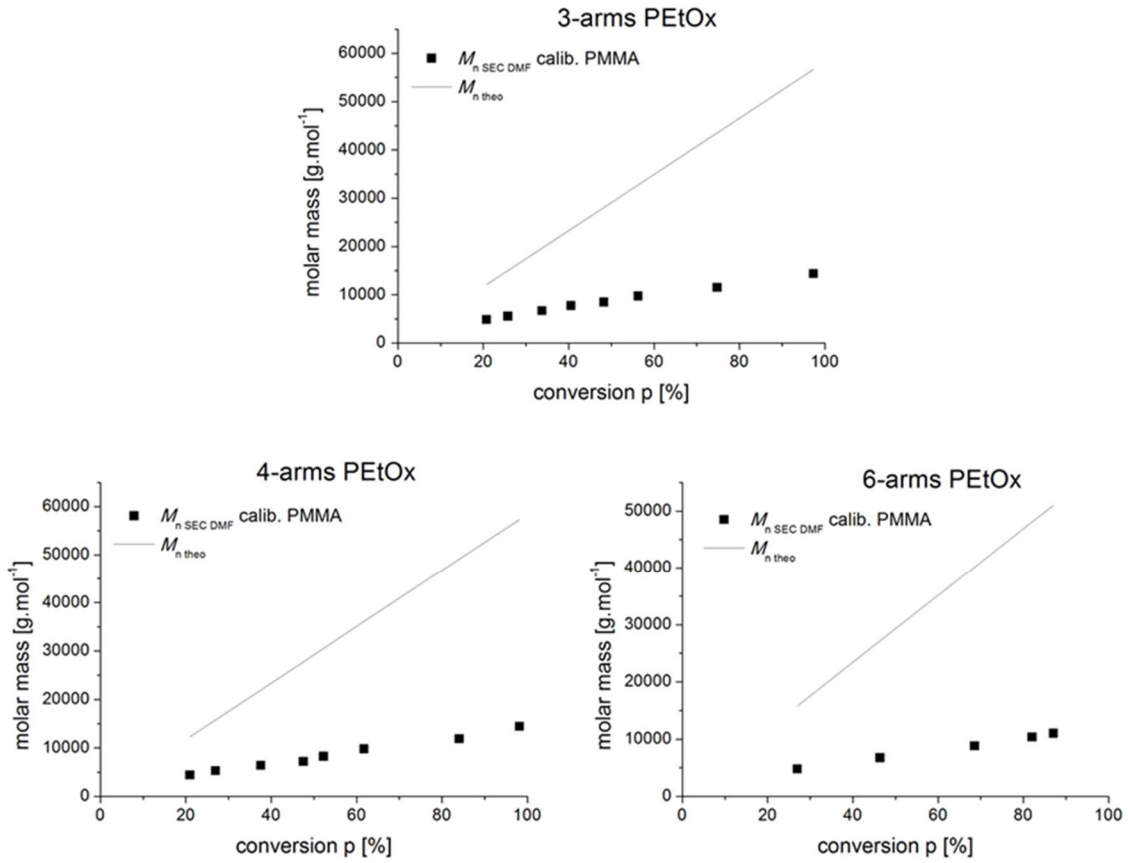


Figure 3.30. Masse molaire des PEtOx en étoile à 3, 4 et 6 branches en fonction de la conversion (avec $[EtOx]_0/[I]_0 = 590$)

Il est à noter que l'utilisation d'un ratio molaire monomère sur amorceur élevé masque souvent l'étape d'amorçage. Pour cette raison, une deuxième étude cinétique a été menée en fixant le rapport initial $[EtOx]_0/[I]_0$ à 188. Celle-ci permettra aussi de vérifier l'indépendance du k_p^{app} par rapport au degré de polymérisation visé. Les cinétiques de polymérisation d'EtOx à partir des amorceurs I_3, I_{e4} et I_{e6} ont donc été étudiées. Des échantillons du milieu réactionnel brut (sans désactivation des centres actifs) ont été prélevés régulièrement et analysés par RMN ^{1}H. Les graphes $\ln([M]_0/[M]_t)$ en fonction du temps (Figure 3.31) présentent une relation

linéaire seulement à partir de 40 minutes de réaction, ce qui suggère une étape d'amorçage lente. Une régression linéaire sur la partie linéaire du graphe est représentée en trait plein sur la Figure 3.31. Les k_p^{app} calculés à partir des pentes des régressions linéaires des points finaux sont tracés en fonction du nombre de fonctions amorçantes (Figure 3.29). Les valeurs de k_p^{app} ne sont pas significativement différentes de celles obtenues avec $[EtOx]_0/[I]_0 = 590$, confirmant que la vitesse de propagation est indépendante du ratio initial $[EtOx]_0/[I]_0$.

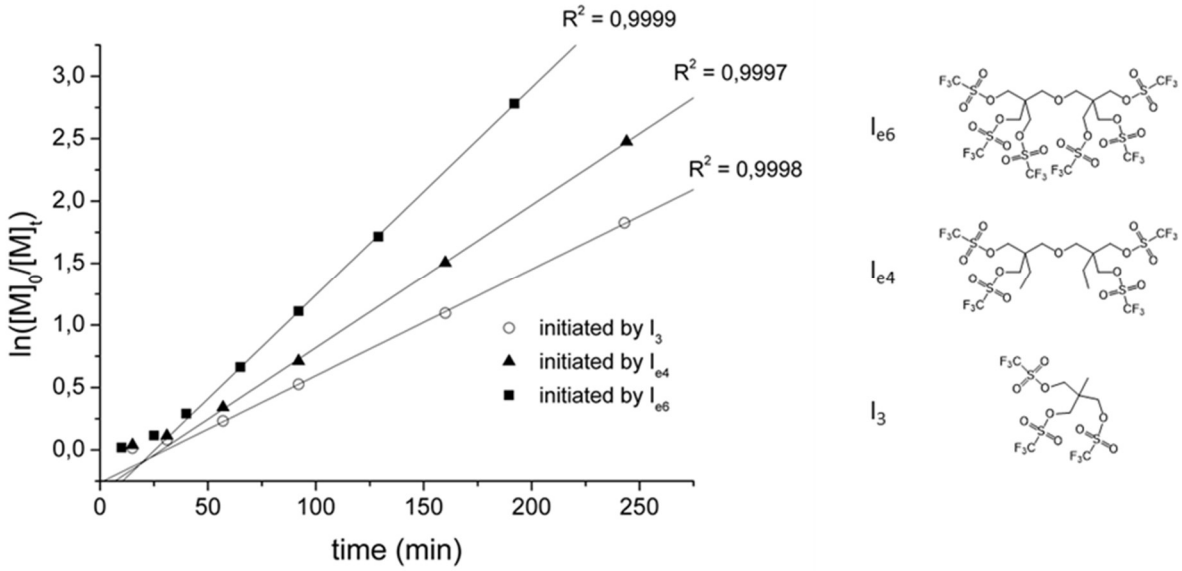


Figure 3.31. Graphes de $\ln([M]_0/[M]_t)$ en fonction du temps pour les polymérisations d'EtOx à partir des amorceurs I_3, I_{e4}, et I_{e6} avec$[EtOx]_0/[I]_0 = 188$, [EtOx] = 3,5 M et sans ajout d'agent désactivant

L'analyse des prélèvements de la polymérisation menée avec I_{e6} et $[EtOx]_0/[I]_0 = 188$ par RMN ^{1}H, *avant* la mise en présence d'un quelconque agent de terminaison a permis de mettre en évidence l'existence d'espèces ioniques en croissance, en accord avec le travail de Saegusa[25,26], de Dworak[27] et de Lapinte[12]. Les protons méthylène C*H*$_2$-O (a) et C*H*$_2$-N (b) des extrémités de chaînes oxazolinium résonnent respectivement à 4,64 et 4,05 ppm (Figure 3.32). Cette attribution a été confirmée grâce à l'analyse RMN COSY présentée en Annexe 3.7, qui met également en évidence le couplage entre les protons méthylène (d) et (e) du monomère n'ayant pas encore réagi. Les intégrations des pics des protons méthylène des extrémités de chaînes oxazolinium à 4,64 ppm, des protons méthylène de l'EtOx résiduelle à 3,92 ppm et des protons méthylène du squelette du polymère à 3,14 ppm ont été utilisées pour calculer le pourcentage des extrémités de chaîne sous forme oxazolinium. Le calcul est détaillé en Annexe

3.8. Le pourcentage d'espèces ioniques est tracé en fonction de la conversion à la Figure 3.33. Ce pourcentage augmente avec la conversion pour atteindre une valeur constante d'environ 85%-90% à partir de 35% de conversion. Cette valeur est cohérente avec le temps à partir duquel la cinétique de polymérisation devient linéaire (Figure 3.31) et qui correspond à l'instant où tous les centres actifs ioniques sont formés. Nous faisons l'hypothèse dans cette étude que l'incertitude des analyses RMN est supérieure à la valeur habituellement admise (≈5%) dans la mesure où les pics des extrémités oxazolinium intègrent pour des valeurs très faibles en comparaison de celles des pics des protons méthylène du monomère ou du polymère (selon la conversion atteinte au moment de l'analyse). Ceci expliquerait la différence entre les pourcentages d'extrémités oxazolinium mesurés et attendus. Il a été montré dans la littérature que les espèces en croissance lors de la polymérisation de MeOx (ou de EtOx) à partir d'un amorceur triflate monofonctionnel étaient toutes ioniques[28]. Cependant, dans ce travail, l'utilisation d'amorceurs multifonctionnels implique la proximité de charges sur la molécule d'amorceur au début de la polymérisation. L'apparition progressive de ces charges jusqu'à une conversion minimale à partir de laquelle tous les centres actifs sont ioniques n'est donc pas un résultat aberrant.

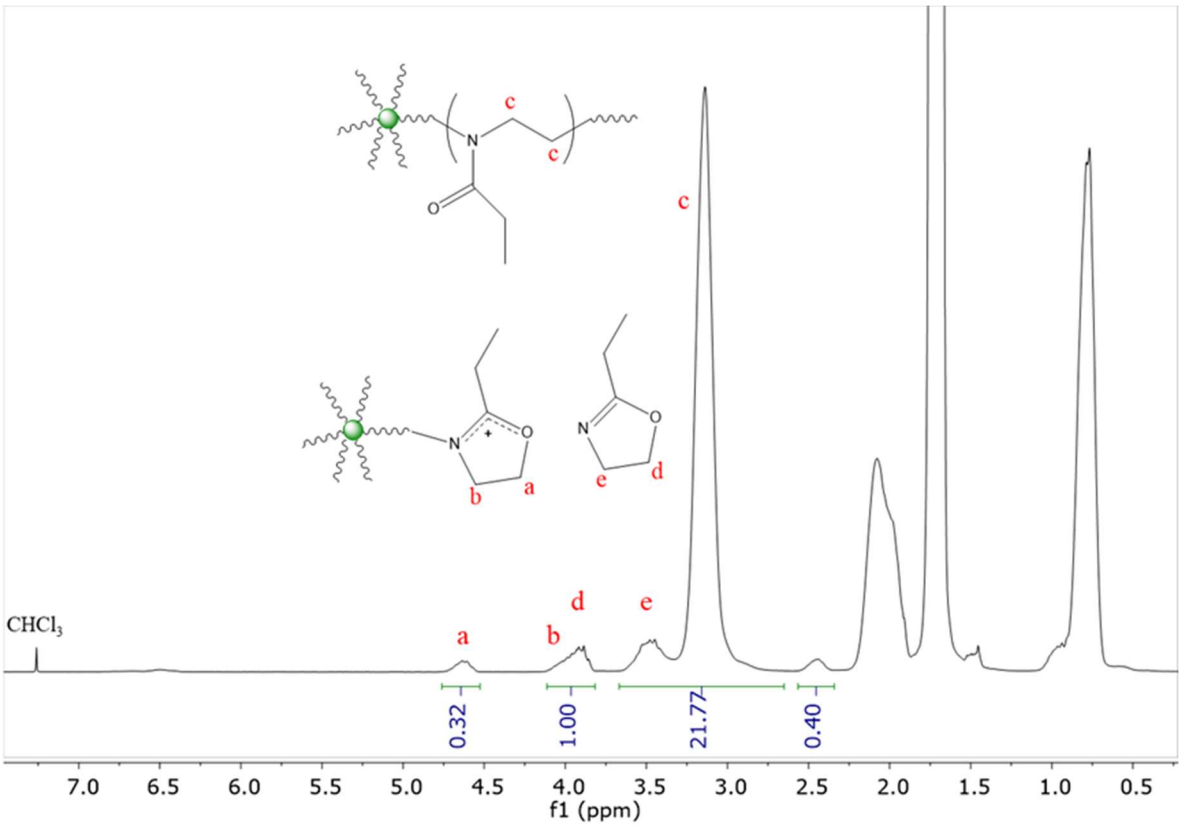


Figure 3.32. Spectre RMN ^{1}H du 8^{e} prélèvement de la polymérisation amorcée par I_{e6} avec $[EtOx]_0/[I]_0$ = 188 dans $CDCl_3$ à 20°C

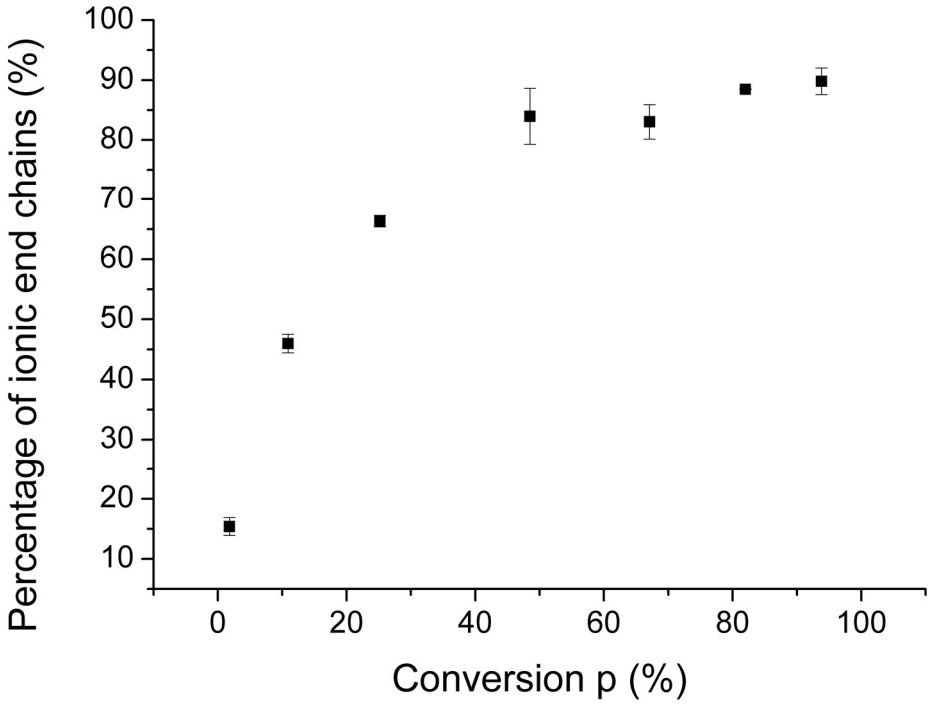


Figure 3.33. Pourcentage d'extrémités de chaîne ioniques calculé à partir des spectres RMN ^{1}H des prélèvements en fonction de la conversion. Polymérisation amorcée par I_{e6} avec $[EtOx]_0/[I]_0$ = 188 et [EtOx] = 3,5 M. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois analyses différentes d'un même fichier RMN (Fid)

Ce phénomène n'a pas été observé pour la polymérisation de MeOx à partir des amorceurs multitriflates pourtant effectuée dans les mêmes conditions. Dans ce cas, un amorçage rapide est observé, indiquant que toutes les espèces en croissance se forment quasiment instantanément. Cette différence de comportement ne peut pas être expliquée par une différence de réactivité des deux monomères puisque les k_p^{app} déterminés dans cette étude ne sont pas significativement différents. L'étape d'amorçage requiert la formation de nombreuses espèces ioniques dans le voisinage du cœur du polymère en étoile, ce qui est thermodynamiquement défavorable. La longueur de Bjerrum l_B qui caractérise la force des interactions électrostatiques dans un solvant peut être calculée selon l'équation suivante: $l_B = \frac{e_0^2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r k_B T}$ avec e_0 la charge élémentaire (e_0 = 1,602.10^{-19} A.s), ε_r la permittivité relative ou constante diélectrique du solvant (ε_{rACN} = 37,5), ε_0 la permittivité du vide (ε_0 = 8,8542.10^{-12} F.m^{-1}), k_B la constante de Boltzmann (k_B = 1,38.10^{-23} J.K^{-1}), T la température (T = 353 K). Dans l'acétonitrile, l_B est proche de 13 Å, valeur bien supérieure à la distance entre 2 fonctions triflate

dans les amorceurs multitriflates utilisés. La solubilité de la PMeOx et de la PEtOx n'étant pas identique dans l'ACN, la conformation que les chaînes adoptent ne l'est pas non plus, ce qui pourrait expliquer que la thermodynamique de formation d'une seconde charge à proximité de la première diffère entre les chaînes PMeOx et PEtOx.

L'amorçage lent observé pour la polymérisation d'EtOx en présence des amorceurs multitriflate I_3, I_{e4} et I_{e6} suggère que les étoiles de PEtOx puissent être hétérogènes quand la masse molaire visée est assez faible. Cependant, on peut considérer que cette hétérogénéité s'atténue avec l'augmentation de la masse molaire visée (notamment pour X_n = 590). Au contraire, si on se fie à l'étude cinétique menée pour X_n = 188, il semblerait que les PMeOx en étoile, même de M_n faible, sont de structure bien définie.

En conclusion, après avoir défini les conditions de polymérisation sur des POx linéaires, et notamment la nécessité de polymériser l'EtOx plutôt que la MeOx pour obtenir des polymères de M_n élevée, les polymérisations de différentes familles de POx en étoile contenant 3, 4 et 6 branches à partir d'amorceurs multitriflates ont été présentées dans cette partie : des PMeOx de X_n = 188 ainsi que des PEtOx de X_n = 188, 370 et 590. Parmi ces quatre familles, notre travail a permis de démontrer que les PMeOx en étoile de X_n = 188 et les PEtOx en étoile de X_n = 590 sont bien définies. Les caractérisations des PMeOx par CES ainsi que l'étude cinétique menée tendent à prouver que les structures en étoile désirées ont bien été obtenues puisque la cinétique ne met en évidence aucune réaction de transfert ou de terminaison. De plus, l'étude du nombre de branches par CES dans l'eau grâce à la multidétection donne des valeurs très proches des valeurs théoriques. Malgré nos efforts, la caractérisation par CES multi-détection des PEtOx en étoile ne donne pas de résultats cohérents. Cependant, les deux études cinétiques menées et l'évolution linéaire de M_n avec la conversion tendent à prouver que, malgré une hétérogénéité probable des branches pour les PEtOx en étoile aux faibles M_n visées (X_n = 188), des étoiles avec le nombre de branches désirées ont bien été obtenues et ce, pour les 3 X_n visés.

Partie 2 – Synthèse des poly(éthylèneimine)s

Maintenant que plusieurs familles de POx en étoile ont été obtenues et caractérisées, l'étape suivante de ce travail consiste à hydrolyser les fonctions amide des motifs oxazoline en amine secondaire afin d'obtenir des poly(éthylèneimine)s de masse molaire variable et de structure variable (polymère en étoile à 3, 4 ou 6 branches). Nous développerons dans cette partie les conditions d'hydrolyse basique et acide qui ont été testées et nous tâcherons de comparer les polymères obtenus en se basant sur un exemple.

I. Hydrolyse basique

Les liaisons éther présentes au cœur des poly(2-oxazoline)s en étoile synthétisées à partir des amorceurs I_{e4} et I_{e6} étant clivables en conditions acides, l'hydrolyse en conditions basiques des POx nous est apparue comme le premier point à étudier.

1. Hydrolyse basique des PMeOx

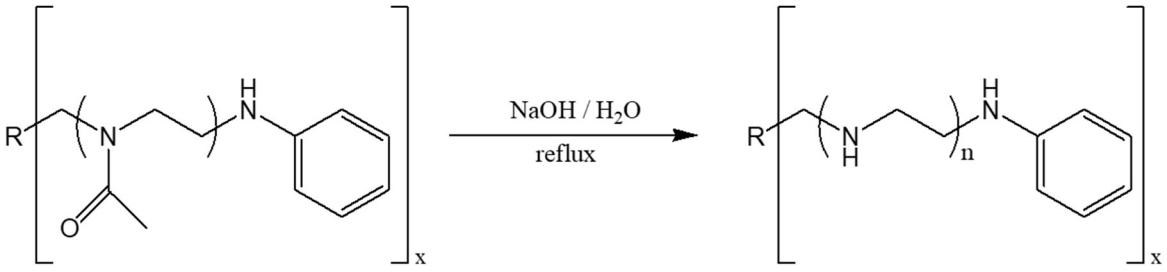


Figure 3.34. Schéma réactionnel de l'hydrolyse basique des PMeOx

Dans un premier temps, l'hydrolyse des PMeOx dans des conditions basiques a été menée en se basant sur les conditions décrites par Brissault *et al.*[29]: après dissolution dans l'eau de la PMeOx, du NaOH (2 à 4 équivalents par motifs de répétition) est ajouté au milieu réactionnel qui est ensuite chauffé à reflux (Figure 3.34). Après plusieurs jours de réaction et retour à température ambiante, le milieu réactionnel est opaque. La solution hétérogène est dialysée contre l'eau et après retour à la neutralité, le solide blanc à l'intérieur de la membrane de dialyse est récupéré et lyophilisé. Le polymère obtenu est ensuite analysé par RMN ^{1}H dans

le méthanol-D_4 afin de déterminer le pourcentage d'hydrolyse. Pour cela, deux calculs sont faits en utilisant le signal des protons méthylène des motifs éthylèneimine (EI) à 2,74 ppm et un signal résiduel des motifs oxazoline (soit le signal des protons méthylène à 3,51 ppm, soit celui des protons méthyle à 2,14 ppm). Un pourcentage d'hydrolyse moyen est calculé à partir de ces deux résultats. Les conditions précises de chaque hydrolyse et les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 3.9. Dans les trois cas, il a été nécessaire de réaliser deux hydrolyses successives pour atteindre un pourcentage d'hydrolyse proche de 100%. Le spectre RMN ^{1}H de PLL92 est présenté en Figure 3.35.

Tableau 3.9. Hydrolyse des PMeOx en étoile (X_n = 188) en conditions basiques

Hydrolysis run	**Starting PMeOx**		**Eq NaOH / unit**	**Total time (days)**	**$M_{n\ theo}$[1] (kg.mol^{-1})**	**Hydrolysis %[3]**
	Structure (initiator)	**Name**				
PLL86H2	3-arms (I_3)	PLL80D	2	7	7.8	98**
PLL96H2	4-arms (I_{e4})	PLL93D	4	8	7.8	100*
PLL92	6-arms (I_{e6})	PLL82D	2	3.5	8.0	98*

[1] $M_{n\ theo\ PEI} = M_{n\ theo\ PMeOx} \times M_{0,EI} / M_{0,MeOx}$
The initial concentration of repeat unit (MeOx) $[unit]_0$ = 0.8 mol.L^{-1}
[3] Hydrolysis % calculated from the ^{1}H NMR spectrum of the purified product
* Partial solubility in methanol-D_4
** Very poor solubility in methanol-D_4
2 successive hydrolyses (the second hydrolysis was performed using the same initial quantity of reactants as the first one)

Le pourcentage d'hydrolyse calculé est très proche de 100% pour les trois produits d'hydrolyse, cependant, dans les trois cas, les polymères hydrolysés ne sont pas totalement solubles dans le méthanol-D_4 comme en témoignent les solutions troubles obtenues. Cette insolubilité a persisté même en diluant et en chauffant les solutions. L'analyse RMN ^{1}H n'est donc pas représentative de la totalité des chaînes polymère. Le polymère obtenu n'a pas pu être solubilisé dans l'eau (même après ajout de HCl), posant un problème majeur pour l'application future.

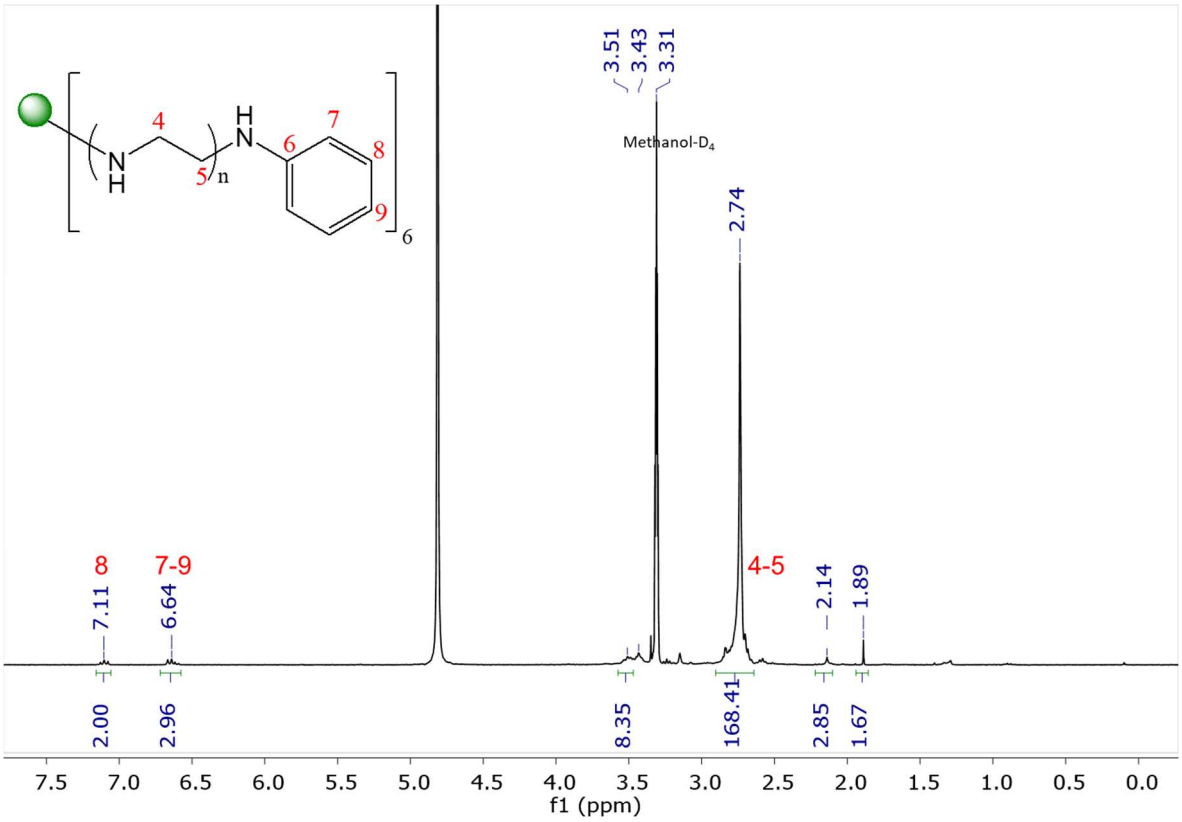


Figure 3.35. Spectre RMN ^{1}H de PLL92 dans le méthanol-D_4 à 20°C

2. Hydrolyse basique des PEtOx

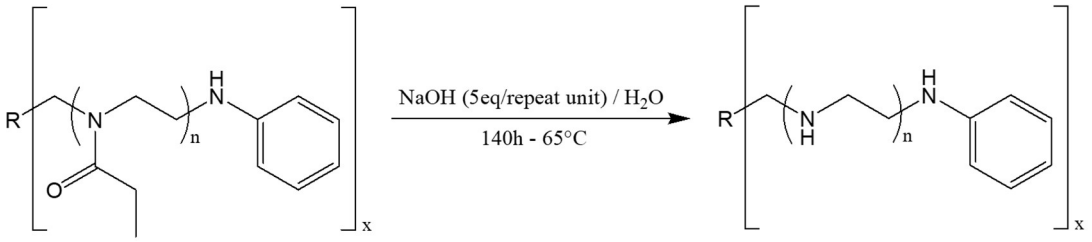


Figure 3.36. Schéma des conditions d'hydrolyse de PEtOx en présence de NaOH

La PEtOx présente une LCST dans l'eau autour de 70°C. Pour cette raison, l'hydrolyse ne peut pas être effectuée à reflux comme pour la PMeOx. Deux essais ont donc été effectués dans les conditions présentées à la Figure 3.36 : 5 équivalents de NaOH à 65°C pendant 140h (6 jours). Les résultats de ces deux essais menés sur des PEtOx de 56,5 et 58,0 $kg.mol^{-1}$ ($X_{n\ visé}$ = 590) amorcées respectivement par I_{e4} et I_{e6} sont présentés dans le Tableau 3.10. Dans

chacun des deux cas, le produit obtenu est parfaitement soluble dans le méthanol deutéré et l'analyse RMN ^{1}H révèle que les PEtOx ne sont pas hydrolysées.

Tableau 3.10. Essais d'hydrolyse basique de PEtOx (X_n = 590) en présence de NaOH

Hydrolysis run	Starting PEtOx		Eq NaOH / unit	Total time (days)	$M_{n\ theo}$[1] (kg.mol^{-1})	Hydrolysis %[2]
	Structure (initiator)	Name				
PLL89	4-arms (I_{e4})	PLL84D	5	6	24.5	0
PLL88	6-arms (I_{e6})	PLL83D	5	6	25.2	0

The initial concentration of repeat unit (MeOx) $[MeOx\ unit]_0$ = 0.8 mol.L^{-1}
[1] $M_{n\ theo\ PEI} = M_{n\ theo\ PEtOx} \times M_{0,EI} / M_{0,MeOx}$
[2] Hydrolysis % calculated from the ^{1}H NMR spectrum of the purified product in methanol-D_4

Suite à cet échec, de nouvelles conditions basiques, décrites à la Figure 3.37, ont été testées pour l'hydrolyse de trois PEtOx de M_n élevée (X_n = 590) amorcées par I_3, I_{e4} et I_{e6}. L'utilisation du DMSO comme co-solvant de l'hydrolyse est supposé permettre la solubilité de la PEtOx malgré la température élevée. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3.11. Après chaque hydrolyse, le polymère obtenu est purifié par dialyse contre l'eau pour éliminer la base en excès. L'eau est changée très régulièrement jusqu'à obtention d'un pH neutre dans le milieu extérieur et dans le milieu intérieur. Deux à trois hydrolyses successives ont été nécessaires dans chacun des cas pour atteindre un taux d'hydrolyse de 100%. Cependant, là encore les produits obtenus sont peu solubles (ou insoluble pour PLL94H3) dans le méthanol deutéré, rendant l'analyse très peu fiable. De plus, pour leur utilisation en thérapie génique, la solubilité des PEI obtenues est un critère primordial. De nombreux tests de solubilité ont été effectués sans succès. Parmi les solvants testés, on peut citer :

- H_2O + HCl
- H_2O + acide trifluoroacétique (TFA)
- Toluène
- Diméthylformamide (DMF)
- Tétrahydrofurane (THF)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Dichlorobenzène.

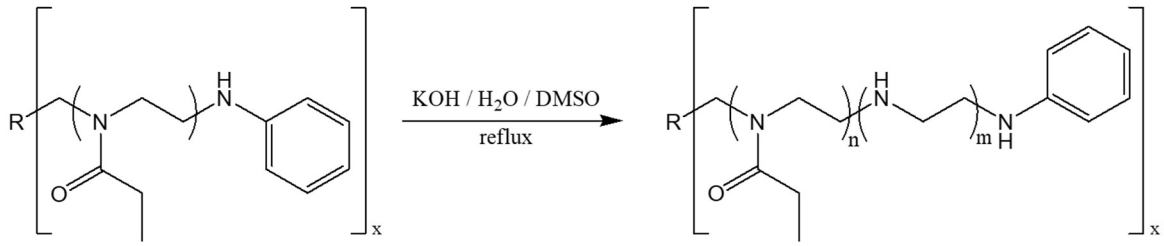


Figure 3.37. Schéma des conditions d'hydrolyse basique de PEtOx en présence de KOH

Tableau 3.11. Essais d'hydrolyse basique de PEtOx (X_n = 590) dans un mélange eau/DMSO

Hydrolysis run	Starting PEtOx		Eq KOH / unit	time (days)	$M_{n\ theo}$[1] (kg.mol^{-1})	Hydrolysis %[2]
	Structure (initiator)	Name				
PLL95H	3-arms (I_3)	PLL85D	9	4.5	25	0
PLL95H2[#]			12	4.5		100**
PLL94H	4-arms (I_{e4})	PLL84D	10	5.5	25	43**
PLL94H2[#]			10	4.5		92**
PLL94H3[#]			9	6		-***
PLL91H	6-arms (I_{e6})	PLL83D	5	2	25	31**
PLL91H2[#]			8	2.8		76**
PLL91H3[#]			8	4		100**

The initial concentration of repeat unit (EtOx) $[EtOx\ unit]_0$ = 0.8 mol.L^{-1}
[1] $M_{n\ theo\ PEI} = M_{n\ theo\ PEtOx} \times M_{0,EI} / M_{0,EtOx}$ (if 100% EtOx moieties are hydrolyzed into EI)
[2] Hydrolysis % calculated from the ^{1}H NMR spectrum of the purified product in methanol-D_4
[#] H2 and H3 means respectively that two or three successive hydrolysis were performed
* Partial solubility in methanol-D_4
** Very poor solubility in methanol-D_4
*** Not soluble in methanol-D_4

Face à ces difficultés, nous avons choisi de concentrer notre étude sur les polymères dont la structure ne comprend pas de pont éther et pour lesquels une hydrolyse acide est envisageable. Le protocole et les résultats sont proposés dans la partie suivante.

II. Hydrolyse acide

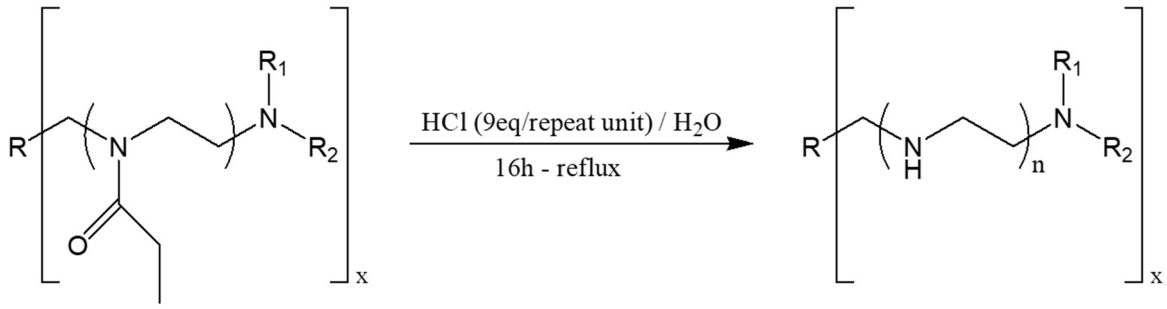


Figure 3.38. Schéma réactionnel de l'hydrolyse des PEtOx

Les PEtOx en étoile synthétisées à partir des amorceurs I_3 et I_4 ainsi que leurs équivalents linéaires synthétisés à partir du bromure d'allyle ont été hydrolysés dans les conditions suivantes : 9 équivalents d'acide chlorhydrique par unité de répétition à reflux pendant 16h (Figure 3.38). A la fin de la réaction, l'ajout de soude jusqu'à l'obtention d'un pH égal à 13 permet de faire précipiter la PEI. Le solide blanc obtenu est rincé abondamment à l'eau distillée. Une fois secs, les produits obtenus sont analysés par RMN ^{1}H. La disparition des signaux caractéristiques de la PEtOx à 3,5 ppm, 2,4 ppm et 1,1 ppm au profit d'un nouveau signal à 2,75 ppm est observée pour chaque polymère (Figure 3.39). La solubilisation totale de tous les polymères dans le méthanol deutéré a permis de calculer avec précision le taux d'hydrolyse pour chacun d'eux (Tableau 3.12). Ils sont tous supérieurs à 99%. Ainsi, une bibliothèque de 9 PEI a été obtenue avec succès.

Tableau 3.12. Hydrolyse acide de PEtOx

Hydrolysis run	Starting PEtOx			Hydrolysis %[1]	$M_{n\ theo}$ [2] (kg.mol^{-1})
	Structure (initiator)	Name	X_n		
AF2	Linear (Al Br)	PLL97D#	186	99.4	7.6
PLL118		PLL110D*	370	99.1	15.9
PLL119		PLL111D*	590	99.1	25.4
PLL115	3-arms star (I_3)	PLL108D*	188	99.1	8.1
PLL114		PLL106D*	370	99.1	15.9
PLL100		PLL85D#	585	99.4	25.2
PLL117	4-arms star (I_4)	PLL109D*	188	99.1	8.1
PLL113		PLL105D*	374	99.0	16.1
PLL112		PLL103D*	591	99.7	25.4

The initial concentration of repeat unit (EtOx) $[\text{EtOx unit}]_0 = 0.5$ mol.L^{-1}

[1]Hydrolysis % calculated from the ^{1}H NMR spectrum of the purified product

[2] $M_{n\ theo\ PEI} = M_{n\ theo\ PEtOx} \times M_{0,EI} / M_{0,EtOx}$

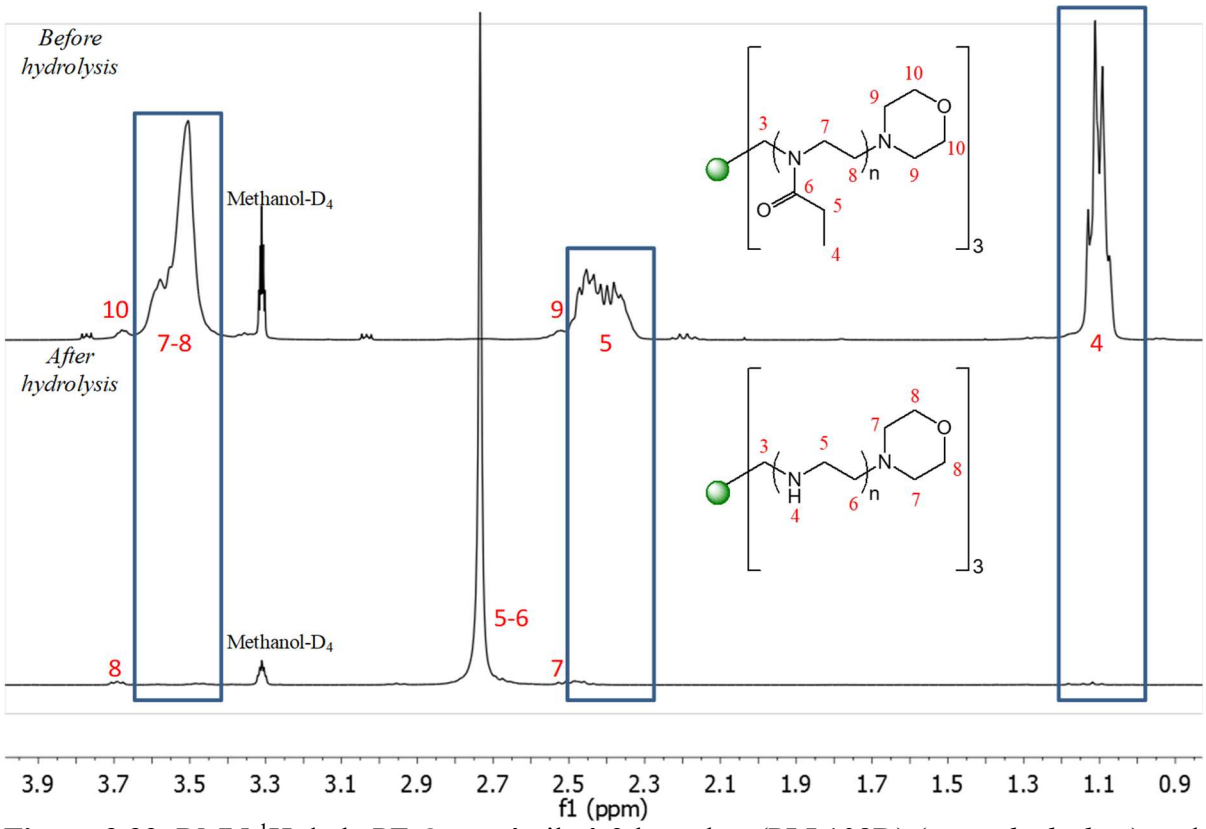


Figure 3.39. RMN ^{1}H de la PEtOx en étoile à 3 branches (PLL108D) (*avant hydrolyse*) et de la PEI en étoile à 3 branches (PLL115) (*après hydrolyse*)

III. Comparaison des hydrolyses acide et basique

Dans le but de comprendre l'insolubilité des polymères issus de l'hydrolyse basique de POx, nous allons comparer les PEI obtenues après hydrolyse basique et acide d'une PEtOx en étoile à trois branches de $M_{n\ theo}$ 57 400 g.mol^{-1} ($X_{n\ visé}$ = 590) (PLL85D) (Figure 3.40). Pour ce faire, les polymères hydrolysés PLL100 et PLL95H2 ont été analysés par calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

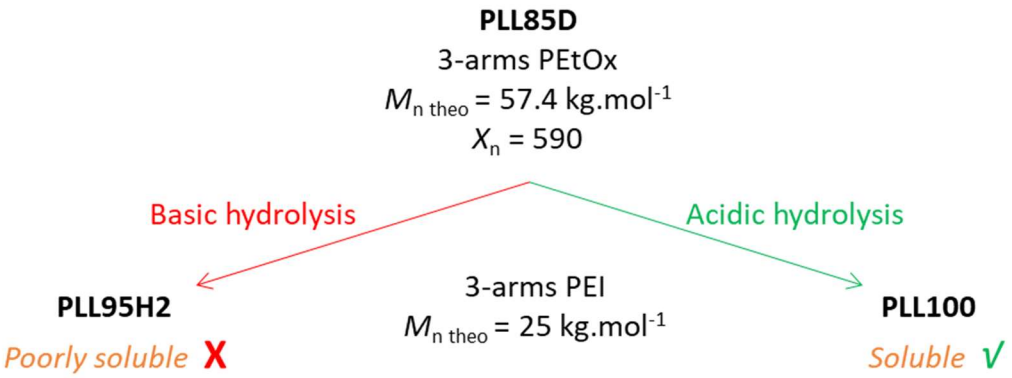


Figure 3.40. Produits d'hydrolyse basique ou acide d'une PEtOx en étoile à 3 branches

L'analyse par DSC de la PEI obtenue par hydrolyse acide (PLL100) confirme la nature semi-cristalline du polymère (Figure 3.41). En plus de la transition vitreuse située à -39°C, il apparaît deux pics exothermiques, un pic de cristallisation à 12,9°C lors de la descente en température, et un pic exothermique de cristallisation froide -3,2°C, indiquant qu'avec suffisamment d'énergie, les chaînes de PEI s'organisent. En continuant à chauffer, un pic de fusion apparaît à 55,4°C. Au contraire, l'analyse DSC de la PEI obtenue par hydrolyse basique (PLL95H2) donne un résultat tout à fait étonnant puisqu'aucune transition n'est identifiable. Ce type de comportement est typique d'un polymère réticulé. Dans ce cas, il s'agit d'une réticulation dont l'origine n'est pas connue. Du sodium est présent à forte concentration et à haute température (100°C) pendant un temps très long (9 jours) et peut interagir avec le polyelectrolyte basique qu'est la PEI, à l'image des interactions existantes entre le POE et le sodium[30]. Des travaux ayant mesuré la conductivité ionique de systèmes PEI/cation métallique ont d'ailleurs été reportés, sans performance majeure[31]. Etant donné qu'il nous a été impossible de solubiliser ces polymères ni d'en connaître la structure exacte, leur étude en transfert de gène ne sera pas menée.

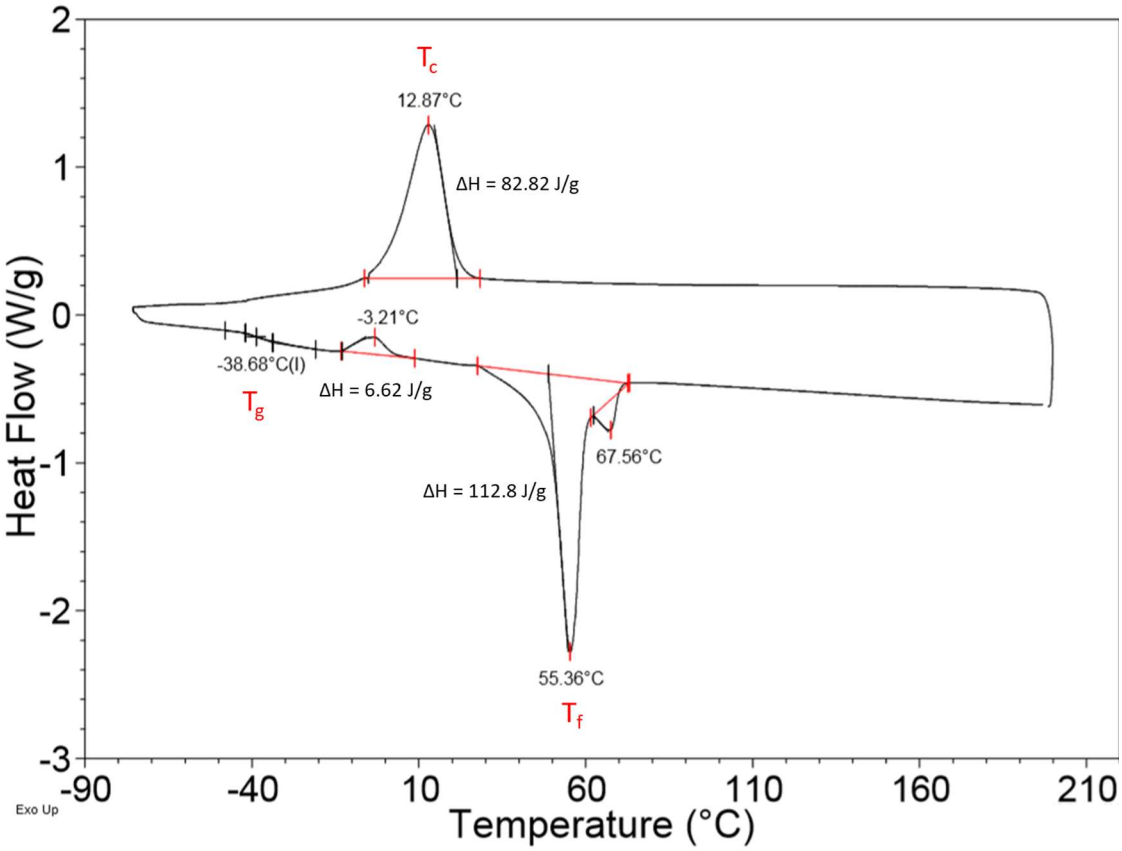


Figure 3.41. Thermogramme DSC de PLL100

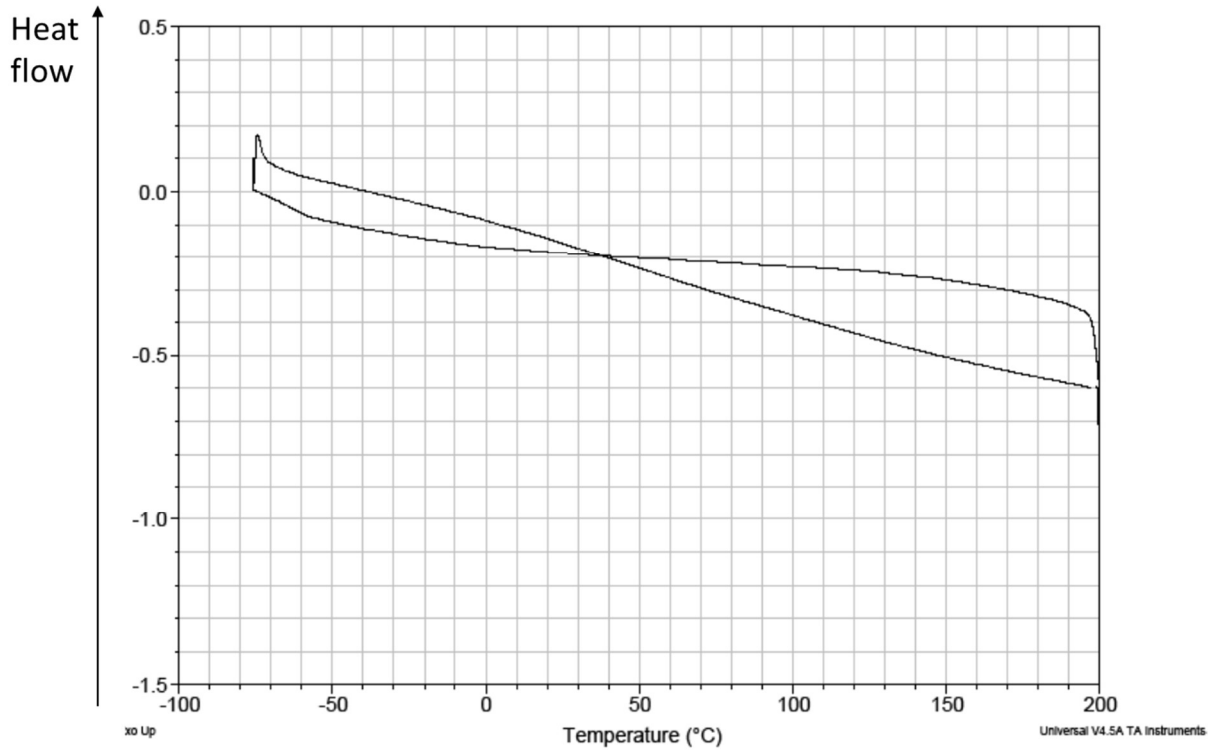


Figure 3.42. Thermogramme DSC de PLL95H2

Partie 3 – Post-modification de la PEI

L'amélioration apportée par l'ajout de résidus histidine sur les PEI linéaires en termes de diminution de la toxicité et d'amélioration de la transfection due à une amélioration de la sortie de l'endosome a été mise en évidence dans la littérature[1,32]. Pour obtenir ces His-*l*PEI, des résidus histidine ont été greffés sur 10 à 16% des résidus EI de la PEI linéaire. A partir de la bibliothèque de PEI linéaires et en étoile à 3 et 4 branches obtenues, il nous est apparu comme indispensable d'essayer d'appliquer cette chimie sur les nouvelles PEI en étoile afin d'investiguer une synergie possible entre la modification et l'architecture, dans le but ensuite de tester leurs capacités en transfection de gènes.

Cette dernière partie traite donc de la synthèse de L-histidine-*N*-acryloyle (HNA) ainsi que du greffage de ce résidu histidine sur l'ensemble des PEI synthétisées.

I. Synthèse du L-histidine-*N*-acryloyle (HNA)

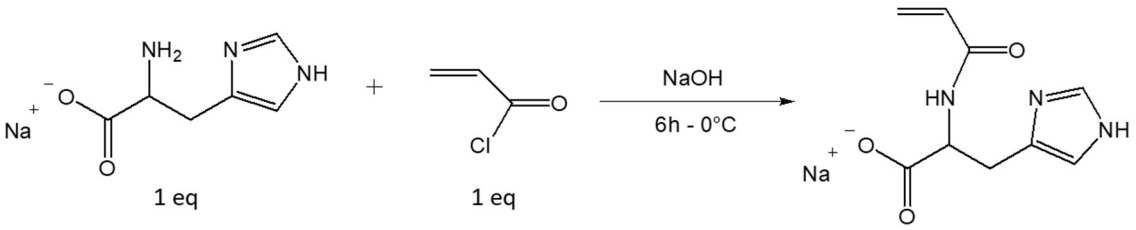


Figure 3.43. Schéma réactionnel de la synthèse du HNA

Le HNA est obtenu par un mécanisme d'addition-élimination de la L-histidine sur le chlorure d'acryloyle (Figure 3.43). Le chlorure d'acryloyle, très réactif, est ajouté avec un débit très lent à l'aide d'un pousse-seringue dans un ballon tricol contenant la L-histidine. Afin de ralentir la cinétique, le milieu réactionnel est maintenu tout au long de l'ajout à une température en dessous de 0 °C grâce à un bain de glace. Une solution de soude est ajoutée simultanément au milieu réactionnel avec le même débit que le chlorure d'acryloyle pour maintenir le pH du milieu réactionnel entre 12 et 13 tout au long de l'addition, malgré la formation d'acide chlorhydrique comme sous-produit. En effet, au cours de l'addition, l'amine primaire (pKa 9,2)

de la L-histidine ne doit pas être protonée pour conserver son rôle de nucléophile. A la fin de l'addition, le produit obtenu est purifié par précipitation dans l'acétone.

Le produit obtenu après purification est caractérisé par RMN ^{1}H dans D_2O. La superposition des spectres de la L-histidine et de l'HNA (Figure 3.44) met en évidence la formation du produit escompté. Après la réaction, des signaux entre 5,8 et 6,2 ppm apparaissent et sont attribués aux protons oléfiniques (1, 1' et 2). De plus, les signaux des protons 6, 7-7', 9, 10 et en particulier celui du proton 6, qui est en alpha de la fonction amide générée, sont déblindés par rapport à ceux du spectre de la L-histidine. Ces observations confirment la réaction entre les 2 réactifs et le bon ratio entre les intégrales des différents signaux met en évidence la formation du produit attendu. Par ailleurs, deux massifs peu intenses à 2,9 et 3,8 ppm, intégrant pour la même valeur sont aussi présents. Ces signaux résultent d'une addition de Mickaël entre deux molécules de HNA et sont attribués aux nouveaux protons méthylène situés entre la fonction amide et le cycle imidazole (Figure 3.45). La présence de ce produit secondaire résultant de l'homocouplage entre deux molécules d'HNA a été confirmé dans un travail précédent effectué au sein de l'équipe par une analyse de spectrométrie de masse ESI.

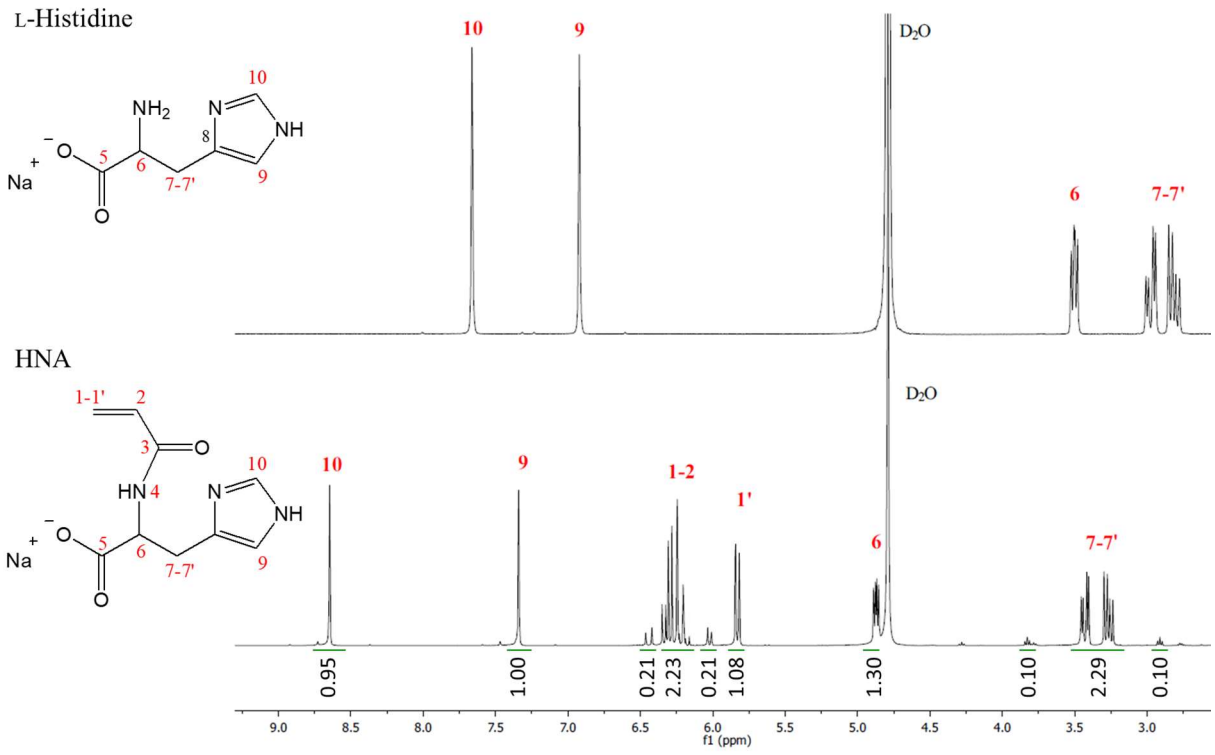


Figure 3.44. Spectres RMN ^{1}H de la L-histidine (en haut) et du HNA (en bas) dans D_2O à 20°C

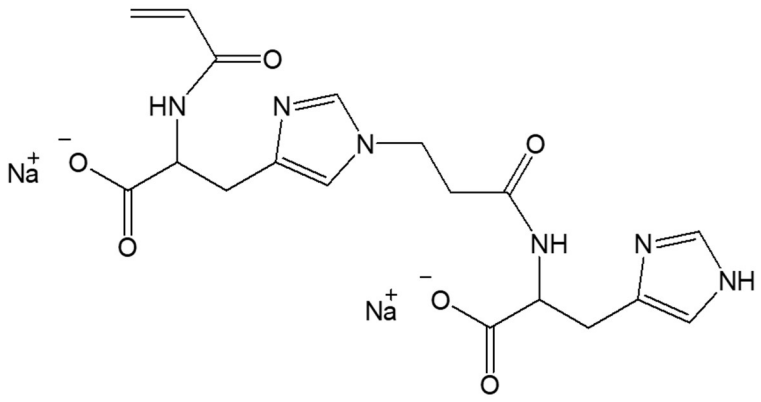


Figure 3.45. Produit secondaire d'homocouplage du HNA

Le pourcentage d'homocouplage a été déterminé par RMN ^{1}H selon le calcul suivant : en posant *i* le pourcentage de molécules issues de l'homocouplage et *p* le pourcentage d'HNA, nous pouvons écrire que l'intensité du signal à 3,8 ppm, $I_{3,8\ ppm}$, est proportionnelle à 1H × 2*i*, alors que celle du signal à 7,3 ppm, $I_{7,3\ ppm}$, est proportionnelle à 1H × (2*i* + *p*). Il en résulte :

$$I_{3,8\ ppm} \leftrightarrow 2i$$

$$I_{7,3\ ppm} \leftrightarrow p + 2i$$

En normalisant $I_{7,3\ ppm}$ à 1 H, nous obtenons : $\boldsymbol{i} = \frac{\boldsymbol{I_{3,8\ ppm}}}{(\boldsymbol{2 - I_{3,8ppm}})}$

Le Tableau 3.13 répertorie les différentes synthèses de HNA effectuées. Malgré les précautions prises et le contrôle des paramètres expérimentaux importants (température, pH), il est à noter que le pourcentage d'homocouplage est très variable même pour des réactions effectuées dans des conditions expérimentales apparemment identiques (même expérimentateur, contrôle et ajustement du pH très régulier, température régulée). Les trois premières synthèses sont faites dans les mêmes conditions : température ne dépassant pas 2°C (bain de glace avec sel régulièrement renouvelé), vérification du pH tous les quarts d'heure, même quantité initiale de L-histidine (20 mmol) ; cependant des résultats très variables sont obtenus, le pourcentage de produit homocouplé dans le produit purifié par 2 précipitations successives dans l'acétone varient de 5 à 33 %. D'après des études préalables, un pourcentage de produit homocouplé de l'ordre de 5 à 10% est acceptable pour le couplage ultérieur avec de la PEI : ainsi, les produits AF9P2 et AF10P2 ne pourront pas être utilisés.

Ces résultats hétérogènes illustrent le fait que malgré nos efforts, les paramètres expérimentaux ne sont pas parfaitement maîtrisés. Nous avons donc cherché à diminuer la réactivité des molécules présentes dans le ballon dans le but de limiter la formation de produit d'homocouplage au cours de la synthèse. Ainsi, la synthèse AF11 a été faite à une température plus basse et parfaitement régulée grâce à un cryostat thermostaté à -5°C. De plus, les précipitations ont été effectuées en utilisant de l'acétone froid. Enfin, pour déterminer à quel moment l'homocouplage se produit, nous avons fait des prélèvements à trois étapes du protocole : à la fin de l'ajout du chlorure d'acryloyle ($AF11t_0$), après la première précipitation (AF11P1) et après la seconde précipitation (AF11P2). Ces prélèvements ont ensuite été analysés par RMN ^{1}H. La Figure 3.46 présente la superposition des spectres RMN ^{1}H de AF11 à ces trois stades de la synthèse. Le spectre de $AF11t_0$, (Figure 3.46 a), présente de nombreux signaux pointés par des flèches qui sont attribuables à des impuretés de l'histidine (Figure 3.44). Le spectre AF11P1 montre donc que la précipitation dans l'acétone est une étape de purification nécessaire pour s'affranchir d'un grand nombre de composés indésirables. Le déblindage des protons 9 et 10 observé entre le spectre de la Figure 3.46 a) et celui de la Figure 3.46 b) peut s'expliquer par un changement de pH entre les deux prélèvements. En effet, lors du premier prélèvement le pH du milieu réactionnel était basique (pH ~ 13), puis le milieu a été acidifié (pH = 2) avant la première précipitation. Après la première précipitation (notée P1), nous remarquons un faible taux d'homocouplage (i_{P1} = 5%), alors qu'après la deuxième précipitation (notée P2) effectuée sur une petite quantité d'AF11P1, le pourcentage d'homocouplage a été multiplié par un facteur 9 (i_{P2} = 45 %). L'augmentation du pourcentage d'homocouplage après la deuxième précipitation a également été observée pour la synthèse ASV3 bien que l'augmentation soit moins importante. Les produits synthétisés par la suite ont donc été purifié par une seule précipitation dans l'acétone froid.

Dans le but d'accroitre la quantité de HNA obtenue à l'issu d'une synthèse, l'influence du nombre de moles initiales de L-histidine a été étudiée. Ainsi, la synthèse d'HNA a été réalisée en divisant par 2 (ASV5) et en multipliant par 2 (ASV6 et GWD87) le nombre de moles de L-histidine par rapport aux expériences précédentes. Les taux d'homocouplage obtenus pour les synthèses réalisées avec 40 mmol de L-histidine sont acceptables (9 et 14 %). Ces nouvelles conditions opératoires permettront un gain de temps non négligeable, étant donné que la synthèse et les purifications représentent 6 jours de travail.

Tableau 3.13. Synthèses d'HNA avec $[HNA]_0 = 2$ mol.L^{-1}

Run	$n_{L\text{-histidine}}$ (mmol)	Temperature (°C)	yield (%)	*i* homocouplage percentage (%)
AF5P2*	20	≈2°C	30	5
AF9P2*	20	≈2°C		33
AF10P2*	20	≈2°C		16
AF11P1	20	-5°C		5
AF11P2*				45
ASV3P1	20	-5°C	11	8
ASV3P2*			9	12
ASV1P1	20	-5°C	31	4
ASV7P1	20	-5°C	18	8
ASV5P1	10	-5°C		8
ASV6P1	40	-5°C	10	14
GWD87P1	40	-5°C	37	9

* P2 HNA purified by two successive precipitations in cold acetone

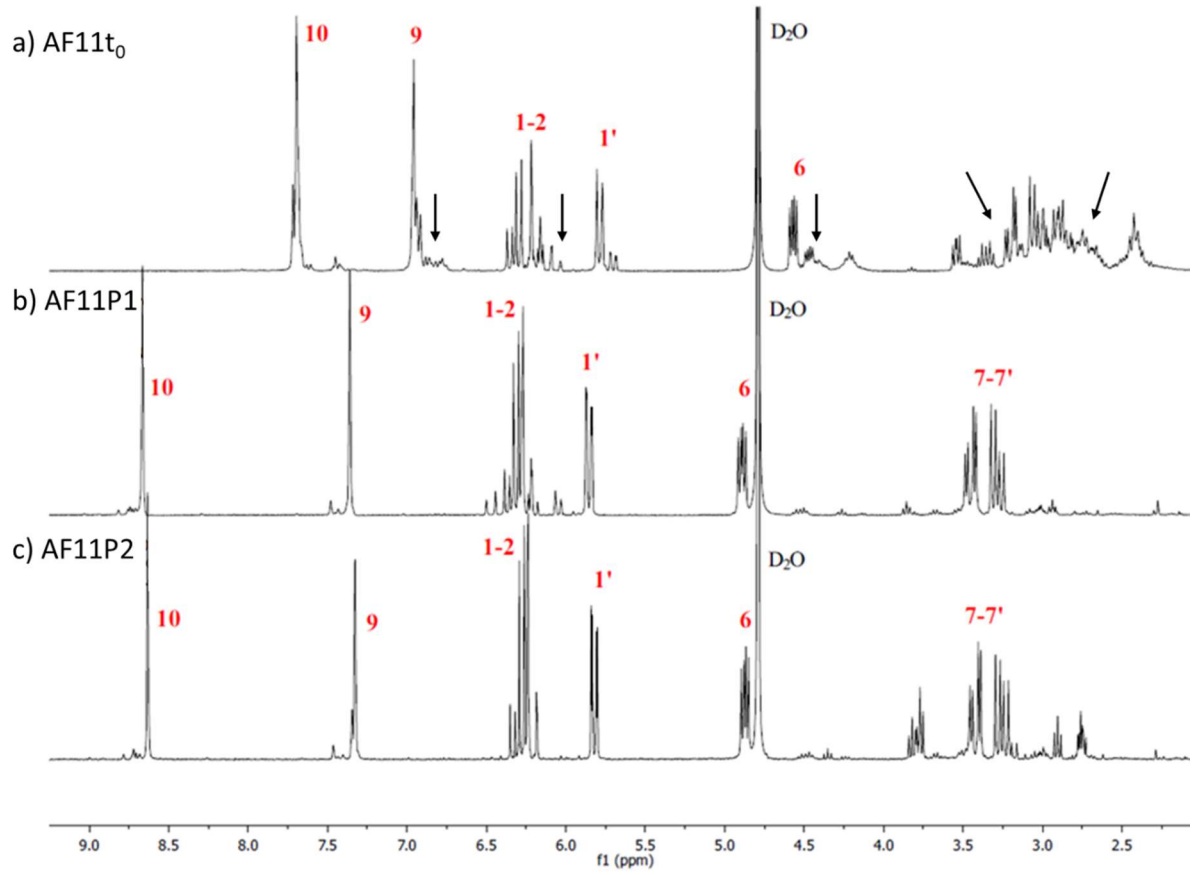


Figure 3.46. Spectres RMN ^{1}H dans D_2O à 20°C a) du prélèvement du milieu réactionnel à la fin de l'addition du chlorure d'acryloyle ($AF11t_0$) b) du produit après la première précipitation (AF11P1) et c) du produit après la seconde précipitation (AF11P2)

II. Modification de PEI par l'HNA

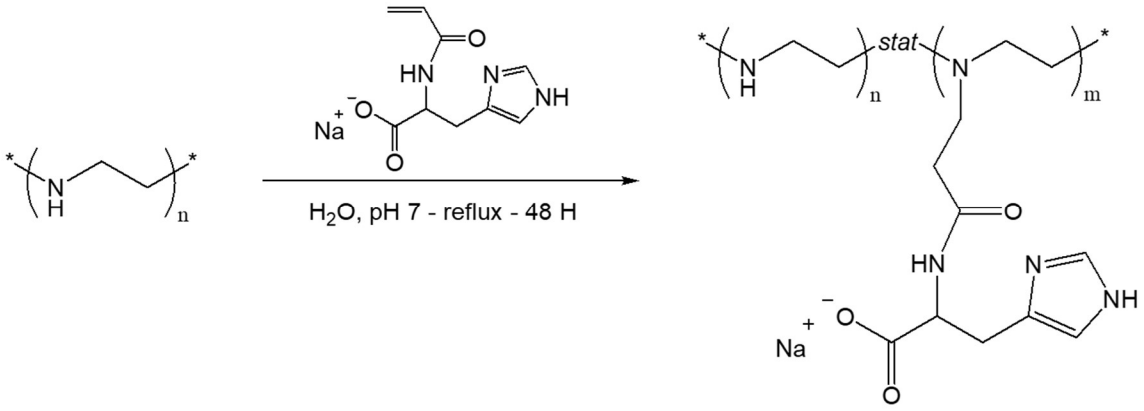


Figure 3.47. Schéma réactionnel de la modification de PEI par l'HNA

En se basant sur les travaux de Bertrand *et al.*[1] et sur des travaux complémentaires menés par l'équipe, nous avons souhaité préparer une bibliothèque de PEI linéaires, en étoile à trois branches et en étoile à quatre branches possédant entre 10 et 16 % de leurs motifs EI modifiés par des molécules de HNA. La modification des chaînes PEI résulte d'une addition de Michaël entre l'amine secondaire de la PEI et le groupement énone de la molécule HNA. La synthèse a été réalisée par ajout progressif d'HNA (à l'aide d'un pousse-seringue) dans un ballon tricol contenant la PEI à modifier, le milieu réactionnel étant chauffé à reflux pendant 48 heures (Figure 3.47). En effet, il est important de maintenir une concentration instantanée en HNA suffisamment faible pour favoriser la réaction entre HNA et motif EI et limiter la réaction entre deux molécules d'HNA (homocouplage). Le produit est ensuite purifié en réalisant une précipitation dans l'éthanol suivie d'une dialyse contre l'eau distillée.

Afin de caractériser le polymère modifié et en particulier de déterminer le taux de substitution obtenu, les polymères obtenus (notés His-PEI) sont analysés par RMN ^{1}H dans D_2O. Le spectre de PLL121D est donné pour exemple à la Figure 3.48. Les deux singulets à 7,3 ppm et 8,6 ppm mettent en évidence la présence de résidus imidazole dans le polymère. L'absence de signaux secondaires dans cette zone, confirme que l'ajout au goutte à goutte du HNA a permis d'éviter l'homocouplage entre un HNA libre et un résidu HNA déjà greffé à la PEI (travaux d'Emilie Bertrand). De plus, l'absence des signaux des protons oléfiniques 1,1'et 2 entre 5,8 ppm et 6,5 ppm démontre la disparition de la double liaison et donc par extension confirme la réaction entre les motifs EI et les molécules HNA. Les protons méthylène des unités répétitives substituées et non substituées résonnent, quant à eux, entre 2,0 et 4,7 ppm.

En comparant l'intensité des signaux de ces unités monomères à l'intensité d'un singulet du résidu imidazole, il est possible de calculer le taux de modification du polymère par le HNA selon le calcul suivant : en posant f le taux de modification, nous pouvons écrire que l'intensité du signal à 8,6 ppm est proportionnelle à $1H \times f$, alors que l'intensité des signaux compris entre 2,0 et 4,7 ppm est proportionnelle à $4H \times (1-f) + 11H \times f$. En effet, entre 2,0 et 4,7 ppm résonnent 4 protons appartenant à des unités non modifiées et 11 protons appartenant à des unités modifiées, en tenant compte des pourcentages de chaque type d'unité. Il en résulte:

$$I_{8,6\ ppm} \leftrightarrow 1f$$

$$I_{2\text{-}4,7\ ppm} \leftrightarrow 4(1-f) + 11f$$

$$\text{Soit : } \boldsymbol{f} = \frac{4 \times I_{8,6\ ppm}}{(I_{2\text{-}4.7\ ppm} - 7 \times I_{8.6\ ppm})}$$

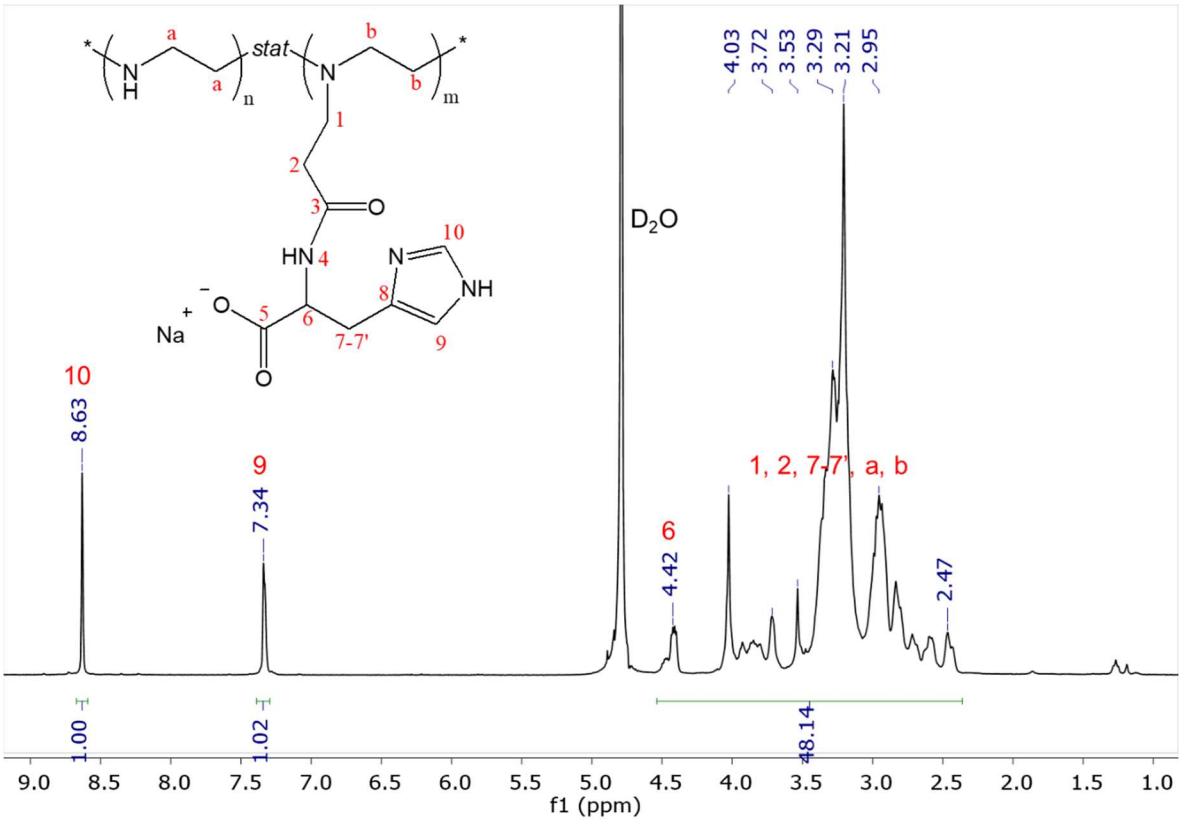


Figure 3.48. Spectre RMN ^{1}H de PLL121D dans D_2O à 20°C

Dans des travaux antérieurs, il a été montré qu'un taux de modification de l'ordre de 10% à 16% permet d'obtenir des résultats intéressants pour le transfert de gène (amélioration de la sortie de l'endosome)[1,32]. Ce résultat est obtenu en utilisant un rapport molaire HNA/EI égal à 0,3. Les premières modifications ont donc été faites dans ces conditions (AF7, ASV4 et PLL121). L'objectif initial de ce travail est d'obtenir le pendant His-PEI (avec un pourcentage compris entre 12 et 16% au mieux) de la bibliothèque de PEI. Cependant, les pourcentages de modification par le HNA obtenus se sont avérés plus faibles que prévu (10,6%, 9,4% et 10,0% respectivement). Bien que l'étude de cette chimie ne fût pas l'objectif premier de ce travail, nous avons fait quelques variations du protocole pour essayer d'en tirer des enseignements et d'obtenir la bibliothèque d'His-PEI possédant un pourcentage de résidus histidine le plus proche possible de la fourchette optimale. Pour augmenter le taux de modification et se rapprocher des 16% visés initialement, nous avons modulé deux paramètres : le ratio molaire initial HNA/EI et le temps de réaction. Pour une réaction, le temps a été augmenté de 48H à 62H (PLL123), pour d'autres expériences le ratio molaire initial HNA/EI a été augmenté de 0,30 à 0,38 (PLL131, PLL124, PLL127, PLL130) et enfin, pour une expérience, les 2 paramètres ont été augmentés (PLL125). Nous n'avons pas procédé à l'étude de la variation de

ces paramètres en gardant constant la nature de la PEI modifiée (linéaire ou en étoile), c'est pourquoi il est difficile de conclure avec exactitude quant à l'influence de chaque paramètre. Toutefois, la PEI obtenue avec le pourcentage de HNA le plus élevé est la PEI en étoile à 4 branches de $M_{n\ theo}$ 25 kg.mol^{-1} qui a été modifiée en utilisant un ratio molaire initial HNA/EI de 0,38 pendant 62h. L'augmentation d'un ou des 2 paramètres pendant la synthèse a donc permis d'obtenir des PEI possédant entre 11,4 et 15,9% d'HNA greffé tout en gardant un taux d'homocouplage toujours inférieur à 10%.

Tableau 3.14. Modification de PEI par l'HNA

Run	Polymer structure	$M_{n\ theo}$ starting PEI (kg.mol^{-1})	HNA batch	[HNA]/[EI]	time	% grafted HNA
AF7		7.6	AF5	0.30	48H	10.6
PLL131	Linear	15.9	GWD87	0.38	48H	11.4
ASV4		25.4	ASV3	0.30	48H	9.4
PLL121		8.1	ASV1	0.30	48H	10.0
PLL124	3-arms star	15.9	ASV1	0.38	48H	12.8
PLL127		25.2	GWD87	0.38	48H	15.2
PLL123		8.1	ASV1	0.30	62H	14.0
PLL125	4-arms star	16.1	ASV5	0.38	62H	15.9
PLL130		25.4	GWD87	0.38	48H	13.5

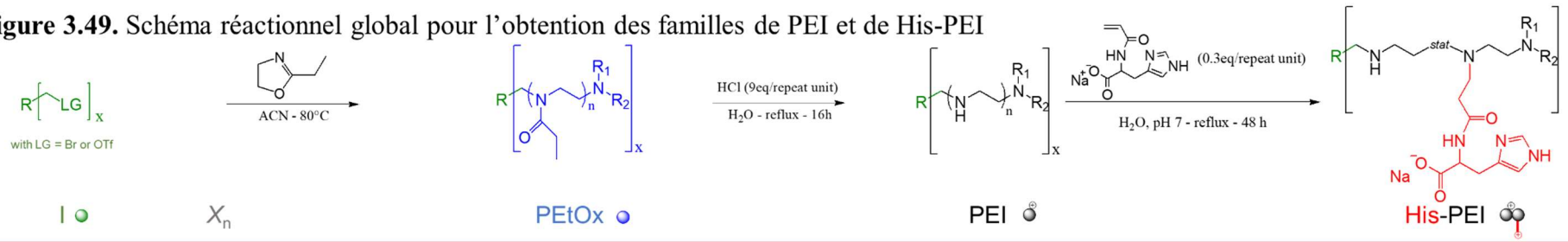
Conclusion

Dans ce chapitre, les polymérisations de différentes familles de POx en étoile contenant 3, 4 et 6 branches à partir d'amorceurs multitriflates ont été présentées : des PMeOx de X_n = 188 ainsi que des PEtOx de X_n = 188, 370 et 590. Parmi ces quatre familles, notre travail a permis de démontrer que les PMeOx en étoile de X_n = 188 et les PEtOx en étoile de X_n = 590 sont bien définies.

Les essais d'hydrolyse basique de ces POx n'ont pas aboutis. Ils n'ont donc pas permis d'obtenir des PEI à partir des POx synthétisées à partir des nouveaux amorceurs tétra et hexafonctionnels contenant un pont éther (I_{e4} et I_{e6}). Pour la suite du projet, une bibliothèque de PEI possédant des masses molaires variables et ayant une structure en étoile à 3 ou 4 branches ou une structure linéaire, soit neuf PEI, a été obtenue par hydrolyse acide des POx synthétisées à partir des amorceurs sans ponts éther (I_3 et I_4 et I_1 ou bromure d'allyle).

Enfin, la post-modification des PEI par greffage de résidus histidine a été effectuée, permettant d'obtenir une deuxième bibliothèque de 9 polymères His-PEI possédant 10 à 16% de résidus histidine.

Figure 3.49. Schéma réactionnel global pour l'obtention des familles de PEI et de His-PEI



	I	X_n	PEtOx	PEI	His-PEI
Linear	x = 1	188	PLL97D#	AF2	AF7
		370	PLL110D*	PLL118	PLL131
		590	PLL111D*	PLL119	ASV4
3-arms	x = 3	188	PLL108D*	PLL115	PLL121
		370	PLL106D*	PLL114	PLL124
		590	PLL85D#	PLL100	PLL127
4-arms	x = 4	188	PLL109D*	PLL117	PLL123
		370	PLL105D*	PLL113	PLL125
		590	PLL103D*	PLL112	PLL130

Références

(1) Bertrand, E.; Gonçalves, C.; Billiet, L.; Gomez, J. P.; Pichon, C.; Cheradame, H.; Midoux, P.; Guégan, P. Histidinylated Linear PEI: A New Efficient Non-Toxic Polymer for Gene Transfer. *Chemical Communications* **2011**, *47* (46), 12547. https://doi.org/10.1039/c1cc15716g.

(2) Monnery, B. D.; Jerca, V. V.; Sedlacek, O.; Verbraeken, B.; Cavill, R.; Hoogenboom, R. Defined High Molar Mass Poly(2-Oxazoline)s. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (47), 15400–15404. https://doi.org/10.1002/anie.201807796.

(3) Guillerm, B.; Monge, S.; Lapinte, V.; Robin, J.-J. How to Modulate the Chemical Structure of Polyoxazolines by Appropriate Functionalization. *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33* (19), 1600–1612. https://doi.org/10.1002/marc.201200266.

(4) Kobayashi, S.; Kaku, M. Synthesis of Poly(2-Methyl-2-Oxazoline) Macromers. *Polymer Bulletin* **1985**, *13*, 447–451.

(5) Volet, G.; Deschamps, A.-C. L.; Amiel, C. Association of Hydrophobically α,ω-End-Capped Poly(2-Methyl-2-Oxazoline) in Water. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2010**, *48* (11), 2477–2485. https://doi.org/10.1002/pola.24019.

(6) Chujo, Y.; Ihara, E.; Ihara, H.; Saegusa, T. A Novel Silane Coupling Agent. 1. Synthesis of Trimethoxysilyl-Terminated Poly(N-Acetylethylenimine). *Macromolecules* **1989**, *22* (5), 2040–2043. https://doi.org/10.1021/ma00195a003.

(7) Celebi, O.; Barnes, S. R.; Narang, G. S.; Kellogg, D.; Mecham, S. J.; Riffle, J. S. Molecular Weight Distribution and Endgroup Functionality of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) Prepolymers. *Polymer* **2015**, *56*, 147–156. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.11.005.

(8) Sedlacek, O.; Monnery, B. D.; Hoogenboom, R. Synthesis of Defined High Molar Mass Poly(2-Methyl-2-Oxazoline). *Polym. Chem.* **2019**, *10* (11), 1286–1290. https://doi.org/10.1039/C9PY00013E.

(9) Wiesbrock, F.; Hoogenboom, R.; Leenen, M. A. M.; Meier, M. A. R.; Schubert, U. S. Investigation of the Living Cationic Ring-Opening Polymerization of 2-Methyl-, 2-Ethyl-, 2-Nonyl-, and 2-Phenyl-2-Oxazoline in a Single-Mode Microwave Reactor. *Macromolecules* **2005**, *38* (12), 5025–5034. https://doi.org/10.1021/ma0474170.

(10) Paulus, R. M.; Becer, C. R.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Acetyl Halide Initiator Screening for the Cationic Ring-Opening Polymerization of 2-Ethyl-2-Oxazoline. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2008**, *209* (8), 794–800. https://doi.org/10.1002/macp.200700506.

(11) Hoogenboom, R.; Fijten, M. W. M.; Kickelbick, G.; Schubert, U. S. Synthesis and Crystal Structures of Multifunctional Tosylates as Basis for Star-Shaped Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)s. *Beilstein J Org Chem* **2010**, *6*, 773–783. https://doi.org/10.3762/bjoc.6.96.

(12) Guillerm, B.; Monge, S.; Lapinte, V.; Robin, J.-J. Novel Investigations on Kinetics and Polymerization Mechanism of Oxazolines Initiated by Iodine. *Macromolecules* **2010**, *43* (14), 5964–5970. https://doi.org/10.1021/ma1009808.

(13) Obeid, R.; Maltseva, E.; Thünemann, A. F.; Tanaka, F.; Winnik, F. M. Temperature Response of Self-Assembled Micelles of Telechelic Hydrophobically Modified Poly(2-Alkyl-2-Oxazoline)s in Water. *Macromolecules* **2009**, *42* (6), 2204–2214. https://doi.org/10.1021/ma802592f.

(14) Wang, C.; Li, Y.; Ma, Y.; Gao, Y.; Dong, D.; Fang, J.; Zhang, N. Thermoresponsive Polymeric Nanoparticles Based on Poly(2-Oxazoline)s and Tannic Acid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2018**, *56* (14), 1520–1527. https://doi.org/10.1002/pola.29033.

(15) Hoogenboom, R.; Fijten, M. W. M.; Schubert, U. S. Parallel Kinetic Investigation of 2-Oxazoline Polymerizations with Different Initiators as Basis for Designed Copolymer Synthesis. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, *42* (8), 1830–1840. https://doi.org/10.1002/pola.20024.

(16) Jin, R.-H. Controlled Location of Porphyrin in Aqueous Micelles Self-Assembled from Porphyrin Centered Amphiphilic Star Poly(Oxazolines). *Advanced Materials* **2002**, *14* (12), 889–892.

(17) Vergaelen, M.; Verbraeken, B.; Monnery, B. D.; Hoogenboom, R. Sulfolane as Common Rate Accelerating Solvent for the Cationic Ring-Opening Polymerization of 2-Oxazolines. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4* (8), 825–828. https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.5b00392.

(18) Luxenhofer, R.; Bezen, M.; Jordan, R. Kinetic Investigations on the Polymerization of 2-Oxazolines Using Pluritriflate Initators. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29* (18), 1509–1513.

(19) Kim, K.-M.; Ouchi, Y.; Chujo, Y. Synthesis of Organic-Inorganic Star-Shaped Polyoxazolines Using Octafunctional Silsesquioxane as an Initiator. *Polymer Bulletin* **2003**, *49* (5), 341–348. https://doi.org/10.1007/s00289-002-0113-0.

(20) Rasolonjatovo, B.; Gomez, J.-P.; Mem, W. Poly(2-Methyl-2-Oxazoline)-b-poly(Tetrahydrofuran)-b-poly(2- Methyl-2-Oxazoline) Amphiphilic Triblock Copolymers: Synthesis, Physicochemical Characterizations, and Hydrosolubilizing Properties. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 748–756. https://doi.org/10.1021/bm5016656.

(21) Zimm, B. H.; Stockmayer, W. H. The Dimensions of Chain Molecules Containing Branches and Rings. *The Journal of Chemical Physics* **1949**, *17* (12), 1301–1314. https://doi.org/10.1063/1.1747157.

(22) Zimm, B. H.; Kilb, R. W. Dynamics of Branched Polymer Molecules in Dilute Solution. *Journal of Polymer Science* **1959**, *37* (131), 19–42. https://doi.org/10.1002/pol.1959.1203713102.

(23) Jackson, C.; Frater, D. J.; Mays, J. W. Dilute Solution Properties of Asymmetric Six-Arm Star Polystyrenes. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **1995**, *33* (15), 2159–2166. https://doi.org/10.1002/polb.1995.090331507.

(24) Glassner, M.; D'hooge, D. R.; Young Park, J.; Van Steenberge, P. H. M.; Monnery, B. D.; Reyniers, M.-F.; Hoogenboom, R. Systematic Investigation of Alkyl Sulfonate Initiators for the Cationic Ring-Opening Polymerization of 2-Oxazolines Revealing Optimal Combinations of Monomers and Initiators. *European Polymer Journal* **2015**, *65*, 298–304. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.01.019.

(25) Saegusa, T.; Ikeda, H.; Fujii, H. Isomerization Polymerization of 2-Oxazoline. IV. Kinetic Study of 2-Methyl-2-Oxazoline Polymerization. *Macromolecules* **1972**, *5* (4), 359–362. https://doi.org/10.1021/ma60028a005.

(26) Saegusa, T.; Ikeda, H. Isomerization Polymerization of 2-Oxazoline. VI. Kinetic Study on the Polymerization of 2-Methyl-2-Oxazoline Initiated by Methyl Iodide. *Macromolecules* **1973**, *6* (6), 808–811. https://doi.org/10.1021/ma60036a004.

(27) Dworak, A. The Role of Cationic and Covalent Active Centers in the Polymerization of 2-methyl-2-oxazoline Initiated with Benzyl Bromide. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1998**, *199* (9), 1843–1849. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3935(19980901)199:9<1843::AID-MACP1843>3.0.CO;2-I.

(28) Aoi, K.; Okada, M. Polymerization of Oxazolines. *Progress in Polymer Science* **1996**, *21*, 151–208.

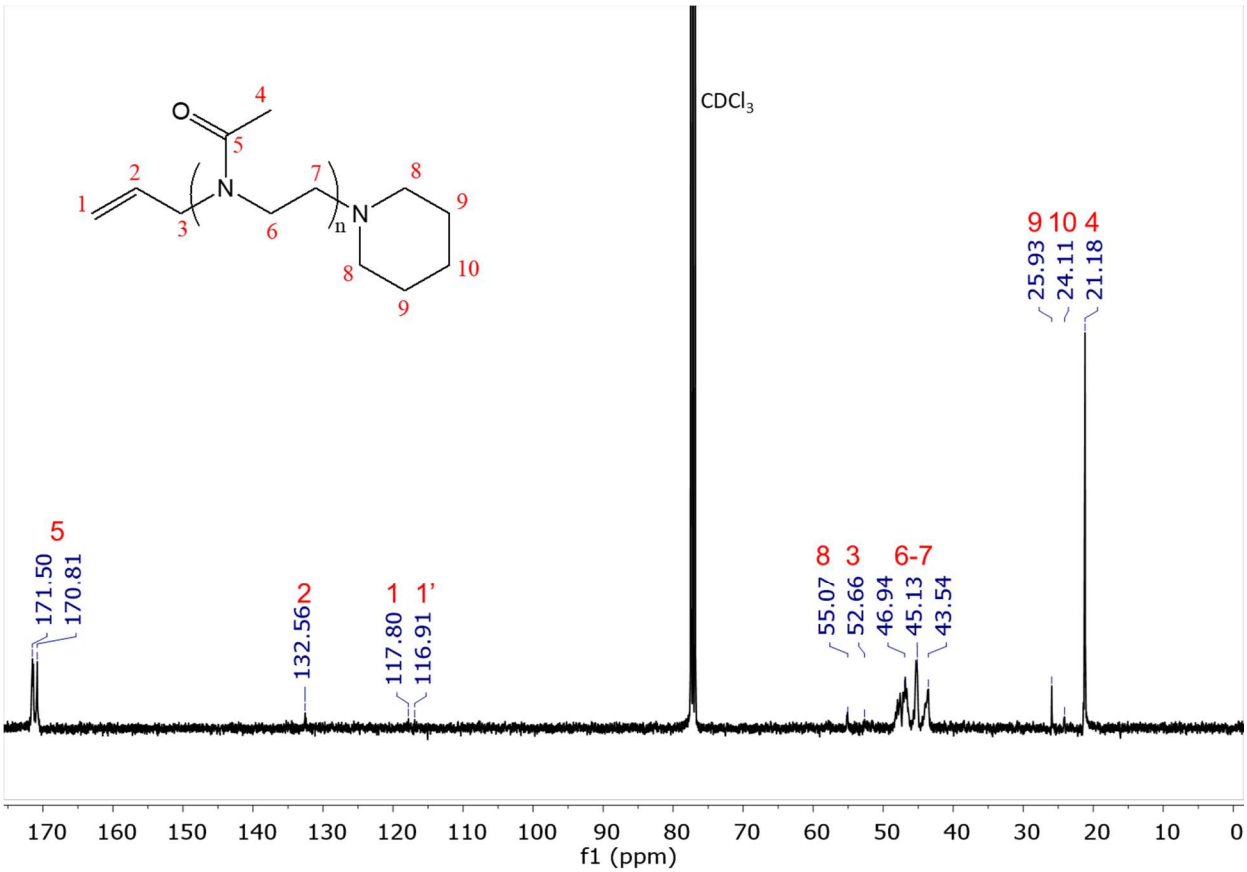
(29) Brissault, B.; Leborgne, C.; Guis, C.; Danos, O.; Cheradame, H.; Kichler, A. Linear Topology Confers in Vivo Gene Transfer Activity to Polyethylenimines. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17* (3), 759–765. https://doi.org/10.1021/bc050287v.

(30) Papke, B. L.; Dupon, R.; Ratner, M. A.; Shriver, D. F. Ion-Pairing in Polyether Solid Electrolytes and Its Influence on Ion Transport. *Solid State Ionics* **1981**, *5*, 685–688. https://doi.org/10.1016/0167-2738(81)90346-5.

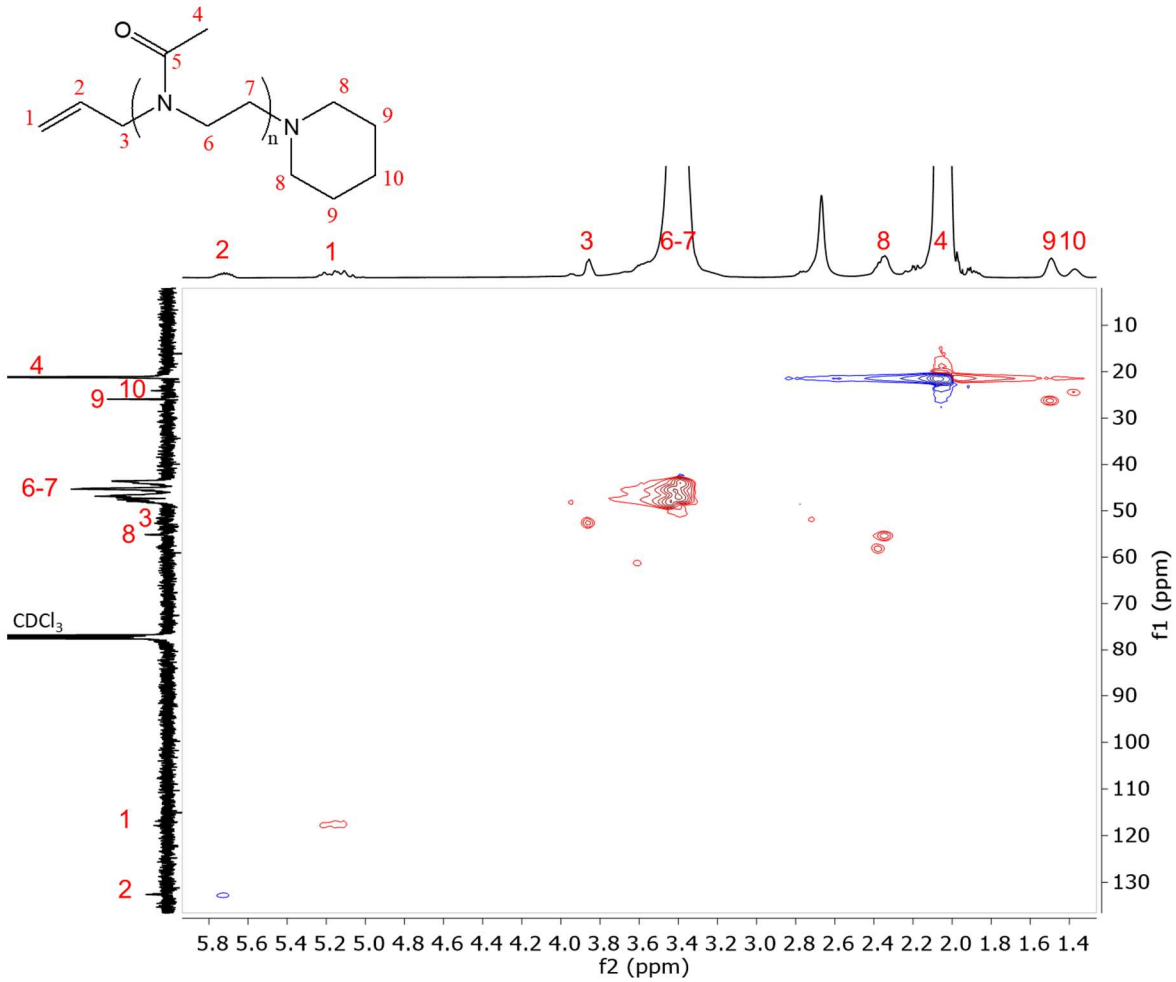
(31) Harris, C. S.; Ratner, M. A.; Shriver, D. F. Ionic Conductivity in Branched Polyethylenimine-Sodium Trifluoromethanesulfonate Complexes: Comparisons to Analogous Complexes Made with Linear Polyethylenimine. *Macromolecules* **1987**, *20* (8), 1778–1781. https://doi.org/10.1021/ma00174a012.

(32) Maury, B.; Gonçalves, C.; Tresset, G.; Zeghal, M.; Cheradame, H.; Guégan, P.; Pichon, C.; Midoux, P. Influence of PDNA Availability on Transfection Efficiency of Polyplexes in Non-Proliferative Cells. *Biomaterials* **2014**, *35* (22), 5977–5985. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.007.

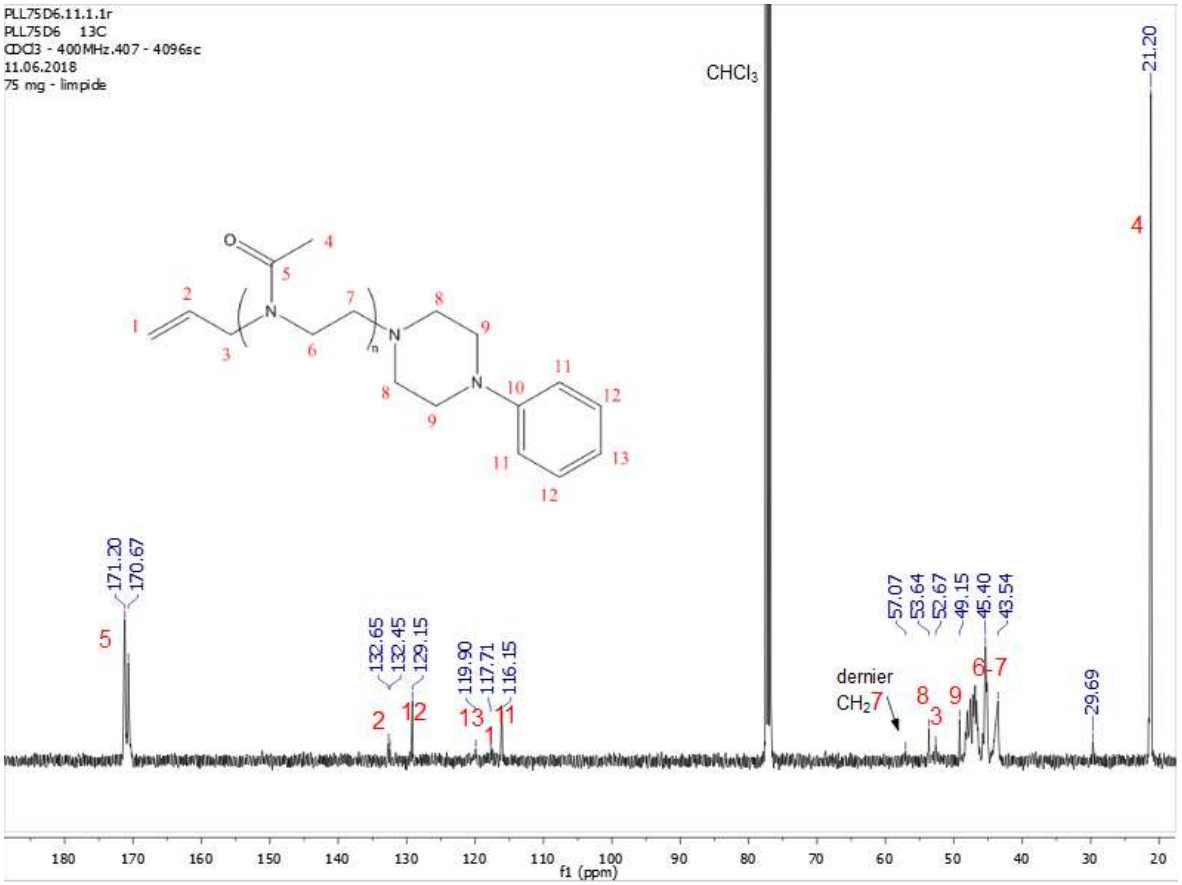
Annexes



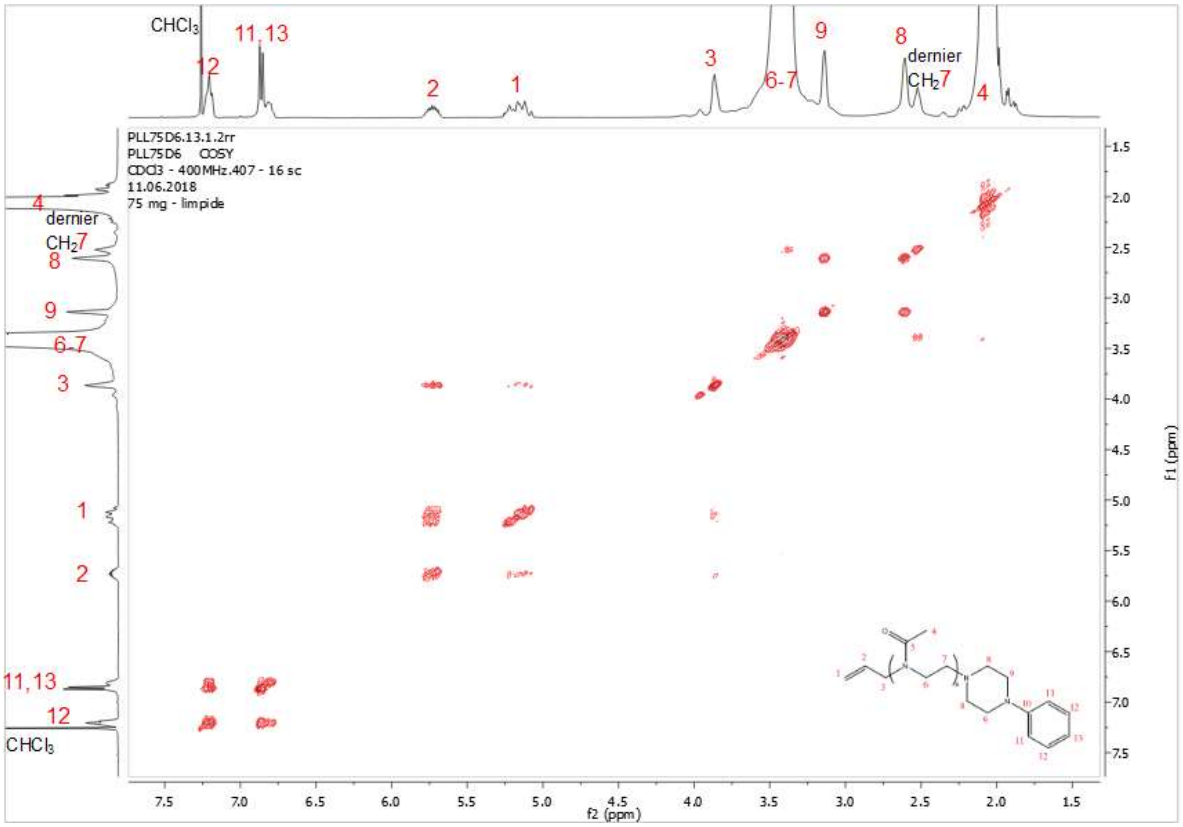
Annexe 3.1. Spectre RMN ^{13}C de PLL40D dans $CDCl_3$ à 20°C



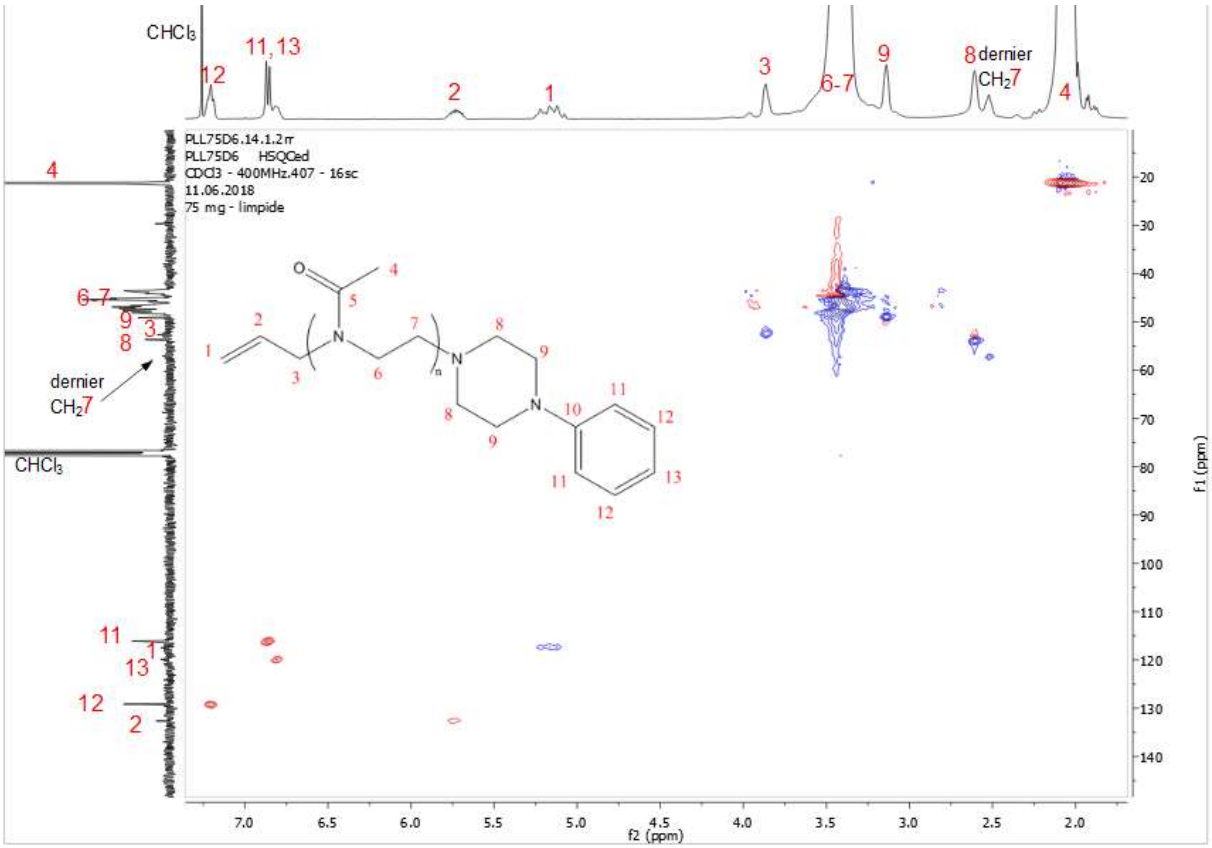
Annexe 3.2. Spectre RMN HSQCed de PLL40D dans $CDCl_3$ à 20°C



Annexe 3.3. Spectre RMN ^{13}C de PLL75D6 dans $CDCl_3$ à 20°C



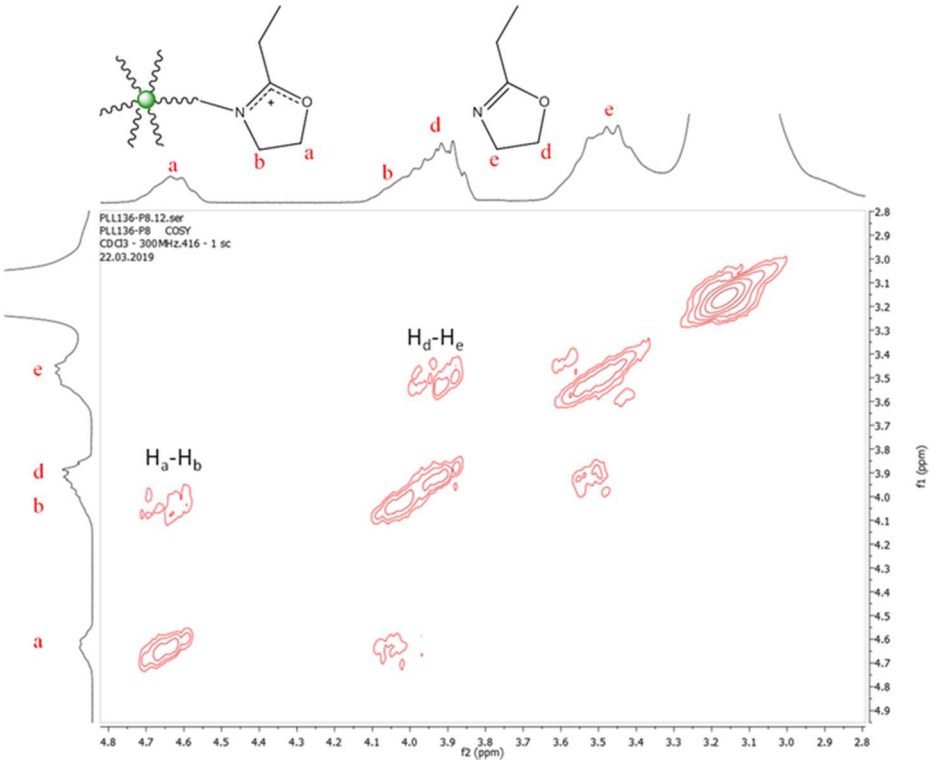
Annexe 3.4. Spectre RMN COSY de PLL75D6 dans $CDCl_3$ à 20°C



Annexe 3.5. Spectre RMN HSQCed de PLL75D6 dans $CDCl_3$ à 20°C

Annexe 3.6. Comparaison des constantes de propagation obtenues pour les polymérisations de MeOx et d'EtOx

Initiator	MeOx X_n = 188		EtOx X_n = 188		EtOx X_n = 590	
	k_p^{app}	$k_p^{app,f}$	k_p^{app}	$k_p^{app,f}$	k_p^{app}	$k_p^{app,f}$
I_1	2.2	2.2	-	-	2.2	2.2
I_3	9.0	3.0	7.7	2.6	7.6	2.5
I_4	-	-	-	-	10.4	2.6
I_{e4}	9.7	2.4	10.2	2.5	-	-
I_{e6}	14.5	2.4	14.9	2.5	14.8	2.5



Annexe 3.7. Agrandissement du spectre RMN COSY du 8e prélèvements de la polymérisation amorcée par I_{e6} avec $[EtOx]_0/[I]_0 = 188$ dans $CDCl_3$ à 20°C

Annexe 3.8. Calcul du pourcentage d'extrémités de chaîne sous forme oxazolinium

N_0 Nombre de moles initiales de monomère

N_t Nombre de moles de monomère résiduel à l'instant t

N_u Nombre de moles de monomère incorporé au polymère à l'instant t

I_0 Nombre de moles initiales d'amorceur

E_i Nombre de moles d'extrémités de chaîne ioniques (ie oxazolinium)

E_c Nombre de moles d'extrémités de chaîne covalentes

On peut écrire que $N_0 = N_t + N_u$ et $6 \times I_0 = E_i + E_c$ en faisant l'hypothèse que les 6 fonctions amorçantes de l'amorceur hexatriflate utilisé ont effectivement amorcé.

$$\frac{N_0}{I_0} = X_n = 188$$

$$\frac{6 \times (N_t + N_u)}{E_i + E_c} = 188$$

Les nombres de moles peuvent à ce niveau être remplacés par les intégrales des signaux correspondants, rapportés aux nombres de protons pour lesquels ils intègrent. $N_t + N_u$ est remplacé par l'intégrale des CH_2 des motifs polymère à 3,14 ppm et des CH_2 du monomère résiduel rapporté à 4 protons.

$$\frac{6 \times \left({(21.77 + 1.0 + 0.32)}/{4H} \right)}{{0.32}/{2H} + {Intensité(E_c)}/{2H}} = 188$$

$$33{,}675 = 30{,}08 + 188 \times {Intensité(E_c)}/{2H}$$

$${Intensité(E_c)}/{2H} = 0{,}0191$$

Donc $\frac{E_i}{E_c+E_i} \leftrightarrow \frac{{0,32}/{2H}}{{Intensité(E_c)}/{2H}+{0,32}/{2H}} = \frac{0,16}{0,0191+\ ,16} =$ 0,893

On peut estimer à 89,3 % la proportion d'extrémités de chaîne ioniques.

Chapitre 4

Formulation de polyplexes à base des bibliothèques de PEI et His-PEI, caractérisation et activité biologique

Sommaire

Introduction 201

Partie 1 – Formulation standard 204

I. Formulation des polyplexes 204

1. Conditions 204

2. Electrophorèse en gel d'agarose 205

a. Principe 205
b. Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes à base de PEI 206
c. Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes à base d'His-PEI 208

3. Taille et potentiel ζ des polyplexes 209

a. Polyplexes à base de PEI 210
b. Polyplexes à base d'His-PEI 212

4. Stabilité des polyplexes 214

a. Principe 214
b. Stabilité des polyplexes à base de PEI 216
c. Stabilité des polyplexes à base d'His-PEI 218

5. Cryo-MET 220

II. Evaluation biologique des polymères 224

1. Principes des tests de transfection et de cytotoxicité 225

a. Test de transfection : RLU 225
b. Test de cytotoxicité : MTT 226

2. Evaluation biologique des PEI sur les cellules CFBE 226

3. Evaluation biologique des PEI sur les cellules HepG2 228

a. Efficacité de transfection 228
b. Cytotoxicité 229

4. Evaluation biologique des His-PEI sur les cellules HepG2 230

a. Efficacité de transfection 230
b. Cytotoxicité 232

Partie 2 – Formulation par extrusion 235
I. Présentation du concept 236
1. Description de l'extrudeuse 236
2. Quantification de l'ADN 237
II. Tests d'extrusion préliminaires 239
1. Variation du volume dans le compartiment *CIS* (V_{CIS}) 240
2. Variation du diamètre des pores de la membrane 240
III. Extrusion d'une solution de pTG11033 vers une solution de polymère : premiers résultats 241

Conclusion 247
Références 249
Annexes 252

Introduction

Certes moins toxique que la *b*PEI, la *l*PEI engendre néanmoins une cytotoxicité non négligeable lorsqu'elle est utilisée pour le transfert de gènes[1,2]. Diverses modifications de la PEI[3] ont été menées pour pallier ses principaux inconvénients qui limitent son utilisation, à savoir sa cytotoxicité et sa propension à agréger ses complexes avec l'ADN. Les principaux travaux répertoriés concernent le greffage de fonctions hydrophobes sur le squelette de la *b*PEI[4,5] ou de la *l*PEI[6], qui permet de diminuer la cytotoxicité du polymère, tout en améliorant ses propriétés de transfection. La nature des greffons utilisés a été choisie de façon à améliorer certaines étapes de la transfection telles que l'internalisation cellulaire ou la sortie de l'endosome[7,8]. Toutefois, il convient de reconnaître que l'implication de ces diverses fonctions dans l'amélioration de la transfection reste difficile à mettre en évidence[9]. Il semble que le domaine de la modification chimique ait été abondamment balayé[10], et d'autres pistes sont désormais à explorer. Parmi celles-ci, des travaux sur la variation de l'architecture des PEI ont montré qu'une architecture plus compacte améliorait leur efficacité de transfection. Plus précisément, Cortez *et al.*[11] ont indiqué que des PEI cycliques présentaient une meilleure efficacité de transfection et une toxicité du même ordre que les *l*PEI équivalentes. L'intérêt des polymères en étoile en biologie a été mis en avant dans le chapitre 1. Nous rappelons que des poly(méthacrylate de 2-(N,N-diéthylamino)s éthyle) (PDMAEMA) en étoile ont été synthétisés, et leurs propriétés de transfection évaluées[12]. Axel H. E. Müller et coll.[12] ont observé que l'architecture en étoile ne permet pas une amélioration très importante des propriétés de transfection. En revanche, la toxicité des polymères est très réduite, permettant ainsi des traitements avec des doses plus importantes de polymère ou des traitements plus fréquents. Bien que la *l*PEI ait la réputation d'être le « gold standard »[13,14], à notre connaissance, la synthèse de PEI à architecture étoilée et leur évaluation en transfert de gènes n'est pas décrite. Le potentiel de la modification des PEI en étoile pour améliorer leurs performances biologiques a encore moins été investigué, en particulier les différents outils tels que l'ajout de résidus histidine permettant de diminuer leur toxicité et de faciliter la sortie de l'endosome de l'ADN[7,9].

Dans le cadre de cette étude, nous avons souhaité évaluer l'apport en termes d'efficacité de transfection et de cytotoxicité d'une architecture en étoile pour des PEI. Pour cela, une famille de PEI de trois architectures différentes, linéaire, en étoile à 3 ou 4 branches, et de trois masses molaires différentes, 8, 16 et 25 kg.mol^{-1} (soit 9 polymères) a été préparée (chapitre 3). Il a été montré que la modification de 10 à 20% des unités EI de la *l*PEI avec de l'histidine

améliorait les propriétés de transfection[7]. Nous proposons de réaliser le même type de modification sur les PEI en étoile, de masses molaires variables, afin de mettre en évidence une potentielle synergie de modifications chimique et architecturale. Nous fixerons pour objectif une modification de 10 à 18% des motifs EI, une gamme à l'intérieure de laquelle les propriétés biologiques des vecteurs sont sensiblement améliorées et constantes[7]. Pour faciliter la lecture de ce chapitre, le schéma récapitulatif des synthèses, présenté à la fin du chapitre 3 est fourni en feuille volante.

L'objectif premier est de formuler le vecteur synthétique avec de l'ADN plasmidique (ADNp) contenant un gène rapporteur, le pTG11033, selon les conditions habituelles de formulation. Cet ADNp code pour la protéine luciférase qui, quand elle est produite par les cellules transfectées, pourra réagir avec la luciférine, et émettre une luminescence quantifiable avec un luminomètre. Ce plasmide a une taille de 9514 paires de bases (bp), soit une masse de $6{,}3.10^6$ daltons (sa carte est présentée Figure 4.1). Cette masse molaire est représentative de divers plasmides contenant des gènes d'intérêt thérapeutique, *i.e.* le gène codant pour CFTR (4440 bp).

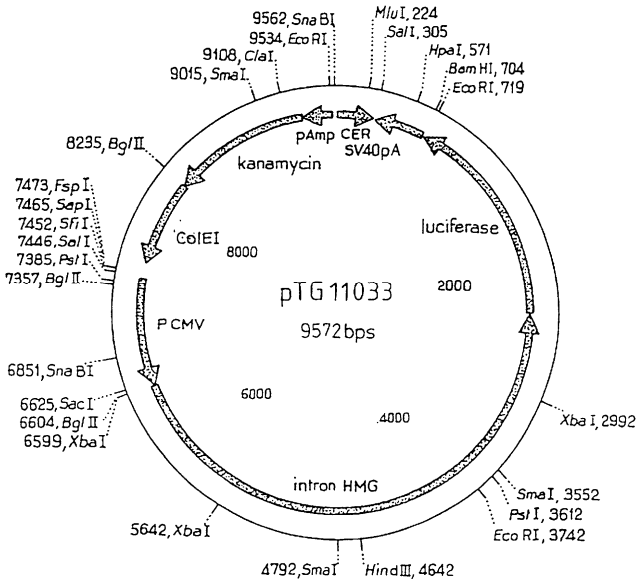


Figure 4.1. Carte du plasmide pTG11033

Le mélange de polymères cationiques à l'ADNp conduit à la formation de nanoparticules appelées polyplexes. Nous déterminerons dans un premier temps les meilleurs rapports massiques polymère/ADNp permettant la condensation de l'ADNp en polyplexes avec

pour objectif l'obtention de taille de l'ordre de 100 nm avec chacun des vecteurs. Les stabilités et les structurations de ces polyplexes seront alors étudiées, puis les propriétés de transfection seront évaluées sur deux lignées cellulaires représentatives des organes ciblés dans le cadre de ce projet. Nous effectuerons enfin une discussion permettant de relier les paramètres moléculaires aux propriétés biologiques des matériaux que nous avons synthétisés.

Dans l'objectif de réaliser des expériences de transfection *in vivo*, nous revisiterons les méthodes de préparation des polyplexes contenant une seule molécule de plasmide en formulant les polyplexes un à un par extrusion de copies d'ADNp dans une solution de vecteurs cationiques. L'objectif est de pouvoir maintenir les diamètres moyens des polyplexes à des valeurs très faibles, même si les plasmides sont formulés à des concentrations supérieures à C*, paramètre que nous pensons important de contourner pour éviter l'agrégation des polyplexes en particules de taille plus élevée.

Partie 1 – Formulation standard

I. Formulation des polyplexes

1. Conditions

Dans notre travail, est appelée « formulation standard », la technique de formulation qui consiste à ajouter une solution de polymère dans une solution d'ADN sur un temps court afin de condenser ce dernier en nanoparticules appelées polyplexes. Ce type de formulation est caractéristique de ce qui est fait dans divers laboratoires[5,11]. Le rapport de nombre de charges positives fournies par le polymère cationique sur le nombre de charges négatives fournies par l'ADN, nécessaire à la condensation complète de l'ADN est généralement supérieur à un, et selon les polymères peut atteindre des valeurs élevées. Dans ce procédé, l'ajout de la solution de polymère cationique induit une augmentation du rapport de charges positives/charges négatives (+/-) jusqu'à une valeur finale supérieure à 1, fixée par les conditions de l'expérience. Lors de cette addition, l'électroneutralité (+/- = 1) est dépassée. Il est à rappeler qu'à l'électroneutralité, une floculation voire précipitation des complexes polymère cationique/ADN est observée lorsque l'équilibre thermodynamique est autorisé[15]. Dans le cas présent, le mélange subit une agitation forte avec un vortex pendant un temps court de quatre secondes afin de limiter cette étape de précipitation/agrégation supposée lente. La formulation est alors laissée équilibrer durant 30 minutes à température ambiante avant utilisation. Il a été montré par Midoux et coll. que durant cette étape, des réorganisations des nanoparticules peuvent avoir lieu, démontrant ainsi le caractère dynamique des polyplexes[16]. Pour quantifier les proportions relatives de polymère et d'ADN, on utilisera le rapport massique polymère/ADNp noté WR (pour weight ratio).

2. Electrophorèse en gel d'agarose

a. Principe

Avant d'évaluer l'efficacité de transfection des deux familles de polymères en étoile (polymères avec ou sans résidu histidine) puis leur toxicité éventuelle, il convient dans un premier temps de déterminer le WR optimal permettant la formulation de polyplexes, soit le WR nécessaire à la condensation complète de l'ADNp. Ce paramètre est déterminé par une expérience de retard sur gel d'agarose par électrophorèse. Cette expérience consiste à appliquer un champ électrique à travers un hydrogel d'agarose à des objets chargés de façon à les séparer en fonction de leur charge, et à charge égale en fonction de leur taille. La révélation est conduite par addition, lors de la formation de l'hydrogel, d'un intercalant de l'ADN (par exemple le bromure d'éthidium noté BET ou le SYBR® Safe DNA Gel Stain), qui devient fluorescent après interaction entre les paires de base de l'ADNp. Des polyplexes de WR croissant sont préparés en fixant à une valeur constante la quantité d'ADN, et en augmentant la quantité de polymère lors de la préparation des polyplexes. Les solutions de polyplexes ainsi que l'ADNp libre, utilisé comme témoin, sont ensuite chargées dans les puits du côté de la cathode. Lors de l'application du champ électrique, l'ADNp libre migre vers l'anode en raison de sa charge négative. Trois bandes sont généralement visibles et correspondent aux trois conformations de l'ADN : la forme super-enroulée (supercoil) de l'ADNp qui migre le plus, la forme linéaire résultant de la coupure des deux brins d'ADN et la forme relâchée (circular) résultant de la coupure d'un des deux brins d'ADNp, qui est la plus retardée. Lorsqu'ils sont propres, les bandes relâchée et linéaire des plasmides sont très faibles comparativement à la bande super-enroulée. Lorsque l'ADNp est complexé avec le polymère, l'ADNp ne migre pas car les charges négatives de l'ADNp sont neutralisées par le polymère cationique. L'absence de migration d'ADNp dans le gel d'agarose traduit une complexation totale de celui-ci. On peut qualitativement évaluer le degré de condensation de l'ADNp en se basant sur l'intensité de fluorescence de l'intercalant de l'ADN : lorsque l'ADNp est faiblement condensé, l'intercalant peut facilement s'intercaler entre les paires de base et fluorescer. Lorsque l'ADNp est fortement condensé, cette compaction importante limite l'accès de l'intercalant, ce qui conduit à une fluorescence moins intense. Dans la discussion qui va suivre, nous considérerons que la neutralisation et la condensation de l'ADNp par le polymère cationique seront obtenues pour des valeurs très proches de WR.

La transfection de cellules en culture par des polyplexes à base de polymères cationiques (PEI) est observée lorsque les polyplexes sont formés avec un léger excès de charges positives ce qui est nécessaire pour maintenir l'état de condensation de l'ADNp, éviter l'agrégation des polyplexes en milieu salin et aider à leur fixation sur la surface des cellules[17]. Toutefois, un trop fort excès de PEI libre engendre une toxicité cellulaire importante. Il est donc important de trouver les ratios massiques polymère/ADNp optimaux pour la transfection. Les résultats des expériences de retard sur gel nous permettent de choisir 2 WR auxquels l'efficacité de transfection sera étudiée : le premier WR correspond à des polyplexes condensés et le deuxième est un ratio légèrement supérieur correspondant à une condensation de l'ADN plus forte sans toutefois que l'excès de polymère cationique ne soit trop grand pour limiter sa cytotoxicité.

b. Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes à base de PEI

Les gels d'agarose des polyplexes à base de PEI sont présentés Figure 4.2. Les polyplexes à base de PEI linéaires (AF2, PLL118 et PLL119) sont préparés avec des WR variant de 1/1 à 8/1, selon des conditions déjà discutées dans la littérature[18]. Pour les trois polymères, à chacun des ratios testés, aucune fluorescence n'est observée hors des puits comme attendu. Dès le plus faible WR testé (1/1), l'ADNp est suffisamment condensé par les PEI linéaires pour ne plus migrer, quelle que soit la masse molaire considérée. On peut aussi remarquer la diminution de l'intensité de fluorescence dans les puits avec l'augmentation du WR, caractérisant une faible accessibilité de l'ADNp par l'intercalant. Pour la série des *l*PEI, nous avons donc choisi les WR 1/1 et 3/1 permettant la condensation complète de l'ADNp afin de préparer les polyplexes qui serviront de référence dans cette étude.

Une étude plus complète est menée sur les PEI en étoile à 3 et 4 branches afin de déterminer les WR nécessaires à leur condensation. Les électrophorèses sur gel sont menées avec des WR plus faibles, variant entre 0,25/1 et 6/1. Les résultats sont présentés au milieu de la Figure 4.2 pour les étoiles à 3 branches et en bas de la Figure 4.2 pour les étoiles à 4 branches. Au WR 0,25/1, une traînée fluorescente avec des bandes plus ou moins nettes est observée pour les 6 polymères. Cette quantité de polymère est donc insuffisante pour complexer complètement l'ADNp. A partir du WR 0,5/1, la fluorescence est observée uniquement au niveau des puits. De plus, on observe comme attendu une diminution de la fluorescence avec l'augmentation du WR jusqu'au WR 6/1 où l'absence totale de fluorescence indique que la compaction est telle

qu'elle ne permet pas à l'intercalant d'accéder aux sites d'interaction de l'ADNp. A nouveau, les WR 1/1 et 3/1 sont choisis pour préparer les polyplexes dont la cytotoxicité et l'efficacité de transfection seront évaluées.

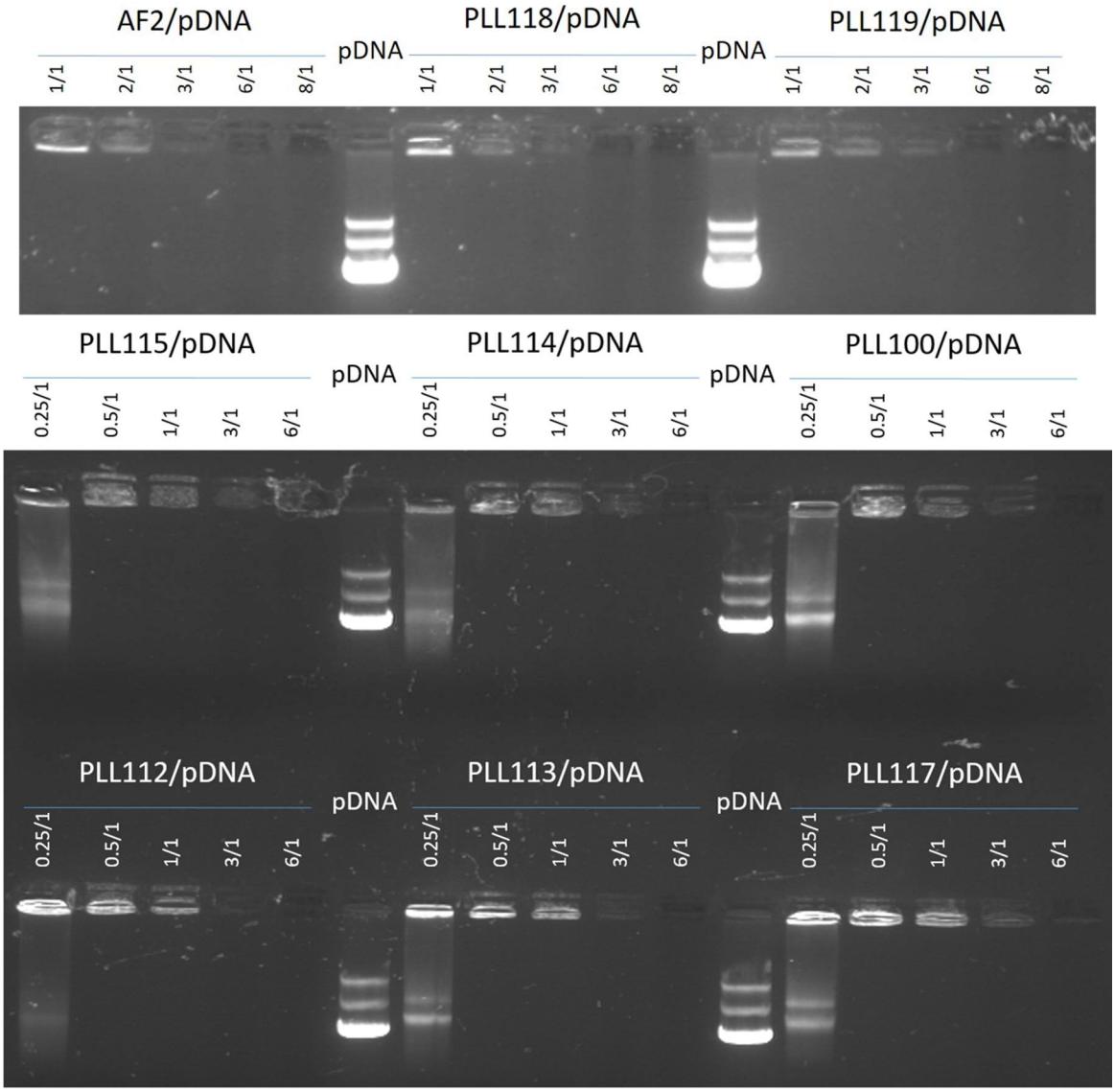


Figure 4.2. Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes préparés à partir des PEI linéaires AF2, PLL118 et PLL119 (en haut), des PEI en étoile à 3 branches PLL115, PLL114, PLL100 (milieu) et des PEI en étoile à 4 branches PLL112, PLL113 et PLL117 (bas)

Nous concluons que l'architecture de la PEI, 3 ou 4 branches versus linéaire, n'a pas d'influence sur les quantités de polymère cationique nécessaires à la condensation de l'ADNp. Toutes les unités EI (y compris celles du cœur) des étoiles de PEI semblent donc être disponibles pour former des interactions électrostatiques avec l'ADNp.

c. Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes à base d'His-PEI

Dans cette étude, toutes les PEI, linéaires ou en étoile, sont modifiées avec une quantité de *N*-acryloyl-L-histidine (HNA) comprise entre 10% et 16% (chapitre 3). La quantité quasi-constante d'histidine greffée sur les polymères cationiques nous permet de nous affranchir de cette variable. En raison de leur charge positive inférieure à celle de la PEI (à pH 7,4 la fonction acide carboxylique du résidu histidine greffé est sous forme carboxylate), les études précédemment menées[7] ont montré qu'un ratio His-*l*PEI/ADNp supérieur à ceux utilisés pour la *l*PEI était nécessaire pour une complexation efficace de l'ADN. Par ailleurs, l'augmentation de la quantité de polymère est rendue possible par la toxicité moindre de l'His-*l*PEI par rapport à la *l*PEI. Les électrophorèses sur gel d'agarose des polyplexes à base d'His-PEI ont d'abord été faites avec des WR variant de 1/1 à 8/1 (Figure 4.3). Nous avons traité simultanément les différentes architectures, pour toutes les masses molaires. De façon surprenante, dès le WR 1/1, l'ADNp est suffisamment condensé pour ne plus migrer dans le gel et ce, pour toutes les His-PEI testées (linéaires et en étoile). Dans un deuxième temps, les expériences de retard sur gel ont été réitérées avec des WR plus faibles, de 1/1 jusqu'à 0,0625/1 (en divisant par 2 de proche en proche). Tous les résultats sont présentés à la Figure 4.3. Pour le WR 0,0625/1, quelle que soit la formulation testée, nous constatons qu'il reste de l'ADNp libre migrant comme le témoin ADN. Ce WR est donc insuffisant pour neutraliser l'ADNp. Pour les WR 0,125/1, 0,25/1 et 0,5/1 la quantité d'ADNp qui migre diminue progressivement jusqu'au WR 1/1 pour lequel l'ADNp est suffisamment condensé pour ne plus migrer vers l'anode. Pour les polyplexes contenant des résidus histidine, il est impératif d'utiliser un WR supérieur ou égal à 1 pour complexer l'ADNp, alors qu'un ratio WR de 0,5 pourrait être suffisant pour les PEI sans histidine. Ce résultat est en accord avec une densité de charges inférieure lorsque les PEI sont modifiées.

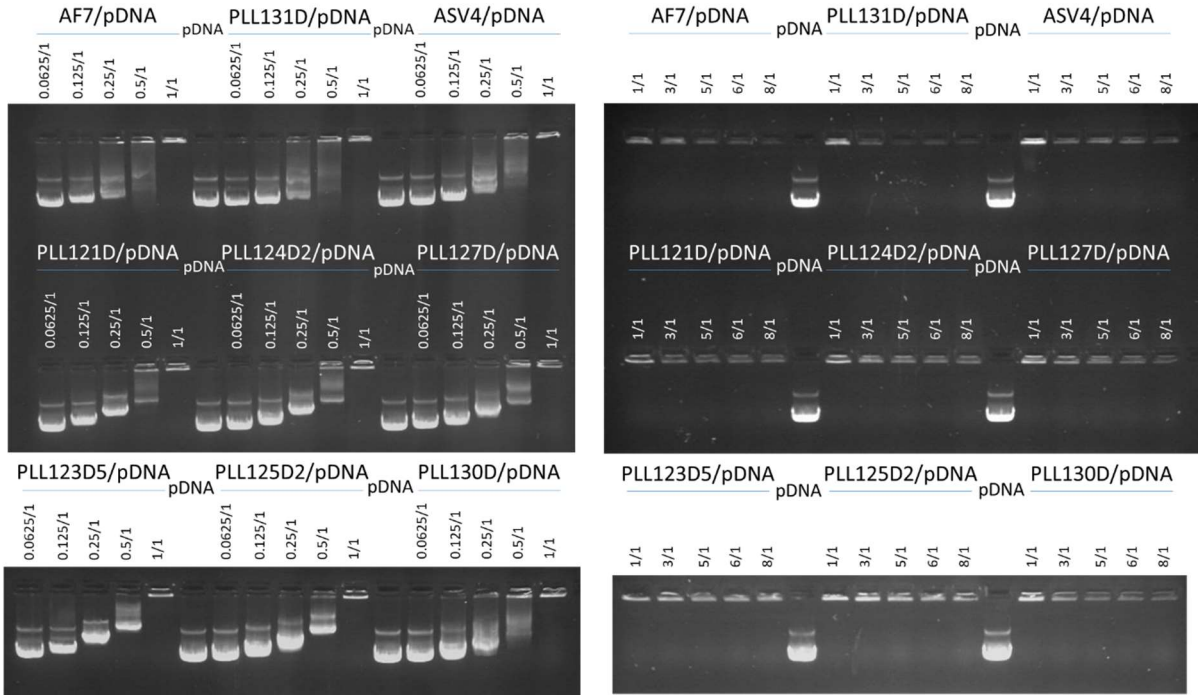


Figure 4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes préparés à partir des His-PEI linéaires AF7, PLL131D et ASV4 (en haut), des His-PEI en étoile à 3 branches PLL121D, PLL124D2, PLL127D (milieu) et des PEI en étoile à 4 branches PLL123D5, PLL125D2 et PLL130D (bas)

Toutes les His-PEI présentent le même comportement, indépendamment de leur masse molaire ou de leur architecture. Dans la suite de ce travail, les polyplexes à base d'His-PEI seront donc préparés aux WR 1/1 et 3/1 pour évaluer leur cytotoxicité et leur efficacité de transfection.

3. Taille et potentiel ζ des polyplexes

La taille des polyplexes est un paramètre majeur de leur efficacité de transfection et de leur cytotoxicité. En effet, Rejman *et al.*[19] ont par exemple démontré que l'internalisation de particules de polystyrène de diamètre supérieure à 500 nm se fait par endocytose cavéole-dépendante, une voie d'internalisation moins efficace que l'endocytose clathrine-dépendante observée dans le cas des particules de PS de diamètre inférieur à 200 nm. Xu *et al.*[20] ont préparé des nanogels de PEI de taille définie variant entre 38 et 167 nm et ont montré que ceux de 75 et 87 nm présentaient la meilleure efficacité de transfection. Les WR nécessaires à la condensation de l'ADN ont été déterminés précédemment par les expériences de retard sur gel.

Nous garderons pour cette étude le WR 3/1 comme référence de formulation, mais nous analyserons au préalable sur une *l*PEI modèle l'effet de ce rapport WR sur les tailles des polyplexes formés selon la formulation standard. Afin de déterminer le diamètre hydrodynamique moyen des polyplexes et leur potentiel ζ respectivement par DLS et mobilité électrophorétrique, les solutions de polyplexes sont préparées à la même concentration que pour les tests de transfection et de cytotoxicité *in vitro,* mais à un volume total 10 fois supérieur pour les besoins des appareils (volume minimal des cuves).

a. Polyplexes à base de PEI

Nous avons étudié en premier lieu l'influence du ratio massique polymère/ADNp (WR). Pour cela, des polyplexes à base d'AF2 (PEI linéaire $M_{n\ theo}$ = 8 kg.mol^{-1}) ont été préparés à 3 WR différents : WR 1/1, WR 3/1 et WR 6/1 toujours dans les mêmes conditions, c'est-à-dire pour une concentration finale en ADNp de 50 µg.mL^{-1}. Cette concentration correspond à la concentration utilisée pour les tests de transfection *in vitro*, et est inférieure à la concentration C*, déterminée dans le cas de plasmides linéarisés de même taille (C* = 1,45 g.L^{-1} pour un plasmide d'environ 10 kb, cf chapitre 1). Pour chaque WR, le diamètre hydrodynamique moyen et le potentiel ζ des polyplexes ont été déterminés et les résultats sont présentés dans la Figure 4**.4**. Une diminution du diamètre moyen des polyplexes avec l'augmentation du WR est observée : 119 nm pour WR 1/1, 104 nm pour WR 3/1 et 96 nm pour WR 6/1. Il convient de rappeler qu'à ces tailles, chaque polyplexe contient entre 3 et 4 copies d'ADNp[21]. La diminution significative du diamètre moyen des polyplexes (diminution du diamètre de 119 à 96 nm correspond à une diminution par 2 du volume, de 882 µm^3 à 463 µm^3 environ), peut être interprétée comme une réduction du nombre de copies d'ADNp par polyplexe. Une augmentation de la concentration en polymère cationique génère une large disponibilité de ce polymère et donc une quantité de surface positive plus élevée. Une fragmentation des polyplexes est alors possible.

Nous avons parallèlement mesuré le potentiel ζ de ces polyplexes. En accord avec la proposition précédente, il augmente légèrement avec l'augmentation du WR (Figure 4.4) : +19 pour WR 1/1, +25 pour WR 3/1 et +27 pour WR 6/1, ce qui traduit la présence d'une quantité croissante de charges positives en surface des polyplexes. Cet excès de charges positives en surface est d'ailleurs nécessaire puisqu'il permet l'adhésion des polyplexes à la surface des

cellules et facilite leur internalisation cellulaire, en particulier pour les expériences de transfert de gènes *in vivo*.

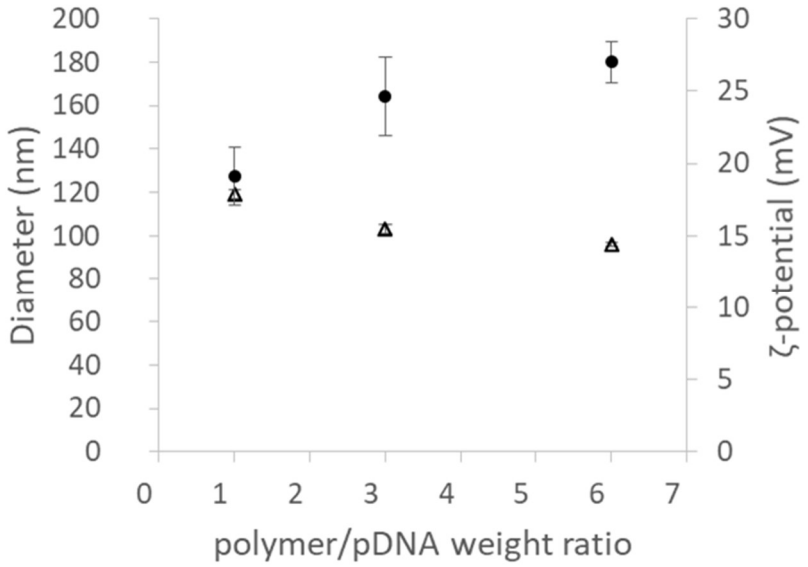


Figure 4.4. Diamètre (z-average) (△) et potentiel ζ (●) des polyplexes à base d'AF2 (PEI linéaire) en fonction du ratio massique polymère/ADNp

Comme expliqué précédemment, tous les polyplexes ont été caractérisés au WR 3/1. La taille et le potentiel ζ obtenus sont présentés Tableau 4.1. Les diamètres mesurés pour les polyplexes à base de PEI linéaire n'augmentent pas significativement avec la masse molaire de la PEI utilisée : 104 nm pour AF2 ($M_{n\ théo}$ = 8 kg.mol^{-1}), 115 nm pour PLL118 ($M_{n\ théo}$ = 16 kg.mol^{-1}), 118 nm pour PLL119 ($M_{n\ théo}$ = 25 kg.mol^{-1}). Les diamètres obtenus sont en accord avec les objectifs souhaités pour ce type de formulation. Quant au potentiel ζ, il augmente légèrement avec la masse molaire du vecteur : +25 mV pour AF2, +31 mV pour PLL118 et +35 mV pour PLL119.

En ce qui concerne les PEI en étoile, il n'y a pas de différence significative pour la taille des polyplexes et leur potentiel ζ en fonction de la masse molaire de la PEI pour une même série. Les tailles des polyplexes à base de PEI en étoile à 3 branches sont comprises entre 101 et 106 nm, tandis que celles des polyplexes à base de PEI en étoile à 4 branches sont comprises entre 97 et 103 nm. Aucune variation significative du potentiel ζ en fonction de la masse molaire ne peut être mise en évidence pour les séries des PEI en étoile à 3 branches et des PEI en étoile à 4 branches étudiées séparément.

Tableau 4.1. Caractérisation des polyplexes PEI/ADNp au WR 3/1

Polymer structure	Polyplexes	$M_{n\ theo}$ PEI (kg.mol^{-1})	*z*-average D_h[1] (nm)	PDI	D_h[2] (nm)	ζ[3] (mV)
Linear	AF2-plex	8	104 ± 2	0.27 ± 0.05	132 ± 13	+25 ± 3
	PLL118-plex	16	115 ± 2	0.26 ± 0.03	136 ± 8	+31 ± 1
	PLL119-plex	25	118 ± 2	0.24 ± 0.04	140 ± 11	+35 ± 1
3-arms star	PLL115-plex	8	102 ± 2	0.22 ± 0.06	120 ± 7	+34 ± 1
	PLL114-plex	16	106 ± 2	0.20 ± 0.02	122 ± 6	+37 ± 0.4
	PLL100-plex	25	101 ± 2	0.23 ± 0.01	118 ± 2	+38 ± 0.2
4-arms star	PLL117-plex	8	97 ± 2	0.30 ± 0.03	120 ± 16	+39 ± 1
	PLL113-plex	16	101 ± 1	0.23 ± 0.01	122 ± 6	+39 ± 2
	PLL112-plex	25	103 ± 3	0.21 ± 0.01	121 ± 10	+40 ± 1

[1]Hydrodynamic diameter D_h *z*-average of polyplexes at 298K in 10 mM HEPES, pH 7.4
[2]Hydrodynamic diameter D_h (diameter in number, peak 1 size = population of smallest size) of polyplexes at 298K in 10 mM HEPES, pH 7.4
[3]ζ-potential of polyplexes at 298K in 10 mM HEPES, pH 7.4

Bien que les polymères en étoile présentent un degré de compaction supérieur à celui des polymères linéaires, pour une masse donnée, il est observé que l'architecture n'influe pas significativement sur les valeurs des diamètres des polyplexes synthétisés. Nous pouvons conclure que la compaction initiale du polymère utilisé n'est pas un facteur déterminant dans la formulation des polyplexes.

b. Polyplexes à base d'His-PEI

De la même façon, les polyplexes préparés à partir de la bibliothèque d'His-PEI à un WR 3/1 ont été analysés en termes de taille et de potentiel ζ et les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 4.2.

Les analogues histidinylés des *l*PEI et des PEI en étoile ont aussi été formulés avec l'ADNp dans les conditions standards. Nous observons pour les polymères linéaires une augmentation du diamètre moyen des polyplexes avec la masse molaire : 120 nm pour AF7 ($M_{n\ théo}$ = 8 kg.mol^{-1}), 137 nm pour PLL131 ($M_{n\ théo}$ = 16 kg.mol^{-1}), 165 nm pour ASV4

($M_{n\ théo}$ = 25 kg.mol^{-1}). Concernant les His-PEI en étoile à 3 ou 4 branches, il n'apparait pas de corrélation entre les tailles des polyplexes et la masse molaire des His-PEI, cependant nous observons une diminution du diamètre moyen des polyplexes avec le nombre de branches du polymère : les diamètres des polyplexes à base d'His-PEI à 3 branches sont compris entre 196 et 232 nm tandis que ceux des polyplexes à base d'His-PEI à 4 sont compris entre 139 et 175 nm.

Les polyplexes issus d'une formulation avec une His-PEI (120 à 232 nm) sont systématiquement plus grands que ceux de leurs analogues sans résidu histidine (97 à 118 nm). L'histidine apporte non seulement un encombrement stérique, qui influe modérément sur les WR, mais apporte aussi de l'hydrophobie.

Durant une étape de formation de polyplexes, trois phénomènes peuvent être identifiés : neutralisation de l'ADNp, condensation de l'ADNp et agrégation de l'ADNp/polymère cationique (l'agrégation peut avoir lieu avant la formation des polyplexes). La présence de résidus histidine semble donc influer sur les agrégations des complexes His-PEI/ADNp.

Tableau 4.2. Caractérisation des polyplexes His-PEI/ADNp au WR 3/1

Polymer structure	Polyplexes	*z*-average D_h[1] (nm)	PDI	D_h[2] (nm)	ζ[3] (mV)
Linear	AF7-plex	120 ± 1	0.30 ± 0.03	121 ± 2	+32 ± 1
	PLL131-plex	137 ± 3	0.23 ± 0.07	140 ± 1	+35 ± 2
	ASV4-plex	165 ± 1	0.23 ± 0.01	171 ± 2	+37 ± 1
3-arms star	PLL121-plex	232 ± 2	0.23 ± 0.01	239 ± 4	+28 ± 1
	PLL124-plex	196 ± 2	0.26 ± 0.05	198 ± 1	+29 ± 0.1
	PLL127-plex	200 ± 2	0.22 ± 0.01	199 ±1	+29 ± 0.2
4-arms star	PLL123-plex	153 ± 1	0.16 ± 0.02	161 ± 1	+25 ± 0.4
	PLL125-plex	139 ± 2	0.19 ± 0.02	149 ± 2	+27 ± 1
	PLL130-plex	175 ± 3	0.24 ± 0.04	180 ± 4	+32 ± 2

[1]Hydrodynamic diameter D_h *z*-average of polyplexes at 298K in 10 mM HEPES, pH 7.4
[2]Hydrodynamic diameter D_h (diameter in number, peak 1 size = population of smallest size) of polyplexes at 298K in 10 mM HEPES, pH 7.4
[3]ζ-potential of polyplexes at 298K in 10 mM HEPES, pH 7.4

Cette étude nous a permis de montrer que dans le cas des PEI (sans résidus histidine), l'architecture du polymère et sa masse molaire n'influent pas sur la condensation et l'agrégation des polyplexes. En revanche, le greffage de résidus histidine modifie fortement ce comportement : nous observons des diamètres plus élevés pour les PEI modifiées, en particulier pour les His-PEI en étoile. Nous pouvons donc nous demander si le greffage de résidus histidine apporte un effet sur la stabilité des complexes, en particulier pour envisager la libération de l'ADNp dans le cytosol une fois les polyplexes internalisés.

4. Stabilité des polyplexes

a. Principe

La stabilité des complexes *in vitro* est évaluée par un test de compétition avec le sulfate de dextran de masse molaire. Le dextran est un polysaccharide ramifié de masse molaire élevée composé d'unités glucose liées entre elles par des liaisons α-1,6 et de ramifications branchées par des liaisons α-1,3 principalement et éventuellement α-1,2 et α-1,4. Le sulfate de dextran est un dérivé anionique du dextran dans lequel une partie des fonctions alcool est remplacée par des groupements sulfate (Figure 4.5).

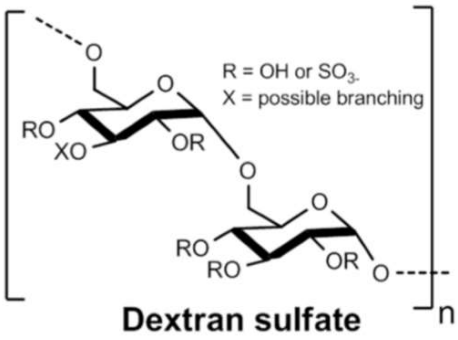


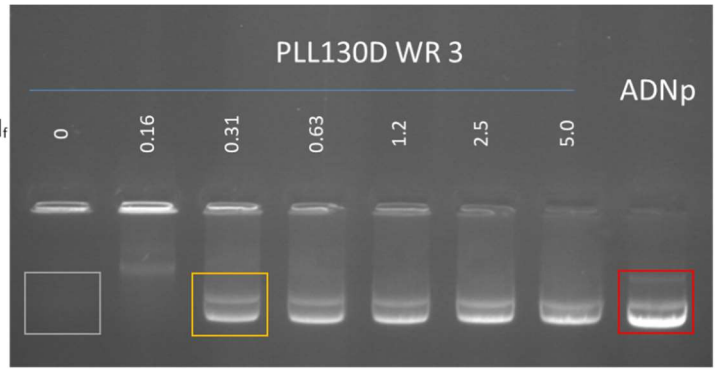
Figure 4.5. Structure du sulfate de dextran[22]

Le principe de ce test consiste à évaluer la force de l'interaction entre l'ADNp et le polymère cationique au sein du polyplexe en ajoutant une quantité croissante de sulfate de dextran qui joue le rôle de compétiteur des interactions entre l'ADNp et le polymère cationique. A partir d'une certaine concentration en sulfate de dextran, de l'ADNp est libéré au profit de nouveaux complexes polymère cationique / sulfate de dextran. Dans cette série d'expériences,

les polyplexes sont préparés à un WR 3/1 de la manière habituelle et après 30 minutes d'incubation à température ambiante, des aliquots de sulfate de dextran sont ajoutés dans chacun des polyplexes. Après une nouvelle incubation de 30 minutes à température ambiante, une électrophorèse en gel d'agarose est effectuée avec deux témoins : l'ADNp libre qui migre dans le gel (témoin positif) et le polyplexe au WR 3/1 sans ajout de sulfate de dextran qui reste dans le puits (témoin négatif). La fluorescence des bandes est évaluée par le logiciel ImageJ qui mesure le nombre de pixel d'une zone donnée. Le calcul du pourcentage d'ADNp libre pour une concentration de sulfate de dextran donnée est expliqué à la Figure 4.6. Pour la concentration de sulfate de dextran de 0,31µM par exemple, le pourcentage d'ADNp libre est ainsi exprimé comme le rapport du nombre de pixel de la zone où migre l'ADNp (orange) sur le nombre de pixels de la zone correspondante pour l'ADNp libre du controle (rouge) (100%), chacune des valeurs étant calibrée par le nombre de pixel de la même zone pour le témoin négatif (gris). L'ensemble de l'étude est effectué avec la même solution mère en ADNp de façon à limiter les erreurs. Il est tout de même à noter que la capture des images des gels après électrophorèse conduit à une incertitude relativement importante en raison des artéfacts qui peuvent être présents.

Les courbes du pourcentage d'ADNp relargué en fonction de la concentration finale en sulfate de dextran présentent toutes la même allure (schématisée à la Figure 4.7) : un palier de relargage après une augmentation abrupte de la quantité d'ADNp libéré, pour une faible quantité de sulfate dextran ajouté (les résultats sont présentés dans les paragraphes suivants). La pente initiale peut difficilement être interprétée comme une étude cinétique, puisque chaque point correspond à l'équilibre thermodynamique atteint après 30 minutes, traduisant les populations présentes dans le milieu à une concentration de sulfate de dextran donnée. Deux valeurs peuvent alors être discutées à partir de ces graphes : la valeur du palier (exprimé en %) et la concentration minimale pour atteindre ce palier. La valeur du palier doit en principe être égale à 100% si tout l'ADNp est décomplexé. Nous verrons que ce point n'est pas toujours validé.

a)



b) $$\%\ released\ pDNA_{0.31\mu M} = \frac{Pix_{0.31\mu M} - Pix_{0\mu M}}{Pix_{ADNp} - Pix_{0\mu M}} \times 100$$

Figure 4.6. Expérience de compétition avec le sulfate de dextran : a) photo du gel obtenu, b) équation utilisée pour le calcul du pourcentage d'ADN relargué

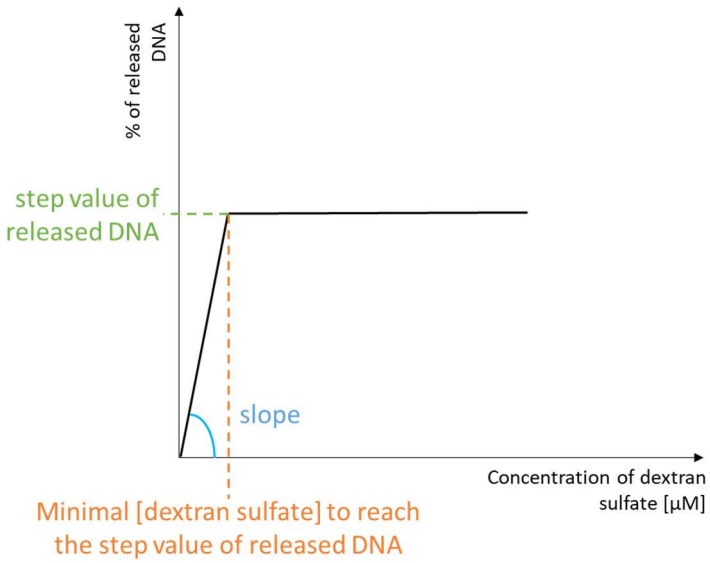


Figure 4.7. Représentation schématique des courbes du pourcentage d'ADNp relargué en fonction de la concentration finale en sulfate de dextran

b. Stabilité des polyplexes à base de PEI

De façon à visualiser l'influence de l'architecture des PEI sur la stabilité des polyplexes, les résultats obtenus sont représentés à la Figure 4.8 pour chacune des séries de masse molaire étudiée.

Pour les polyplexes à base de PEI en étoile à 4 branches de 8 et 16 kg.mol^{-1}, un relargage total de l'ADNp de 100% est obtenu pour une concentration finale de sulfate de dextran

supérieure ou égale à 2,5 µM. Quelle que soit la quantité de sulfate de dextran ajoutée aux polyplexes à base de PEI linéaires et de PEI en étoile à 3 branches, le relargage de l'ADNp est limité à 80% environ, et le palier est atteint pour une concentration en sulfate de dextran d'environ 1 µM. Pour ces 2 masses molaires, l'architecture en étoile à 4 branches semble donc conduire à des complexes moins stables que ceux faits à partir de PEI linéaire ou de PEI en étoile à 3 branches (concentration minimale pour atteindre le pallier plus faible).

Pour la série des PEI de 25 $kg.mol^{-1}$, la tendance est moins claire, mais il semble que la pente des PEI en étoile à 4 branches soit plus importante que les deux autres confirmant ainsi l'ordre de stabilité des complexes défini plus haut pour les PEI de 8 et 16 $kg.mol^{-1}$: linéaire > 3 branches > 4 branches.

L'interprétation des différents paliers observés est plus difficile, et nous ne possédons pas assez d'informations pour arriver à une conclusion définitive. Pour la série des PEI 25 $kg.mol^{-1}$, l'architecture linéaire permet un relargage total de l'ADNp tandis que le relargage est limité à 80% pour les PEI en étoile à 3 branches, et à environ 65% pour les PEI en étoile à 4 branches. Lors d'un relargage total, les polyplexes sont décondensés et le polymère cationique est séparé de l'ADNp. Lorsqu'un palier est observé, il peut y avoir décondensation des nanoparticules, mais avec toujours une neutralisation d'une fraction de l'ADNp, conduisant à observer un signal résiduel dans le puits même lorsque la concentration en sulfate de dextran est très élevée. L'ordre des valeurs de paliers est croissant avec la complexité des architectures pour les faibles masses molaires de polymère : linéaire < 3 branches < 4 branches. Cet ordre est inversé pour les polymères de masse molaire 25 $kg.mol^{-1}$. Aucune explication ne peut complètement satisfaire ces observations, et des études de dynamiques de décondensation des polyplexes seraient nécessaires pour expliquer ces observations. Nous pouvons toutefois souligner, au moins pour les gammes 8 et 16 $kg.mol^{-1}$, que l'ordre de stabilité des polyplexes suit celui des paliers.

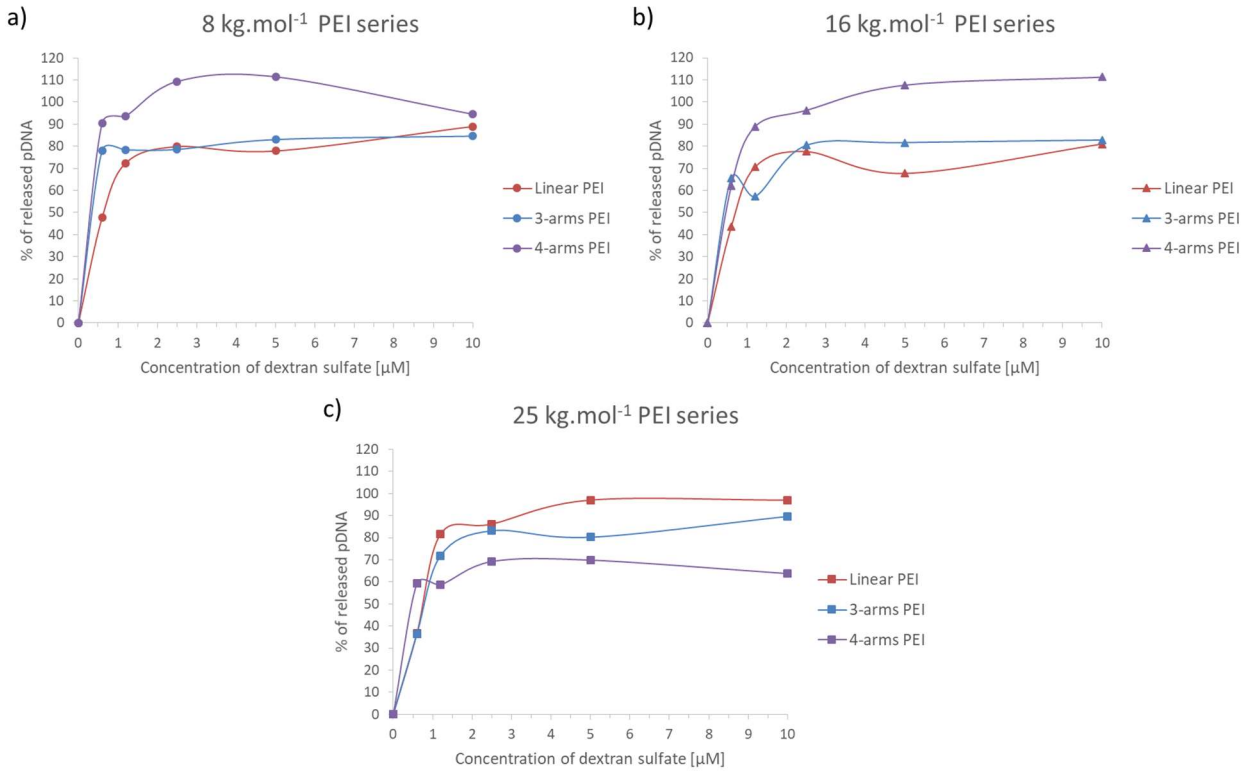


Figure 4.8. Pourcentage d'ADNp relargué en fonction de la concentration de sulfate de dextran ajoutée pour : a) les PEI de 8 kg.mol^{-1}, b) les PEI de 16 kg.mol^{-1}, c) les PEI de 25 kg.mol^{-1}

c. Stabilité des polyplexes à base d'His-PEI

La stabilité des polyplexes à base de PEI modifiées a également été étudiée. Les graphes obtenus pour chaque série de masse molaire d'His-PEI sont comparés en fonction de l'architecture du polymère utilisé pour faire les polyplexes (Figure 4.9). La concentration en sulfate de dextran nécessaire à la déstabilisation complète des polyplexes diminue avec la complexité croissante de l'architecture des polymères cationiques utilisés, exactement de la même façon que pour les PEI sans résidu histidine. Ainsi, la stabilité des polyplexes diminue avec l'augmentation du nombre de branches des His-PEI utilisées et ce, pour chacune des séries de masses molaires étudiées. Pour les His-PEI linéaires, la concentration de sulfate de dextran nécessaire pour atteindre une valeur constante d'ADNp relargué est plus grande (5 µM) que pour les His-PEI en étoile à 3 ou à 4 branches (1,25 µM) (à l'exception de l'His-PEI en étoile à 3 branches de 16 kg.mol^{-1}). C'est pour les His-PEI de 25 kg.mol^{-1} que la différence de stabilité en fonction de l'architecture est la plus marquée puisque les pourcentages d'ADNp libérés

(valeurs des paliers) sont d'environ 85%, 75% et 65% pour les His-PEI respectivement en étoile à 4 branches, en étoile à 3 branches et linéaires.

Quelles que soient la masse molaire et l'architecture des His-PEI, le pourcentage d'ADNp relargué n'est jamais total et n'excède jamais 85%. L'ajout de résidus histidine aux différents polymères semble stabiliser les complexes. Toutefois, nous ne pouvons certifier que des polyplexes existent encore à ces concentrations aussi élevées de sulfate de dextran, et des études de diffusion de particules ou de microscopie électronique permettraient de répondre à ces questions.

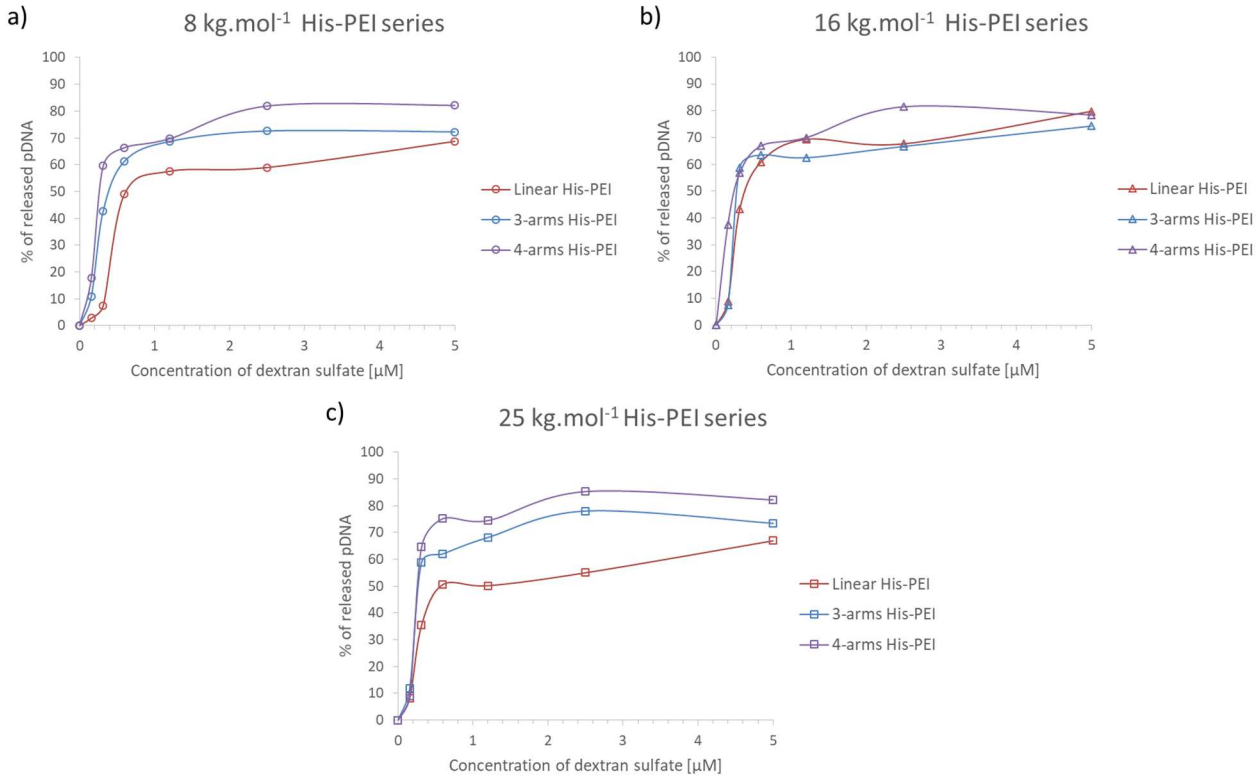


Figure 4.9. Pourcentage d'ADNp relargué en fonction de la concentration de sulfate de dextran ajoutée pour : a) les His-PEI de 8 kg.mol^{-1}, b) les His-PEI de 16 kg.mol^{-1}, c) les His-PEI de 25 kg.mol^{-1}

Dans cette partie, nous avons pu mettre en évidence par des expériences d'addition d'un polymère anionique (sulfate de dextran) sur les polyplexes, les stabilités relatives de ces derniers en fonction de la masse molaire du polymère cationique, de son architecture et de sa modification par de l'histidine. Dans tous les cas, la stabilité des polyplexes diminue avec l'augmentation du nombre de branches des (His-)PEI utilisées et ce, pour chacune des séries de

masses molaires étudiées. Ces analyses montrent par ailleurs que la stabilité des polyplexes augmente avec la masse molaire du polymère cationique. Il est évident qu'une étude plus fine dans des concentrations faibles en sulfate de dextran serait à mener pour confirmer ces résultats.

5. Cryo-MET

Des analyses de cryo-microscopie électronique à balayage (Cryo-MET) ont été réalisées de façon à compléter les résultats de mesures de taille des polyplexes obtenus par DLS et à obtenir des informations sur l'organisation structurale des polyplexes (qui pourront être confrontées aux résultats sur la stabilité des polymères obtenus à l'issue des expériences d'électrophorèse présentées ci-dessus). Tous les polyplexes ont été préparés au WR 3/1 et à une concentration en ADNp (pTG11033) de 200 $\mu g.mL^{-1}$. Pour les besoins de l'analyse, les polyplexes ont dû être préparés à une concentration plus élevée que la concentration utilisée pour les tests de transfection et de cytotoxicité *in vitro*. Cependant, nous supposons qu'à cette concentration, l'ADNp est toujours en solution diluée ($c < C^*$) et donc que les tailles des polyplexes dans ces conditions ne doivent pas être trop différentes de celles des polyplexes préparés dans les conditions des tests *in vitro*. Les polyplexes à base de polymères linéaires de 25 $kg.mol^{-1}$ (PEI et His-PEI) ont été préparés. En ce qui concerne les PEI en étoile, nous avons choisi d'analyser les polyplexes issus de la formulation standard entre le pTG11033 et les PEI en étoile des masses molaires minimales et maximales de notre étude : 8 et 25 K.

Les images de cryo-MET des polyplexes à base de *l*PEI 25K (Figure 4.10) présentent des structures en couronne (donut) et en bâtonnets bien identifiées. Les objets sont présents avec une densité rarement observée et, malgré cela, leurs tailles sont très régulières et inférieures à 100 nm. L'excès de charges positives en surface des polyplexes assure une bonne répulsion entre les polyplexes et évitent leur agrégation. Les diamètres des objets visualisés par cryo-MET sont donc plus faibles que ceux mesurés par DLS (*z*-average $D_h = 118 \pm 2$ nm). Une analyse fine des polyplexes révèle la présence d'une structuration à l'intérieur des polyplexes comme déjà observé[9]. Ceci implique une densité d'énergie cohésive élevée. L'apport énergétique pour libérer l'ADNp de ces polyplexes sera élevé.

Les polyplexes obtenus à partir des His-*l*PEI 25K ont des tailles inférieures à 100 nm (Figure 4.10). Les particules sont de forme soit allongée, soit sphérique. Nous n'observons plus

de donuts, comme c'est généralement le cas pour les *l*PEI. La structuration à l'intérieur de ces polyplexes est moins claire que dans le cas des *l*PEI. Ceci est en accord avec l'encombrement stérique apporté par les greffons histidine. On peut donc conclure que les polyplexes à base de His-*l*PEI ont une densité d'énergie cohésive plus faible que celle des polyplexes formulés à partir de *l*PEI.

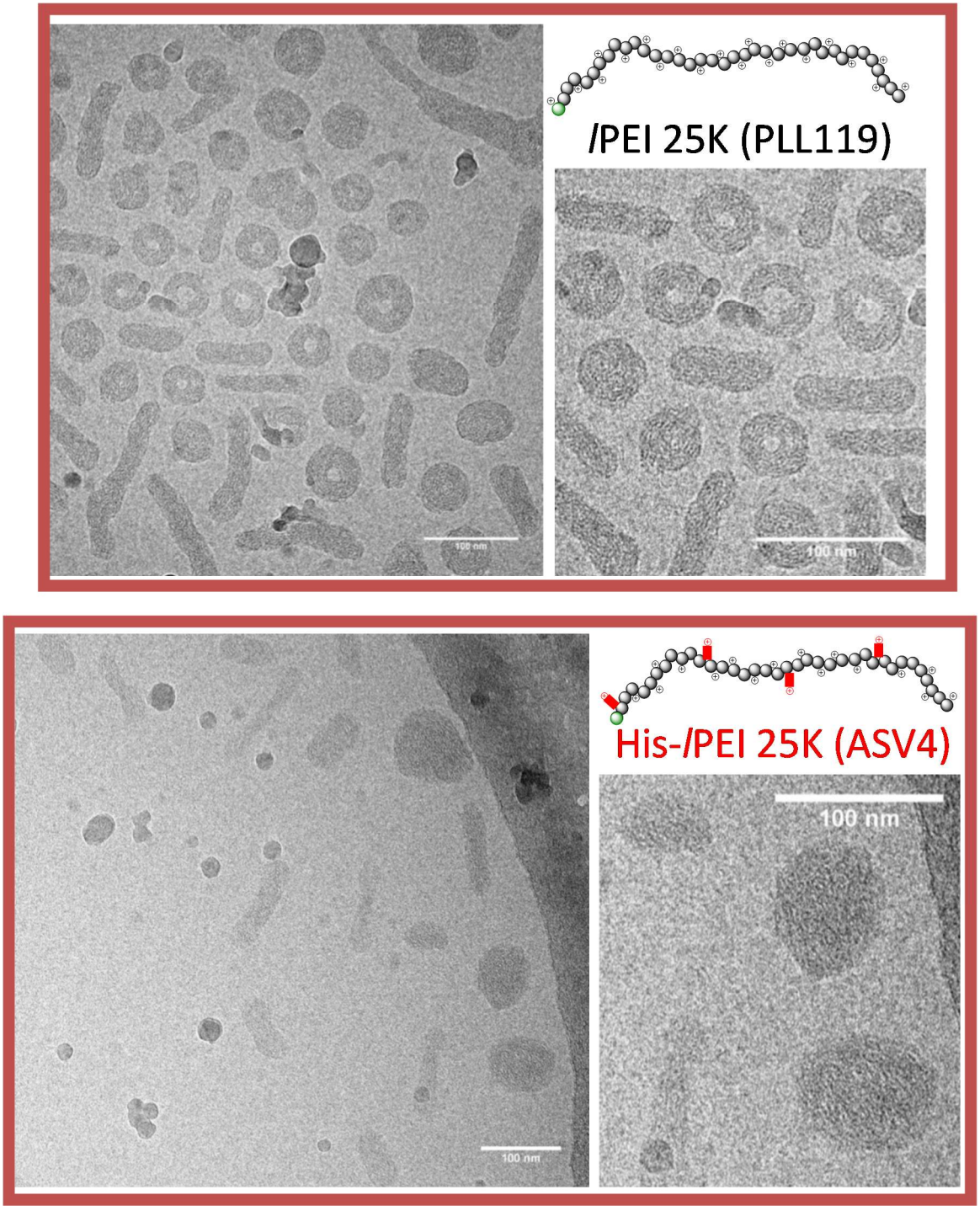


Figure 4.10. Images de cryo-MET obtenues pour les polyplexes *l*PEI 25K/pTG11033 et His-*l*PEI 25K/pTG11033 au WR 3/1 avec une concentration en pTG11033 de 200 µg.mL^{-1}

En ce qui concerne les polyplexes obtenus à partir des PEI en étoile à 3 et 4 branches de 8 K, des objets sphériques de plus de 100 nm et des agrégats sont observés (Figure 4.11). Au contraire, les polyplexes obtenus à partir des PEI en étoile à 3 et 4 branches de 25 K présentent des tailles inférieures à 100 nm (Figure 4.12).

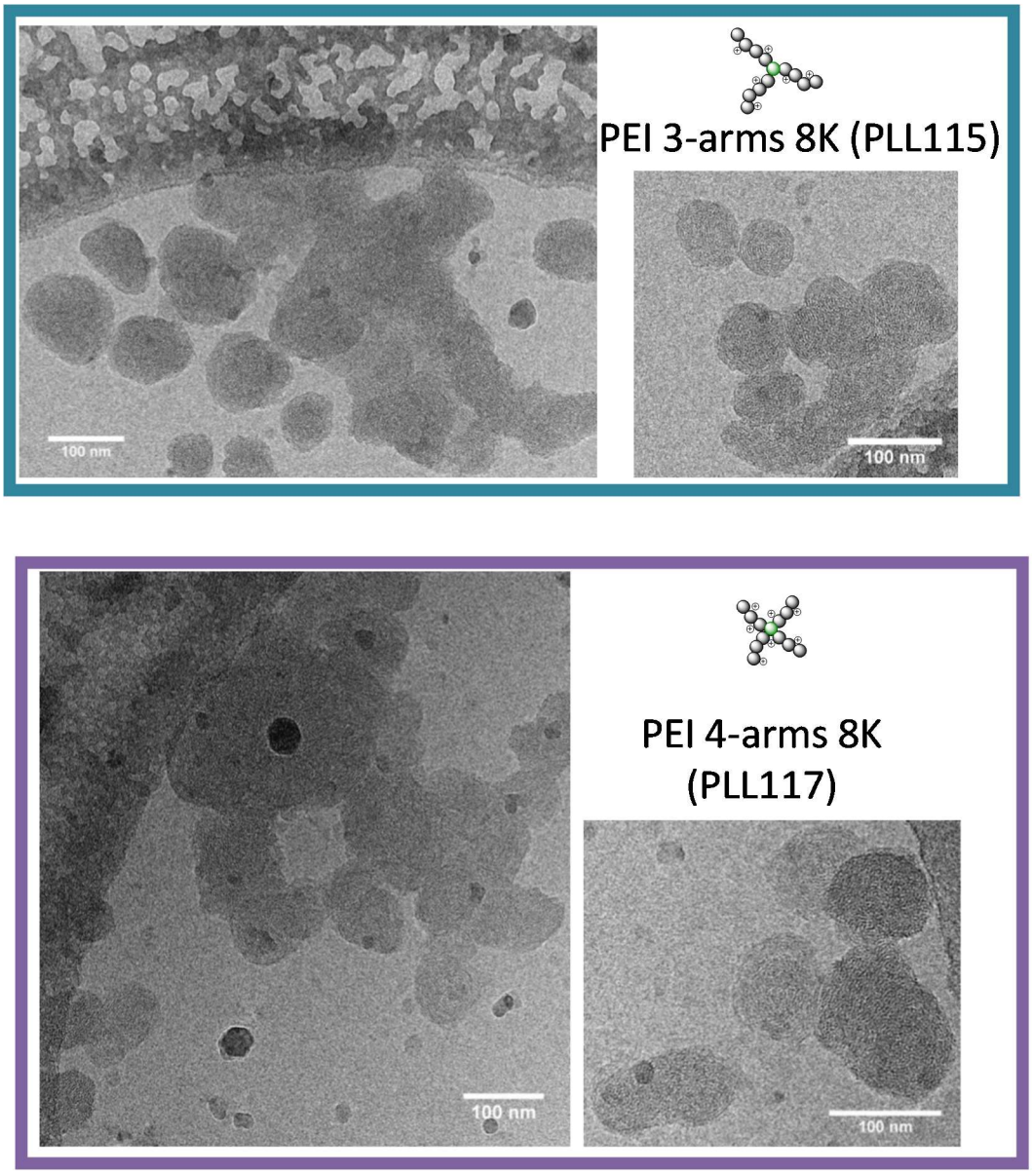


Figure 4.11. Images de cryo-MET obtenues pour les polyplexes PEI 3 branches 8K/pTG11033 et PEI 4 branches 8K/pTG11033 au WR 3/1 avec une concentration en pTG11033 de 200 µg.mL^{-1}

L'utilisation d'His-PEI en étoile pour former des polyplexes de faible diamètre s'est révélée peu efficace, comme indiqué en DLS. Nous verrons plus loin que les propriétés de transfection de l'ADNp avec ces polymères sont aussi assez faibles. Aussi, nous n'avons pas poursuivi l'analyse Cryo-MET de ces composés, s'agissant d'une analyse difficile à mettre en œuvre.

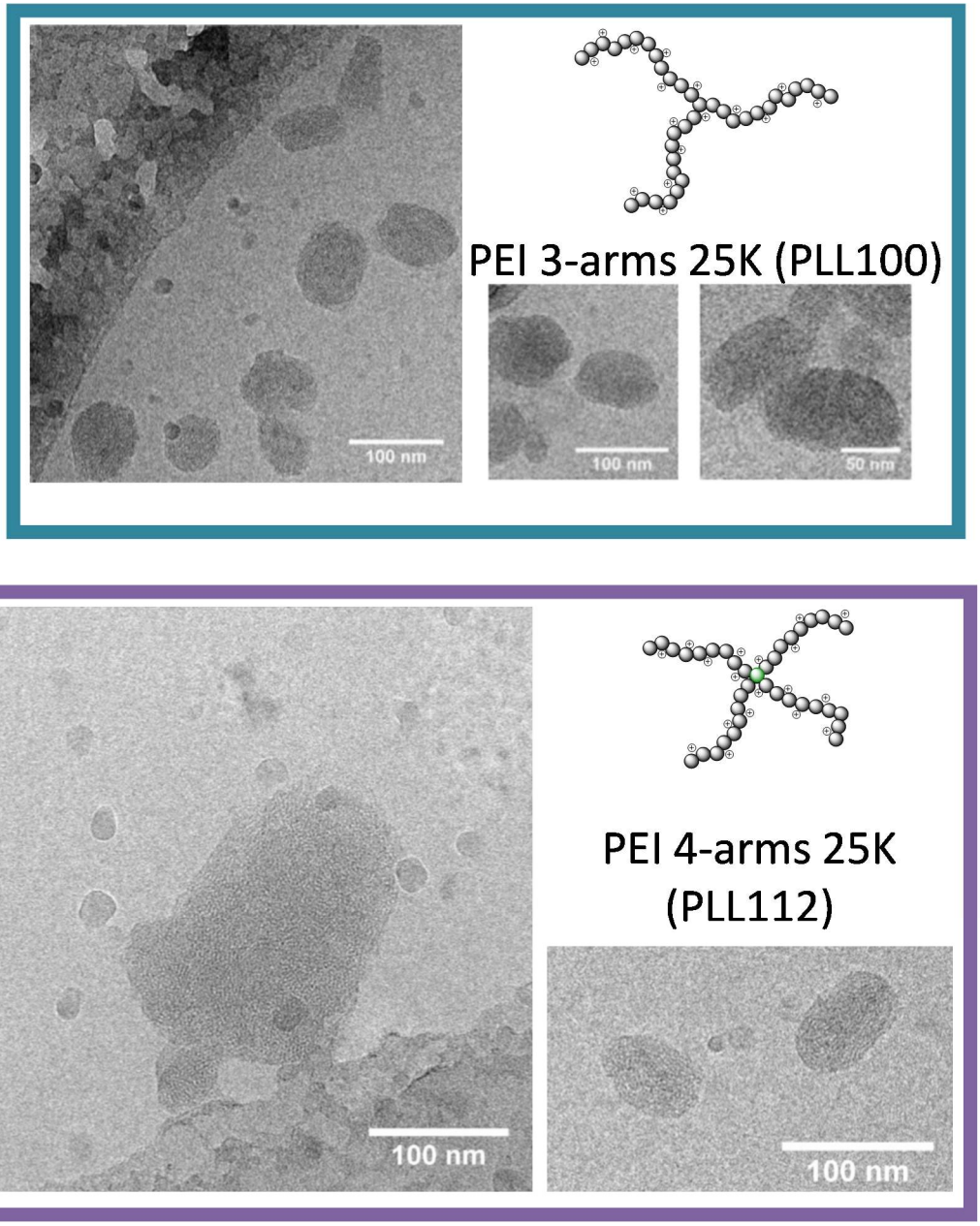


Figure 4.12. Images de cryo-MET obtenues pour les polyplexes PEI 3 branches 25K/pTG11033 et PEI 4 branches 25K/pTG11033 au WR 3/1 avec une concentration en pTG11033 de 200 µg.mL^{-1}

Ces images de cryo-MET mettent en évidence la structure assez bien définie des polyplexes étudiés. Nous observons une corrélation entre les mesures obtenues par DLS, et les observations faites par cryo-MET, bien que des concentrations légèrement supérieures soient utilisées pour ces analyses (les premières analyses menées à des concentrations de 50 $\mu g.mL^{-1}$ ne permettaient pas d'avoir une statistique significative des polyplexes analysés, et conduisaient à des doutes quant aux attributions). Cette corrélation DLS/cryo-MET n'est pas tout à fait vérifiée pour les PEI en étoile à 3 ou 4 branches. A cette étape de l'étude, il n'est pas possible d'indiquer s'il s'agit d'un effet de concentration (cryo-MET réalisée sur des polyplexes plus concentrés, donc agrégés), ou d'une faible qualité de la mesure DLS.

II. Evaluation biologique des polymères

Les polyplexes sont préparés dans les conditions définies préalablement (WR optimum déterminés par retard sur gel) et leur capacité à transfecter des cellules en culture sera évaluée grâce au gène rapporteur porté par l'ADNp utilisé. Ces tests ont été faits sur deux types de lignées cellulaires : les cellules CFBE et les cellules HepG2. Les cellules CFBE, fréquemment utilisées au laboratoire, sont des cellules épithéliales bronchiques humaines n'exprimant pas le gène CFTR normal. Le gène CFTR (pour cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) code pour une protéine transmembranaire responsable du flux d'ions chlorures. Des mutations de ce gène chez l'homme conduisent à la mucoviscidose, maladie génétique la plus fréquente dans les pays occidentaux. Les cellules HepG2 sont des cellules d'hépatoblastome humain c'est-à-dire des cellules cancéreuses du foie. Elles nous intéressent particulièrement pour ce projet puisque dans le cadre de l'application visée, nous nous intéressons à la transfection de cellules du foie. Leur cytotoxicité sera ensuite évaluée. Le principe des tests et les résultats obtenus sont présentés dans cette partie.

1. Principes des tests de transfection et de cytotoxicité

a. Test de transfection : RLU

Pour évaluer leur efficacité de transfection, les polyplexes sont préparés avec le plasmide pTG11033 codant pour un gène rapporteur, le gène de la luciférase de luciole, une enzyme capable de catalyser l'oxydation de la luciférine en présence d'ATP et d'O_2 comme cofacteurs (Figure 4.13). Cette réaction génère de la luminescence, c'est-à-dire qu'elle provoque l'émission de lumière.

48h après la transfection des cellules par les polyplexes, les cellules sont traitées à l'aide d'un kit (Promega, E1500), puis l'activité luciférase des lysats cellulaires est mesurée à l'aide d'un luminomètre (LUMAT LB 9507). Plus le niveau de transfection des cellules est élevé, plus elles contiennent d'enzymes luciférase (produites à partir du plasmide) et donc plus la quantité de photons émis est grande. Pour normaliser cette quantité de photons émis par le nombre de cellules vivantes, la quantité de protéines par puits (proportionnelle à la quantité de cellules vivantes) est dosée par le test protéines BCA à l'aide d'un kit. L'efficacité de transfection est ensuite exprimée en unités de lumière relative (RLU) par mg de protéines.

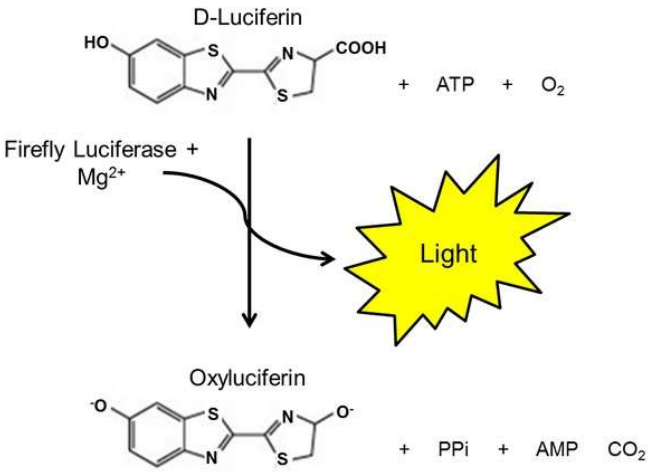


Figure 4.13. Réaction de bioluminescence catalysée par l'enzyme luciférase de luciole
(source : https://www.tebu-bio.com/blog/tag/luciferase-assay/)

Dans tous nos tests, le polymère PTG1® (Polythéragène, Evry, France), PEI de M_w 25 kg.mol^{-1} possédant environ 16% des motifs EI modifiés par du HNA est utilisé comme référence. Les polyplexes PTG1/pTG11033 aux WR 1/1 et 3/1 conduisent à des niveaux de transfection toujours compris entre 10^7 et 10^8 RLU/mg de protéines.

b. Test de cytotoxicité : MTT

La toxicité des polyplexes sur les cellules a été évaluée par le test MTT dont le principe est décrit dans ce paragraphe. Des cellules en culture sont incubées pendant 4h avec les polyplexes, puis le milieu de culture est changé et, après 48h, le réactif MTT de couleur jaune et soluble est ajouté dans chacun des puits. Les réductases des mitochondries des **cellules vivantes** vont transformer le MTT en formazan, un composé bleu-violet insoluble (Figure 4.14). Après solubilisation du formazan formé, l'absorbance est mesurée par lecture au spectrophotomètre à 560 nm. Plus le composé testé est toxique, moins il y a de cellules vivantes capables de réduire le MTT en formazan et donc moins l'absorbance à 560 nm est grande. La toxicité induite par les polyplexes est ensuite calculée en la rapportant à l'absorbance des cellules témoin, qui n'ont pas été incubées avec un polyplexe (A_T) et de l'absorbance des cellules incubées avec le polyplexe d'intérêt (A_P) selon l'équation : $tox(\%) = \frac{A_T - A_P}{A_T} \times 100$.

On représentera dans les graphes la viabilité des cellules : $via\ (\%) = 100\% - tox(\%)$ en considérant que les cellules témoin présentent 100% de viabilité.

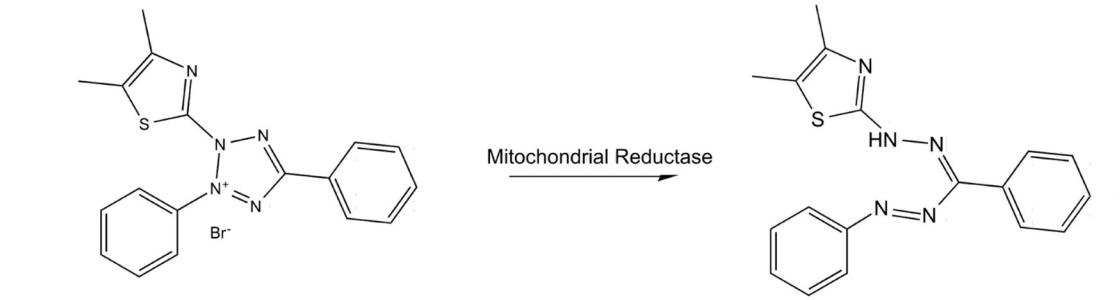


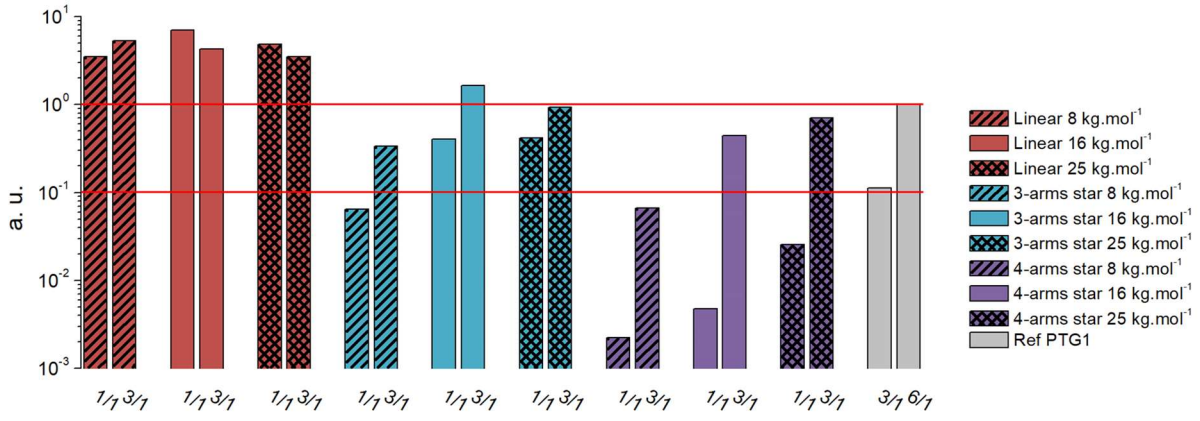
Figure 4.14. Réaction de réduction du MTT en formazan

2. Evaluation biologique des PEI sur les cellules CFBE

L'équipe travaillant principalement sur les thématiques de la mucoviscidose (maladie pulmonaire) et des myopathies (maladies du muscle), une étude préliminaire a été faite pour étudier l'efficacité de transfection des cellules CFBE par chacune des PEI de la bibliothèque. Cette première étude a permis de faire un premier criblage avant l'étude complète sur les cellules pertinentes pour l'application de ce travail. Les résultats de transfection sont exprimés en RLU/mg de protéines, et rapportés à l'efficacité de transfection du polymère PTG1® au WR 6/1, utilisé comme référence. Ce WR est le plus efficace pour PTG1®[7]. Les résultats sont

donc présentés en unité arbitraire (a. u.) sur la Figure 4.15. Pour faciliter la lecture, deux lignes horizontales matérialisent le niveau de transfection de la référence PTG1 et un niveau de transfection un ordre de grandeur inférieur à celui-ci.

Les PEI linéaires issues de cette étude présentent toutes un niveau de transfection supérieur (environ un demi-ordre de grandeur supérieur) à celui du PTG1. Ce résultat est inattendu par rapport à la littérature. Par ailleurs, l'influence de la masse molaire des *l*PEI est négligeable. L'efficacité de transfection des PEI en étoile est globalement moins bonne. Dans la série des PEI en étoile à 3 branches, la PEI de M_n = 8 kg.mol^{-1} présente un niveau de transfection assez faible, aux deux WR testés. Pour les PEI en étoile à 3 branches de M_n = 16 et 25 kg.mol^{-1}, le WR 3/1 donne de meilleurs résultats que le WR 1/1, ces résultats étant du même ordre que la référence. En ce qui concerne les PEI en étoile à 4 branches, quelle que soit la M_n le WR 1/1 ne permet pas un bon niveau de transfection. Seules les PEI en étoile à 4 branches de M_n = 16 et 25 kg.mol^{-1} au WR 3/1 mènent à un niveau de transfection presque équivalent à la référence.



Le WR utilisé est précisé sous chaque colonne du graphe. L'efficacité de transfection est exprimée comme le rapport de l'efficacité de transfection du polyplexe étudié (RLU/mg de protéine) sur celle du PTG1 au WR 6/1 utilisé comme référence (RLU/mg de protéine).

Figure 4.15. Efficacité de transfection des cellules CFBE par les polyplexes à base de PEI

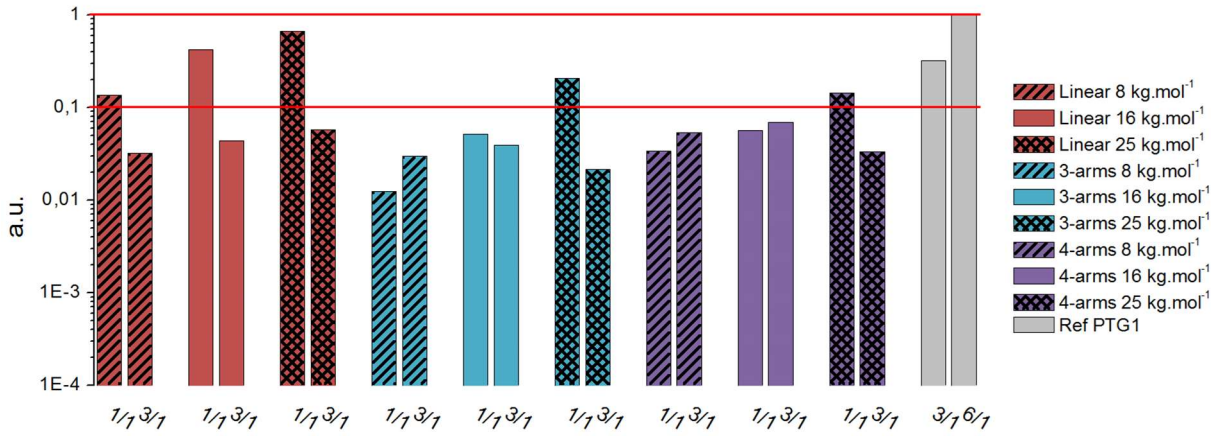
En conclusion, sur ce type cellulaire, l'architecture en étoile des PEI ne conduit pas à un niveau de transfection supérieur à celui des PEI linéaires. Seules les PEI en étoile de M_n > 16 kg.mol^{-1} permettent d'obtenir un niveau de transfection de l'ordre de 10^7-10^8 RLU/mg de protéines.

3. Evaluation biologique des PEI sur les cellules HepG2

Nous nous sommes ensuite intéressés à la capacité de transfection des PEI sur un autre type cellulaire : les cellules HepG2, qui sont des cellules de foie, donc intéressantes dans le cadre de notre projet.

a. Efficacité de transfection

Parmi toute la bibliothèque de PEI testée, seules les PEI linéaires de 16 et 25 kg.mol^{-1} au WR 1/1 transfectent les cellules HepG2 à un niveau comparable au PTG1. Les PEI en étoile à 3 branches et à 4 branches de masse molaire 8 et 16 kg.mol^{-1} transfectent avec une efficacité plus faible, tandis que celles de 25 kg.mol^{-1} transfectent à un niveau acceptable au WR 1/1.



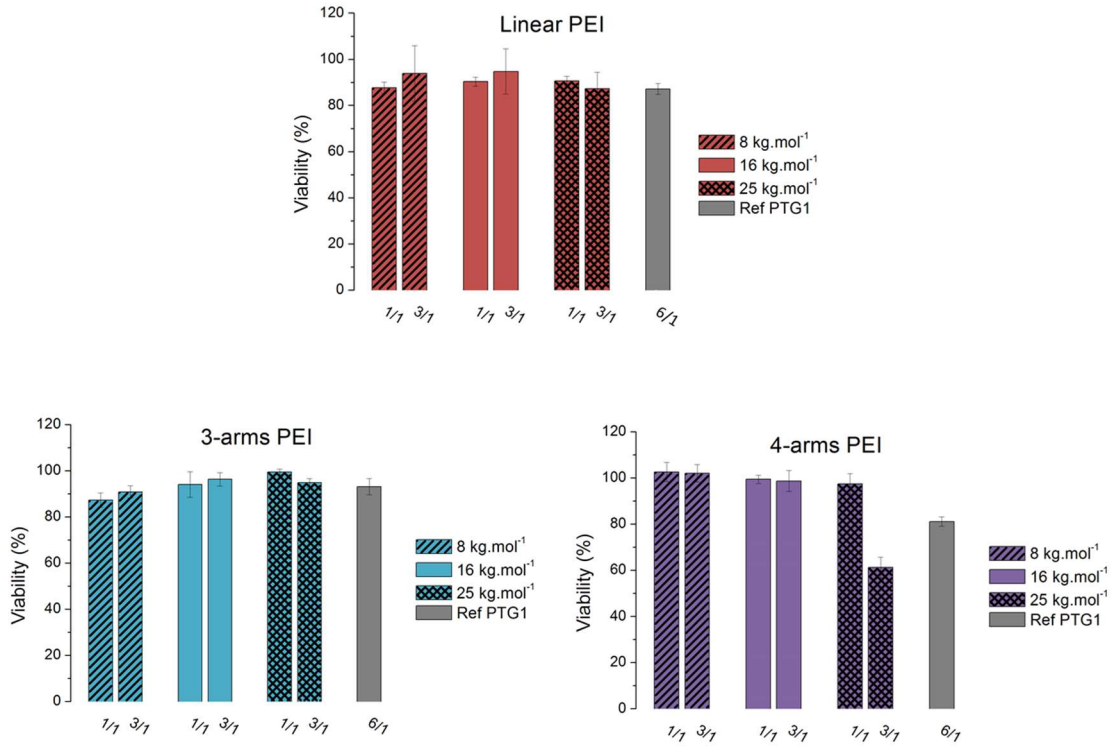
Le WR utilisé est précisé sous chaque colonne du graphe. L'efficacité de transfection est exprimée comme le rapport de l'efficacité de transfection du polyplexe étudié (RLU/mg de protéine) sur celle du PTG1 au WR 6/1 utilisé comme référence (RLU/mg de protéine).
Les résultats de chacune des plaques sont présentés en Annexe 4.1, 4.2 et 4.3

Figure 4.16. Efficacité de transfection des cellules HepG2 par les polyplexes à base de PEI

En conclusion, les PEI en étoile transfectent aussi les cellules HepG2. L'architecture en étoile a un rôle variable. Dans le cas des faibles masses molaires, les PEI en étoile transfectent peu. En revanche, pour un rapport WR 1/1, les PEI en étoile de 25 kg.mol^{-1} ont des niveaux de transfection équivalents à ceux des PEI linéaires, que leur nombre de branches soit 3 ou 4. L'augmentation du WR pour ces polymères n'améliore pas les niveaux de transfection.

b. Cytotoxicité

La cytotoxicité des polyplexes à base de PEI sur les cellules HepG2 a été évaluée par le test MTT. Les graphes de viabilité des cellules après transfection sont présentés à la Figure 4.17. Le PTG1 au WR 6/1 est testé sur chacune des plaques, c'est-à-dire pour chaque série de PEI. Nous pouvons remarquer une légère variation de la viabilité en fonction de la plaque, témoignant de l'incertitude de la mesure. Les PEI linéaires provoquent moins de 10% de toxicité, quels que soient la masse molaire de la PEI et le WR testé ; ils conduisent donc à une viabilité égale ou supérieure à celle induite par le PTG1®. En ce qui concerne les PEI en étoile à 3 branches, ce sont les plus petites PEI (8 kg.mol^{-1}) qui présentent la viabilité la plus faible (bien que celle-ci reste tout à fait acceptable : environ 85-90%), alors que les PEI de plus hautes masses molaires présentent une viabilité de quasiment 100%. Enfin, pour ce qui est des PEI en étoile à 4 branches, elles conduisent toutes à une viabilité de 100%, à l'exception de celle de plus haute masse molaire (25 kg.mol^{-1}) au WR 3/1 qui entraîne une chute drastique de la viabilité à 60%. La chute de l'efficacité de transfection avec l'augmentation du WR de 1/1 à 3/1, observée au paragraphe précédent, est corrélée avec leur plus grande toxicité à ce WR.



La viabilité cellulaire des cellules HepG2 a été évaluée par un test MTT effectué 42h après transfection des cellules avec les polyplexes préparés aux WR indiqués sous les colonnes des graphes et est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées.

Figure 4.17. Viabilité des cellules HepG2 après transfection avec les polyplexes à base de PEI

Dans ce paragraphe, nous observons que les PEI en étoile sont peu toxiques dans les conditions analysées, c'est à dire à 50 µg.mL^{-1} d'ADNp pour le WR 1/1 et 150 µg.mL^{-1} pour le WR 3/1 (à l'exception de la PEI 4 branches à ce ratio). Ces résultats encourageants nous ont entrainés à réaliser une étude de toxicité de ces polymères seuls. Cette étude est en cours. En effet, il est connu que la toxicité est essentiellement causée par les polymères libres dans les formulations de polyplexes.

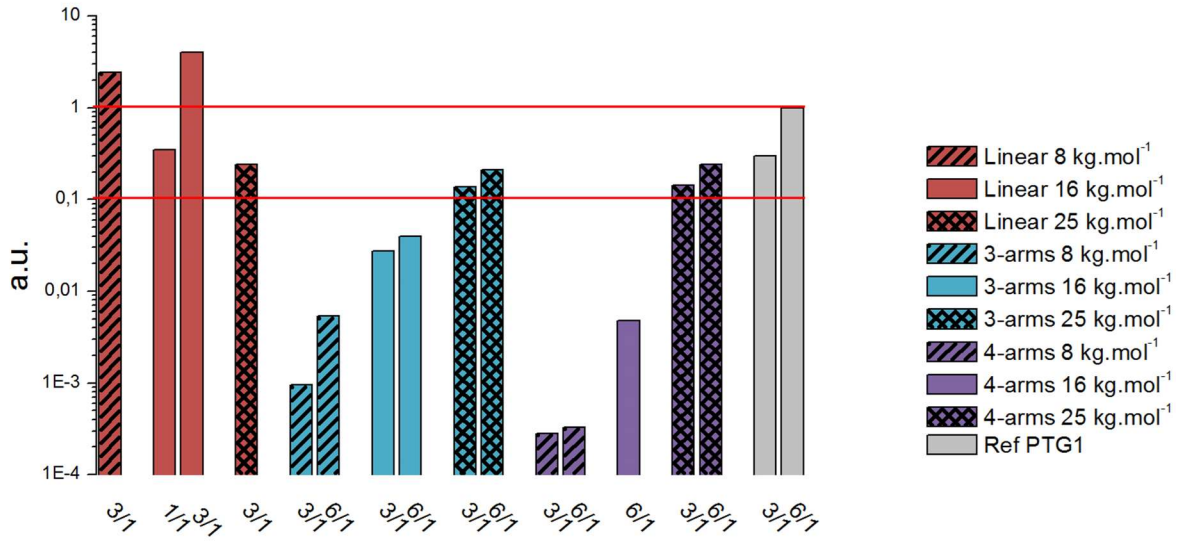
4. Evaluation biologique des His-PEI sur les cellules HepG2

L'efficacité de transfection et la cytotoxicité de la bibliothèque d'His-PEI ont ensuite été évaluées afin de conclure quant à l'apport de la modification des PEI avec de l'histidine sur l'activité biologique.

a. Efficacité de transfection

Au WR 1/1, aucune des His-PEI linéaires testées ne transfecte les cellules HepG2 à l'exception de l'His-PEI de 16 kg.mol^{-1}. Par ailleurs, au WR 3/1, les His-PEI linéaires de 8 et 16 kg.mol^{-1} transfectent plus efficacement que le PTG1®. Les résultats sont rassemblés à la Figure 4.16.

Les His-PEI en étoile à 3 ou 4 branches ne transfectent pas au WR 1/1 quelle que soit la masse molaire de la PEI. Il en est de même pour l'His-PEI à 4 branches de 16 K au WR 3/1. Ces résultats n'ont donc pas été reportés à la Figure 4.16. Nous avons mené une série d'expérience en augmentant le WR à 6/1, comme dans le cas de PTG1®, le polymère de référence. La toxicité supposée des polymères cationiques nous conduit à ne pas investiguer de rapports WR plus élevés. Pour les His-PEI en étoile à 3 ou 4 branches, une très faible efficacité de transfection est observée pour les masses molaires de 8 et de 16 kg.mol^{-1}. Seules les His-PEI de 25 kg.mol^{-1}, aux WR 3/1 et 6/1 permettent un niveau de transfection de l'ordre de grandeur des His-PEI linéaires et de la référence (PTG1®).



Le WR utilisé est précisé sous chaque colonne du graphe. L'efficacité de transfection est exprimée comme le rapport de l'efficacité de transfection du polyplexe étudié (RLU/mg de protéine) sur celle du PTG1 au WR 6/1 utilisé comme référence (RLU/mg de protéine).

Figure 4.18. Efficacité de transfection des cellules HepG2 par les polyplexes à base d'His-PEI

Afin de comparer plus aisément l'impact de l'ajout de résidus histidine, les efficacités de transfection des formulations préparées au WR 3/1 à partir de PEI avec et sans histidine ont été reportées de nouveau dans la Figure 4.19 pour chaque architecture et chaque masse molaire. Pour les His-PEI en étoile de 3 et 4 branches de 8 et 16 kg.mol^{-1}, la modification chimique des polymères en étoile a un effet néfaste sur la transfection. Au contraire, pour les His-PEI en étoile de 3 et 4 branches de 25 kg.mol^{-1}, la modification chimique des polymères en étoile semble avoir un effet légèrement bénéfique suivant la tendance des PEI linéaires. Toutefois, la comparaison est faite ici en considérant uniquement les formulations faites au WR 3/1. Si on s'intéresse aux valeurs d'efficacité de transfection des polyplexes à base de polymères à 3 et 4 branches de 25 K, formulés au WR optimal pour chacun, le bénéfice de l'ajout d'histidine disparaît, contrairement au cas de polymères linéaires.

En comparant les His-PEI en étoile à 3 et 4 branches de 25 K aux PEI linéaires sans résidus histidine, nous concluons qu'il n'y a pas de synergie de modifications chimique et architecturale.

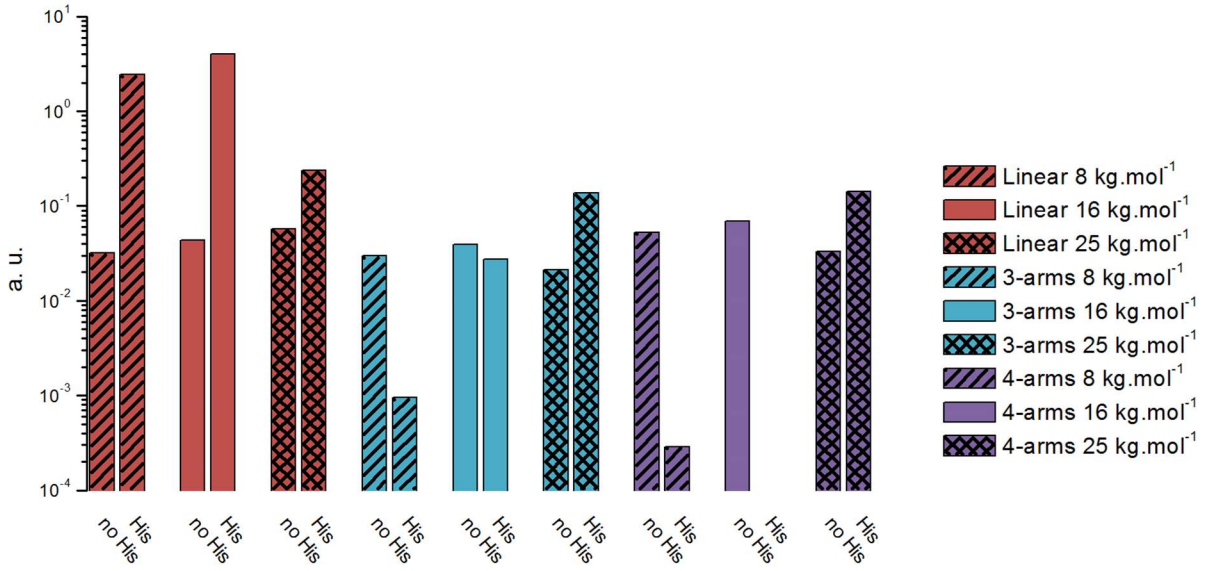


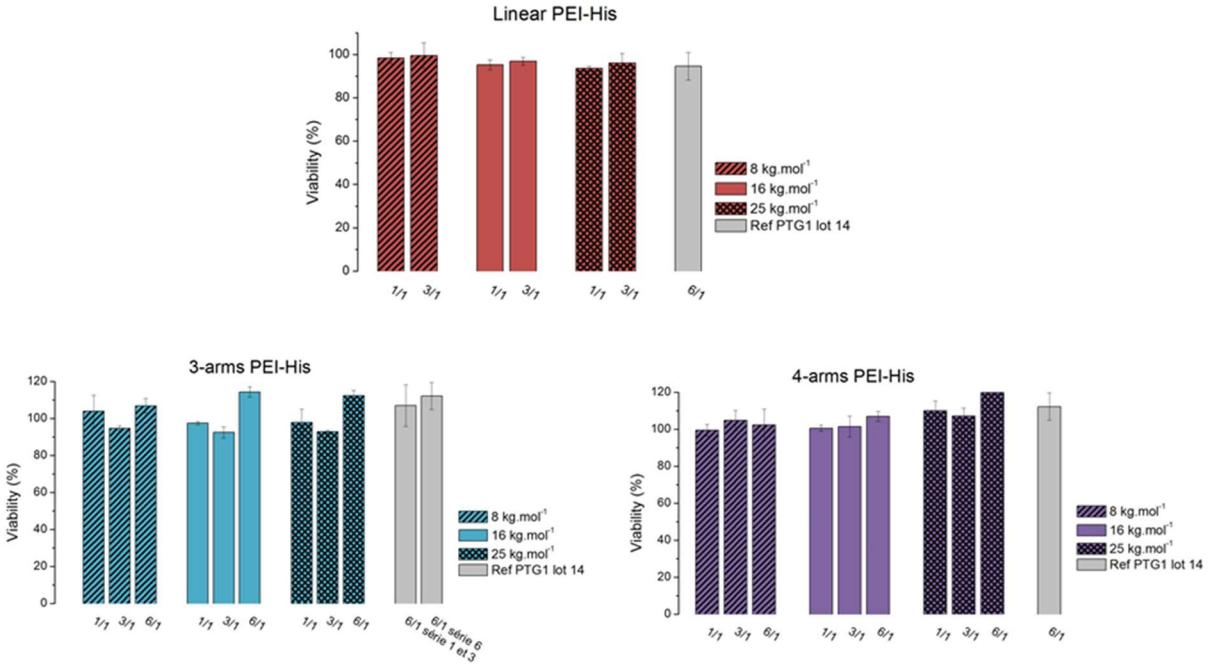
Figure 4.19. Efficacité de transfection des cellules HepG2 par les polyplexes à base de His-PEI

La littérature ne reporte pas d'étude de modification chimique de polymère en étoile, ou de synthèse de polymère en étoile ayant des branches de type copolymère statistique. Ce résultat ne pouvait donc être anticipé, il représente néanmoins une réponse à la question scientifique initialement posée. La faible qualité de transfection peut avoir diverses origines. Tout d'abord, les diamètres des polyplexes utilisés pour cette étude sont généralement plus élevés que ceux obtenus dans le cas des PEI ou de la His-*l*PEI. En se référant aux travaux de Rejman[19], on comprend donc que l'augmentation des tailles doit impliquer un changement de voie d'internalisation des polyplexes, probablement pas à notre avantage, même si on a vu que la stabilité des polyplexes testés dans ce paragraphe est plus faible que celle des polyplexes à base de PEI. Nous pensons donc que le paramètre de taille des polyplexes est plus important que celui du relargage dans l'exemple que nous avons traité. Malgré ces résultats en deçà de nos espérances, nous avons tout de même vérifié la cytotoxicité de ces produits.

b. Cytotoxicité

La cytotoxicité des His-PEI testées au paragraphe précédent a été testée par le test MTT décrit plus haut. Les résultats sont reportés Figure 4.20. Quelle que soit leur masse molaire, les His-PEI ne présentent aucune toxicité significative. Même au WR 6/1 pour lequel un large

excès de polymère est présent (puisqu'on sait grâce aux expériences de retard sur gel que les His-PEI condensent l'ADNp dès le WR 1/1), aucune toxicité n'est décelée.



La viabilité cellulaire des cellules HepG2 a été évaluée par un test MTT effectué 42h après transfection des cellules avec les polyplexes préparés aux WR indiqués sous les colonnes des graphes et est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées.

Figure 4.20. Viabilité des cellules HepG2 après transfection avec les polyplexes à base d'His-PEI

En conclusion de cette première partie, pour chacune des architectures des familles de PEI et d'His-PEI préalablement synthétisées, il a été possible de trouver des conditions (masse molaire et WR) permettant de transfecter les cellules d'intérêt (CFBE et HepG2). Comme attendu, les PEI linéaires et les His-PEI linéaires transfectent efficacement et avec une toxicité acceptable (< 20%). Pour la première fois, l'efficacité de transfection et la cytotoxicité de PEI d'architecture en étoile synthétisées par une stratégie core-first ont été décrites et l'influence de la masse molaire (8, 16 et 25 $kg.mol^{-1}$) et de l'architecture (linéaire, en étoile à 3 branches et en étoile à 4 branches) a été étudiée. Il est possible de transfecter efficacement les cellules HepG2 avec les PEI et His-PEI en étoile à 3 et 4 branches de 25 $kg.mol^{-1}$. Les polymères de masses molaires 8 et 16 $kg.mol^{-1}$ ne transfectent pas aussi efficacement ces lignées cellulaires dans ces conditions. De meilleurs résultats ne sont pas à exclure dans d'autres types cellulaires. Des études complémentaires sont en cours. Ces résultats montrent toutefois l'enjeu qu'il y a à maitriser la taille des polyplexes pour maintenir un niveau de transfection acceptable. Le protocole de formulation dans cette première étude a été basé sur une solution en ADNp de

concentration 50 $\mu g.mL^{-1}$, à laquelle était ajoutée la solution de polymère cationique. Afin d'envisager des études *in vivo*, des formulations avec des concentrations en ADNp 100 fois plus grandes doivent être envisagées, et maitrisées. Nous proposons dans la partie suivante de tester une nouvelle voie de formulation pour contrôler le diamètre moyen des polyplexes qui seront synthétisés.

Partie 2 – Formulation par extrusion

En utilisant des concentrations faibles ([ADNp] = 50 µg.mL^{-1}) mais suffisantes pour l'application *in vitro*, la formulation standard a permis l'obtention de polyplexes de taille de l'ordre de 100 à 120 nm pour les PEI et de l'ordre de 120 à 230 nm pour les His-PEI capables de transfecter les cellules HepG2 en culture. Nous avons observé que l'augmentation des tailles de ces polyplexes réduisait fortement l'efficacité de transfection. Pour des tests *in vivo*, l'utilisation de solutions de polyplexes plus concentrées est nécessaire (cf chapitre 1). Or, il est connu que l'augmentation des concentrations utilisées pour la formulation standard conduit à des polyplexes de taille importante qui, lors d'administration systémique sur souris peuvent entrainer des embolies pulmonaires pouvant aller jusqu'à la mort des souris (T. Montier, communication personnelle, 8 juillet 2019).

Nous avons vu que les concentrations C* des ADNp sont relativement faibles (≈ 0,5-4 mg.mL^{-1}). Les formulations standards pour les tests *in vivo* sont en général menées à des concentrations de 0,5 mg.mL^{-1} et sont donc de l'ordre des C*. Par conséquent, elles conduisent naturellement à des agrégats de tailles élevés, incompatibles avec une expérimentation animale. En effet, ces formulations nécessitent de remonter le diagramme de phase, impliquant le passage par l'électroneutralité, zone de précipitation. La préparation de solutions de polyplexes à la fois plus concentrées en polyplexes mais aussi constituées de polyplexes de diamètres inférieurs à 100 nm est un résultat préliminaire indispensable à atteindre avant de pouvoir tester les polyplexes sur des souris. Pour tenter d'atteindre cet objectif, nous avons décidé de mettre en œuvre une nouvelle technique de formulation susceptible de contourner le diagramme de phase (en particulier la zone d'électroneutralité) en évitant de réaliser ces formulations à des concentrations où l'ADNp est au-dessus de C* au moment de la condensation. Pour atteindre cet objectif, il faut formuler chaque copie d'ADNp une à une. L'idéale est une addition molécule par molécule de l'ADNp dans la solution concentrée de polymère cationique. Il a été montré par différentes équipes, en particulier par celle de Loïc Auvray, qu'il est possible d'extruder de l'ADN à travers des pores nanométriques (entre 15 et 100 nm) sans que ceux-ci ne soient dégradés, par simple pression hydrolique. Les phénomènes de flux déforment la macromolécule et l'entrainent à travers le nanopore. Le modèle de succion de P. G. de Gennes démontre que cette translocation ne dépend ni de la masse molaire de l'ADNp, ni de la taille du nanopore, mais seulement de la pression appliquée. Nous proposons donc dans ce chapitre d'évaluer l'opportunité d'extruder chaque copie d'ADNp une à une dans une solution de polymère

cationique à travers des membranes possédant des pores compris entre 15 et 100 nm. Nous présenterons d'abord l'extrudeuse utilisée, puis, nous décrirons les tests effectués afin de déterminer les paramètres pertinents pour formuler des polyplexes de taille inférieure à 100 nm. Quelques résultats préliminaires seront décrits.

I. Présentation du concept

Comme expliqué, le concept d'extruder une solution d'ADNp à travers des nanopores vers une solution concentrée de polymère cationique pourrait permettre d'obtenir des nanoparticules ne contenant qu'une seule copie d'ADNp. Nous présenterons ici l'extrudeuse, puis la méthode utilisée pour doser l'ADNp après extrusion, l'objectif étant de quantifier la concentration en ADNp de la solution finale et par là même, de vérifier que la membrane nanoporeuse ne joue pas le rôle de filtre mais régule uniquement le débit en ADNp vers le compartiment TRANS.

1. Description de l'extrudeuse

L'extrudeuse utilisée est présentée à la Figure 4.21. Elle est constituée de deux compartiments (*CIS* et *TRANS*) entre lesquels une membrane nanoporeuse (membrane Nucléopore® en polycarbonate possédant des pores de diamètre calibré) peut être placée. Pour la protéger de la pression appliquée, cette membrane nanoporeuse est encadrée par deux pièces métalliques percées de pores non calibrés non visibles à l'œil nu. Une fois chacun des compartiments remplis par la solution d'intérêt, ils peuvent être mis en place dans l'extrudeuse comme présenté sur la Figure 4.21. Le système est relié à une arrivée d'air comprimé et l'enclenchement du levier permet d'appliquer une pression parfaitement contrôlée par un système de régulation de pression et un manomètre sur le piston *CIS*, poussant ainsi le contenu du compartiment *CIS* vers le compartiment *TRANS* en le faisant passer à travers la membrane nanoporeuse qui joue donc le rôle de régulateur.

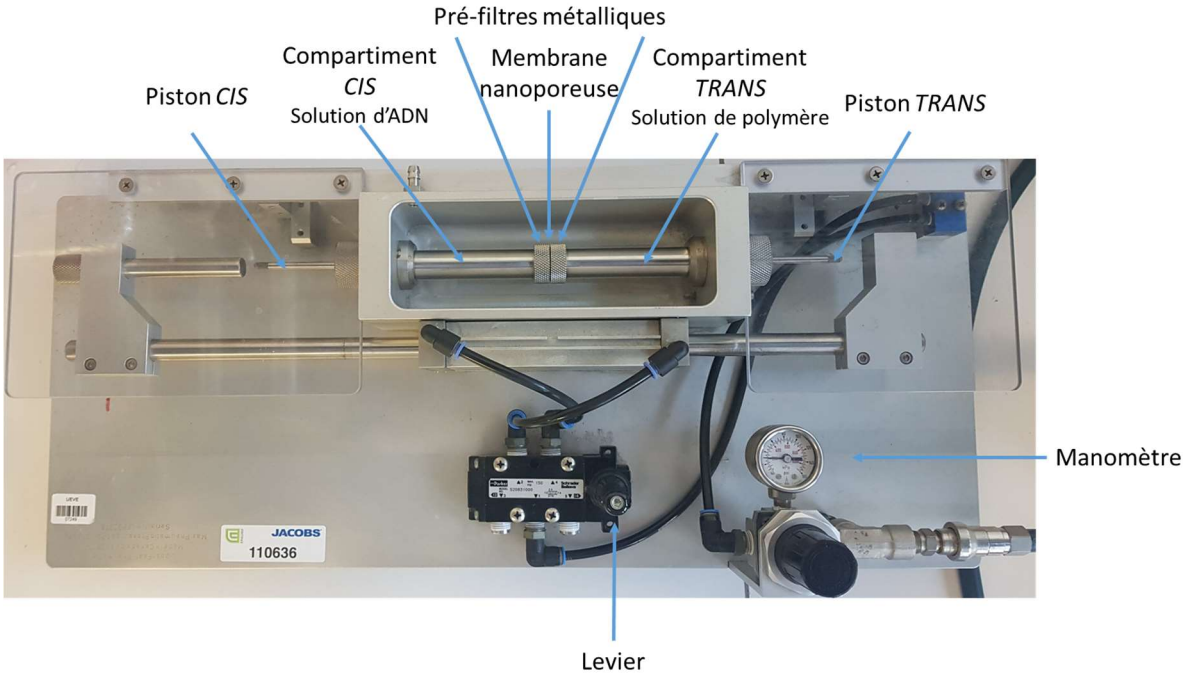


Figure 4.21. Système d'extrusion utilisé pour la formulation

2. Quantification de l'ADN

Le nanodrop est un spectromètre capable d'analyser des volumes de l'ordre du microlitre. Les hétérocycles des bases azotées dans la structure de l'ADN lui confèrent un maximum d'absorption à 260 nm. En utilisant le mode « dsDNA », le nanodrop donne directement une valeur de la concentration en ADN (utilisation de la loi de Beer-Lambert).

Dans un premier temps, de l'ADN de sperme de hareng a été utilisé (D3159, Sigma-Aldrich). Cet ADN double brin est un mélange d'oligonucléotides de moins de 50 paires de bases soit de M_w comprise entre 30 et 50 kDa. Toutefois, il faut être prudent quant à l'exactitude de ces données. En effet, Ulbrich et coll.[23] ont caractérisé par SEC de l'ADN de thymus de veau (Aldrich) et ont trouvé des valeurs différentes de celles données par le fournisseur (M_w = 8 418 000 g.mol^{-1} et Đ = 5,2). Bien que l'ADN de sperme de hareng soit un ADN mal défini, il présente l'avantage d'être peu coûteux. Il a donc été choisi pour mener les tests préliminaires. Des solutions d'ADN de hareng (D3159) ont été préparées à 1000, 750, 500, 250 et 100 µg.mL^{-1} dans une solution de glucose à 5% dans de l'eau distillée et analysées par nanodrop afin de valider la précision du dosage par nanodrop. Ce solvant est particulièrement intéressant dans le but d'effectuer des transfections par administration systémique. Des

polyplexes à base de *l*PEI 10 K (Aldrich) et d'ADN D3159 ont été préparées par formulation standard à partir de ces solutions d'ADN D3159 et de solutions de *l*PEI 10 K à respectivement 6000, 4500, 3000, 1500 et 600 µg.mL^{-1} afin d'obtenir un WR de 6/1 après mélange d'un volume identique de chaque solution. Les solutions obtenues après formulation des polyplexes (formulations standards) sont ensuite analysées par nanodrop, l'objectif étant de s'assurer que l'absorbance de l'ADNp est la même avant et après formation des polyplexes. Sur la Figure 4.22, l'absorbance mesurée par nanodrop a donc été tracée en fonction de la concentration effective d'ADN dans les solutions d'ADN et dans les solutions de polyplexes. Les résultats montrent que l'absorbance mesurée pour les solutions d'ADN est linéaire avec la concentration en ADN. De plus, l'absorbance des solutions de polyplexes se superpose à celle obtenue pour l'ADN seul. Cela prouve donc qu'il n'y a pas de contribution de la PEI dans l'absorbance des solutions de polyplexes et que la condensation de l'ADN ne perturbe pas la mesure. Il est à noter que dans le cas de l'His-PEI, la présence de groupements imidazole absorbant également à 260 nm ne permettra pas de remonter si facilement à la concentration en ADNp.

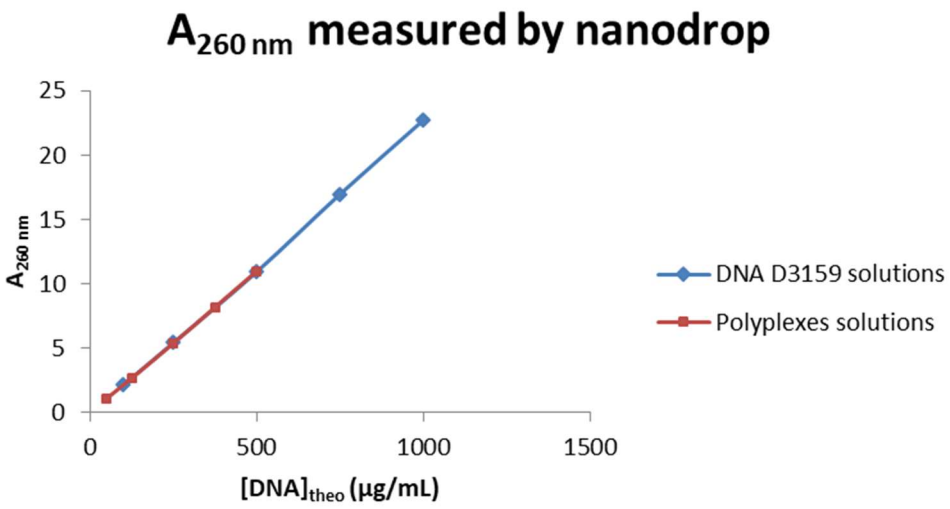


Figure 4.22. Absorbance à 260 nm mesurée par nanodrop en fonction de la concentration théorique des solutions d'ADN et des solutions de polyplexes à base de *l*PEI 10 K dans 5% glucose

II. Tests d'extrusion préliminaires

Dans un premier temps, des essais d'extrusion sont menés sans polymère dans le but de déterminer les meilleures conditions d'expérimentation. Dans les expériences présentées dans ce paragraphe, le compartiment *TRANS* contient uniquement une solution de 5% glucose (absence de polymère) d'un volume identique à celui du compartiment *CIS*. De plus, l'ADN utilisé est un ADN double brin issu de sperme de hareng (D3159). L'analyse DLS de cet ADN donne un diamètre moyen en nombre de 35 nm et un diamètre moyen en intensité de 230 nm avec une forte dispersité (Annexe 4.4). Les essais d'extrusion d'ADN qui ont été réalisées sont répertoriés dans le Tableau 4.3 et seront commentés dans les deux sous-parties suivantes. Le tableau est divisé en deux parties : la partie « *PRE*-extrusion » dans laquelle sont consignées les informations concernant le contenu des compartiments *CIS* et *TRANS avant* extrusion ainsi que le diamètre des pores de la membrane utilisée, puis la partie « *POST*-extrusion » qui liste les résultats des analyses du contenu du compartiment *TRANS* après extrusion (mesure de la concentration en ADN par nanodrop, évaluation du volume récupéré en *TRANS* et mesures des diamètres moyens en intensité et en nombre). En raison de la forte dispersité de l'ADN de hareng utilisé, il est difficile de conclure quant aux diamètres obtenus après extrusion.

Tableau 4.3. Extrusions d'ADN D3159 dans du solvant pur (sans polymère)

	***PRE*-extrusion**						***POST*-extrusion**					
Extrusion N°	$Solvent_{CIS}$	$V_{CIS,i}$ (µL)	Membrane pores D (nm)	Polymer	$Solvent_{TRANS}$	$V_{TRANS,i}$ (µL)	$[DNA]_{theo\ TRANS,f}$ ($mg.mL^{-1}$)	$[DNA]_{TRANS,f}$ ($mg.mL^{-1}$)[1]	$V_{TRANS,f}$ (µL)	$m_{DNA\ TRANS,f}$ (µg)	D intensité[2] (nm)	D nombre[2] (nm)
PLL-FE1	gluc 5%	250	15	-	gluc 5%	250	0,5	0,032	175	6	315	303
PLL-FE2	gluc 5%	250	30	-	gluc 5%	250	0,5	0,021	295	6	473	414
PLL-FE3	gluc 5%	500	30	-	gluc 5%	500	0,5	0,193	805	155	215	39
PLL-FE4	gluc 5%	500	100	-	gluc 5%	500	0,5	0,211	765	162	354	86
PLL-FE5	gluc 5%	500	15	-	gluc 5%	500	0,5	0,084	615	52	351	99
PLL-FE5bis	gluc 5%	500	15	-	gluc 5%	500	0,5	0,105	605	64	409	2
PLL-FE5ter	gluc 5%	500	15	-	gluc 5%	500	0,5	0,130	630	82	464	4
PLL-FE6	eau pure	500	15	-	gluc 5%	500	0,5	0,150	705	106	482	36
PLL-FE6bis	eau pure	500	15	-	gluc 5%	500	0,5	0,166	805	134	414	32
PLL-FE7	gluc 5%	750	30	-	gluc 5%	750	0,5	0,314	1070	336	424	92
PLL-FE7bis	gluc 5%	750	30	-	gluc 5%	750	0,5	0,353	1195	422	328	255

DNA used = D3159, $[DNA]_{CIS}$ = 1 $mg.mL^{-1}$
$V_{CIS} = V_{TRANS}$
[1] obained by nanodrop
[2] obained by DLS

1. Variation du volume dans le compartiment *CIS* (V_{CIS})

Pour les extrusions FE1 et FE2, le volume initial de chacun des compartiments *CIS* et *TRANS* ($V_{CIS,i}$ et $V_{TRANS,i}$) est de 250 µL. Après extrusion, le volume obtenu en *TRANS* ($V_{TRANS,f}$) est d'environ 250 µL, soit environ le même qu'avant extrusion et la concentration en ADN mesurée par nanodrop est très inférieure à la concentration attendue. La théorie prédit qu'il est possible d'extruder de l'ADN de 230 nm de diamètre hydrodynamique à travers des nanopores de 15 ou 30 nm. La pression utilisée est de 2 bars, soit très supérieure à la pression minimale permettant ce type de translocation[24]. Nos résultats montrent qu'un volume négligeable de la solution d'ADN est passé vers le compartiment *TRANS* et ce, que ce soit en utilisant une membrane de pores de diamètre 15 nm (FE1) ou de 30 nm (FE2). Suite à ce résultat, le volume mort dans la zone entre les deux compartiments a été évalué en pesant un pré-filtre après extrusion d'eau puis à sec après une nuit à l'étuve. La différence de masse de 110 µg environ nous a permis d'estimer à 220 µL environ le volume mort des deux pré-filtres. En raison de l'existence de ce volume mort très important, la perte de la quantité d'ADN présente dans ce volume est incompressible. Si les pré-filtres sont secs avant extrusion, le volume en *TRANS* après extrusion sera inférieur au volume théorique et la concentration en ADNp sera plus faible ; si les pré-filtres sont immergés dans le solvant d'extrusion avant l'extrusion, le volume mesuré en *TRANS* après l'extrusion sera plus proche du volume théorique mais la solution finale en ADNp sera diluée en raison du volume de solvant contenu dans les pré-filtres avant extrusion. Les extrusions FE2, FE3 et FE7 (et FE7bis) ont été faites en utilisant des membranes ayant des pores de 30 nm de diamètre et avec un $V_{CIS,i}$ respectivement de 250, 500 et 750 µL. On note que plus $V_{CIS,i}$ est grand, plus la concentration effective du compartiment *TRANS* après extrusion s'approche de la concentration théorique (≈ 0,5 $mg.mL^{-1}$).

2. Variation du diamètre des pores de la membrane

Les extrusions FE5, FE3 et FE4 ont été faites avec $V_{CIS,i}$ fixé à 500 µL et une membrane avec des pores de diamètre respectivement de 15 nm, 30 nm et 100 nm.

Avec des pores de diamètre 15 nm (FE5), la quantité d'ADN récupérée mesurée par nanodrop en *TRANS* après extrusion est très faible. L'extrusion est renouvelée deux fois dans les mêmes conditions (FE5bis et FE5ter). La quantité d'ADN en *TRANS* est de 66 µg en

moyenne, soit 2,5 fois moins environ que lors de l'utilisation des pores de 30 ou 100 nm. Les pores de 15 nm de diamètre ne semblent donc pas laisser passer l'ADN D3159. Bien que ce résultat soit inattendu, nous avons décidé de ne plus utiliser ce diamètre de pores dans la suite des expériences.

En diminuant la viscosité du compartiment *CIS* (eau pure) par rapport à celle du compartiment *TRANS* (5% de glucose) dans l'extrusion FE6, le volume de solution récupéré en *TRANS* après extrusion et la concentration en ADN sont un peu plus élevés que dans le cas de la manip FE5 faite avec 5% glucose en *CIS* et en *TRANS.*

Nous avons observé dans cette partie qu'il est possible d'extruder de l'ADN de volume hydrodynamique élevé à travers des pores de 30 à 100 nm. Par contre, les nanopores de 15 nm ne conviennent pas à ce type de formulation. La nécessité d'appliquer une pression élevée rend obligatoire l'utilisation de préfiltres qui conduit à des zones de volumes morts, ce qui est un facteur potentiel de perte de copies de plasmide durant la formulation. Il conviendra d'être vigilant sur ce point dans la suite des expériences, en travaillant sur de grands volumes d'ADN en *CIS* de façon à garder des concentrations en ADN élevées après extrusion.

III. Extrusion d'une solution de pTG11033 vers une solution de polymère : premiers résultats

Nous nous intéressons dans cette partie à formuler par extrusion des polyplexes à partir du plasmide pTG11033. Contrairement aux expériences du Tableau 4.3, les extrusions sont faites ici en imitant les conditions de la formulation standard (cf Partie 1), c'est-à-dire dans l'Hepes 10 mM pH 7,4 et à des concentrations assez faibles ($[ADN]_{CIS,i}$ = 71,4 µg.mL^{-1} pour obtenir une concentration finale en ADNp de 50 µg.mL^{-1}) en appliquant une pression de 2 bars. Le Tableau 4.4 présente les conditions d'extrusion et les résultats obtenus pour les extrusions de solution de pTG11033 dans une solution de PLL112 (PEI en étoile à 4 branches de 25 kg.mol^{-1}). Ce composé a donné les résultats de transfection les plus élevés, et garde un fort potentiel du fait de sa faible toxicité, paramètre important pour les applications visées.

Les extrusions FE20 et FE21 (et FE21bis) sont faites dans les mêmes conditions en faisant varier le diamètre des pores de la membrane de 50 à 100 nm. La concentration d'ADN dans le compartiment *TRANS* après extrusion est comprise entre 35 et 48 µg.mL^{-1}, soit une perte de près de 30% d'ADNp, ce qui reste acceptable pour ce type d'expérience. De plus, d'après les analyses DLS, les polyplexes obtenus ont des diamètres inférieurs à 100 nm (moyenne en nombre) : 69 nm pour FE20 et 82 nm pour FE21 (et FE21bis, extrusion reproductible) (Figure 4.**23**).

Tableau 4.4. Formulations par extrusion

Extrusion N°	***PRE*-extrusion**									***POST*-extrusion**						
	DNA	$[DNA]_i$ (µg.mL^{-1})	$Solvent_{CIS}$	$V_{CIS,i}$ (µL)	Membrane pores D (nm)	Polymer	$[polymer]_i$ (µg.mL^{-1})	$Solvent_{TRANS}$	$V_{TRANS,i}$ (µL)	$[DNA]_{theo\ TRANS,f}$ (µg.mL^{-1})	$[DNA]_{TRANS,f}$ (µg.mL^{-1})[1]	$V_{TRANS,f}$ (µL)	$m_{DNA\ TRANS,f}$ (µg)	D intensité[2] (nm)	Pdi	D nombre[2] (nm)
PLL-FE20	pTG11033	71.4	Hepes 10mM pH7.4	560	50	PLL112	500	Hepes 10mM pH7.4	240	50	35.3	550	19.4	201	0.21	69
PLL-FE21	pTG11033	71.4	Hepes 10mM pH7.4	560	100	PLL112	500	Hepes 10mM pH7.4	240	50	35.4	490	17.3	174	0.24	82
PLL-FE21bis	pTG11033	71.4	Hepes 10mM pH7.4	560	100	PLL112	500	Hepes 10mM pH7.4	240	50	48	600	28.8	205	0.23	82
PLL-FE24	pTG11033	71.4	5% Gluc	560	50	PLL112	500	5% Gluc	240	50	35			245	0.17	157
PLL-FE25	pTG11033	71.4	5% Gluc	560	100	PLL112	500	5% Gluc	240	50	11			1014	0.20	870
PLL-FE22	pTG11033	71.4	Hepes 10mM pH7.4	560	100	PLL130	500	Hepes 10mM pH7.4	240	50	-	500	-	198	0.14	130

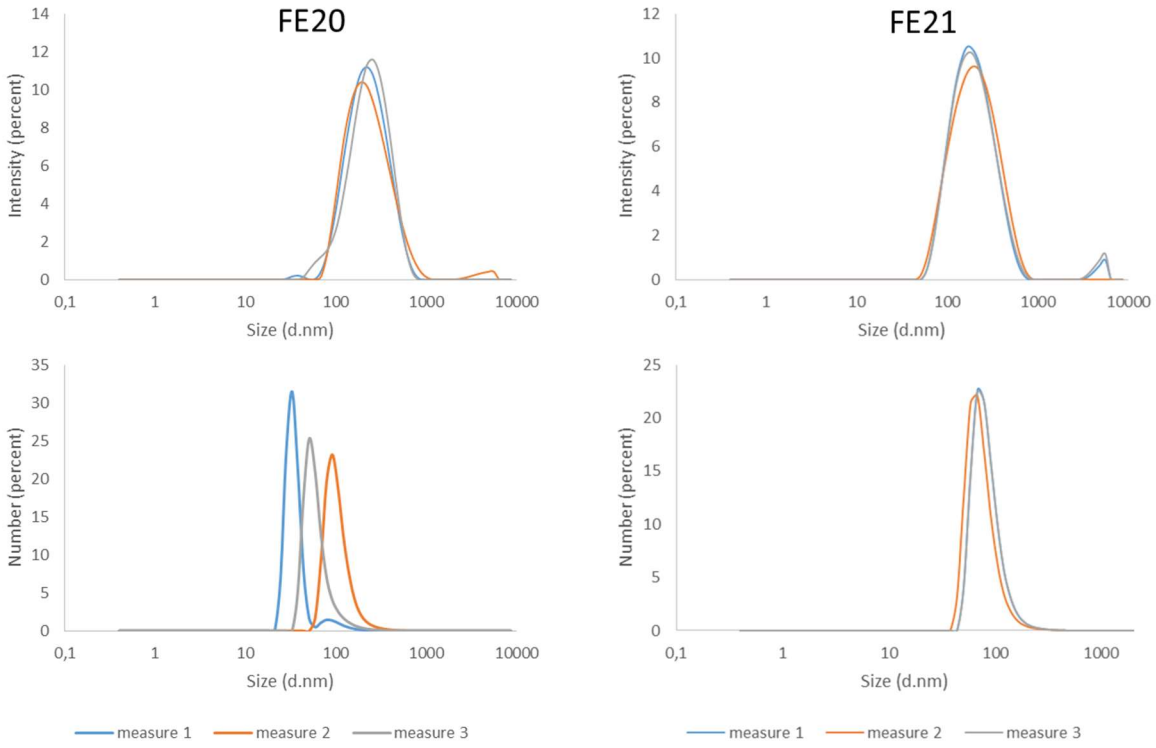


Figure 4.23. Résultats des analyses DLS (distribution en intensité et en nombre) des formulations FE20 et FE21 dans l'HEPES 10 mM pH 7,4

Les expériences de formulation standard conduites dans les mêmes conditions (polymère, concentration, plasmide, WR) ont conduit à la formation de polyplexes de 103 nm. Cette diminution significative des diamètres moyens des polyplexes traduit l'intérêt de revisiter le mode de formulation pour obtenir de faible diamètre de polyplexe. Les valeurs élevées de ces diamètres signifient qu'il y a encore plusieurs copies d'ADNp par polyplexe, cependant ce nombre a été réduit.

Une extrusion (FE22) de pTG11033 dans une solution d'His-PEI en étoile à 4 branches de 25K (PLL130) est faite dans les mêmes conditions que FE21 (PEI sans histidine). En raison de l'absorbance à 260 nm des groupements imidazole des résidus histidine, la concentration en ADNp n'a pas pu être évaluée avec fiabilité pour l'extrusion FE22. Les polyplexes obtenus semblent être bien définis (indice de polydispersité de 0,14) et présentent un diamètre moyen supérieur (130 nm) à ceux des polyplexes obtenus dans les mêmes conditions d'extrusion avec une PEI équivalente (FE21). Comme précédemment, si on compare la taille du polyplexe obtenu par extrusion (130 nm, FE22, Tableau 4.4) à celle du polyplexe obtenu par formulation standard (180 nm, PLL130-plex, Tableau 4.2), nous observons le bénéfice de la formulation par extrusion.

Les formulations extrudées FE21 et FE22 ont été analysées par cryo-MET. Les images obtenues sont présentées à la Figure 4.24. Les polyplexes obtenus par extrusion (FE21) d'une solution de pTG11033 dans une solution de PEI en étoile à 4 branches de 25K (PLL112) ont des tailles variant de 50 à un peu plus de 100 nm. Des stries sont visibles, reflétant une structure très organisée. L'auto-organisation des polyplexes n'est donc pas fonction du mode de formulation, puisque des résultats similaires ont été précédemment présentés dans le cas de formulation standard. Dans le cas des polyplexes obtenus par extrusion (FE22) d'une solution de pTG11033 dans une solution d'His-PEI en étoile à 4 branches de 25K (PLL130), des objets de taille supérieure sont visibles (≈ 130 nm). Il est difficile de conclure de façon certaine, mais il semble qu'une auto-organisation de l'ADNp puisse être détectée. Ces résultats doivent être confirmés par d'autres analyses telles que la diffusion de rayons X aux petits angles par exemple (SAXS).

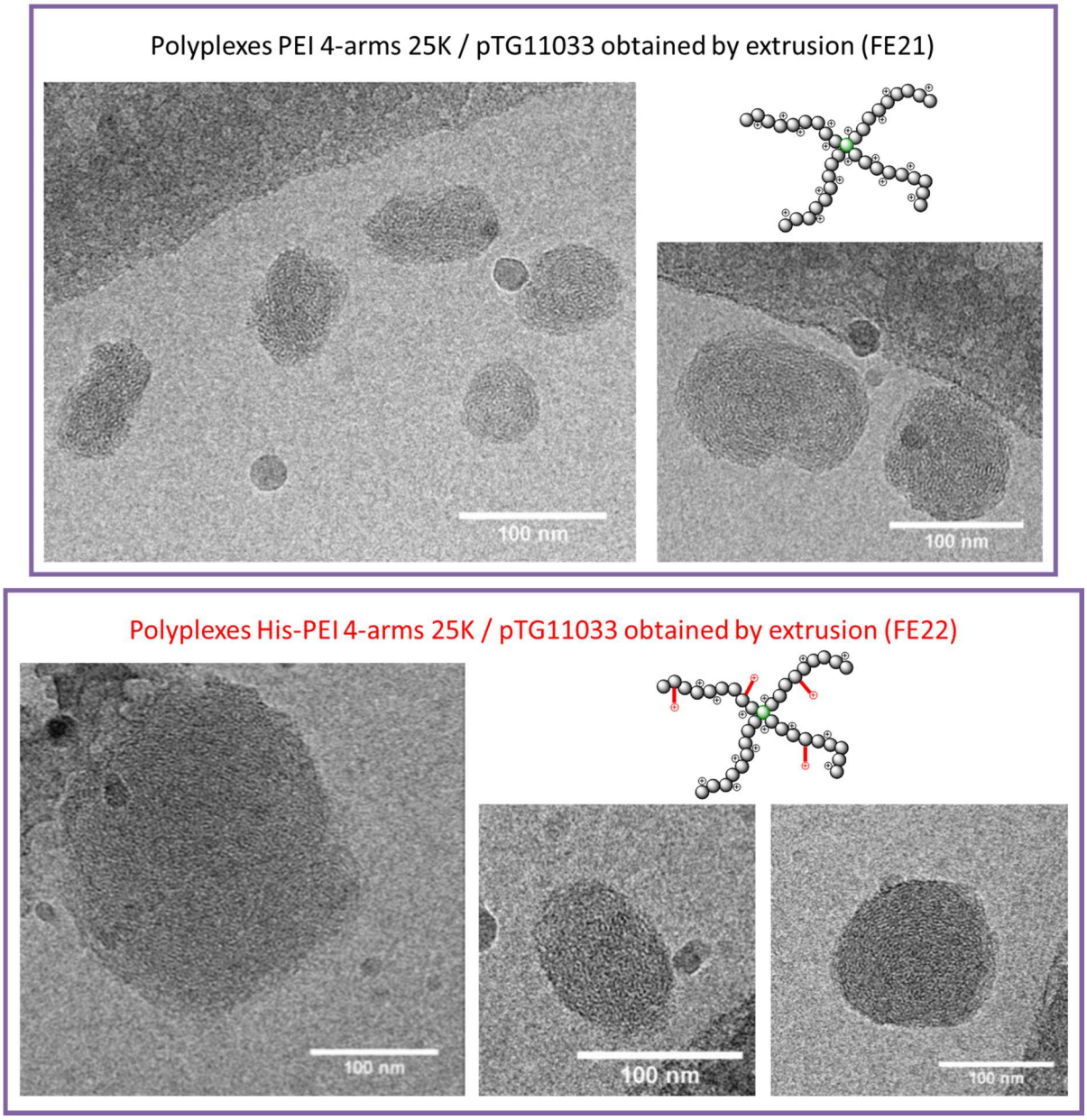


Figure 4.24. Images de cryo-MET obtenus pour les polyplexes polymère/pTG11033 au WR 3/1 obtenus par formulation par extrusion.

Suite à ce résultat encourageant pour les PEI en étoile à 4 branches de 25 K (PLL112), nous avons changé le solvant Hepes contre une solution 5% glucose, compatible avec l'utilisation parentérale chez les souris. Des polyplexes de 157 nm sont obtenus lorsque des pores de 50 nm sont utilisés et des agrégats de plus de 800 nm sont obtenus lorsque des pores de 100 nm sont utilisés. Il semble que ce solvant ne permet pas de maitriser les formulations aussi aisément que lors de l'utilisation de l'HEPES. Il est difficile de proposer une explication indubitable à ce résultat. La théorie stipule que la viscosité ne perturbe pas la translocation

d'ADN à travers un nanopore, ce paramètre devrait donc être exclu. Ajouter un sel d'HEPES dans une solution de polyélectrolyte modifie le comportement de celui-ci. Il est difficile d'anticiper ce comportement lorsque l'ADNp est dans un milieu confiné, le nanopore. Toutefois il convient de rappeler que le sel aura un effet d'écrantage de l'ADNp, qui module son comportement physique.

Suite à ces résultats, une nouvelle extrusion (GWD-F02, Tableau 4.5) est faite dans les conditions de FE21 (*i.e.* dans l'Hepes, avec $[ADN]_{CIS,i}$ = 71,4 µg.mL^{-1} et une membrane de pores 100 nm). Les résultats sont à nouveau reproductibles et des polyplexes de 79 nm sont obtenus. Du glucose est ensuite ajouté, post-extrusion de façon à atteindre une concentration finale en glucose de 5%. Le diamètre des polyplexes est alors mesuré, et atteint tout juste 100 nm. L'augmentation de taille confirme la dynamique des polyplexes, en particulier lorsque les conditions de solvant changent.

Afin d'obtenir des solutions plus concentrées en polyplexes, deux extrusions sont faites en multipliant par 10 les concentrations initiales, en *CIS* et en *TRANS* (GWD-F04 et GWD-F04bis). L'augmentation des concentrations mène à l'agrégation des polyplexes puisque les diamètres obtenus sont de l'ordre du µm. Dans ce cas, l'ajout de glucose post-extrusion semble réduire la taille des objets, qui restent néanmoins beaucoup trop gros pour l'application visée (1500 nm dans un cas et 350 nm dans l'autre cas).

Tableau 4.5. Formulation par extrusion

Extrusion N°	***PRE*-extrusion**									***POST*-extrusion**			
	DNA	$[DNA]_i$ (µg.mL^{-1})	$Solvent_{CIS}$	$V_{CIS,i}$ (µL)	Membrane pores D (nm)	Polymer	$[polymer]_i$ (µg.mL^{-1})	$Solvent_{TRANS}$	$V_{TRANS,i}$ (µL)	$[DNA]_{theo\ TRANS,f}$ (µg.mL^{-1})	D intensité^2 (nm)	Pdi	D nombre^2 (nm)
GWD-F02	pTG11033	71.4	Hepes 10 mM pH7.4	560	100	PLL112	500	Hepes 10 mM pH7.4	240	50	203	0.22	79
	Ajout de glucose post-extrusion										207	0.23	100
GWD-F04	PTG11033	714	Hepes 10 mM pH7.4	560	100	PLL112	5000	Hepes 10 mM pH7.4	240	500	2980	0.22	4377
	Ajout de glucose post-extrusion										5400	0.75	1558
GwD-F04bis	PTG11033	714	Hepes 10 mM pH7.4	560	100	PLL112	5000	Hepes 10 mM pH7.9	240	500	2048	0.38	1188
	Ajout de glucose post-extrusion										761	0.67	357

Nous constatons que l'utilisation de glucose comme solvant perturbe la formulation des polyplexes par rapport aux formulations réalisées dans l'HEPES lorsque la concentration en ADNp est de 71.4 µg.mL^{-1}. Nous avons contourné cet effet par ajout post-formulation de

glucose, et les diamètres moyens des polyplexes sont alors contrôlés (<100nm). Par contre, lorsque l'on formule à des concentrations élevées, nous n'avons pas réussi à éviter le phénomène d'agrégation des polyplexes. Plusieurs pistes restent toutefois à explorer : choix des polymères, modification de WR, cinétique d'extrusion du plasmide. En effet, il a été montré que les cinétiques de condensation de l'ADNp sont des phénomènes lents, et il serait intéressant de ralentir la cinétique d'extrusion au profit de la cinétique de condensation. Le temps imparti pour ce travail ne nous a pas permis de pousser notre réflexion à son terme, mais des travaux ultérieurs seront conduits au laboratoire.

Conclusion

Pour la première fois, la synthèse d'une famille de PEI de masses molaires (8, 16 et 25 K) et d'architectures variables (linéaires, en étoile à 3 et à 4 branches) a été décrite et l'évaluation systématique de l'efficacité de transfection et de la cytotoxicité des polymères a été menée.

Les PEI en étoile transfectent les cellules CFBE et HepG2. L'architecture en étoile a un rôle variable. Dans le cas des faibles masses molaires, les PEI en étoile transfectent peu. En revanche, pour un rapport WR 1/1, les PEI en étoile de 25 $kg.mol^{-1}$ ont des niveaux de transfection équivalents à ceux des polymères linéaires, que leur nombre de branches soit 3 ou 4. Les polymères testés ne présentent globalement pas de cytotoxicité importante.

Dans cette étude, toutes les PEI, linéaires ou en étoile, ont été modifiées avec une quantité de *N*-acryloyl-L-histidine comprise entre 10% et 16%, considérée comme quasi-constante (cf chapitre 3). Une faible différence de complexation de l'ADNp est observée lors des expériences de retard sur gel puisque les PEI complexent l'ADNp dès le WR 0,5/1 tandis qu'un WR 1/1 est nécessaire pour que les His-PEI complexent l'ADNp. Là encore, les polymères en étoile de 25 K sont ceux qui transfectent le mieux, avec une efficacité comparable aux linéaires.

La technique d'extrusion a été étudiée pour explorer les possibilités de synthèse de polyplexes de plus petites tailles et à des concentrations plus élevées. Dans un premier temps, les essais faits dans des conditions équivalentes à la formulation standard (concentration finale en ADNp de 50 $\mu g.mL^{-1}$ ont conduit à des polyplexes de taille inférieure (80 nm environ contre 100 nm environ par formulation standard). Cependant ce travail devra être poursuivi pour obtenir des polyplexes à concentration plus élevée et dans un solvant compatible avec l'utilisation parentérale chez des souris.

L'obtention de polyplexes de taille réduite est très encourageante pour la poursuite de ces études. Une suite logique de cette partie est l'évaluation de propriétés de transfection de ces polyplexes de petites tailles. Le protocole de l'essai de transfection repose sur une étape de sédimentation des polyplexes sur les cellules adhérentes. Un temps de quatre heures est habituellement utilisé. Lorsque les diamètres des polyplexes sont très réduits, la sédimentation n'opère plus et les résultats de transfection sont très faibles[25]. Nous n'avons donc pas mené

d’essais biologiques pour ces différents essais de formulation, qui n’auraient pas eu de sens. Nous poursuivons le travail de concentration des polyplexes dans l’objectif de conduire des essais *in vivo* sur souris, qui permettront, nous l’espérons, d’éviter les phénomènes d’embolie.

Références

(1) Castan, L.; José da Silva, C.; Ferreira Molina, E.; Alves dos Santos, R. Comparative Study of Cytotoxicity and Genotoxicity of Commercial Jeffamines® and Polyethylenimine in CHO-K1 Cells: CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF JEFFAMINES® AND PEI IN CHO-K1 CELLS. *J. Biomed. Mater. Res.* **2018**, *106* (2), 742–750. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33882.

(2) Kafil, V.; Omidi, Y. Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells. *BioImpacts : BI* **2011**, *1*, 23–30. https://doi.org/10.5681/bi.2011.004.

(3) Pandey, A. P.; Sawant, K. K. Polyethylenimine: A Versatile, Multifunctional Non-Viral Vector for Nucleic Acid Delivery. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *68*, 904–918. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.066.

(4) Petersen, H.; Kunath, K.; Martin, A. L.; Stolnik, S.; Roberts, C. J.; Davies, M. C.; Kissel, T. Star-Shaped Poly(Ethylene Glycol)-Block-Polyethylenimine Copolymers Enhance DNA Condensation of Low Molecular Weight Polyethylenimines. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (5), 926–936. https://doi.org/10.1021/bm025539z.

(5) Petersen, H.; Fechner, P. M.; Martin, A. L.; Kunath, K.; Stolnik, S.; Roberts, C. J.; Fischer, D.; Davies, M. C.; Kissel, T. Polyethylenimine-Graft-Poly(Ethylene Glycol) Copolymers: Influence of Copolymer Block Structure on DNA Complexation and Biological Activities as Gene Delivery System. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13* (4), 845–854. https://doi.org/10.1021/bc025529v.

(6) Brissault, B.; Kichler, A.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H.; Gau, J.; Auvray, L.; Guis, C. Synthesis, Characterization, and Gene Transfer Application of Poly(Ethylene Glycol-b-Ethylenimine) with High Molar Mass Polyamine Block. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (10), 2863–2870. https://doi.org/10.1021/bm060499a.

(7) Bertrand, E.; Gonçalves, C.; Billiet, L.; Gomez, J. P.; Pichon, C.; Cheradame, H.; Midoux, P.; Guégan, P. Histidinylated Linear PEI: A New Efficient Non-Toxic Polymer for Gene Transfer. *Chemical Communications* **2011**, *47* (46), 12547. https://doi.org/10.1039/c1cc15716g.

(8) Pichon, C.; Gonçalves, C.; Midoux, P. Histidine-Rich Peptides and Polymers for Nucleic Acids Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *53* (1), 75–94. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00221-6.

(9) Maury, B.; Gonçalves, C.; Tresset, G.; Zeghal, M.; Cheradame, H.; Guégan, P.; Pichon, C.; Midoux, P. Influence of PDNA Availability on Transfection Efficiency of Polyplexes in Non-Proliferative Cells. *Biomaterials* **2014**, *35* (22), 5977–5985. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.007.

(10) Liu, Z.; Zhang, Z.; Zhou, C.; Jiao, Y. Hydrophobic Modifications of Cationic Polymers for Gene Delivery. *Progress in Polymer Science* **2010**, *35* (9), 1144–1162. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.007.

(11) Cortez, M. A.; Godbey, W. T.; Fang, Y.; Payne, M. E.; Cafferty, B. J.; Kosakowska, K. A.; Grayson, S. M. The Synthesis of Cyclic Poly(Ethylene Imine) and Exact Linear Analogues: An Evaluation of Gene Delivery Comparing Polymer Architectures. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (20), 6541–6549. https://doi.org/10.1021/jacs.5b00980.

(12) Synatschke, C. V.; Schallon, A.; Jérôme, V.; Freitag, R.; Müller, A. H. E. Influence of Polymer Architecture and Molecular Weight of Poly(2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate) Polycations on Transfection Efficiency and Cell Viability in Gene Delivery. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 4247–4255. https://doi.org/10.1021/bm201111d.

(13) Wytrwal, M.; Leduc, C.; Sarna, M.; Goncalves, C.; Kepczynski, M.; Midoux, P.; Nowakowska, M.; Pichon, C. Gene Delivery Efficiency and Intracellular Trafficking of Novel Poly(Allylamine) Derivatives. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *478* (1), 372–382. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.053.

(14) Brissault, B.; Leborgne, C.; Guis, C.; Danos, O.; Cheradame, H.; Kichler, A. Linear Topology Confers in Vivo Gene Transfer Activity to Polyethylenimines. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17* (3), 759–765. https://doi.org/10.1021/bc050287v.

(15) Mengarelli, V.; Auvray, L.; Pastré, D.; Zeghal, M. Charge Inversion, Condensation and Decondensation of DNA and Polystyrene Sulfonate by Polyethylenimine. *Eur. Phys. J. E* **2011**, *34* (11), 127. https://doi.org/10.1140/epje/i2011-11127-3.

(16) Pigeon, L.; Gonçalves, C.; Pichon, C.; Midoux, P. Evidence for Plasmid DNA Exchange after Polyplex Mixing. *Soft Matter* **2016**, *12* (33), 7012–7019. https://doi.org/10.1039/c6sm00575f.

(17) Hanzlíková, M.; Ruponen, M.; Galli, E.; Raasmaja, A.; Aseyev, V.; Tenhu, H.; Urtti, A.; Yliperttula, M. Mechanisms of Polyethylenimine-Mediated DNA Delivery: Free Carrier Helps to Overcome the Barrier of Cell-Surface Glycosaminoglycans. *J Gene Med* **2011**, *13* (7–8), 402–409. https://doi.org/10.1002/jgm.1587.

(18) Brissault, B.; Kichler, A.; Guis, C.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H. Synthesis of Linear Polyethylenimine Derivatives for DNA Transfection. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14* (3), 581–587. https://doi.org/10.1021/bc0200529.

(19) Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. Size-Dependent Internalization of Particles via the Pathways of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis. *Biochem J* **2004**, *377* (Pt 1), 159–169. https://doi.org/10.1042/BJ20031253.

(20) Xu, D.-M.; Yao, S.-D.; Liu, Y.-B.; Sheng, K.-L.; Hong, J.; Gong, P.-J.; Dong, L. Size-Dependent Properties of M-PEIs Nanogels for Gene Delivery in Cancer Cells. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 6.

(21) Hou, S.; Ziebacz, N.; Wieczorek, S. A.; Kalwarczyk, E.; Sashuk, V.; Kalwarczyk, T.; Kaminski, T. S.; Holyst, R. Formation and Structure of PEI/DNA Complexes: Quantitative Analysis. *Soft Matter* **2011**, *7* (15), 6967–6972. https://doi.org/10.1039/C1SM05449J.

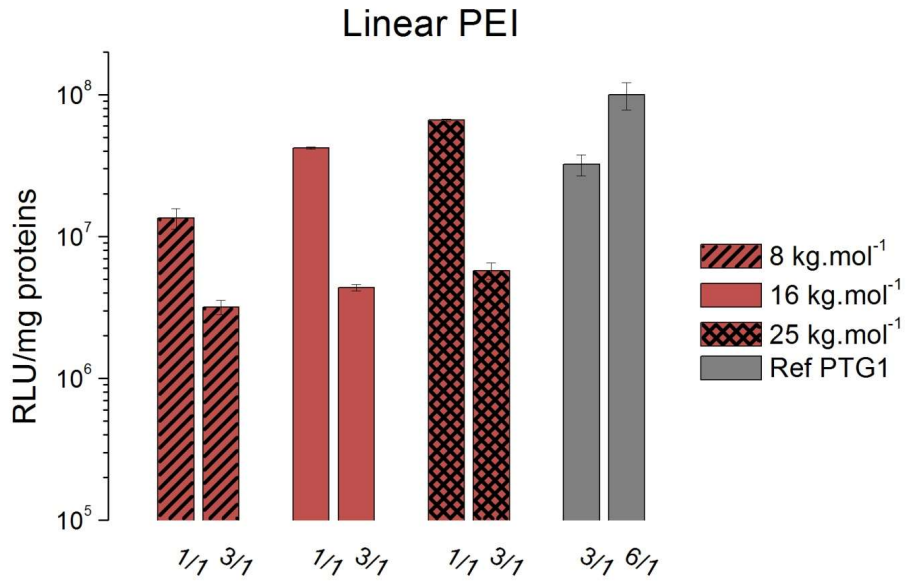
(22) Poupard, N.; Badarou, P.; Fasani, F.; Groult, H.; Bridiau, N.; Sannier, F.; Juchereau, S.; Kieda, C.; Piot, J.-M.; Grillon, C.; et al. Assessment of Heparanase-Mediated Angiogenesis Using Microvascular Endothelial Cells: Identification of λ-Carrageenan Derivative as a Potent Anti Angiogenic Agent. *Marine Drugs* **2017**, *15*, 134. https://doi.org/10.3390/md15050134.

(23) Porsch, B.; Laga, R.; Horský, J.; Koňák, Č.; Ulbrich, K. Molecular Weight and Polydispersity of Calf-Thymus DNA: Static Light-Scattering and Size-Exclusion Chromatography with Dual Detection. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (11), 3148–3150. https://doi.org/10.1021/bm900768j.

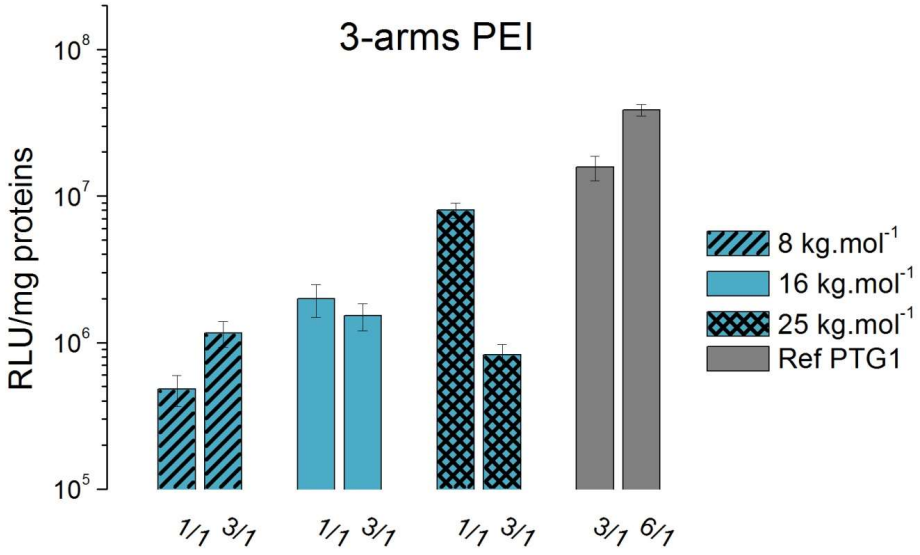
(24) Benaoudia, D. Fonctionnalisation chimique de membranes nanoporeuses pour la mise en oeuvre de filtres commutatifs, Université Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes & Institut Parisien de Chimie Moléculaire, 2018.

(25) Tarnaud, E. Synthèse de vecteurs polymères pour la thérapie génique : construction de polyplexes par extrusion moléculaire, Université d'Evry Val d'Essonne, Laboratoire d'Analyse et de Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, 2013.

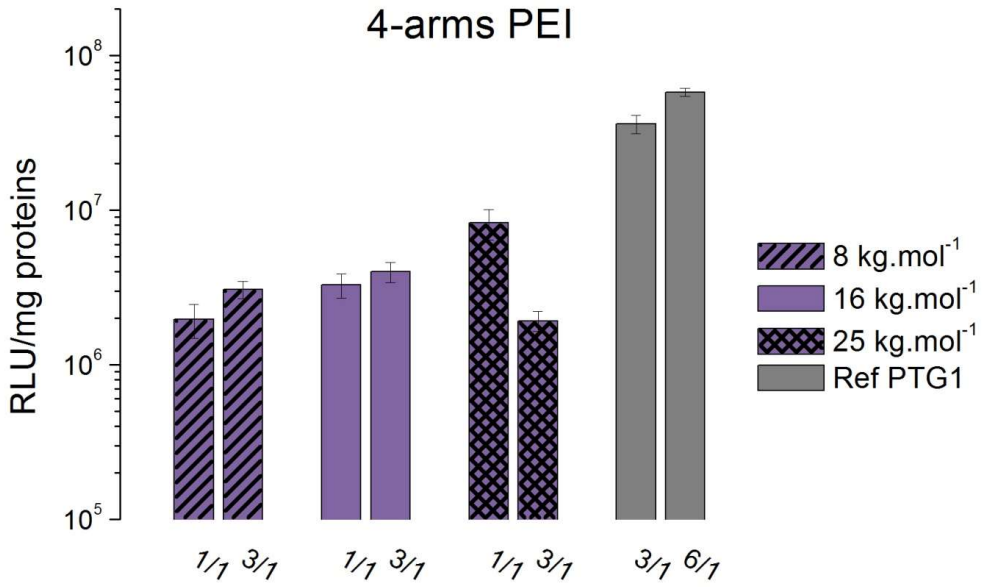
Annexes



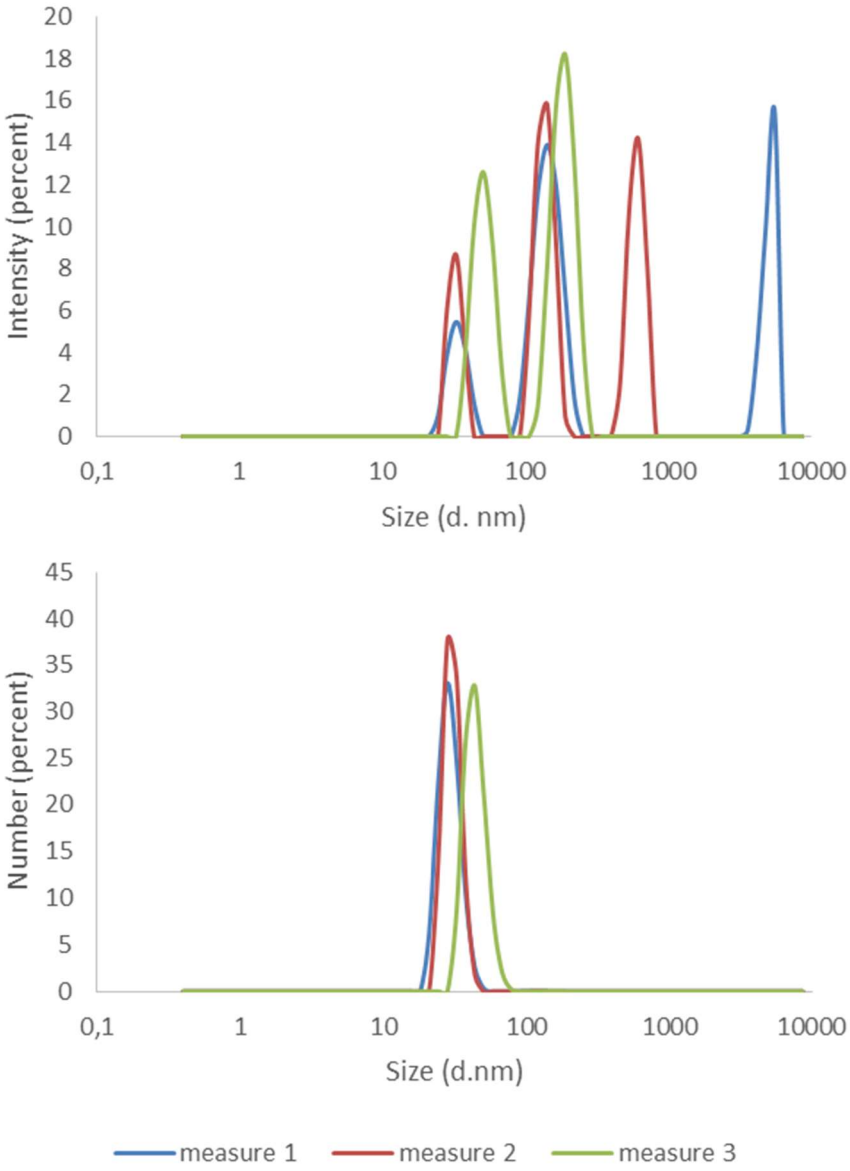
Annexe 4.1. Efficacité de transfection des polyplexes à base de PEI linéaires de 8, 16 et 25 kg.mol^{-1} testés à 2 WR (1/1 et 3/1) sur les cellules HepG2



Annexe 4.2. Efficacité de transfection des polyplexes à base de PEI en étoile à 3 branches de 8, 16 et 25 kg.mol^{-1} testés à 2 WR (1/1 et 3/1) sur les cellules HepG2



Annexe 4.3. Efficacité de transfection des polyplexes à base de PEI en étoile à 4 branches de 8, 16 et 25 kg.mol^{-1} testés à 2 WR (1/1 et 3/1) sur les cellules HepG2



Annexe 4.4. Analyse DLS d'une solution d'ADN de hareng (D3159) à 0,5 mg.mL^{-1} dans 5% glucose

Chapitre 5

Techniques expérimentales

Sommaire

Partie 1 – Méthodes de caractérisation 259

I. Résonnance magnétique nucléaire (RMN) 259

II. Chromatographie d'exclusion stérique (CES) 260

1. CES dans le DMF 260

2. CES dans l'eau 260

III. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) 261

IV. Spectrométrie de masse haute résolution (HRMS-ESI) 261

V. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) 262

VI. Cryo-MET 262

Partie 2 – Protocoles de synthèse 263

I. Réactifs 263

II. Synthèse d'amorceurs multifonctionnels pour la polymérisation de 2-oxazolines 264

1. Synthèse des amorceurs multitosylates 264

a. Pentaérythritol tétratosylate 264
b. Di(triméthylolpropane) tétratosylate 265
c. Dipentaérythritol hexatosylate 265

2. Synthèse des amorceurs multitriflates 266

a. Pentaerythritol tétratriflate 266
b. 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane tristriflate 266
c. Di(triméthylolpropane) tétratriflate 267
d. Dipentaérythritol hexatriflate 268

III. Synthèse de poly(2-oxazoline)s 269

IV. Synthèse de poly(éthylèneimine) 270

1. Hydrolyse basique de PMeOx 270

2. Hydrolyse basique de PEtOx 271

a. En présence de NaOH 271
b. En présence de KOH dans un mélange H_2O/DMSO 271

3. Hydrolyse acide de PEtOx 272

V. Synthèse d'His-PEI 273

4. Synthèse de HNA 273

5. Greffage de résidus histidine sur la PEI 274

Partie 3 – Protocoles de biologie 275

I. Matériel 275

1. Plasmides 275

2. Réactifs et tampons 275

3. Cellules 275

II. Formulation standard des polyplexes 276

III. Mesures de taille et de potentiel ζ des polyplexes 276

IV. Efficacité de transfection 276

V. Cytotoxicité 277

Réferences 278

Partie 1 – Méthodes de caractérisation

I. Résonnance magnétique nucléaire (RMN)

L'institut Parisien de Chimie Moléculaire utilise plusieurs spectromètres RMN appartenant à la plate-forme RMN de la Fédération FR2769. Deux spectromètres 300 MHz Bruker Nanobay et un spectromètre 400 MHz Bruker Nanobay sont accessibles en libre-service dans les locaux de l'IPCM. La plupart des analyses de routine ainsi que les suivis cinétiques par RMN^{1}H sont faits sur ces spectromètres. Pour des analyses plus poussées nécessitant des temps d'analyse plus long (expériences 2D : ^{1}H/^{1}H (COSY) ou ^{1}H/^{13}C (HSQCed)), deux spectromètres (un 400 MHz Bruker Avance I et un 600 MHz Bruker Avance III) sont disponibles sur réservation sur la plateforme. Ces cinq spectromètres sont équipés de passeurs automatiques. Occasionnellement, certaines analyses ont été faites sur un spectromètre 300 MHz Bruker Avance II d'utilisation manuelle. Les six spectromètres du parc sont équipés d'un logiciel d'exploitation TopSpin.

Les solutions à analyser sont préparées avec une vingtaine de mg de produit pour les expériences proton et entre 80 et 120 mg de produit pour les expériences carbone dans environ 0,6 mL de solvant deutéré.

Les analyses 1D sont traitées sur le logiciel MestReNova. Les analyses 2D sont phasées sur le logiciel TopSpin avant d'être traitées elles aussi sur le logiciel MestReNova. Les déplacements chimiques sont exprimés en parties pour million (ppm) et la calibration des spectres est faite sur le signal du solvant utilisé. Les déplacements chimiques des solvants utilisés sont donnés dans le Tableau 5.1.

Tableau 5.1. Déplacements chimiques des solvants deutérés utilisés

	^{1}H		^{13}C	
	Multiplicité	δ (ppm)	Multiplicité	δ (ppm)
Chloroforme ($CDCl_3$)	singulet	7,26	triplet	77,16
Diméthylsulfoxyde (DMSO-D_6)	quintuplet	2,50	septuplet	39,52
Eau (D_2O)	singulet	4,79	-	-
Méthanol (Méthanol-D_4)	quintuplet	3,31	septuplet	49,00

II. Chromatographie d'exclusion stérique (CES)

1. CES dans le DMF

La masse molaire moyenne en nombre (M_n), la masse molaire moyenne en poids (M_w) et la dispersité ($Đ = M_w/M_n$) des polymères synthétisés ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (CES) dans le *N*,*N*-diméthylformamide (DMF) (1 $g.L^{-1}$ LiBr) à 60°C avec un débit de 0,8 $mL.min^{-1}$. L'appareil se compose de deux colonnes PSS GRAM 1000 Å (8×300 mm ; limites de séparation : 1 à 1000 $kg.mol^{-1}$) et une colonne PSS GRAM 30 Å (8×300 mm ; limites de séparation : 0.1 à 10 $kg.mol^{-1}$) couplées à un détecteur d'indice de réfraction différentiel (RI) et à un détecteur UV calibré avec des étalons poly(méthylméthacrylate) (PMMA). Les solutions de polymère préparées à 5 $mg.mL^{-1}$ sont injectées (V = 0,1 mL) après filtration à travers un filtre de porosité 0,2 µm.

2. CES dans l'eau

La masse molaire moyenne en nombre (M_n), la masse molaire moyenne en poids (M_w) et la dispersité ($Đ = M_w/M_n$) des polymères synthétisés ont aussi été déterminées par CES dans une solution aqueuse de $NaNO_3$ 0,2 $mol.L^{-1}$ à 35°C avec un débit de 0,7 $mL.min^{-1}$ en utilisant le système CES Viscotek (Viscotek VE 2001 GPC Solvent - GPC MAX - Sample Module and TDA 302 triple detector array) équipé avec deux colonnes SHODEX OH SB-806M HQ (13 µm, 300 mm × 8 mm). Les solutions de polymères préparées à 4 $mg.mL^{-1}$ sont injectées après filtration à travers une membrane de porosité 0,2 µm. Les masses molaires absolues sont déterminées par 3 détecteurs en série (détecteurs d'indice de réfraction différentiel, viscosimétrique et de diffusion statique de la lumière) s'appuyant sur une calibration faite à partir d'étalons poly(oxyde d'éthylène) ou pullulan.

III. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les expériences de diffusion dynamique de la lumière ont été faites sur deux appareils différents.

Pour les polyplexes préparés par formulation standard, les analyses ont été faites à 25°C sur un SZ-100 Nanopartica (Horiba). Les échantillons sont éclairés par un laser de 10 mW à une longueur d'onde de 532 nm. L'intensité de la lumière diffusée est mesurée à un angle de 90° pour les mesures de diamètres et à un angle de 13° pour les mesures de potentiel zeta. Les valeurs de *z*-average seront discutées.

Pour les polyplexes formulés par extrusion, les mesures de tailles ont été faites à 25°C sur un Nano S90 (Malvern). Les échantillons sont éclairés par un laser de 5 mW à une longueur d'onde de 633 nm. L'intensité de la lumière diffusée est mesurée à un angle de 90°. Les diamètres moyens en nombre et en intensité seront discutés.

IV. Spectrométrie de masse haute résolution (HRMS-ESI)

Les analyses de spectrométrie de masse sont faites par ESI-LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) en mode d'ionisation négatif avec une tension de capillaire de 3,2 kV. Les tensions appliquées étaient de 20 et 70 V, respectivement, pour le capillaire de transfert d'ions et la lentille du tube. Le capillaire de transfert a été maintenu à 275°C. La détection a été réalisée dans l'Orbitrap avec une résolution réglée à 100000 (au m/z 400) et une gamme de m/z comprise entre 200 et 4000 en mode profil. Les spectres ont été analysés à l'aide du logiciel d'acquisition XCalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Le contrôle automatique de gain (AGC) a permis d'accumuler jusqu'à 2.10^5 ions pour les balayages FTMS, le temps d'injection maximum a été réglé à 300 ms avec 1 µscan. 10 µL ont été injectés à l'aide d'un système HPLC Thermo Finnigan Surveyor (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) avec une infusion en continue de méthanol à 100 $\mu L.min^{-1}$.

V. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les analyses DSC des polymères ont été faites en utilisant un calorimètre différentiel à balayage Q2000 (TA Instruments). Les polymères (5-10 mg) sont introduits dans des capsules scellées en aluminium. Les polymères sont chauffés de 25°C à 200°C à 20°C.min^{-1}, puis refroidis à -80°C à 50°C min^{-1}. Les chauffages et les refroidissements suivants sont effectués à 10°C.min^{-1}, avec une isotherme de 2 min à la fin de chaque chauffage et de chaque refroidissement. La température de transition vitreuse (T_g) et la température de fusion (T_f) ont été mesurées lors du dernier chauffage.

VI. Cryo-MET

Les polyplexes ont été analysés par cryo-microscopie électronique à balayage. 3 µL de solution d'échantillon ont été déposés sur une grille de carbone trouée (Quantifoil R2/2), préalablement ionisée par décharge luminescente. L'excès de solution a été absorbé avec un papier filtre puis la grille a été plongée directement dans de l'éthane liquide refroidi à l'azote liquide avec un Vitrobot FEI. Les grilles ont été stockées dans de l'azote liquide jusqu'à leur utilisation. Les échantillons congelés ont été transférés dans un cryo-support Gatan 626 et observés à -180°C à l'aide d'un microscope JEOL JEM-2010 équipé d'un canon à émission de champ à 200 kV. Les échantillons ont été imagés avec un grossissement de 50 000 en utilisant un système de dose minimale et les images ont été recueillies avec une caméra CCD Gatan Ultrascan 4K à 1,5 et 2 µm de défocalisation.

Partie 2 – Protocoles de synthèse

I. Réactifs

Les réactifs utilisés sont répertoriés dans le Tableau 5.2. La 2-méthyl-2-oxazoline (MeOx), la 2-éthyl-2-oxazoline (EtOx) et le bromure d'allyle sont séchés sur CaH_2 sous vide pendant au moins 24h et cryodistillés avant d'être utilisés. Les agents de terminaison (aniline, pipéridine et morpholine) sont stockés sur du tamis moléculaire 3 Å préalablement activé par un chauffage à 150°C sous vide pendant 5h.

Tableau 5.2. Réactifs utilisés

Nom	Pureté (%)	Provenance	Masse molaire (g/mol)	densité à 25°C (g/mL)
1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane	≥ 98	Sigma-Aldrich	516,33	-
1,4-benzenediméthanol	99	Aldrich	138,16	-
1-phénylpipérazine	99	Aldrich	162,23	1,062
2-éthyl-2-oxazoline	≥ 99	Sigma-Aldrich	99,13	0,982
2-méthyl-2-oxazoline	98	Sigma-Aldrich	85,10	1,005
Anhydride triflique	≥ 99	Sigma-Aldrich	282,14	1,677
Aniline	≥ 99,5	Sigma-Aldrich	93,13	1,022
Bromure d'allyle	99	Acros Organics	120,98	1,398
Calix[4]arène	98	Alfa Aesar	424,50	-
Chlorure d'acryloyle	96	Alfa Aesar	90,51	1,114
Chlorure de mésyle	99,5	Acros Organics	114,55	1,48
Chlorure de tosyle	90	Alfa Aesar	190,65	-
Di(triméthylolpropane)	97	Sigma-Aldrich	250,33	-
Dipentaérythritol	90	Acros Organics	254,28	-
L-histidine	> 99	Sigma-Aldrich	155,15	-
Morpholine	99	ABCR	87,12	1,007
n-butylamine	> 99	Acros Organics	73,13	0,740
N,*N*,*N*',*N*'-tétrakis(2-hydroxyéthyl)éthylènediamine	technical grade	Sigma-Aldrich	236,31	1,1

Nom	Pureté (%)	Provenance	Masse molaire (g/mol)	densité à 25°C (g/mL)
Pentaérythritol	> 99	Sigma-Aldrich	136,15	-
Pipéridine	99	Acros Organics	85,15	0,862
Pyridine anhydre	99,8	Sigma-Aldrich	79,10	0,978
Triéthylamine	99	Alfa Aesar	101,19	0,726

II. Synthèse d'amorceurs multifonctionnels pour la polymérisation de 2-oxazolines

1. Synthèse des amorceurs multitosylates

a. Pentaérythritol tétratosylate

Dans un ballon de 100 mL, 1,36 g (10 mmol, 0,50 mol.L^{-1}) de pentaerythritol est dilué dans 20 mL de pyridine anhydre et refroidi à 0°C. Par la suite, 9,53 g (50 mmol, 2,50 mol.L^{-1}, 1,25 éq par fonction alcool) de chlorure de tosyle (solide blanc) sont ajoutés à la spatule, gramme par gramme. Le milieu réactionnel se colore en jaune. Le milieu réactionnel est agité pendant 16h en laissant la température remonter progressivement jusqu'à température ambiante. Le milieu réactionnel blanchâtre et opaque est ensuite versé dans un bécher contenant 125 mL de HCl 6M. Le précipité blanc formé, plutôt poudreux, est récupéré par filtration sur papier filtre et replacé dans le bécher pour être lavé à l'eau distillée (2×100 mL). Le précipité est recristallisé dans un mélange éthanol/acétone (100 mL/100 mL). Le mélange est chauffé sous agitation jusqu'à obtenir solubilisation du précipité puis le mélange est laissé à refroidir jusqu'à 20°C puis 1 nuit à -15°C. Une poudre blanche est obtenue et séchée à l'étuve.

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7,65 (d, 8H, Ar-*H*), 7,46 (d, 8H, Ar-*H*), 3,81 (s, 8H, CH_2-OTs), 2,43 (s, 12H, CH_3-Ar).

b. Di(triméthylolpropane) tétratosylate

Dans un ballon de 100 mL, 2,5 g (10 mmol, 0,50 mol.L^{-1}) de di(triméthylolpropane) sont dilués dans 20 mL de pyridine anhydre et refroidis à 0°C. Par la suite, 9,53 g (50 mmol, 2,50 mol.L^{-1}) de chlorure de tosyle (solide blanc) sont ajoutés à la spatule, gramme par gramme. Le milieu réactionnel jaune est agité pendant 20h en laissant la température remonter progressivement jusqu'à température ambiante. Le milieu réactionnel blanchâtre et opaque est ensuite versé dans un bécher contenant 125 mL de HCl 6M. Le précipité blanc, pâteux et collant est récupéré et lavé à l'eau distillée. Puis le produit est repris dans 60 mL de dichlorométhane et lavé avec 10 fois 15 mL d'eau distillée. Le solvant est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif et le produit est séché à l'étuve sous vide à 40°C. Le produit est un solide huileux incolore.

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7,71 (d, 8H, Ar-*H*), 7,46 (d, 8H, Ar-*H*), 3,67 (s, 8H, C*H*$_2$-OTs), 2,95 (s, 4H, C-C*H*$_2$-O), 2,41 (s, 12H, C*H*$_3$-Ar), 1,07 (q, 4H, C-C*H*$_2$-CH$_3$), 0,51 (t, 6H, C-CH$_2$-C*H*$_3$).

c. Dipentaérythritol hexatosylate

Dans un ballon de 100 mL, 2,54 g (10 mmol, 0,49 mol.L^{-1}) de dipentaérythritol sont dilués dans 20 mL de pyridine anhydre et refroidis à 0°C. Par la suite, 14,3 g (75 mmol, 3,74 mol.L^{-1}, 1,25 éq par fonction alcool) de chlorure de tosyle (solide blanc) sont ajoutés à la spatule, gramme par gramme. Le milieu réactionnel se colore en jaune. Celui-ci est agité pendant 20h en laissant la température remonter progressivement jusqu'à température ambiante. Le milieu réactionnel blanchâtre et opaque est ensuite versé dans un bécher contenant 125 mL de HCl 6M. Le précipité blanc, pâteux et collant formé est récupéré et lavé à l'eau distillé (2×100 mL). Le précipité est ensuite recristallisé dans un mélange éthanol/acétone (250 mL/250 mL). Le mélange est chauffé sous agitation jusqu'à dissolution du précipité puis le mélange est laissé à refroidir jusqu'à 20°C puis 1 nuit à -15°C. Une poudre blanche est obtenue, puis séchée à l'étuve sous vide à 35°C. Les résidus d'éthanol et d'acétone sont éliminés par entrainement au dichlorométhane.

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7,67 (d, 12H, Ar-*H*), 7,45 (d, 12H, Ar-*H*), 3,73 (s, 12H, C*H*$_2$-OTs), 3,01 (s, 4H, C-C*H*$_2$-O), 2,41 (s, 18H, C*H*$_3$-Ar). HRMS (ESI, [M+Na]$^{+}$) pour dipentaerythritol hexatosylate : $C_{40}H_{50}O_{13}S_4Na$, calculé : 889,2026, expérimental : 889,2049

2. Synthèse des amorceurs multitriflates

a. Pentaerythritol tétratriflate

505 mg (3,7 mmol, 0,39 mol.L^{-1}) de pentaérythritol (solide blanc) sont pesés dans un ballon de 100 mL. Le ballon est placé sous atmosphère inerte (ballon de baudruche avec argon), puis 4 mL d'acétonitrile préalablement séché sur CaH_2 et 2,5 mL de pyridine sont ajoutés. Une ampoule de 5g d'anhydride triflique est ensuite cassée (atmosphère ambiante), le contenu est rapidement prélevé à l'aide d'une seringue et injecté à travers un septum dans le ballon réactionnel. L'anhydride triflique est alors ajouté très lentement (sur une durée de 30 minutes) à 0°C, provoquant l'apparition de fumées blanches. A la fin de l'ajout, le milieu est orange. Celui-ci est agité pendant 3h à température ambiante. 20 mL de HCl 1M sont ensuite ajoutés. Après 20 minutes sous agitation dans un bain de glace, un solide jaune est obtenu par filtration (sur entonnoir et papier filtre). Une « recristallisation » (pas de dissolution complète du solide) dans un mélange eau/acétonitrile (100 mL / 100 mL) est ensuite menée. Après filtration et évaporation des solvants à l'évaporateur rotatif, 0,54 g (22% de rendement) de solide blanc est obtenu.

RMN ^{1}H (400 MHz, acétone-d_6): δ (ppm) = 5,17 (s, 8H, CH_2-OTf)
RMN ^{13}C (400 MHz, acétone-d_6): δ (ppm) = 119,47 (q, J = 319 Hz, CF_3), 72,40 (s, CH_2-OTf), 45,66 (C-CH_2).
HRMS (ESI, $[M+Na]^+$) pour I_4 : $C_{14}H_{28}N_2O_4S_4Na$, calculé : 686,8599, expérimental : 686,8606

b. 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane tristriflate

591 mg (4,9 mmol, 0,52 mol.L^{-1}) de 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane (solide blanc) sont pesés dans un ballon de 100 mL. Le ballon est placé sous atmosphère inerte (ballon de baudruche avec argon). 4 mL d'acétonitrile préalablement séché sur CaH_2 puis 2,5 mL de pyridine sont ensuite ajoutés. Une ampoule de 5g d'anhydride triflique est cassée (atmosphère ambiante), le contenu est rapidement prélevé à l'aide d'une seringue et injecté à travers un septum dans le ballon réactionnel. L'anhydride triflique est alors ajouté très lentement (sur une durée de 30 minutes) à 0°C, provoquant l'apparition de fumées blanches. Le milieu réactionnel se teinte progressivement de jaune à orange de plus en plus foncé. Celui-ci est agité pendant 3h à température ambiante. 20 mL de HCl 1M sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel orangé. Après 20 minutes sous agitation dans un bain de glace, une huile marron-rouge est obtenue au

fond du ballon et est séparée du reste du milieu via une ampoule à décanter. Après évaporation des solvants à l'évaporateur rotatif, 2,42 g (95% de rendement) de solide orange sont obtenus.

RMN ^{1}H (400 MHz, acétone-d_6): δ (ppm) = 4,92 (s, 6H, CH_2-OTf), 1,40 (s, 3H, CH_3-C)
RMN ^{13}C (400 MHz, acétone-d_6): δ (ppm) = 119,55 (q, J = 319 Hz, CF$_3$), 76,92 (s, CH$_2$-OTf), 41,48 (C-CH$_2$-OTf), 15,50 (CH$_3$-C).
HRMS (ESI, [M+Na]$^+$) pour I_3 : $C_8H_9F_9O_9S_3Na$, calculé : 538,9157, expérimental : 538,9161

c. Di(triméthylolpropane) tétratriflate

924 mg (3,7 mmol, 0,39 mol.L^{-1}) de di(triméthylolpropane) (solide blanc) sont pesés dans un ballon de 100 mL. Le ballon est placé sous atmosphère inerte (ballon de baudruche avec argon). 4 mL d'acétonitrile préalablement séché sur CaH_2 puis 2,5 mL de pyridine sont ensuite ajoutés. Une ampoule de 5g d'anhydride triflique est cassée (atmosphère ambiante), le contenu est rapidement prélevé à l'aide d'une seringue et injecté à travers un septum dans le ballon réactionnel. L'anhydride triflique est alors ajouté très lentement (sur une durée de 30 minutes) à 0°C, provoquant l'apparition de fumées blanches. Le milieu réactionnel se teinte progressivement de rose vif à rouge de plus en plus foncé. Celui-ci est agité pendant 3h à température ambiante. 20 mL de HCl 1M sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel rouge. Après 20 minutes sous agitation dans un bain de glace, une huile rouge foncée est obtenue au fond du ballon et est séparée du reste du milieu via une ampoule à décanter. Après évaporation des solvants à l'évaporateur rotatif puis à l'étuve sous vide pendant 6h à température ambiante, 2,9 g (100% de rendement) de solide rouge sont obtenus. Des traces de pyridine sont toujours présentes.

RMN ^{1}H (400 MHz, acétone-d_6): δ (ppm) = 4,80 (s, 8H, CH_2-OTf), 3,67 (s, 4H, CH_2-O), 1,70 (q, 4H, C-CH_2-CH$_3$) 1,03 (t, 6H, C-CH$_2$-CH_3)
RMN ^{13}C (400 MHz, acétone-d_6): δ (ppm) = 119,53 (q, J = 319 Hz, CF$_3$), 77,22 (s, CH$_2$-OTf), 69,96 (s, O-CH$_2$), 44,20 (C-CH$_2$-OTf), 22,60 (s, C-CH$_2$-CH$_3$), 7,22 (C-CH$_2$-CH$_3$)
HRMS (ESI, [M+Na]$^+$) pour I_{e4} : $C_{16}H_{22}F_{12}O_{13}S_4Na$, calculé : 800,9644, expérimental : 800,9667

d. Dipentaérythritol hexatriflate

626,6 mg (2,4 mmol, 0,26 mol.L^{-1}) de dipentaérythritol (solide blanc) sont pesés dans un ballon de 100 mL. Le ballon est placé sous atmosphère inerte (ballon de baudruche avec argon). 4 mL d'acétonitrile préalablement séché sur CaH_2 puis 2,5 mL de pyridine sont ensuite ajoutés. Une ampoule de 5g d'anhydride triflique est cassée (atmosphère ambiante), le contenu est rapidement prélevé à l'aide d'une seringue et injecté à travers un septum dans le ballon réactionnel. L'anhydride triflique est alors ajouté très lentement (sur une durée de 30 minutes) à 0°C, provoquant l'apparition de fumées blanches. Le milieu réactionnel se teinte progressivement en orange de plus en plus foncé. Celui-ci est agité pendant 3h à température ambiante. 20 mL de HCl 1M sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel orangé. Après 20 minutes sous agitation dans un bain de glace, un solide orange est obtenu par filtration (sur entonnoir et papier filtre). Une « recristallisation » dans un mélange eau/acétonitrile (100 mL / 100 mL) est ensuite menée. En chauffant, le solide ne se solubilise pas mais devient une huile orange. Après 24h à 4°C, l'huile orange dense au fond du bécher est séparée du reste des solvants via une ampoule à décanter puis séchée. Après séchage à l'évaporateur rotatif, 756 mg (29% de rendement) de solide orange sont obtenus.

RMN ^{1}H (400 MHz, acétone-d_6): δ (ppm) = 5,06 (s, 12H, CH_2-OTf), 4,00 (s, 4H, CH_2-O).
RMN ^{13}C (400 MHz, acétone-d_6): δ (ppm) = 119,47 (q, J = 319 Hz, CF_3), 74,19 (s, CH_2-OTf), 68,44 (s, O-CH_2), 45,79 (C-CH_2-OTf).
HRMS (ESI, $[M+Na]^+$) pour I_{e6} : $C_{16}H_{16}F_{18}O_{19}S_6Na$, calculé : 1068,8215, expérimental : 1068,8257

III. Synthèse de poly(2-oxazoline)s

Les polymérisations de MeOx et d'EtOx ont été faites dans de l'acétonitrile préalablement séché sur CaH_2, à 80°C, dans un réacteur de 100 mL flammé sous vide avant utilisation.

(Exemple PLL108)

159 mg de I_3 ($3{,}08.10^{-4}$ mol) sont séchés sur la rampe à vide la nuit précédant la polymérisation puis solubilisés dans 10,7 mL d'ACN anhydre dans la boîte à gants. Cette solution et 5,8 mL d'EtOx ($5{,}75.10^{-2}$ mol, 187 éq, $[EtOx]_0 = 3{,}5$ mol.L^{-1}) sont successivement introduits dans le réacteur. Celui-ci est ensuite chauffé à 80°C à l'extérieur de la boite à gants pendant le temps requis. A la fin de la polymérisation, une fois le réacteur revenu à température ambiante (T.A.), 10 équivalents de morpholine sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 5 jours sous agitation à T.A., un échantillon du milieu réactionnel est prélevé et analysé par RMN ^1H pour calculer la conversion atteinte. Après évaporation du solvant et séchage du polymère à l'étuve sous vide à 50°C pendant 1 nuit, le polymère brut est purifié par dialyse contre l'eau en utilisant une membrane en cellulose régénérée de cut-off 1 kDa (spectra/pore®). L'eau extérieure est changée au bout de 1h, 2h, 17h soit un temps total de 24h. Le polymère dialysé est ensuite lyophilisé avant d'être analysé.

Les variantes à ce protocole ($X_{n\ visé}$, agent de terminaison, solvant de dialyse etc…) sont données dans les tableaux de résultats du chapitre 3.

Les études cinétiques des polymérisations de MeOx ou d'EtOx sont menées de la même façon, en utilisant un réacteur de 100 mL équipé d'un septum. Des échantillons de milieu réactionnel sont prélevés à différents temps à l'aide d'une seringue et d'une aiguille et ajoutés à un pilulier contenant un excès d'agent de terminaison (aniline ou morpholine). Après cela, les échantillons sont analysés par RMN ^1H pour déterminer la conversion en monomère (sauf dans le cas des études cinétiques de la polymérisation d'EtOx à partir des amorceurs I_3, I_{e4} and I_{e6} au ratio $[EtOx]_0/[I]_0 = 188$, où les échantillons sont analysés avant d'être mis en contact avec l'agent de terminaison). Les échantillons sont ensuite séchés et analysés par CES dans le DMF.

IV. Synthèse de poly(éthylèneimine)

1. Hydrolyse basique de PMeOx

(Exemple PLL96H2)

1,08 g de PMeOx PLL93D (solide orange) ($1{,}27.10^{-2}$ mol de motifs, [motifs] = 1,0 mol.L^{-1}) est solubilisé dans 12 mL d'eau distillée dans un ballon de 25 mL. 1,99 g de NaOH (pastilles) ($5{,}0.10^{-2}$ mol, 3,9 éq/motif) est ajouté. Après dissolution des pastilles de NaOH, le ballon est chauffé pendant 95h à reflux. Après retour à température ambiante, le produit est purifié par dialyse contre l'eau (le milieu réactionnel hétérogène est placé dans la membrane de dialyse). L'eau extérieure est changée à de nombreuses reprises (à chaque fois que son pH devient trop basique), jusqu'à ce que les pH de l'eau extérieure et de l'eau intérieure soient neutres. Le contenu du boudin de dialyse (solution opaque avec solide orange) est transvasé dans un ballon et lyophilisé. Le produit obtenu est analysé par RMN ^{1}H dans le méthanol-D_4 (analyse non représentative de l'échantillon car le produit n'est que partiellement soluble). Le taux d'hydrolyse estimé n'étant pas de 100% (96%), l'hydrolyse est réitérée dans les mêmes conditions, c'est-à-dire en considérant que le polymère n'a pas été hydrolysé.
681 mg de PLL96H ($8{,}0.10^{-3}$ mol de motifs en considérant 100% de motifs EtOx, [motifs] = 0,8 mol.L^{-1}) sont solubilisés dans 10 mL d'eau distillée dans un ballon de 25 mL. 1,36 g de NaOH (pastilles) ($3{,}4.10^{-2}$ mol, 4,2 éq/motif) est ajouté. Après dissolution des pastilles de NaOH, le ballon est chauffé pendant 88h à reflux. Après retour à température ambiante, le produit est purifié par dialyse contre l'eau (le milieu réactionnel hétérogène est placé dans la membrane de dialyse). L'eau extérieure est changée à de nombreuses reprises (à chaque fois que son pH devient trop basique), jusqu'à ce que les pH de l'eau extérieure et de l'eau intérieure soient neutres. Le contenu du boudin (solution opaque avec solide orange) est transvasé dans un ballon et lyophilisé. Le produit obtenu (m = 766 mg) est analysé par RMN ^{1}H dans le méthanol-D_4 (analyse non représentative de l'échantillon car le produit n'est que partiellement soluble) et le pourcentage d'hydrolyse est estimé à 100%.

2. Hydrolyse basique de PEtOx

a. En présence de NaOH

(Exemple PLL89)

1,23 g de PEtOx PLL84D ($1{,}24.10^{-2}$ mol de motifs, [motifs] = 0,8 mol.L^{-1}) est solubilisé dans 15,5 mL d'eau distillée dans un ballon de 100 mL.
2,48 g de NaOH (pastilles) ($6{,}2.10^{-2}$ mol, 5 éq/motif) sont ajoutés. Après dissolution des pastilles de NaOH, le ballon est chauffé pendant 142h à 65°C. Après retour à température ambiante, le produit est purifié par dialyse contre l'eau. L'eau extérieure est changée à de nombreuses reprises (à chaque fois que son pH devient trop basique), jusqu'à ce que les pH de l'eau extérieure et de l'eau intérieure soient neutres. Le contenu du boudin de dialyse (solution limpide jaune) est transvasé dans un ballon et lyophilisé. Le produit obtenu est analysé par RMN ^{1}H dans le méthanol-D_4 (soluble) et le pourcentage d'hydrolyse est estimé à 0%.

b. En présence de KOH dans un mélange H_2O/DMSO

Exemple PLL95H2

877 mg de PEtOx PLL85D ($8{,}8.10^{-3}$ mol de motifs, [motifs] = 0,8 mol.L^{-1}) sont mis en suspension dans 4 mL de DMSO dans un ballon de 100 mL (polymère pas parfaitement soluble). 7,6 mL de solution aqueuse de KOH 10 mol.L^{-1} ($7{,}6.10^{-2}$ mol, 8,6 éq/motif) sont ajoutés. Le ballon est chauffé pendant 110h (4,5 jours) à reflux. A la fin, deux phases sont observables : la plus dense est grise, opaque et la phase supérieure est limpide jaune. Après retour à température ambiante, le produit est purifié par dialyse contre l'eau (la totalité du milieu réactionnel est prélevée à la pipette pasteur et introduite dans la membrane de dialyse). L'eau extérieure est changée à de nombreuses reprises (à chaque fois que son pH devient trop basique), jusqu'à ce que les pH de l'eau extérieure et de l'eau intérieure soient neutres. Le contenu du boudin de dialyse est transvasé dans un ballon et lyophilisé. Le produit obtenu est analysé par RMN ^{1}H dans le méthanol-D_4 (analyse non représentative de l'échantillon car le produit n'est que partiellement soluble). Le taux d'hydrolyse estimé n'étant pas de 100% (52%), l'hydrolyse est réitérée dans les mêmes conditions, c'est-à-dire en considérant que le polymère n'a pas été hydrolysé. 763 mg du produit PLL95H ($7{,}7.10^{-3}$ mol de motifs en considérant 100% de motifs EtOx, [motifs] = 0,6 mol.L^{-1}) sont repris dans 4 mL de DMSO et 9 mL de solution

aqueuse de KOH 10 mol.L^{-1} (9,0.10^{-2} mol, 11,7 éq/motif). Le ballon est chauffé pendant 110h (4,5 jours) à reflux. Après retour à température ambiante, le produit est purifié par dialyse contre l'eau (le milieu réactionnel est prélevé à la pipette pasteur et introduit dans la membrane de dialyse). L'eau extérieure est changée à de nombreuses reprises (à chaque fois que son pH devient trop basique), jusqu'à ce que les pH de l'eau extérieure et de l'eau intérieure soient neutres. Le contenu du boudin de dialyse est transvasé dans un ballon et lyophilisé. Le produit obtenu est analysé par RMN ^{1}H dans le méthanol-D_4 (analyse non représentative de l'échantillon car le produit n'est que partiellement soluble). Le pourcentage d'hydrolyse est estimé à 100%.

3. Hydrolyse acide de PEtOx

Exemple PLL100

Dans un ballon de 100 mL équipé d'un réfrigérant, 1,61 g de poly(2-éthyl-2-oxazoline) PLL85D (1,6.10^{-2} mol de motifs EtOx) est dissous dans 20 mL d'eau distillée. Puis, 12 mL de HCl 37% (12 M) (9 éq/motifs EtOx, 1,4.10^{-1} mol) sont additionnés au mélange ([motifs EtOx] = 0,5 mol.L^{-1}). Le mélange est ensuite placé sous agitation et chauffé à reflux à 100 °C dans un bain d'huile, pendant 16 heures. Après retour à température ambiante, le polymère précipite et a un aspect blanc laiteux. L'excès de HCl, l'eau et l'acide propionique formé sont éliminés à l'évaporateur rotatif à 60°C. Le polymère est ensuite dissous dans 20 mL d'eau distillée et 1,30 g de pastilles de soude (2,2 éq/motifs, 5,5.10^{-2} mol) est ajouté jusqu'à précipitation du polymère. Le mélange est filtré sur un verre fritté de porosité 3 et lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage atteigne un pH 6 (lavage avec environ 400 mL d'eau distillée). Enfin, le précipité blanc est récupéré et séché au lyophilisateur pendant 20 heures. 0,97 g de poudre blanche est obtenu (soit un rendement massique de l'ordre de 100%, produit très hygroscopique).

RMN ^{1}H (400 MHz, méthanol-d_4): δ (ppm) = 4,82 ppm (s, H_2O), 2,74 ppm (s, CH_2-CH_2-NH-)

V. Synthèse d'His-PEI

4. Synthèse de HNA

(Exemple AF 5)

Dans un ballon tricol de 250 mL, 3,08 g de L-histidine (19,9 mmol) sont dissous dans une solution alcaline contenant 0,9 g de soude (22,5 mmol) dans 10 mL d'eau distillée. Puis, 1,61 mL de chlorure d'acryloyle (20 mmol, 1 éq/L-histidine) et 1,61 mL d'une solution alcaline de soude à 12,5 M sont ajoutés au milieu réactionnel. L'ajout se fait à l'aide d'un pousse-seringue de façon simultanée, chacune des deux solutions étant contenue dans une seringue Hamilton de 5 mL, pendant environ 6 heures avec un débit de 0,005 $mL.min^{-1}$. Pendant toute la durée de l'ajout, le ballon tricol est placé sous agitation dans bain thermostaté à -5°C (utilisation d'un cryostat). De plus, le pH doit être maintenu entre 12 et 13 au cours de la réaction.

Remarque : Le pH du milieu réactionnel est vérifié toutes les 15 min. Si le pH descend en dessous de 12, on ajoute au milieu réactionnel quelques gouttes de solution de soude à 12,5 M à l'aide d'une pipette pasteur (ajout de l'ordre de 0,1 mL).

A la fin de l'ajout, la solution est acidifiée avec 9 mL d'HCl 6M afin d'atteindre un pH proche de 2. Le mélange est ensuite précipité dans 400 mL d'acétone froid (1ère précipitation). La précipitation permet d'éliminer les sels (NaCl) et la L-histidine n'ayant pas réagi. Le mélange est ensuite filtré sur un verre fritté de porosité 3. Puis, le filtrat est récupéré et le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif à température ambiante. Le liquide rougeâtre est ensuite lyophilisé pendant 16 heures. Après lyophilisation, on obtient un solide cristallin rosé. Le solide est ensuite solubilisé dans un mélange composé de 3 mL d'eau distillée et d'1 mL d'HCl 6M puis précipité dans 50 mL d'acétone froid (2ème précipitation). Pour finir, le mélange est filtré sur un verre fritté de porosité 3 et le filtrat est récupéré, évaporé à sec et lyophilisé. A la sortie du lyophilisateur, on obtient un solide blanc mousseux (30% de rendement).

La caractérisation du produit final se fait en réalisant des analyses RMN ^{1}H, ^{13}C, COSY, HSQC, à 400 MHz, dans de l'eau deutérée.

Remarques :

- Le produit ne doit pas rester longtemps en solution.
- Le produit ne doit pas être chauffé quand il est en solution.
- Le produit final étant sensible à l'humidité doit être conservé sous argon et dans un réfrigérateur pour limiter sa dégradation.

5. Greffage de résidus histidine sur la PEI

(Exemple PLL121D)

Dans un ballon tricol de 25 mL équipé d'un réfrigérant, 204,9 mg de PEI PLL115 (poudre blanche électrostatique) ($4{,}8.10^{-3}$ mol de motifs EtOx) sont dissous dans 2 mL d'eau distillée puis une solution d'HCl 6M (≈ 0,8 mL) est ajoutée progressivement à la micropipette jusqu'à l'obtention d'un pH égal à 2. La solution est jaune/orangée, limpide. Environ 0,2 mL d'une solution de NaOH à 12,5 M est ensuite ajoutée jusqu'à atteindre pH 7. Le milieu réactionnel est alors limpide. Ensuite, une solution contenant 334,1 mg de L-histidine-*N*-acryloyle (ASV1, $1{,}44.10^{-3}$ mol) dans 2 mL d'eau distillée, est ajoutée goutte à goutte dans le tricol à l'aide d'un pousse-seringue. L'ajout se fait avec un débit de 0,08 $mL.h^{-1}$ (pendant environ 25 heures) à 100 °C, à reflux et sous argon. Le temps de chauffage est de 48 heures à partir du début de l'ajout. La solution limpide orangée est ensuite lyophilisée pendant environ 16h. La poudre jaunâtre obtenue est dissoute dans 3,5 mL d'eau distillée. La solution orange est ensuite précipitée dans un mélange contenant 180 mL d'éthanol et 3 mL d'HCl 6M à froid (T < -40°C grâce à un bain d'azote liquide et d'acétone). En effet, à température ambiante le produit se solubilise. Le mélange doit être ajouté progressivement dans le fritté de porosité 5 de façon à ce qu'il n'ait pas le temps de se réchauffer dans le fritté. Le précipité est ensuite repris dans 3 mL d'eau distillée (dissolution lente). Puis, une dialyse avec une membrane Spectrapor de cut-off 500 g/mol est effectuée contre l'eau distillée (4 changements d'eau), pendant 24 heures. La dialyse permet d'éliminer les molécules d'HNA n'ayant pas réagi ainsi que l'HCl et l'éthanol restant. Enfin, le produit est séché une nuit au lyophilisateur. 238 mg de produit (produit huileux collant) sont obtenus (rendement proche de 100%).

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 8,63 (s, 1H × n'), 7,34 (s, 1H × n'), 4,42 (m, 1H × n'), 4,03-2,47 (m, 4H × n + 10H × n'), considérant que le copolymère est constitué de n motifs EI non substitué et n' motifs EI modifiés.

Partie 3 – Protocoles de biologie

I. Matériel

1. Plasmides

Tous les essais de transfection et de cytotoxicité *in vitro* ont été faits en utilisant le plasmide pCMV-luc (pTG11033, 9514 bp, Transgene S.A., Strasbourg, France) codant pour le gène de la luciférase de luciole (luc) sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus humain (CMV).

Les tests préliminaires d'extrusion ont été faits en utilisant de l'ADN de hareng (D3159, Sigma-Aldrich). Cet ADN double brin est un mélange d'oligonucléotides de moins de 50 paires de bases soit de M_w comprise entre 30 et 50 kDa (caractérisation fournisseur).

2. Réactifs et tampons

Sauf indication, tous les produits utilisés proviennent de Sigma-Aldrich. Le milieu minimum essentiel de Eagle (MEM), le sérum de veau fœtal (SVF ou FBS pour fetal bovine serum), la solution de pénicilline-streptomycine (pénicilline 10 000 $IU.mL^{-1}$ et streptomycine 10 $mg.mL^{-1}$), le PBS, et l'HEPES proviennent de PAA Laboratories (Les Mureaux, France). L'agarose provient de chez Lonza.

3. Cellules

Deux lignées cellulaires ont été utilisées dans ce travail : les cellules CFBE41o$^-$ (ici CFBE) qui sont des cellules épithéliales bronchiques humaines exprimant le gène CFTR avec la mutation delta F508[1] ainsi que les cellules HepG2 qui sont des cellules d'hépatoblastome humain (ATTC 8065 HB).

II. Formulation standard des polyplexes

Les polyplexes sont préparés à différents ratios massiques polymère/ADNp (WR) dans un tampon HEPES à 10 mmol.L^{-1} (pH 7,4). La quantité appropriée de polymère (solution à 0,5 mg.mL^{-1} dans l'HEPES) est ajoutée à 1 µL d'une solution stock d'ADNp à 1 mg.mL^{-1} dans l'HEPES (1 µg d'ADNp) dilué au préalable dans 13 µL d'HEPES (soit 14 µL de solution). La solution est vortexée pendant 4 secondes.

Pour exemple, pour un ratio massique polymère/ADNp de 3 (WR = 3/1), 6 µL d'une solution de polymère dans l'HEPES à 0,5 mg.mL^{-1} (3 µg de polymère) sont ajoutés au 14 µL de la solution d'ADNp (1 µg d'ADNp) dans un tube eppendorf, puis la solution est vortexée 4 secondes et est laissée à température ambiante pendant 30 minutes avant utilisation des polyplexes.

III. Mesures de taille et de potentiel ζ des polyplexes

Sauf mention contraire, les polyplexes sont préparés à un WR 3/1 par ajout de 60 µL de solution de polymère à 0,5 mg.mL^{-1} dans 140 µL d'une solution d'ADNp à 71 µg.mL^{-1} (10 µg d'ADNp). Les solutions finales sont donc à 50 µg.mL^{-1} d'ADNp et 150 µg.mL^{-1} de polymère. Après vortex pendant 4 secondes et 30 minutes au repos à température ambiante, la taille et le potentiel ζ des polyplexes sont mesurés, respectivement par diffusion de la lumière et la mobilité électrophorétique, en utilisant l'appareil SZ-100 Nanopartica (Horiba, Les Ulis, France). Les échantillons sont éclairés avec un faisceau laser de longueur d'onde 532 nm et de 10 mW. L'intensité de la lumière diffusée est mesurée sous un angle de 90° pour la mesure de taille et de 13° pour le potentiel ζ.

IV. Efficacité de transfection

Les cellules sont ensemencées dans une plaque de 24 puits à une densité de $1{,}5x10^5$ cellules (CFBE ou HepG2) par puits dans 1 mL de milieu de culture. Après 24h de culture, le milieu est retiré et les cellules sont incubées pendant 4h à 37°C avec les polyplexes fraîchement préparés (1 µg d'ADNp par puits) dans 500 µL de milieu de culture complémenté

par 10% de SVF (FBS en anglais). Ensuite, le milieu contenant les polyplexes est retiré et remplacé par 1 mL de milieu de culture complet (10% SVF non décomplémenté, 0,4% de pénicilline et de streptomycine et 1% de glutamax) ne contenant aucun polyplexe. 48h plus tard, l'activité luciférase contenue dans les lysats cellulaires est mesurée en utilisant un kit de dosage de la luciférase (Promega, E1500) et un luminomètre (LUMAT LB 9507). L'activité luciférase est normalisée par la quantité totale de protéines mesurée par le dosage protéine BCA (Uptima, Interchim SA, Montluçon, France), et est exprimée en unités de lumière relative (RLU) par mg de protéine. Pour un type de polyplexe donné, la transfection est réalisée dans 3 puits différents.

L'expérience est répétée à l'identique sur une seconde plaque de 24 puits qui servira à la mesure de la cytotoxicité des polyplexes.

V. Cytotoxicité

La cytotoxicité des polyplexes est évaluée par le test MTT. 48h après la transfection, 100 µL de bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) (solution à 5 $mg.mL^{-1}$ dans le PBS, de couleur jaune), sont ajoutés dans chacun des puits (contenant 1 mL de milieu de culture complet). Les cellules sont incubées 4h à 37°C.

Le milieu est ensuite retiré, puis le formazan formé est solubilisé par ajout d'1 mL d'isopropanol acidifié (HCl à $3{,}6.10^{-2}$ $mol.L^{-1}$) et 200 µL d'une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 3% dans l'eau. Après 30 min d'incubation à température ambiante, 200 µL sont prélevés (en prenant soin de parfaitement homogénéiser le milieu) et mis en triplicate dans une microplaque de 96 puits: cela signifie que 3 x 200 µL d'un même puits sont répartis dans 3 puits différents, la toxicité d'un polyplexe donné à un ratio WR est donc estimée à partir de 9 puits. La toxicité induite par les polyplexes (notée tox) est calculée en mesurant A_T l'absorbance des cellules témoin qui n'ont pas été incubées avec un polyplexe et A_P l'absorbance des cellules incubées avec le polyplexe d'intérêt selon l'équation: $tox(\%) = \frac{A_T - A_P}{A_T} \times 100$. Les absorbances sont mesurées à 560 nm avec un spectrophotomètre Victor I.

Les valeurs données correspondent à la moyenne de 9 mesures issues de trois expériences indépendantes (3 puits différents), chacune analysée en triplicate. L'écart type associé est également calculé à partir de ces 9 mesures.

Réferences

(1) Bruscia, E.; Sangiuolo, F.; Sinibaldi, P.; Goncz, K. K.; Novelli, G.; Gruenert, D. C. Isolation of CF Cell Lines Corrected at ΔF508-CFTR Locus by SFHR-Mediated Targeting. *Gene Therapy* **2002**, *9* (11), 683–685. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301741.

Conclusion générale

Dans ce projet, nous proposions de concevoir des polyplexes de taille inférieure à 100 nm à base de nouveaux polymères cationiques et d'ADNp avec pour objectif qu'ils remplissent les critères nécessaires à une utilisation *in vivo* pour un ciblage hépatique. Dans ce but, nous avons d'abord synthétisé des poly(éthylèneimine)s (PEI) en étoile, jamais décrites auparavant.

Pour ce faire, nous avons sélectionné plusieurs alcools tri, tétra et hexafonctionnels dans le but de préparer des esters tosylates ou des esters triflates pour l'amorçage de la polymérisation de 2-alkyl-2-oxazolines. Chacune des deux familles a été synthétisée et caractérisée avec succès, cependant les esters tosylates n'ont pas permis d'amorcer la polymérisation de la 2-méthyl-2-oxazoline dans les conditions testées.

La synthèse de poly(2-méthyl-2-oxazoline)s (PMeOx) et de poly(2-éthyl-2-oxazoline)s (PEtOx) a été effectuée avec succès à partir des esters triflates multifonctionnels suivants : le 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane tristriflate (I_3), le pentaérythritol tétratriflate (I_4), le di(triméthylolpropane) tétratriflate (I_{e4}) et le dipentaérythritol hexatriflate (I_{e6}). Les PMeOx et PEtOx ainsi obtenues ont été caractérisées par diverses techniques, directes (CES, RMN) et indirectes (études cinétiques des polymérisations) afin de confirmer leurs architectures en étoile. Les polymères ont été caractérisés par CES dans deux solvants différents : l'eau et le diméthylformamide (DMF). En particulier, une étude approfondie des PMeOx a été menée par utilisation d'une ligne CES multi-détection dans l'eau. La viscosité intrinsèque des différents polymères a été mesurée et une décroissance de la viscosité avec l'augmentation de la fonctionnalité de l'amorceur utilisé a été mise en évidence. Ce résultat corrobore la présence du nombre de branches désiré pour chacune des étoiles puisque la théorie indique que la présence de branchements réduit le volume hydrodynamique du polymère (d'autant plus que le nombre de branchements est important) et donc diminue sa viscosité. Les nombres de branches de chacune des PMeOx en étoile ont été calculés et sont en accord avec les valeurs théoriques. Différentes familles de POx en étoile contenant 3, 4 et 6 branches à partir des amorceurs multitriflates synthétisés ont été obtenues : des PMeOx de X_n = 188 ainsi que des PEtOx de X_n = 188, 370 et 590. L'étude cinétique de la polymérisation des PEtOx en étoile de X_n = 188 a mis en évidence un amorçage lent. Néanmoins, parmi les quatre familles synthétisées, les autres études cinétiques menées ont permis de démontrer que les PMeOx en étoile de X_n = 188 et les PEtOx en étoile de X_n = 590 étaient bien définies.

En vue d'obtenir les PEI en étoile correspondantes, les possibilités d'hydrolyse des POx ont été investiguées en se basant sur les conditions d'hydrolyse de POx linéaires. Malgré

plusieurs essais dans diverses conditions, les essais d'hydrolyse basique des PMeOx et des PEtOx synthétisées à partir des amorceurs possédant un pont éther dans leur structure (I_{e4} ou I_{e6}) n'ont pas été concluants. En effet, pour tenter d'hydrolyser à 100% les motifs oxazoline, des réactions successives sur une durée totale de plusieurs jours ont été menées, aboutissant à un produit insoluble dans les solvants d'analyse (détermination précise du pourcentage d'hydrolyse impossible) ainsi que dans les solvants aqueux, les rendant incompatibles avec l'application visée. Néanmoins, le protocole d'hydrolyse acide des POx linéaires a pu être adapté aux PMeOx et PEtOx en étoile n'ayant pas de cœur avec un pont éther (polymères synthétisés à partir des amorceurs I_3 et I_4). Cela nous a permis d'obtenir une famille de 9 PEI de masse molaire (8, 16 et 25 K) et d'architecture (linéaires, étoiles à 3 ou 4 branches) variables.

La modification des *l*PEI par ajout de résidus histidine ayant montré dans des travaux précédents un réel apport en termes d'amélioration de l'efficacité de transfection et de diminution de la cytotoxicité, nous avons souhaité adapter le protocole de modification des *l*PEI aux PEI en étoile. La synthèse du L-histidine-*N*-acryloyle (HNA) a été réalisée avec succès dans des conditions limitant les réactions secondaires et permettant l'obtention d'un produit suffisamment pur pour le greffage. La post-modification de la bibliothèque de PEI par greffage de HNA a été menée à bien, permettant d'obtenir une deuxième bibliothèque de 9 polymères notés His-PEI possédant entre 10 et 16% de résidus histidine.

Les polymères des deux bibliothèques de PEI et d'His-PEI, de masse molaire (8, 16 et 25 K) et d'architecture (linéaires, étoiles à 3 ou 4 branches) variables, ont été ensuite utilisés pour obtenir des polyplexes par formulation standard avec un ADNp d'environ 10 kbp porteur d'un gène rapporteur. D'après les expériences d'électrophorèse sur gel d'agarose, toutes les PEI présentent la même capacité de neutralisation de l'ADNp, indépendamment de leur masse molaire ou de leur architecture. De même, toutes les His-PEI présentent la même capacité de neutralisation de l'ADNp, pour un WR légèrement supérieur aux PEI (sans histidine).
La taille et le potentiel ζ des polyplexes ont été mesurés. Tous les polyplexes présentent un potentiel ζ positif du même ordre, entre + 30 et + 40 mV. L'influence de l'architecture ou de la masse molaire des polymères sur le diamètre des polyplexes n'a pas pu être mise en évidence pour chacune des séries PEI ou His-PEI. Cependant, les polyplexes à base d'His-PEI présentent tous un diamètre supérieur à celui des polyplexes à base de PEI ; ceci met en évidence des phénomènes de complexation différents.

Des expériences d'addition d'un polymère anionique (sulfate de dextran) sur les polyplexes ont permis d'étudier leur stabilité. Les résultats obtenus devront être confirmés par des analyses plus précises mais semblent mettre en évidence une diminution de la stabilité des polyplexes avec l'augmentation du nombre de branches des polymères.

Les images de cryo-microscopie révèlent une structuration nette des polyplexes à base de *l*PEI qui s'estompe dans le cas de la His-*l*PEI en raison de l'encombrement apporté par les greffons histidine.

Les polyplexes ont été préparés à partir des PEI aux WR définis par les expériences d'électrophorèse (1/1 et 3/1). Leur efficacité à transfecter des cellules CFBE et HepG2 ainsi que leur cytotoxicité ont été testées. Les PEI en étoile transfectent les deux types cellulaires. L'effet apporté par l'architecture en étoile est variable : dans le cas des faibles masses molaires, les PEI en étoile transfectent faiblement, tandis que celles de 25 K atteignent des niveaux de transfection équivalents aux *l*PEI tout en conduisant à une meilleure viabilité (>95%).

De façon à évaluer l'apport du greffage de résidus histidine, l'évaluation biologique de la bibliothèque d'His-PEI a également été faite. Contrairement à ce qui est observé pour les polymères linéaires, l'effet de l'ajout de résidus histidine sur les PEI en étoile n'est pas significatif sur les lignées cellulaires utilisées : l'efficacité de transfection est moindre, et en particulier, elle chute drastiquement pour les PEI en étoile à 3 et 4 branches de 8 et 16K. Nous n'avons donc pas observé la synergie que nous espérions entre les modifications chimique et architecturale. Toutefois les polymères ne présentent aucune cytotoxicité significative et de meilleurs résultats de transfection ne sont pas à exclure sur d'autres types cellulaires.

Dans le but d'envisager des études *in vivo*, des solutions de polyplexes ayant des concentrations en ADNp 50 à 100 fois plus élevées que celles utilisées pour les études *in vitro* présentées (50 $\mu g.mL^{-1}$) doivent être obtenues. Pour cela, une nouvelle voie de formulation consistant à extruder les copies d'ADNp une à une à travers une membrane dans une solution de polymère concentrée a été étudiée. Les premiers essais faits dans des conditions de concentration équivalentes à la formulation standard ont permis d'obtenir, de manière reproductible, des polyplexes de diamètre environ 20% inférieur à ceux obtenus par la formulation standard. Cependant ce travail devra être poursuivi pour obtenir des polyplexes à une concentration plus élevée et dans un solvant compatible avec l'utilisation parentérale chez des souris.

Une difficulté majeure de l'optimisation des polyplexes pour leur utilisation *in vivo* réside dans les tailles optimales des polyplexes qui sont très différentes pour les expérimentations *in vitro* et *in vivo*. Le phénomène de sédimentation mis en jeu dans la transfection des cellules en culture nécessite l'utilisation de polyplexes de taille suffisamment importante, qui provoqueraient aisément une embolie dans le cas de tests *in vivo*. Au contraire, des polyplexes suffisamment petits pour qu'il soit envisageable de les tester *in vivo*, ne sédimenteraient pas et donc ne donneraient probablement pas des efficacités de transfection escomptées lors de tests *in vitro* par rapport aux standards. Cela suppose donc qu'il faille soit tester « à l'aveugle » un grand panel de formulations de polyplexes de taille suffisamment faible chez les souris, laissant ouverte une vraie problématique puisque l'utilisation des souris est – heureusement – réglementée, soit utiliser des tests *in vitro* sur d'autres types de culture cellulaire comme des cellules en suspension.

Différentes perspectives se dégagent de ce travail. La question du ciblage hépatique n'a pas pu être développée dans le temps imparti pour ce travail. Cependant, des études sont menées en parallèle au laboratoire pour greffer des résidus galactose sur des polymères linéaires dans le cadre d'un autre projet de thèse. Le galactose est en effet connu pour se lier spécifiquement à la lectine, un récepteur membranaire spécifique du galactose présent à la surface des cellules hépatiques. L'optimisation de cette étape de greffage est en cours et pourrait par la suite être utilisée pour fonctionnaliser les extrémités de chaîne des polymères en étoile.

L'optimisation de la formulation par extrusion devra être poursuivie dans le but d'obtenir des solutions de polyplexes de concentration de l'ordre de 1 $mg.mL^{-1}$ tout en évitant l'agrégation des polyplexes entre eux.

Une fois cet objectif atteint, afin de contourner le processus de sédimentation nécessaire pour la transfection de cellules adhérentes, l'utilisation de cellules en suspension pourrait être envisagée pour tester l'efficacité de transfection des polyplexes de faible diamètre. Les faibles temps de contact habituellement observés entre les polyplexes et les cellules en suspension pourraient être augmentés grâce à l'interaction entre les résidus galactose des polymères et les lectines en surface des cellules.

Le potentiel zeta des polyplexes de faible diamètre obtenus par extrusion devra être mesuré. Certaines études menées au préalable au laboratoire ont montré que les polyplexes extrudés ne présentaient pas de charge positive en surface (contrairement à ceux obtenus par formulation standard). Ce point n'a pas été exploré mais il serait intéressant de comprendre ce phénomène et d'étudier son impact sur la transfection.

Synthèse de nouveaux vecteurs cationiques à architecture en étoile pour le transfert de gènes

Certaines maladies rares d'origine génétique, peuvent être traitées par une thérapie nommée « thérapie génique » qui consiste à introduire un polynucléotide (ADN ou ARN) à l'intérieur des cellules pour moduler leur activité dans un but thérapeutique. L'emploi d'un vecteur capable de protéger le polynucléotide et de le véhiculer jusqu'au noyau des cellules cibles est nécessaire. La polyéthylèneimine (PEI) est actuellement le polymère cationique de référence dans ce domaine. Cependant, en raison de sa toxicité importante, de nombreuses études visant à modifier la PEI sont toujours en cours pour améliorer ses propriétés. Entre autre, il a été montré que des architectures compactes conféraient de meilleures propriétés aux polymères.

Dans ce contexte, des PEI en étoile ont été synthétisées pour la première fois. A cette fin, des précurseurs de poly(2-oxazoline)s en étoile ont été préparés et leur architecture a été confirmée par des analyses par chromatographie d'exclusion stérique et des études cinétiques. Des PEI de masse molaire (8, 16 et 25 K) et d'architecture (linéaire, à 3 et 4 branches) variables ont ensuite été obtenues par adaptation du protocole d'hydrolyse utilisé pour les polymères linéaires. La transfection de cellules CFBE et HepG2 par des polyplexes à base d'ADNp et de ces polymères a été évaluée. L'influence de la masse molaire et de l'architecture a été étudiée. Pour finir, la modification de ces PEI par des résidus histidine, connus pour améliorer l'efficacité de transfection des lPEI, a été réalisée avec succès. La synergie espérée entre les modifications chimique et architecturale n'a pas été observée pour la transfection des cellules HepG2 *in vitro*.

Mots clés : polymérisation cationique par ouverture de cycle ; poly(2-oxazoline) ; polymères en étoile ; poly(éthylèneimine) ; transfert de gènes

Synthesis of new cationic vectors with star architecture for gene transfer

Some rare diseases of genetic origin can be treated by a therapy called "gene therapy" which consists in introducing a polynucleotide (DNA or RNA) into the cells to modulate their activity for therapeutic purposes. The use of a vector able to protect the polynucleotide and to transport it to the nucleus of the target cells is necessary. Polyethyleneimine (PEI) is currently the cationic polymer gold standard in this field. However, due to its high toxicity, many studies aiming to modify PEI are still underway to improve its properties. Among other things, it has been shown that compact architectures give better properties to polymers.

In this context, star PEI were synthesized for the first time. To this end, star poly(2-oxazoline)s precursors were prepared and their architecture was confirmed by steric exclusion chromatography analyses and kinetic studies. PEI of variable molar mass (8, 16 and 25 K) and architecture (linear, 3 and 4 arms star) were then obtained by adapting the hydrolysis protocol used for linear polymers. The transfection of CFBE and HepG2 cells with polyplexes based on pDNA and these polymers was evaluated. The influence of molar mass and architecture was studied. Finally, the modification of these PEI with histidine moieties known to increase lPEI transfection efficiency was successfully achieved, however, the expected synergy between the chemical and architectural modifications was not observed for the in vitro transfection of HepG2 cells.

Keywords: cationic ring opening polymerization; poly(2-oxazoline); star polymers; poly(ethyleneimine); gene transfer