

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Synthèse de poly(N-isopropylacrylamide)s modifiés par des groupements cholestérols et leur étude en solutions aqueuses.

par :

Florence Ségui

Département de Chimie

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

en chimie

Août 2007

© Florence Ségui, 2007



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Synthèse de poly(N-isopropylacrylamide)s modifiés par des groupements cholestérols et leur étude en solutions aqueuses.

Présenté par :

Florence Ségui

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Prof. Julian Zhu

Directrice de recherche : Prof. Françoise M. Winnik

Membre du jury : Prof. Suzanne Giasson

Résumé :

Le poly(*N*-isopropylacrylamide) est un polymère thermosensible qui précipite lorsque sa solution aqueuse est chauffée au-delà de sa température inférieure critique de solubilisation (Lower Critical Solution Temperature, LCST) (32°C). Cette thermosensibilité lui procure des propriétés très intéressantes, tant au point de vue fondamental que pour des applications industrielles. Les caractéristiques de ce polymère peuvent être changées lorsque la chaîne de ce polymère est modifiée par différents groupements, hydrophiles ou hydrophobes.

Ce projet porte sur la préparation de poly(*N*-isopropylacrylamide), PNIPAM, par polymérisation contrôlée par agent de transfert de chaîne. Ce polymère sera ensuite modifié en vue d'obtenir un polymère téléchélique ayant des masses molaires bien définies et une faible polydispersité. La chaîne hydrophile du PNIPAM a été modifiée par des groupements cholestérol hydrophobes. Dans un deuxième temps, l'étude en solution aqueuse des chaînes de α,ω -dicholesteryl poly(*N*-isopropylacrylamide) a été effectuée. Dans le but de connaître les propriétés thermodynamiques de ces polymères en solution aqueuse, des études de microcalorimétrie et de turbidimétrie ont été effectuées. L'influence de la masse molaire sur ces propriétés a été constatée. Les températures de transition de phase, les enthalpies de transition, les coefficients d'expansion thermique et les changements de volume d'hydratation ont pu être déterminés, ainsi que les points troubles. L'auto-assemblage des chaînes de ces polymères en solution aqueuse a aussi été étudié par diffusion dynamique et statique de la lumière (DLS et SLS). Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec le PNIPAM téléchélique terminé avec une chaîne de 18 carbones. Malgré des masses molaires identiques et la même nature de chaîne

de polymère, de différences ont été observées dues au fort pouvoir hydrophobe des groupements cholestérols, à leur rigidité et à leur volume.

Mots clés : Poly(N-isopropylacrylamide), cholestérol, microcalorimétrie, diffusion de la lumière.

Abstract :

Poly(N-isopropylacrylamide) is a thermosensitive polymer. It precipitates in aqueous solution when it is heated above a critical temperature, the Lower Critical Solution Temperature (LCST) (32°C). This property is very interesting for fundamental research or industrial applications. Modifying the polymers with hydrophilic or hydrophilic group can change their behaviour in aqueous solution.

In this project, poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) was prepared by reversible addition fragmentation transfer polymerization in order to obtain telechelic PNIPAM with well defined molecular weights and low polydispersities. Then this polymer was hydrophobically modified by cholesterol group. This resulting polymer, the α,ω -dicholesteryl poly(N-isopropylacrylamide)s, and their aqueous solutions were studied. The thermodynamics properties of this polymer have been studied by microcalorimetry and the cloud points have been investigated by turbidimetry. The influence of molecular weight of this polymer on these properties was also noted. Transition temperatures, enthalpy of transition, thermal expansion coefficient, changes in the volume of the hydration layer of the polymer, and also the cloud point were determined. The self-assemblies of the polymer chains in aqueous solutions were studied by dynamic and static light scattering (DLS and SLS). The telechelic PNIPAM with octadecyl group at each chain end has been studied previously by this technique, and the results were compared with the results obtained with the α,ω -dicholesteryl PNIPAM. Due to the high hydrophobicity and the rigidity of the cholesterol group, we observed significant differences between their behaviour in aqueous media.

Keywords : Poly(N-isopropylacrylamide), cholesterol, microcalorimetry, light scattering.

Table des matières:

Résumé.....	iii
Mots clés.....	iv
Abstract.....	v
Keywords.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des abréviations.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des tableaux.....	xvii
Remerciements.....	xviii

Chapitre 1 : Introduction.....1

1. Le poly(<i>N</i>-isopropylacrylamide) ou PNIPAM.....	2
1.1 Préparations du poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide).....	3
1.2 Propriétés du poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide) en solution aqueuse.....	3
1.3 Applications du PNIPAM.....	5
1.4 Le poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide) modifié par des groupements hydrophobes.....	6
2. Le cholestérol utilisé pour modifier les polymères.....	7
2.1 Les stérols utilisés pour la modification de polymères.....	7
2.2 Le cholestérol utilisé pour la modification de polymères.....	8
3. Polymérisation radicalaire contrôlée par agent de transfert de chaîne....	10
3.1 Mécanisme de la polymérisation RAFT.....	11
3.2 Conclusion et limites de cette voie de polymérisation.....	13
4. Techniques d'analyses utilisées.....	14
4.1 La calorimétrie différentielle à balayage haute sensibilité.....	14
4.1.1 Principe de la microcalorimétrie différentielle à balayage.....	15
4.1.2 Informations obtenues par DSC et application au PNIPAM en solution aqueuse.....	15
4.2 La calorimétrie à perturbation de pression.....	17
4.2.1 Principe de la calorimétrie à perturbation de pression.....	18
4.2.2 Informations obtenues par calorimétrie à perturbation de pression.....	19
4.3 La diffusion de la lumière.....	22
4.3.1 La diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	24
4.3.2 La diffusion statique de la lumière (SLS).....	25

5. Présentation des chapitres.....	27
6. Références.....	29

Chapitre 2 : “An Efficient Synthesis of Telechelic Poly(N-isopropylacrylamides) and its Application To the Preparation of α,ω-Dicholesteryl and α,ω-Dipyrenyl Polymers.”.....	36
--	-----------

1. Introduction.....	38
2. Experimental.....	41
2.1 Materials	41
2.2 RAFT polymerization of N-isopropylacrylamide (iBu-NIPAM).....	42
2.3 Preparation of α,ω -dimercapto poly(N-isopropylacrylamides) (SH-PNIPAM).....	42
2.4 Preparation of α,ω -di(cholest-5-en-3 β -yl 6-oxyhexylthio) poly(N-isopropylacrylamide) (CH-PNIPAM).....	43
2.5 Preparation of 4-(1-pyrenyl)butyl tosylate.....	44
2.6 Preparation of 4-(1-pyrenyl)butyl iodide.....	44
2.7 Preparation of α,ω -di-[4-(1-pyrenyl)butylthio] poly(N-isopropylacrylamide)s (Py-PNIPAM).....	45
2.8 Determination of the M_n values of iBu-PNIPAMs by UV/Vis absorption spectroscopy.....	45
2.9 Determination of the M_n values of iBu-PNIPAMs by ^1H NMR spectroscopy.....	46
2.10 Quantitative thiol analysis by Ellman method.....	46
2.11 Determination of the molecular weight of CH-PNIPAMs by end-group analysis.....	46
2.12 Determination of the degree of substitution of Py-PNIPAMs.....	47
2.13 Instrumentation.....	47
2.14 Fluorescence spectroscopy measurements.....	48
3. Results and discussion.....	50
3.1 Preparation of α,ω -dimercapto PNIPAMs.....	50
3.2 Preparation of α,ω -di(cholest-5-en-3 β -yl 6-oxyhexylthio) PNIPAMs (CH-PNIPAM) and α,ω -di-[4-(1-pyrenyl)butylthio] PNIPAMs (Py-PNIPAM).....	55
3.3 Self-assembly of CH-PNIPAM and Py-PNIPAM in water.....	59
3.3.1 Evidence from ^1H NMR spectroscopy.....	59
3.3.2 Evidence from fluorescence spectroscopy.....	60
4. Conclusions.....	63
5. Acknowledgments.....	64
6. References.....	65

Chapitre 3	68
-------------------------	-----------

Autres essais de synthèse des α,ω -Dicholesteryl PNIPAMs et caractérisations des solutions aqueuses des CH-PNIPAMs

1. Introduction.....	69
2. Partie expérimentale.....	70
2.1 Matériel utilisé.....	70
2.2 Synthèse muti-étapes du cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyléther.....	70

2.2.1	Synthèse du cholest-5-en-3 β -yl [(<i>p</i> -tolylsulfonyl)oxy] éther.....	70
2.2.2	Synthèse du cholest-5-en-3 β -yl 6-hydroxyhexyl éther.....	71
2.2.3	Synthèse du cholest-5-en-3 β -yl 6-[(<i>p</i> -tolylsulfonyl)oxy]hexyl éther.....	72
2.2.4	Synthèse du cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyl éther	73
2.3	Autres voies de synthèses étudiées pour la modification du PNIPAM par le cholestérol (CH-PNIPAM).....	74
2.3.1	Synthèse d'un dérivé acrylate à partir du cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyléther.....	74
2.3.2	Modification du PSH par le dérivé acrylate du cholestérol.....	75
2.4	Synthèse d'un agent de transfert de chaîne ayant un substituant cholestérol.....	77
2.4.1	Synthèse du cholest-5-en-3 β -yl 6-thiohexyl éther.....	77
2.4.2	Synthèse du S-1-n-cholesteryl hexyléther-S'-(α,α' -diméthyl- α'' -acide acétique).....	78
2.4.3	Synthèse de S-1-n-cholesteryl hexyléther-S'-(α,α' -diméthyl- α'' - n- isopropylamide).....	79
2.5	Analyses.....	80
2.5.1	Mesures de points troubles.....	81
2.5.2	Mesures par calorimétrie différentielle à balayage haute sensibilité (HS-DSC).....	81
2.5.3	Mesures par calorimétrie à perturbation de pression (PPC).....	81
2.5.4	Mesures par diffusion de la lumière.....	82
2.5.5	Mesures par microscopie électronique à transmission (TEM).....	82
2.5.6	Mesures de spectres d'émission par fluorescence.....	83
2.6	Méthodes de préparation des solutions de CH-PNIPAM.....	84
2.6.1	Par dissolution.....	84
2.6.2	Par dialyse.....	84
3.	Résultats et discussion.....	85
3.1	Caractérisation des CH-PNIPAM 10K, 20K et 30K.....	85
3.2	Synthèse du nouvel agent de transfert de chaîne pour la préparation de PNIPAM semi-téléchélique.....	86
3.3	Caractérisation des solutions aqueuses de CH-PNIPAM-10, 20 et 30K préparées par dissolution du polymère.....	88
3.3.1	Caractérisation par calorimétrie différentielle à balayage (HS-DSC) et points troubles.....	89
3.3.2	Analyse par calorimétrie à perturbation de pression (PPC)	94
3.3.3	Analyse par diffusion dynamique de la lumière à température ambiante.....	96
3.3.3.1	Etude de sphéricité du CH-PNIPAM-20K et 30K.....	97
3.3.3.2	Etude en concentration des CH-PNIPAM-10K et 30K;.....	99
3.3.4	Etude par diffusion de la lumière avec variation de température.....	100
3.4	Caractérisation des solutions aqueuses de CH-PNIPAM-10, 20 et 30K préparées par dialyse.....	103

3.4.1	Analyse par diffusion dynamique de la lumière à température ambiante et étude de stabilité.....	103
3.4.2	Etude des solutions de CH-PNIPAM en fonction de la température par diffusion dynamique de la lumière.....	105
3.4.3	Etude d'encapsulation pour le CH-PNIPAM-20K.....	108
3.4.4	Image de microscopie à force atomique (AFM).....	110
3.4.5	Etude par microscopie électronique à transmission (TEM).....	111
4.	Conclusions.....	113
5.	Références.....	114
	Conclusion générale.....	116
	Annexe 1 : le test d'Ellman.....	119

Liste des abréviations

AFM : microscopie à force atomique

ATRP : polymérisation radicalaire par transfert d'atome

DEGDIM: diéthylèneglycol di(2-1-isobutyl)sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-methylpropionate)

DSC : calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry).

GPC : Gel Permeation Chromatography

h : heure

LCST : Lower Critical Solution Temperature (température inférieure critique de solubilisation)

Log : logarithme décimal

M : mol/L.

M_n : masse molaire moyenne en nombre

M_w : masse molaire moyenne en poids

MWCO : molecular weight cut off

n : nombre d'unité monomère

PNIPAM : poly(*N*-isopropylacrilamide).

CH-PNIPAM-10, 20 ou 30K : α,ω -dicholesteryl poly(*N*-isopropylacrilamide) de masse 10,000g/mol, 20,000g/mol ou 30,000g/mol.

PNIPAM-SH : α,ω -dimercapto poly(*N*-isopropylacrilamide)

PPC : calorimétrie à perturbation de pression (Pressure Perturbation Calorimetry).

pTsCl : chlorure de para toluène sulfonate

PVDF : polyfluorure de vinylidène

RAFT : transfert par addition-fragmentation réversible (Reversible Addition-Fragmentation Transfer).

RMN : résonance magnétique nucléaire

RT : température ambiante (Room Temperature)

TEM : microscopie à transmission électronique

THF : tetrahydrofurane

UV-Vis : ultraviolet – visible

t : triplet

m : multiplet

d : doublet

ppm : partie par million

δ : déplacement chimique

λ : longueur d'onde

Liste des schémas et figures

Chapitre 1

Figure 1 : Poly (<i>N</i> -isopropylacrylamide) ou PNIPAM.....	2
Figure 2 : Solubilité du PNIPAM en dessous et au-dessus de la LCST.....	4
Figure 3 : Structure du cholestérol.....	8
Figure 4 : Structure du pullulan modifié par le cholestérol.....	9
Figure 5 : Mécanisme de la polymérisation par transfert addition-fragmentation réversible.....	12
Figure 6 : Endotherme pour une solution aqueuse de C_{18} -PNIPAM- C_{18} -35K à une concentration de 5.0g L^{-1}	16
Figure 7 : Schéma de la calorimétrie à perturbation de pression.....	18
Figure 8 : Courbe expérimentale de PPC d'une solution aqueuse de PNIPAM (5g/L) à 20°C	19
Figure 9 : Courbe PPC d'une solution aqueuse de C_{18} -PNIPAM- C_{18} -35K de 5g/L...20	
Figure 10 : Schéma de la diffusion de la lumière.....	23

Chapitre 2

Scheme 1	50
Preparation of α,ω -dimercapto poly-(<i>N</i> -isopropylacrylamide (SH-PNIPAM) by a two step procedure involving 1) the RAFT-polymerization of <i>N</i> -isopropylacrylamide (NIPAM) in the presence of DEGDIM and AIBN and 2) aminolysis of the isobutylthiocarbonyl end groups with <i>n</i> -butylamine (<i>n</i> -Bu).	
Scheme 2	56
Preparation of α, ω -di(cholest-5-en-3 β -yl-6-oxylhexylthio) PNIPAMs (CH-PNIPAM) and α, ω -di[4(1-pyrenyl)butyl] PNIPAMs (Py-PNIPAM).	
Figure 1	51
Normalized gel permeation chromatography (GPC) traces monitored with a refractive index detector of poly(<i>N</i> -isopropylacrylamides) (iBu-PNIPAM) prepared by	

polymerization of NIPAM in the presence of the RAFT agent DEGDIM and AIBN at 65 °C in 1,4-dioxane starting with the [NIPAM]/[DEGDIM] ratios listed in Table 1.

Figure 2.....54
¹H NMR spectra of α,ω -di(isobutylthiocarbonylthio)-poly(*N*-isopropylacrylamide) (iBu-PNIPAM-10K; black curve) and α,ω -dimercapto-poly(*N*-isopropylacrylamide) (SH-PNIPAM, red curve) (solvent: CDCl₃); * residual water of hydration bound to the polymer.

Figure 3.....55
 UV-absorption spectra of α,ω -di(isobutylthiocarbonylthio)-poly(*N*-isopropylacrylamide) (iBu-PNIPAM-13K), α,ω -(dimercapto)-poly(*N*-isopropylacrylamide) (SH-PNIPAM-13K) and α,ω -di[4(1-pyrenyl)butyl](poly(*N*-isopropylacrylamide) (Py-PNIPAM-13K) in methanol.

Figure 4.....57
¹H NMR spectra of α,ω -di(cholest-5-en-3 β -yl-6-oxyhexylthio)-poly(*N*-isopropylacrylamide) (CH-PNIPAM-10K) in CDCl₃ (top) and in D₂O, 24 °C (bottom).

Figure 5.....59
¹H NMR spectra of α,ω - di[4(1-pyrenyl)butyl]poly(*N*-isopropylacrylamide) (Py-PNIPAM-13K) in CDCl₃ (top) and in D₂O, 24 °C (bottom).

Figure 6.....61
 Plot of the changes as a function of CH-PNIPAM concentration in water of the ratio (*I*₁/*I*₃) of the emission intensity of pyrene at 376 nm (*I*₁) and at 385 nm (*I*₃); also shown are the emission spectra of pyrene in water (A) and in a solution of CH-PNIPAM-10K in water (5.0 g/L); (B) ○ CH-PNIPAM-10K; λ CH-PNIPAM-28K; temperature 20 °C.

Figure 7.....63
 Plot of the changes as a function of Py-PNIPAM-13K in water of the ratio (*I*_E/*I*_M) of the intensity of the pyrene excimer emission and monomer emission; temperature: 20 °C; also shown are emission spectra of solutions of Py-PNIPAM-13K (0.01 g/L and 0.8 g/L).

Chapitre 3

Figure 1 : schéma réactionnel de synthèse.....70

Figure 2: cholest-5-en-3 β -yl [(*p*-tolylsulfonyl)oxy] éther.....70

Figure 3 : cholest-5-en-3 β -yl 6-hydroxyhexyl éther.....	71
Figure 4 : cholest-5-en-3 β -yl 6-[(p-tolylsulfonyl)oxy]hexyl ether.....	72
Figure 5 : cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyl ether	73
Figure 6 : choléstéryl 6-hydroxyhexylether acrylate	74
Figure 7 : PNIPAM modifié préparé par addition du dérivé acrylate du cholestérol..	76
Figure 8 : structure du cholesteryl 6-thiohexyl éther.....	77
Figure 9 : Structure de l'agent RAFT acide.....	78
Figure 10 : Structure de l'agent RAFT.....	79
Figure 11 : Mécanisme de la réaction utilisée pour la synthèse de l'acide.....	87
Figure 12 : Schéma réactionnel de formation de l'amide.....	87
Figure 13 : Equation de la réaction de synthèse du PNIPAM semi-téléchélique.....	88
Figure 14 : endothermes des CH-PNIPAM-10K, 20K et 30K à 1g/L.....	90
Figure 15 : Capacité calorifique en fonction de la température pour le CH-PNIPAM 10K à différentes concentrations (lors du chauffage).....	93
Figure 16 : Coefficient d'expansion thermique des CH-PNIPAM-10K et 30K.....	95
Figure 17 : Rayon hydrodynamique des CH-PNIPAM à 24°C.....	96
Figure 18A : Rayon hydrodynamique en fonction de l'angle pour le CH-PNIPAM- 20K et 30K à 1g/L à température ambiante	98
Figure 18B : Γ en fonction de q^2 pour le CH-PNIPAM-20K et 30K à 1g/L à température ambiante	98
Figure 19A : Rayons hydrodynamiques du CH-PNIPAM-30K à température ambiante.....	100
Figure 19B : stabilité des particules suivant la concentration	100
Figure 20 : Variation du rayon hydrodynamique du CH-PNIPAM-10K en fonction de la température.....	101
Figure 21 : Variation de R_h en fonction de la température des CH-PNIPAM-10K, 20K et 30K.....	102

Figure 22 : Variation de Rh en fonction de la température du CH-PNIPAM-20K.....	102
Figure 23 : Distribution des rayons hydrodynamiques des CH-PNIPAM-10K, 20K, et 30K.....	104
Figure 24 : Variation du rayon hydrodynamique des CH-PNIPAM en fonction du temps à température ambiante.....	105
Figure 25 : Rayons hydrodynamiques en fonction de la température pour le CH-PNIPAM-30K.....	106
Figure 26 : Rayons hydrodynamiques en fonction de la température pour le CH-PNIPAM-20K.....	107
Figure 27 : Intensité à 578nm des spectres d'émission en fonction du temps.....	109
Figure 28 : Image AFM du CH-PNIPAM-20K à 0,22g/L	110
Figure 29 : Images TEM des CH-PNIPAM-20K et 30K	111
Figure 30 : distribution en taille des CH-PNIPAM-20K et 30K.....	112

Liste des tableaux

Chapitre 2

Table 1	52
Preparation and characterization of PNIPAM samples obtained by azoisobutyronitrile (AIBN) initiated polymerization of N-isopropylacrylamide (NIPAM) in the presence of the diethylene glycol di(2-(1-isobutyl)sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-methyl propionate) (DEGDIM) at a temperature of 65°C.	
Table 2	58
Preparation and characterization of α, ω -di-[4-(1-pyrenyl)butyl] poly(<i>N</i> -isopropylacrylamides) (Py-PNIPAM) and of α, ω -di(cholest-5-en-3 β -yl 6-oxyhexylthio) poly(<i>N</i> -isopropylacrylamides) (CH-PNIPAM)	

Chapitre 3

Tableau 1	90
Propriétés thermiques obtenues par DSC et turbidimétrie des solutions aqueuses de PNIPAM modifiés	
Tableau 2	94
Propriétés thermiques obtenues par PPC des solutions aqueuses de PNIPAM modifiés	

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, le Prof. Françoise M. Winnik sans qui ce projet de recherche n'aurait pu être mené à bien, ainsi que pour sa patience et ses encouragements tout au long de ces deux dernières années.

D'autre part, j'aimerais aussi remercier tous mes collègues du groupe de recherche : Piotr Kujawa, Rodolphe Obeid, Charbèl Diab, Ghareb Soliman, Zhimei Miao, Pei Lian Ma, Vincent Darras, Xing-Ping Qiu et Siwar Chayed qui m'ont aidé en de nombreuses occasions et donnés de multiples conseils.

Je tiens à adresser un grand merci aussi à mes parents, à mes amis et à Florent pour leur écoute et leur soutien durant ces deux années.

CHAPITRE 1

Introduction

Les polymères sont indissociables de notre environnement et de notre vie pratique. Ils se sont imposés dans tous les domaines de nos activités: des objets les plus banals jusqu'à des applications techniques sophistiquées, en passant par leur utilisation dans les produits d'hygiène ou d'alimentation. Le plus souvent synthétiques, quelquefois naturels, ils doivent cet essor à leur large gamme de caractéristiques, durs, mous ou élastiques, transparents ou opaques, isolants et quelquefois conducteurs. Ces dernières années, un intérêt grandissant a vu le jour pour des polymères possédant des propriétés biologiques ou physico-chimiques.

C'est dans cette optique que ce projet de recherche a été réalisé. Cette étude porte sur la synthèse et l'étude des comportements en solution aqueuse de chaînes de poly(*N*-isopropylacrylamide) modifiées par des groupements hydrophobes biocompatibles: le cholestérol.

1. Le poly(*N*-isopropylacrylamide).

Le *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) est un monomère hydrosoluble dont la structure moléculaire ressemble fortement à celle des amino-acides. Son polymère neutre (figure 1) présente de nombreuses propriétés très intéressantes, dont la thermo-sensibilité de sa solution aqueuse réversible qui a été rapportée pour la première fois en 1968 par Heskins et Guillet¹.

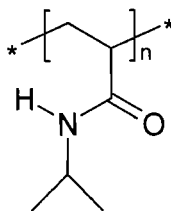


Figure 1 : Poly(*N*-isopropylacrylamide) ou PNIPAM

Ce polymère voit sa solubilité dans l'eau diminuer lorsque la température augmente. La température à laquelle se produit le passage du polymère de l'état soluble à insoluble est appelée température inférieure critique de solution ou Lower Critical Solution Temperature (LCST). Le PNIPAM est un polymère à LCST qui a fait l'objet de nombreuses études fondamentales. De plus, sa LCST à environ 32°C dans l'eau rend son étude en laboratoire aisée.

1.1. Préparations du poly(*N*-isopropylacrylamide).

Le PNIPAM a été synthétisé à l'aide de différentes méthodes permettant d'obtenir diverses architectures : par initiation redox en milieu aqueux, par polymérisation radicalaire en solution² ou radicalaire en émulsion³, ou encore ionique. Des architectures linéaires, des micelles⁴, des particules micro ou macro gels^{3,5} peuvent ainsi être obtenus. Des méthodes de polymérisations radicalaires contrôlées ont aussi été largement étudiées pour la préparation de polyacrylamides, telles que la polymérisation radicalaire à l'aide de nitroxyde⁶, par transfert d'atome (ATRP)⁷ ou encore par agent de transfert de chaîne (RAFT).

1.2. Propriétés du poly(*N*-isopropylacrylamide) en solution aqueuse.

Le comportement d'un polymère en solution est le reflet des interactions monomère-monomère, monomère-solvant et solvant-solvant. Dans le cas de l'eau, les interactions solvant-solvant sont particulièrement fortes et se présentent sous la forme d'une structure partiellement ordonnée. La LCST est souvent utilisée dans la caractérisation d'un polymère⁸. En dessous de 32°C, le PNIPAM est hydrophile, hydrosoluble, et se présente sous forme de chaînes étendues. La partie polaire de la chaîne de polymère (la fonction amide) se lie aux molécules d'eau par liaisons

hydrogène formant des sphères de solvation. La partie apolaire, comme le groupement isopropyl, sera encerclée par les molécules d'eau avoisinantes qui formeront une cage appelée clathrate⁹. Ce comportement est dû à un phénomène appelé effet hydrophobe qui tend à diminuer l'entropie du mélange (figure 2). Lorsque le polymère est dissout dans un bon solvant, l'enthalpie de mélange négative l'emporte sur la réduction de l'entropie et permet la solubilisation des chaînes de polymères. Mais lorsque la température dépasse la LCST, l'eau devient un mauvais solvant. La séparation de phase provient de deux effets :

- l'augmentation de l'entropie due à la libération des molécules d'eau formant les cages autour des parties hydrophobes,
- l'augmentation de l'enthalpie entraînée par la rupture ou l'affaiblissement des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et les parties polaires (fonctions amides) de la chaîne de polymère.

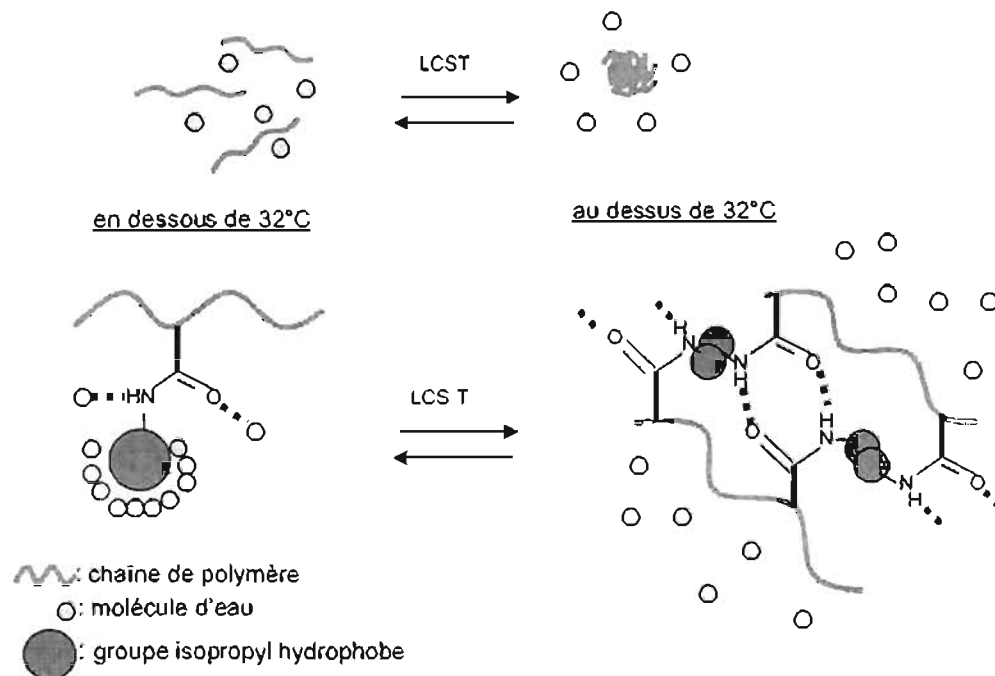


Figure 2 : Solubilité du PNIPAM en dessous et au dessus de la LCST

La transition pelote-globule associée à cette température est brutale et pour des PNIPAM de masse molaire supérieure à 20,000g/mol, dépend peu de la masse molaire^{8,10-11}. Cette transition conformationnelle a également fait l'objet de nombreuses études expérimentales^{10,12,13,14,15,16,17,18}. D'après ces dernières études, la transition se ferait en deux étapes :

- chaque chaîne subit d'abord un effondrement intramoléculaire, les pelotes précédemment gonflées deviennent denses.
- puis, les globules ainsi formés s'agrègent pour former de grosses particules colloïdales qui donneront des phases macroscopiques séparées.

La transition observée lors du chauffage de la solution aqueuse de PNIPAM se produit à une température quelque peu différente de celle observée lors du refroidissement. Ce phénomène est appelé phénomène d'hystérèse ou hystérésis. Ce dernier est dû à la formation de liaisons intrachânes lorsque les chaînes sont dans l'état de globule et à la cinétique lente de désenchevêtrement des chaînes précipitées¹⁹.

1.3. Applications du poly(*N*-isopropylacrylamide).

L'intérêt majeur du PNIPAM, par rapport à d'autres polymères neutres hydrosolubles, vient du fait que sa transition de phase est rapide et se produit à une température facilement accessible. Cette transition pelote-globule résulte donc de la réorganisation des chaînes de polymères et s'accompagne aussi d'un changement d'hydrophobicité. Ceci permet une très grande variation des propriétés du PNIPAM avec la température, et des applications industrielles à usages très spécifiques. Ils sont par exemple utilisés dans l'industrie cosmétique²⁰⁻²¹, comme agents épaississant dans le domaine des enduits, pour la récupération assistée du pétrole et le traitement des eaux usées²², ou encore pour l'élaboration de matériaux dont la transparence varie

avec la température²³. Les applications potentielles les plus importantes du PNIPAM concernent le domaine biologique. En effet, la température de transition de phase (32°C) étant proche de la température physiologique, ce polymère peut être utilisé pour de nouvelles techniques de diagnostic biomédical et dans les biotechnologies, comme pour la fixation de cellules²⁴ ou de protéines, ou bien le transport et la libération contrôlée de médicaments hydrophobes²⁵⁻²⁶.

1.4. Le poly(*N*-isopropylacrylamide) modifié par des groupements hydrophobes.

Le PNIPAM change de conformation suivant la température comme il a été décrit à la section 1.2. Des changements peuvent aussi intervenir lorsque la chaîne de PNIPAM est modifiée par des groupements hydrophobes. Des microstructures hétérogènes peuvent être ainsi formées en dessous de la LCST : les microdomaines hydrophiles seront formés par les segments du PNIPAM, et les agrégats hydrophobes par les segments hydrophobes incorporés. Les propriétés thermiques de ces polymères dépendent de la structure moléculaire de la chaîne modifiée, ou encore de l'hydrophobicité des segments ajoutés. Les caractéristiques du PNIPAM peuvent donc être modifiées en fonction de l'application visée. En effet, l'incorporation de composés comme des lipides, des vitamines, des hormones ou des peptides à la chaîne de polymère est une méthode très efficace pour optimiser des propriétés telles que la bioactivité et la biocompatibilité^{24,27,28,29}. L'effet de chaînes hydrocarbonées placées aux deux extrémités des chaînes de polymères se trouvant en solution aqueuse a déjà été étudié en détail³⁰. Ces PNIPAM téléchéliques modifiés par des chaînes hydrocarbonées forment en solution des micelles en-dessous de la LCST du PNIPAM, et des mesoglobules stables à haute température⁴. L'incorporation de segments

hydrocarbonés et fluorocarbonés à la chaîne de PNIPAM permet d'obtenir des micelles dans l'eau par l'association de ces segments hydrophobes³¹. De plus, ces derniers vont former deux compartiments différents au cœur de la micelle, l'un riche en segments hydrocarbonés (hydrophobe et lipophile) et l'autre en segments fluorocarbonés (hydrophobe et lipophile). Ceci permet la solubilisation d'agents actifs immiscibles à l'intérieur d'une même micelle ou encore la création d'un fluide intelligent qui réagira différemment à l'addition de tensio-actifs hydro ou fluorocarbonés par exemple.

Une autre modification du PNIPAM visant une autre application a été effectuée par Chaw et al.³². Ils ont démontré l'efficacité d'un système de nanoparticules, constituées de copolymères polyacrylamides, le poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N,N*-diméthylacrylamide) dont les chaînes sont terminées à un bout par un groupement cholestérol, pour l'encapsulation et le relargage de médicaments hydrophobes tels que la cyclosporine A et l'indométhacine.

2. Le cholestérol utilisé pour modifier les polymères.

2.1. Les stérols utilisés pour la modification de polymères.

Les stérols sont connus pour être présents dans les membranes de la plupart des cellules eucaryotes. Leurs utilisations pour modifier des polymères synthétiques ou naturels font l'objet de nombreuses études et ces nouvelles macromolécules portant des bouts stéroïdes semblent être très intéressantes pour concevoir de nouveaux biomatériaux³³⁻³⁴, comme par exemple pour stabiliser des vésicules^{35,36}, la synthèse de polycarbonates biodégradables³⁷ ou encore pour la préparation de nouveaux polymersomes³⁸.

2.2. Le cholestérol utilisé pour la modification de polymères.

Au niveau membranaire, le cholestérol joue un rôle structural qui régularise la fluidité membranaire excessive³⁹. En présence de cholestérol, cette fluidité est réduite. Cet effet provient de la rigidité du système induit par les cycles du groupement cholestérol (Figure 3).

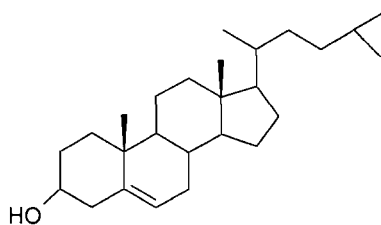


Figure 3 : Structure du cholestérol

Il est important de noter aussi, que le cholestérol joue un grand rôle dans l'auto-assemblage de molécules dans les systèmes biologiques³⁹⁻⁴⁰. Il a déjà été rapporté que les polyélectrolytes contenant des cholestérols forment des micelles de type « fleur » en solution aqueuse. De plus, il a été démontré que les cholestérols ont une forte tendance à s'auto-associer même s'ils sont présents en faible quantité dans le polymère⁴¹⁻⁴². Ce pouvoir auto-associatif relativement fort⁴³ assure de manière assez aisée, l'incorporation d'un médicament à caractère hydrophobe au cœur de l'agrégat à travers des interactions hydrophobes et non covalentes⁴⁴.

Plusieurs études ont déjà été effectuées sur la préparation et la caractérisation de polysaccharides modifiés par des groupements cholestérols. Ce type de polysaccharides montre un comportement associatif unique. Ainsi les pullulans modifiés par des cholestérols se positionnant le long de la chaîne de polymère, forment des nanoparticules monodisperses stables (20-30nm) par auto-association

intra et/ou inter-macromoléculaire dans l'eau^{45,46,47}. Ces particules sont formées de deux domaines, l'un constitué des bouts hydrophobes cholestérol et le « squelette » formé du polysaccharide hydrophile. De plus, elles peuvent former des hydrogels microscopiques. Le grand intérêt de ces nanoparticules est leur capacité à former des complexes avec de nombreuses substances hydrophobes⁴⁸ ainsi qu'avec des protéines ; comme par exemple l'insuline, ce qui empêche cette dernière de s'agréger ou de subir une dégradation enzymatique⁴⁶. Ces nanoparticules sont donc très intéressantes en biotechnologie et pharmacologie et leurs études ont montré qu'elles sont d'excellents vecteurs de protéines⁴⁹. La taille, la densité et la stabilité colloïdale de ces nanoparticules sont contrôlées par le degré de substitution (du groupe hydrophobe), c'est-à-dire, par la variation du nombre de cholestérol sur la chaîne de pullulan (Figure 4)⁴⁶.

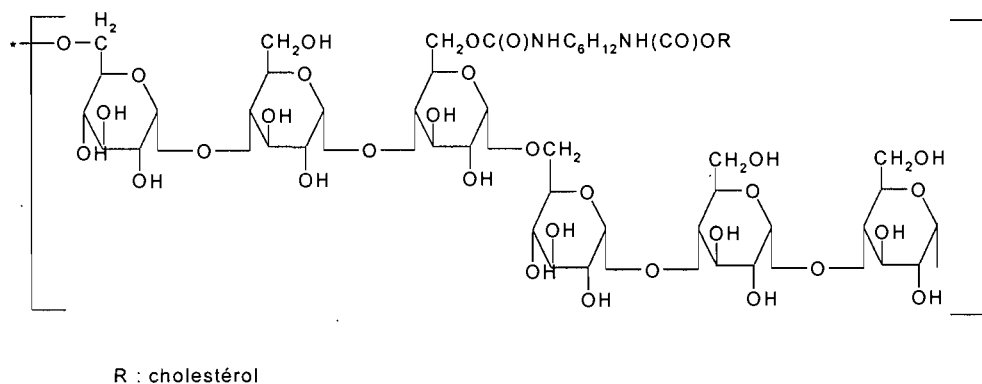


Figure 4 : structure du pullulan modifié par le cholestérol

Le degré de substitution influe aussi sur les caractéristiques du pullulan, ainsi le nombre d'insuline complexé augmentera avec le degré de substitution des cholestérols, dû à l'accroissement du nombre de sites de complexation⁴⁶.

Un mélange constitué de pullulans modifiés par des cholestérols et des chaînes de PNIPAM modifiées avec des groupements hydrophobes a aussi fait l'objet de

recherches⁵⁰. L'auto-association de ces deux polymères modifiés permet d'avoir des nanoparticules hybrides thermosensibles. Cette méthode d'auto-assemblage est une technique très efficace pour préparer des nanogels fonctionnalisés pouvant avoir de nombreuses applications notamment en médecine et pour la libération contrôlée de médicaments comme il a été le cas pour les pullulans modifiés⁴⁹⁻⁵¹.

3. Polymérisation radicalaire contrôlée par agent de transfert de chaîne.

Cette méthode a été choisie par rapport aux autres méthodes de polymérisations radicalaires contrôlées pour ses nombreux avantages comme la diminution importante de la polydispersité.

La technique de polymérisation RAFT, plus sophistiquée que les polymérisations radicalaires conventionnelles, a été développée en Australie en 1998⁵² et permet la préparation de polymères avec une faible polydispersité, une architecture bien définie et une masse moléculaire bien déterminée. Cette technique est fortement apparentée à la technique dite MADIX (MAcromolecular Design via Interchange of Xanthates)⁵³ qui se concentre uniquement sur la classe des xanthates alors que la polymérisation RAFT consiste à utiliser un composé de type thiocarbonylthio comme agent de transfert de chaîne. De plus, c'est une méthode plus diversifiée que la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP), ou la polymérisation radicalaire à l'aide de nitroxyde (NMP). De nombreux agents de transferts RAFT, comme les dithioesters,⁵⁴ les dithiocarbamates,⁵⁵⁻⁵⁶ et les trithio-carbonates,^{54,57} ont été développés. Les fonctions terminales de l'agent RAFT permettent de nombreuses modifications de la chaîne polymère, et donc la préparation d'une large gamme de produits finaux avec des architectures complexes : (co)polymères blocs⁵⁶, greffés, en

étoile⁵⁸, en peigne... De plus, les conditions de synthèse de ces polymères sont très flexibles (grande variété de monomères, conditions de réaction diversifiées) ce qui est très intéressant d'un point de vu industriel.

3.1. Mécanisme de la polymérisation RAFT.

La figure 5 représente le mécanisme des différentes étapes se produisant lors de cette polymérisation radicalaire contrôlée.

Le point important du mécanisme de polymérisation RAFT réside dans l'étape d'équilibre d'addition-fragmentation. Les étapes d'initiation et de terminaison se produisent également dans les polymérisations radicalaires conventionnelles. Les radicaux de propagation ($P_n\cdot$), générés par la décomposition de l'amorceur et l'addition des radicaux dérivés de l'amorceur au monomère, réagissent avec la double liaison carbone-soufre de l'agent RAFT. Le radical labile intermédiaire (**2**) permet soit la régénération de l'espèce de départ soit la formation temporaire de l'espèce dormante (**3**) ainsi que celle du radical $R\cdot$ dérivé de l'agent RAFT. Ce radical peut ensuite réagir avec le monomère et ainsi reinitier la polymérisation et former un nouveau radical de propagation ($P_m\cdot$). Une caractéristique essentielle du mécanisme RAFT est que la partie dithiocarbonate ($Z-C(S)S-$), présente dans l'agent RAFT initial sera aussi présente au niveau de la chaîne polymère (**3**). C'est pour cela, que la chaîne dormante de polymère peut aussi agir en tant qu'agent de transfert comme le montre l'équilibre principal. De même que pour le pré-équilibre, le radical de propagation réagit avec l'agent RAFT polymérique. Par cette réaction, le radical est transformé en espèce dormante, alors que la chaîne de polymère provenant de l'agent RAFT polymérique se retrouve sous forme de radical et permet ainsi une croissance de la chaîne. La nouvelle espèce dormante formée peut aussi être réactivée. L'équilibre

rapide entre les nouveaux radicaux de propagation ($P_n\cdot$ et $P_m\cdot$) et l'espèce dormante polymérique thiocarbonylthio permet une probabilité égale aux chaînes de croître, et permet donc la production de polymères ayant une faible polydispersité.

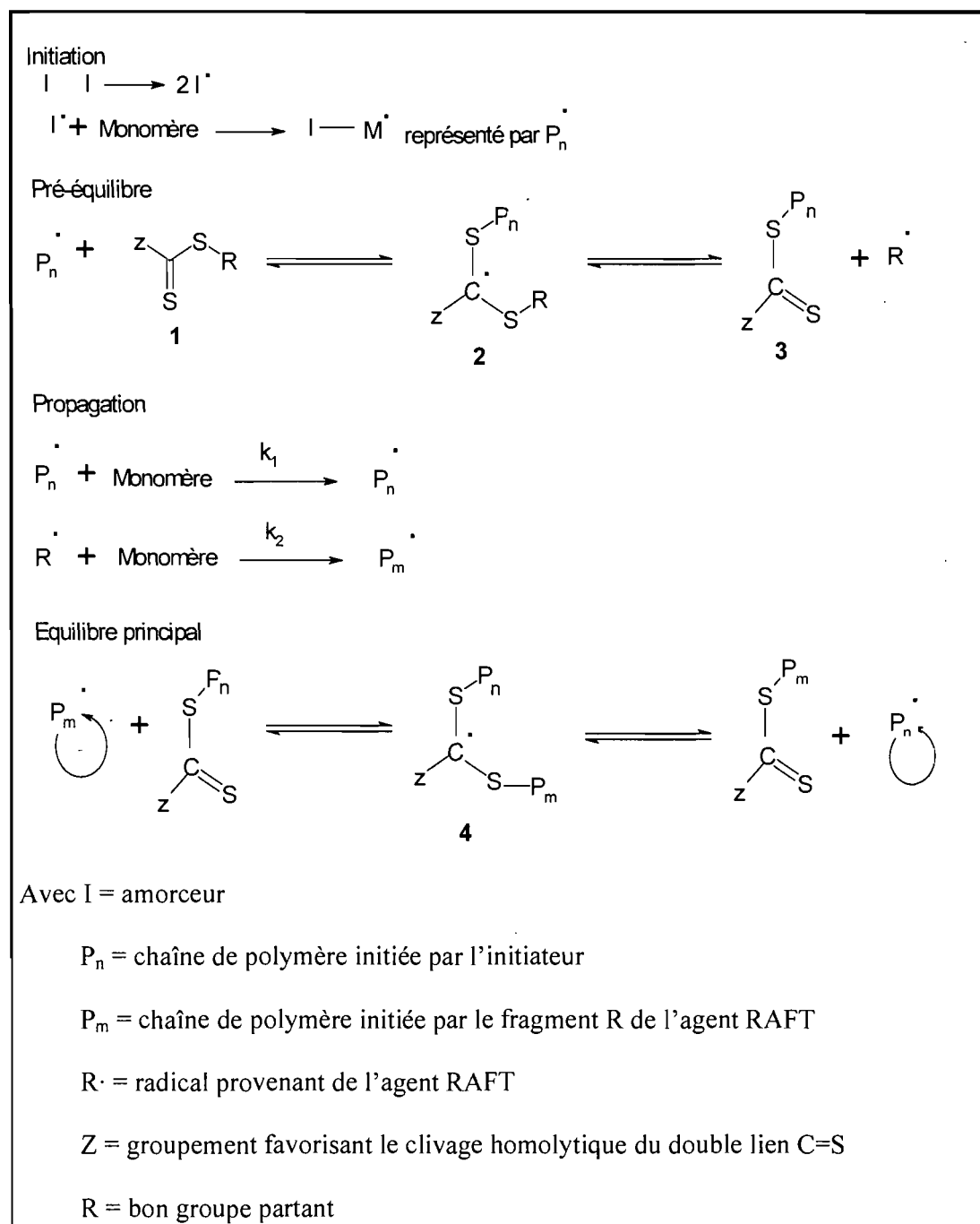


Figure 5 : Mécanisme de la polymérisation par transfert addition-fragmentation

réversible

Lorsque la polymérisation est finie ou arrêtée, la plupart des chaînes sont terminées par le groupement thiocarbonylthio et peuvent être isolées comme matériau stable.

Pour obtenir un polymère avec des caractéristiques bien définies, la polymérisation RAFT doit obéir à certaines règles : il faut qu'il y ait une réaction d'échange rapide (par rapport à la propagation), un bon groupe partant R capable de reinitier la réaction et un nombre constant de chaînes durant la polymérisation. Une large gamme de thiocarbonylthio agents RAFT ont déjà été rapportés^{59,60,61}. L'efficacité de l'agent RAFT dépend bien sûr du monomère qui doit être polymérisé, mais dépend fortement des propriétés du groupe partant R et du groupe Z qui peut être choisi pour activer ou désactiver la double liaison C=S et modifier la stabilité de l'intermédiaire radicalaire^{62,63,64,65,66}. Pour une polymérisation RAFT efficace, les composés **1** et **3** doivent avoir une double liaison C=S réactive, les intermédiaires radicalaires **2** et **4** doivent se fragmenter rapidement et ne pas donner des réactions secondaires (liaison S-R faible). De plus, le radical R· doit reinitier la polymérisation efficacement.

3.2. Conclusion et limites de cette voie de polymérisation.

La polymérisation RAFT est devenue l'une des plus importantes méthodes de polymérisation radicalaire « vivante ». Cette méthode est souple et peut être appliquée à la majorité des polymères préparés par polymérisation radicalaire. Cependant, le choix de l'agent RAFT pour le monomère et les conditions de réaction est crucial pour la réussite de la polymérisation. Grâce à cette technique, des polymères d'architecture bien définie, comportant des fonctions bien définies en bout de chaîne issues de l'agent RAFT, et de longueur de chaîne contrôlée (faible polydispersité), peuvent être

synthétisés. Ces polymères trouvent de plus en plus d'applications dans des domaines très diversifiés : essor de nouveaux surfactants, de dispersants, d'enduits⁶⁵, d'adhésifs, de biomatériaux, de membranes, de matériaux en microélectronique⁶⁷, ou encore pour le relargage de médicaments en utilisant des polymères amphiphiles possédant une LCST pouvant solubiliser des substances par un changement de température⁶⁸.

Cependant, il existe certains inconvénients à utiliser des agents RAFT, tels que l'incorporation des fonctions dithioesters au bout de la chaîne de polymère. En effet, ces derniers contiennent du soufre ce qui peut provoquer un dégagement d'odeur désagréable, cette odeur étant plus persistante si le polymère est de faible masse molaire. De plus, il colore le polymère final, ce qui peut ne pas être souhaité pour des applications industrielles. Cette coloration, jaune pâle pour les thiocarbonylthios, est due à l'absorption du groupe $-C=S(S)$ dans le visible.

4. Techniques d'analyses utilisées

4.1. La calorimétrie différentielle à balayage haute sensibilité.

La calorimétrie différentielle à balayage haute sensibilité (ou differential scanning calorimetry, DSC) est une méthode analytique souvent utilisée dans l'étude des polymères⁶⁹, que cela soit à l'état solide ou en solution. En effet, la plupart des phénomènes physico-chimiques sont accompagnés d'un dégagement ou d'une absorption de chaleur, la microcalorimétrie peut donc être utilisée à des fins analytiques ou pour des études fondamentales sur des principes thermodynamiques. La température ayant un effet sur le comportement des chaînes de polymères en solution, de nombreuses études microcalorimétriques ont déjà été effectuées que cela

soit pour l'étude de protéines, d'interactions ligand-protéines ou encore protéine-protéine⁷⁰ ainsi que pour un très grand nombre de polymères synthétiques.

4.1.1 Principe de la microcalorimétrie différentielle à balayage HS-DSC.

Cette méthode repose sur un principe simple : la mesure de la chaleur absorbée ou dégagée par l'échantillon en fonction de la température appliquée. Pour réaliser cette expérience, la solution de polymère est placée dans la cellule de mesure, et le même volume de la référence (le solvant utilisé pour la solution de polymère) dans la cellule de référence. Ces deux cellules suivent exactement le même cycle thermique. A tout moment, les deux cellules sont donc à la même température. Si l'échantillon subit une transition endo ou exothermique, le microcalorimètre devra adapter la puissance fournie à l'échantillon pour maintenir sa température égale à celle de la référence. Le suivi de la différence de puissance fournie à l'échantillon et à la référence est donc une mesure directe de la différence de capacité calorifique, C_p , entre la solution de l'échantillon et de la référence (équation 1).

$$\frac{dQ_p}{dt} \frac{1}{\sigma M} = C_p \quad (1)$$

Où Q_p représente la chaleur absorbée ou dégagée à pression constante, t le temps, σ la vitesse de balayage, M le nombre de mole de l'échantillon dans la cellule.

4.1.2 Informations obtenues par DSC et application au PNIPAM en solution aqueuse.

Cette technique permet d'obtenir des informations sur les paramètres thermodynamiques associés à la transition induite par le chauffage de la solution. La figure 6 montre un thermographe classiquement obtenu pour une solution de PNIPAM

dans l'eau³⁰. Celui-ci concerne une solution de PNIPAM téléchélique, dont les chaînes sont terminées par une chaîne hydrocarbonée ayant dix-huit carbonés.

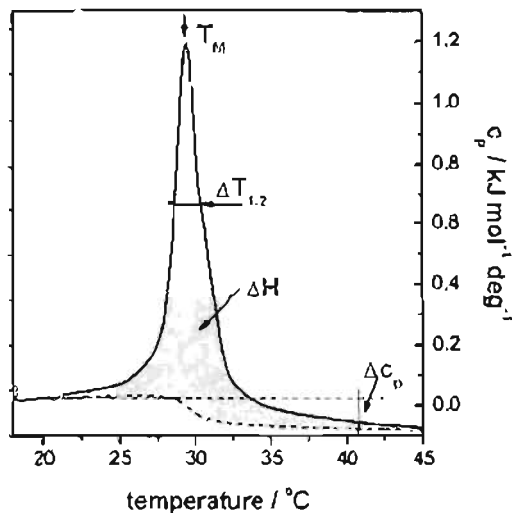


Figure 6 : Endotherme (vitesse de chauffage : $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$) pour une solution aqueuse de C_{18} -PNIPAM- C_{18} -35K à une concentration de 5.0g L^{-1} ³⁰

La capacité calorifique de la solution est mesurée en fonction de la température. De cette valeur, les différences d'enthalpie (ΔH), d'entropie (ΔS) liées à la transition peuvent être calculées. De plus, la différence de capacité calorifique avant et après chauffage (ΔC_p), et la température de transition de phase T_M sont observées. Les relations entre l'enthalpie, l'entropie et la capacité calorifique sont données par les équations 2 et 3 :

$$\Delta H = \int_{T < T_M}^{T > T_M} \Delta C_p \cdot dT = \Delta C_p (T_{T < T_M} - T_{T > T_M}) \quad (2)$$

$$\Delta S = \int_{T < T_M}^{T > T_M} \frac{\Delta C_p}{T} dT = \Delta C_p \ln(T_{T < T_M} - T_{T > T_M}) \quad (3)$$

où $T > T_M$ représente la gamme de température au-dessus de la température de transition et $T < T_M$ la gamme de température en-dessous de la température de transition.

La microcalorimétrie s'avère être une technique très appropriée pour étudier les chaînes de PNIPAM en solution dont la caractéristique principale est sa thermosensibilité réversible. Cette technique permet de déterminer précisément la température et l'enthalpie de la transition pelote-globule. La rupture des liaisons hydrogène entre le polymère et les molécules d'eau, conduisant à une déshydratation des chaînes lors du chauffage d'une solution aqueuse de PNIPAM, est accompagnée d'une variation d'enthalpie qui peut être facilement suivie par microcalorimétrie (HS-DSC)^{71,72}. En ce qui concerne l'effet de la concentration en PNIPAM, il a été constaté que lorsque la concentration augmente, la température de transition diminue légèrement (quelques centièmes de degrés), de plus, ceci est accompagné d'un élargissement de pic. Cette température de transition, T_M , correspond au moment où la solution commence à être turbide⁷³. Par contre, l'enthalpie ΔH , reste à peu près constante et positive indiquant que la transition pelote-globule est endothermique. Pour ce qui est de l'effet de la masse molaire, la température de transition pelote-globule augmente faiblement avec la masse molaire. Ceci provient de fait que lors de la déshydratation des chaînes de PNIPAM, les liaisons hydrogènes formées entre le PNIPAM et les molécules d'eau se rompent en même temps⁷⁴.

4.2 La calorimétrie à perturbation de pression.

La calorimétrie à perturbation de pression ou Pressure Perturbation Calorimetry (PPC) mesure le changement de chaleur résultant du changement de pression appliquée à une solution. Des informations concernant l'hydratation des

chaînes de polymère et les propriétés volumiques des solutions de polymères peuvent être obtenues à l'aide de cette technique. Le changement de chaleur mesuré peut être utilisé pour calculer le coefficient d'expansion thermique de l'échantillon α , $\alpha = 1/V(\partial V / \partial T)_P$ et ce en fonction de la température. Ce coefficient va dépendre aussi des interactions entre le polymère et le solvant, c'est-à-dire l'eau. Cette technique permet donc d'obtenir des informations sur la relation entre la température et le caractère hydrophile/hydrophobe du polymère en solution⁷⁵, et donc de calculer les changements de volume de la couche de solvation autour de la chaîne de polymère avant et après la transition de phase.

4.2.1 Principe de la calorimétrie à perturbation de pression.

Les mesures de PPC sont effectuées avec le même microcalorimètre qui est utilisé pour la HS-DSC. Un simple accessoire est rajouté permettant d'appliquer une pression aux échantillons. La pression maximale applicable est de 500 kPa. La solution de polymère est placée dans une cellule et le solvant dans la cellule de référence. La même pression est appliquée aux deux cellules et une sonde permet de récolter les données (figure 7).

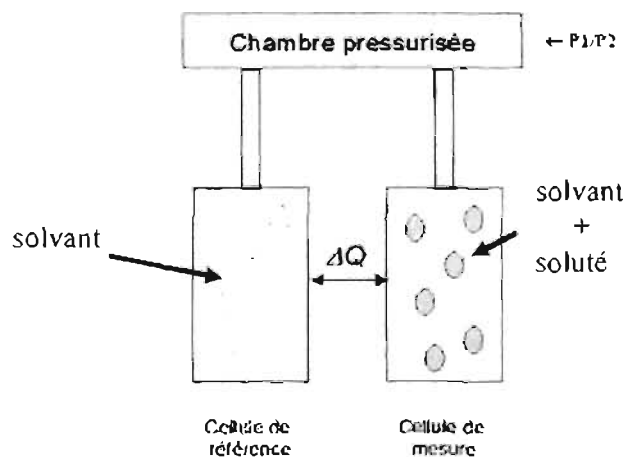


Figure 7 : Schéma de la calorimétrie à perturbation de pression

La ligne de base est tracée, à l'équilibre, à une température donnée et à la pression P1. Une légère surpression P2 est ensuite appliquée générant de la chaleur qui est absorbée par les deux cellules. Une légère différence de chaleur ΔQ est observée due à la présence de polymère dans la cellule de mesure. Les pics de compression et de décompression sont identiques mais de signe opposé (Figure 8)⁷⁶. La différence de chaleur ΔQ est obtenue en intégrant chaque pic. La température est alors changée, une nouvelle ligne de base est tracée à l'équilibre et un nouveau cycle de compression/décompression est répété.

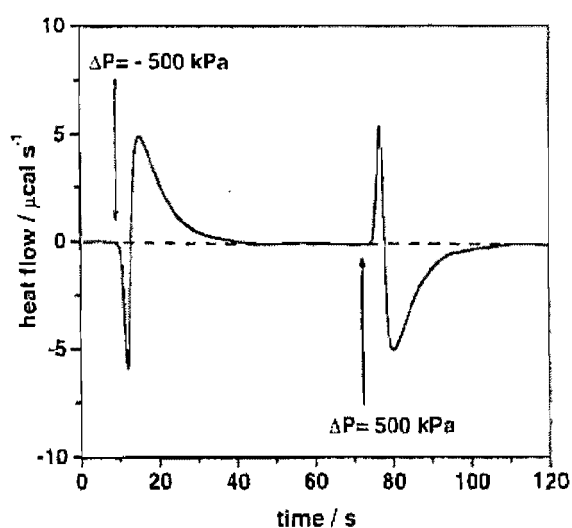


Figure 8 : Courbe expérimentale de PPC d'une solution aqueuse de PNIPAM (5g/L) à 20°C ⁷⁶.

4.2.2 Informations obtenues par calorimétrie à perturbation de pression.

Les données obtenues par les cycles de pression pour une même température sont moyennées et permettent d'obtenir la courbe de PPC dont la figure 9 est un exemple³⁰. L'aire en dessous de la courbe donne la variation de volume de la solution accompagnant la transition.

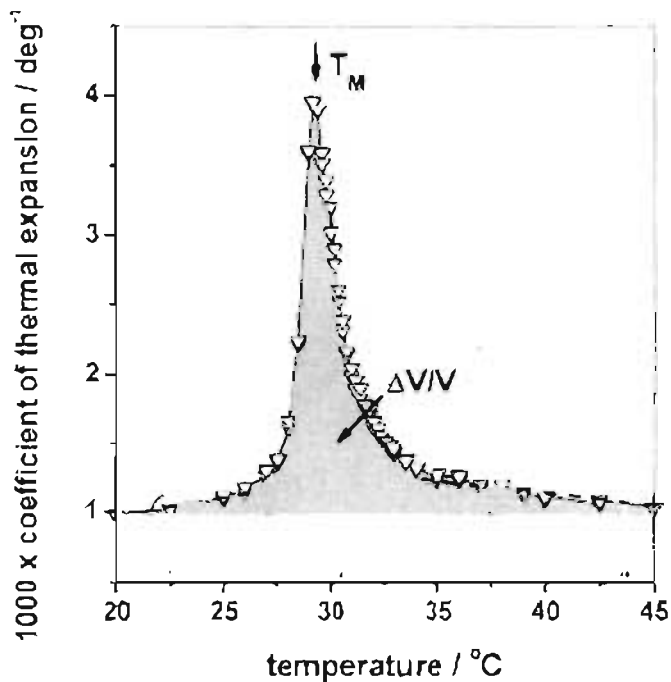


Figure 9 : Courbe PPC d'une solution aqueuse de C₁₈-PNIPAM-C₁₈-35K de 5g/L³⁰.

La température de transition (T_m) est aussi obtenue et peut être comparée à celle obtenue par HS-DSC. Des paramètres thermodynamiques peuvent être calculés à l'aide d'équations déjà établies.

Dans le cas d'un système à un composé, et d'après la deuxième loi de la thermodynamique, la variation de chaleur dQ_{rev} pour un processus réversible à une température T est reliée à la variation d'entropie par :

$$dS = \frac{dQ_{rev}}{T} \quad (4)$$

La dérivée différentielle de cette équation par rapport à la pression à température

constante donne :

$$\left(\frac{\partial Q_{rev}}{\partial P} \right)_T = T \left(\frac{\partial S}{\partial P} \right)_T \quad (5)$$

En utilisant la relation de Maxwell, $(\partial S/\partial P)_T = -(\partial V/\partial T)_P$, où V est le volume du système, on obtient à partir de l'équation 5 l'égalité suivante :

$$\left(\frac{\partial Q_{rev}}{\partial P}\right)_T = -T\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P = -TV\alpha \quad (6)$$

où α représente le coefficient d'expansion thermique du système, $\alpha = 1/V(\partial V/\partial T)_P$.

En intégrant cette équation à température constante et pour une petite variation de pression, on suppose que V et α restent inchangés dans ces conditions, l'approximation suivante est ainsi obtenue :

$$Q_{rev} = -TV\alpha\Delta P \quad (7)$$

Pour un système à deux composés, c'est-à-dire un polymère de masse m_p dissout dans un solvant de masse m_s , le volume total V_{total} est égal à:

$$V_{total} = m_s V_s + m_p \bar{V}_p \quad (8)$$

où \bar{V}_p est le volume spécifique partiel du polymère dans la solution et V_s est le volume spécifique du solvant pur. En procédant de la même façon que précédemment, le coefficient d'expansion thermique (α) des chaînes de polymères peut être calculé à l'aide de l'équation (9) :

$$\alpha = \alpha_s - \frac{\Delta Q}{T\Delta P m_p \bar{V}_p} \quad (9)$$

où α_s représente le coefficient d'expansion du solvant, T la température, m_p et \bar{V}_p la masse du polymère et son volume partiel en solution, respectivement. ΔQ est la différence de chaleur entre la cellule de l'échantillon et celle de la référence. La

variation volumique des chaînes de polymères hydratées ΔV qui accompagne la transition est obtenue en intégrant la courbe représentant le coefficient d'expansion thermique en fonction de la température, comme l'indique l'équation (10) :

$$\frac{\Delta V}{V} = \int \alpha_p dT = \int \frac{1}{V} \left(\frac{dV}{dT} \right) dT \quad (10)$$

On suppose que ΔV , représentant le changement de volume eau d'hydratation/ eau dans le volume de la cellule, est très faible par rapport au volume V de la solution. La valeur ΔV est donc exprimée comme pourcentage de V .

4.3 La diffusion de la lumière.

La diffusion de radiations est utilisée depuis déjà plusieurs années comme technique rapide, précise et efficace pour la détermination de la taille des particules en suspension ou en aérosols⁷⁷.

Lors d'analyses par diffusion de lumière, un échantillon de particules en suspension est soumis à un faisceau incident monochromatique, comme un laser He-Ne ($\lambda = 632 \text{ nm}$). Lorsque la lumière rencontre ces particules, elle est rediffusée dans toutes les directions. Quand les particules sont très petites comparées à la longueur d'onde de la lumière incidente, l'intensité de la lumière diffusée est la même dans toutes les directions (diffusion Rayleigh). Pour des particules plus grandes (de diamètre supérieur à 250 nm), l'intensité dépend de l'angle (diffusion de Mie). L'intensité de la lumière diffusée à un angle θ mesurée à partir du faisceau principal, peut être détectée et analysée (figure 10).

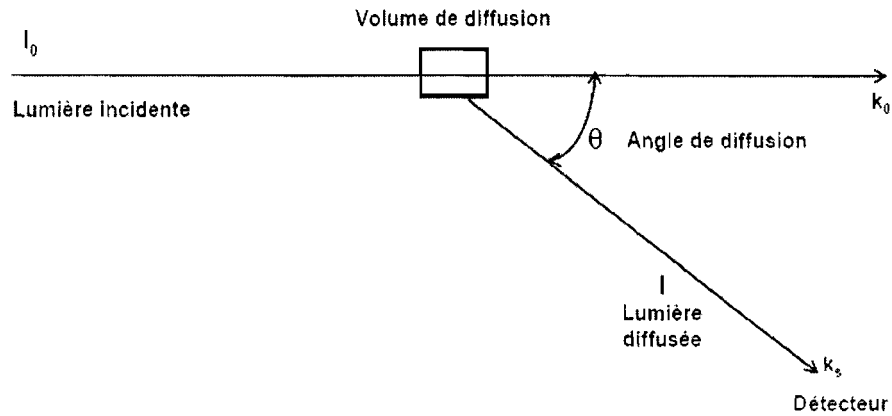


Figure 10 : Schéma de la diffusion de la lumière.

k_0 représente le vecteur d'onde incident et k_s le vecteur d'onde diffusé. La différence vectorielle, $k_0 - k_s$, appelée le vecteur de diffusion (q), a une valeur qui peut être obtenue à partir de la formule suivante (équation 11) :

$$|q| = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (11)$$

où n_0 est l'indice de réfraction du milieu dans lequel sont dispersées les particules et λ est la longueur d'onde (dans le vide) du rayon incident. L'unité de la valeur q est l'inverse d'une longueur. q^{-1} donne donc l'échelle de longueur qui sera analysée par la lumière diffusée à l'angle θ . Aux petits angles, q^{-1} est large et la lumière diffusée dans cette direction contiendra seulement des informations grossières sur les propriétés dynamiques et structurales des particules. Au contraire, la lumière diffusée à un grand angle contient des informations plus fines et peut, par exemple, apporter des renseignements sur la structure interne des particules.

En ce qui concerne cette technique, deux approches expérimentales fondamentalement différentes sont utilisées. Dans la première approche, les fluctuations de l'intensité de lumière diffusée résultant du mouvement diffusif des

particules sont enregistrées et analysées par auto-corrélation. Cette méthode étudiant les fluctuations de l'intensité, quand elle est appliquée à la diffusion de lumière, est connue sous différents noms comme diffusion quasi-élastique de la lumière (Quasi Elastic Light Scattering : QELS), ou encore diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering : DLS). La seconde approche implique la mesure de l'intensité moyenne de la lumière diffusée par les particules en fonction de l'angle de diffusion (θ). Cette méthode s'appelle la diffusion statique de la lumière (Static Light Scattering : SLS).

4.3.1 La diffusion dynamique de la lumière.

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique très utilisée pour déterminer la taille moyenne et la distribution en taille de particules en suspension, mesurant de quelques nanomètres à quelques micromètres. En DLS, nous nous intéressons aux fluctuations de l'intensité au cours du temps, sur quelques microsecondes, dues au mouvement brownien des particules dans la solution. Il est possible d'observer cette fluctuation en fonction du temps en utilisant un photomultiplicateur comme détecteur. Après analyse de ces fluctuations d'intensité en fonction du temps et connaissant le coefficient de diffusion des particules et la viscosité du milieu, l'équation de Stokes-Einstein permet de calculer le rayon hydrodynamique R_h ou le diamètre des particules (équation 12). Le rayon hydrodynamique représente la taille effective de la particule détectée à partir de son mouvement brownien, ce qui équivaut au rayon d'une « sphère dure » ayant le même coefficient de diffusion et les mêmes propriétés hydrodynamiques que la macromolécule.

Le coefficient de diffusion de la particule (en $m^2.s^{-1}$) est relié au rayon hydrodynamique de la particule sphérique par la formule de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (12)$$

où R_H représente le rayon hydrodynamique des particules ; k , la constante de Boltzmann ; T la température ; η la viscosité et D le coefficient de diffusion.

4.3.2 Diffusion statique de la lumière.

La diffusion statique de la lumière (SLS) est utilisée dans la détermination des masses moléculaires en poids, du rayon et de la structure des particules. Elle permet également d'étudier les interactions entre les particules. En SLS, on considère la valeur moyenne de l'intensité de la lumière diffusée. Celle-ci est donc constante au cours du temps, mais varie en fonction de l'angle θ entre les faisceaux incident et diffusé.

Le rayon de giration R_g représente la distance entre chaque point de la chaîne de polymère et le centre de gravité de ce dernier. R_g renferme donc une information sur la taille et la géométrie de la particule. Il est relié de façon plus ou moins complexe aux paramètres géométriques définissant la forme de la particule :

Pour $qR_g \ll 1$:

- $R_g^2 = (3/5) r^2$ pour une sphère de rayon r
- $R_g^2 = (L^2/12)$ pour un bâtonnet de longueur L et d'épaisseur négligeable
- $R_g^2 = r^2/6$ pour une pelote gaussienne de longueur quadratique moyenne r^2 .

Pour $qR_g \gg 1$ et en milieu très dilué :

$$I(q)/C = KMP(q).$$

où I représente l'intensité diffusée ; C la concentration massique en particules diffusantes ; K la constante tenant compte de l'indice de réfraction de la solution ; M la masse molaire des particules et $P(q)$ le facteur de forme des particules.

En première approximation, les courbes $\text{Log}(I(q)/C) = f(\text{Log}(q))$ apporteront des informations sur la taille et la structure des particules. En effet, le facteur de forme des particules P dépend du rayon de giration R_g , la valeur de la pente de ces courbes sera donc liée à la valeur du rayon de giration (R_g^2) et donc à la géométrie des particules. Ainsi, si les particules observées sont des bâtonnets, la pente des courbes tend vers -1. Dans le cas où les objets en solution sont des pelotes gaussiennes, alors la pente sera plus proche de -2.

Ces deux approches (DLS et SLS) ont été utilisées notamment pour étudier les phénomènes d'association et de dissociation des chaînes de PNIPAM en solution aqueuse diluée en faisant varier la température des solutions. Il est donc possible de suivre les changements de conformation des chaînes de polymères de la pelote hydratée au globule collapsé au fur et à mesure que la qualité du solvant diminue lors du chauffage de la solution aqueuse^{78,79,80}. Il a aussi été constaté un phénomène d'hystérèse au niveau du rayon hydrodynamique R_H et du rayon de giration R_g lors des cycles de chauffages et refroidissement⁸¹. La diffusion de la lumière, dynamique et statique, a aussi été utilisée pour étudier la stabilité, la taille et la distribution en taille de mésoglobules formés de chaînes de PNIPAM modifié en fonction de la température⁸². Ces deux méthodes ont aussi permis de mesurer les températures de transitions de PNIPAMs modifiés par des groupes hydrophobes⁴.

5. Présentation des chapitres.

Le poly(*N*-isopropylacrylamide) a suscité beaucoup d'intérêts depuis de nombreuses années dû à sa thermosensibilité réversible. Son point trouble se trouvant à environ 32°C est proche de la température du corps humain et permet donc d'envisager un grand nombre d'applications en biotechnologie. Le PNIPAM peut être modifié par copolymérisation ou encore en attachant à la chaîne principale du polymère divers groupements (hydrophiles, hydrophobes, linéaires, encombrants...). Ces modifications structurales entraînent des changements au niveau des caractéristiques du PNIPAM et de nouvelles applications peuvent donc être visées.

Le deuxième chapitre de ce mémoire s'attache à décrire la synthèse en deux étapes du PNIPAM via une polymérisation radicalaire contrôlée par agent de transfert de chaîne (polymérisation RAFT). Dans un second temps, la méthode employée pour modifier le PNIPAM à l'aide de groupements cholestérol hydrophobes sera précisément décrite. Les différents polymères ainsi obtenus, c'est-à-dire les PNIPAM téléchéliques dont les chaînes sont terminées par des groupes cholestérol, ont été caractérisés par RMN ¹H et GPC.

Le troisième chapitre présente d'autres méthodes de synthèse qui ont été essayées, mais sans succès, pour la préparation du PNIPAM modifié par le cholestérol. Et les propriétés de leurs solutions aqueuses sont étudiées à l'aide de diverses techniques : la calorimétrie différentielle à balayage haute sensibilité, la calorimétrie à perturbation de pression et aussi, la diffusion dynamique et statique de la lumière. Le dernier chapitre décrira aussi les résultats obtenus par des méthodes de caractérisation par imagerie telles que l'AFM (microscopie à force atomique) et le TEM (microscopie électronique à transmission).

Dans la conclusion, un résumé des principaux résultats obtenus sera présenté. Les polymères ainsi préparés posséderont donc une chaîne souple hydrophile terminée par des bouts hydrophobes très rigides. Son comportement en solution aqueuse pourra être comparé à celui du PNIPAM dont les chaînes sont terminées par des segments hydrocarbonés hydrophobes et flexibles^{4,30}. Pour finir, les travaux envisagés pour la continuation de ce projet seront énoncés.

-
- (1) Heskins, M.; Guillet, J. E. *Journal of Macromolecular Science, Chemistry* **1968**, 2 (8), 1441-1455.
 - (2) Zhang, J. X.; Qiu, L. Y.; Zhu, K. J.; Jin, Y. *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, 25 (17), 1563-1567.
 - (3) Saunders, B. R.; Crowther, H. M.; Morris, G. E.; Mears, S. J.; Cosgrove, T.; Vincent, B. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, 149 (1-3), 57-64.
 - (4) Kujawa, P.; Tanaka, F.; Winnik, F.M. *Macromolecules* **2006**, 39, 3048-3055.
 - (5) Pelton, R. *Advances in Colloid and Interface Science* **2000**, 85 (1), 1-33.
 - (6) Benoit, D.; Chaplinski, V.; Braslau, R.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3904-3920.
 - (7) Gaynor, S. G.; Matyjaszewski, K. *In Controlled/Living Radical Polymerization – Progress in ATRP, NMP and RAFT*; Matyjaszewski, K., Ed.; American Chemical Society: Washington DC, **2000**; Vol. 768, pp 347-360.
 - (8) Schild, H. G.; Tirell, D. A.. *Journal of Physical Chemistry* **1990**, 94(10), 4352-4356.
 - (9) Tanford, C. *The Hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes.* **1991**, New York. Wiley.
 - (10) Ricka, J.; Meewes, M.; Nyffenegger, R.; Binkert, T. *Physical Review Letters*, **1990**, 65(5), 657-660.
 - (11) Fujishige, S.; Kubota, K.; Ando, I. *Journal of Physical Chemistry* **1989**, 93(8), 3311-3313.
 - (12) Winnik, F. M. *Macromolecules*, **1990**, 23(1), 233-242.

-
- (13) Meewes, M.; Ricka, J.; Desilva, M., et al. *Macromolecules*, **1991**, 24(21), 5811-5816.
- (14) Chee, C. K.; Rimmer, S.; Soutar, I.; Swanson, L. *Polymer*, **1997**, 38(2), 483-486.
- (15) Wu, C.; Zhou, S. *Macromolecules* **1995**, 28, 5388.
- (16) Winnik, F. M. ; Ringsdorf, H. ; Venzmer, J. *Macromolecules*, **1990**, 23, 8, 2415.
- (17) Gorelov, A. V.; Du Chesne, A.; Dawson, K. A. *Physica A*, **1997**, 240, 443.
- (18) Binkert, Th. ; Oberreich, J. ; Meewes, M. ; Nyffenegger, R.; Ricka, J. *Macromolecules*, **1991**, 24, 5806.
- (19) Ding, Y.; Ye, X.; Zhang, G. *Macromolecules* **2005**, 38, 904-908.
- (20) Chevalier, V.; L'Alloret, F. WO2004006872A61K7/02, Cosmetic use of a polymer comprising lcst units, **2004**.
- (21) Mougin, N. US6159457 Cosmetic or dermatological composition containing polymers exhibiting a critical temperature of the LCST type or of the USCT type of uses there of, **2000**.
- (22) Saunders, B. R.; Crowther, H. M.; Morris, G. E.; Mears, S. J.; Cosgrove, T.; Vincent, B. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, 149 (1-3), 57-64.
- (23) Siol, W.; Terbrach, U. US5430104 C08L29/12, Polymer mixtures with lower critical solution temperature (LCST) behaviour, **1995**.
- (24) Hwang, J. J.; Iyer, S. N.; Li, L. S.; Claussen, R.; Harrington, D. A.; Stupp, S. I. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**, 99, 9662.

-
- (25) Kissel, T.; Breitenbach, A.; Jung, T.; Kamm, W. DE10148353 C11D17/00, Controlled release coating on LCST polymer-coated shaped bodies, such as detergent tablets, are applied from aqueous dispersions containing a coating material, a dispersant and a co-dispersant, **2003**.
- (26) Noriyuki, O.; Hirotaka, F.; Kazunori, K.; Katsuhiko, U. JP2002060436 C08F220/58, Thermoresponsive polymer having capability of forming coacervate, and liquid-liquid phase partition process, immobilized enzyme and drug releasing agent all using polymer, **2002**.
- (27) Kricheldorf, H. R.; Kreiser-Saunders, I. *Polymer* **1994**, 35, 4175.
- (28) Klok, H. A.; Hwang, J. J.; Stupp, S. I. *Macromolecules* **2002**, 35, 746.
- (29) Klok, H. A.; Hwang, J. J.; Hartgerink, J. D.; Stupp, S. I. *Macromolecules* **2002**, 35, 6101.
- (30) Kujawa, P. ; Segui, F. ; Shaban, S. ; Diab, C.; Okada, Y.; Tanaka, F.; Winnik, F. M. *Macromolecules* **2006**, 39, 341-348.
- (31) Kujawa, P; Raju, B. B. ; Winnik, F. M. *Langmuir* **2005**, 21, 10046-10053.
- (32) Chaw, C. S.; Chooi, K. W.; Liu, X. M.; Tan, C. W. ; Wang, L. ; Yang, Y. Y. *Biomaterials* **2004**, 25, 4297-4308.
- (33) Heino, S.; Lusa, S.; Somerharju, P.; Ehnholm, C.; Olkkonen, V. M.; Ikonen, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 3375.
- (34) Zhu, X.; Nichifor, M. *Acc Chem Res* **2002**, 35, 539.
- (35) Beugin, S.; Edwards, K.; Karlsson, G.; Ollivon M.; Lesieur, S. *Biophysical Journal* **1998**, 74, 3198-3210.
- (36) Cho, I. ; Chung, K. C. *Macromolecules* **1984**, 17, 2935-2937.
- (37) Wan, T.; Zou, T.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 524-529.

-
- (38) Xu, J. P.; Ji, J.; Chen, W. D.; Shen, J. C. *Journal of Controlled Release* **2005**, 107, 502-512.
- (39) Demel, R. A.; De Kruffyff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 457, 109-132.
- (40) Zhou, C. R.; Yi, Z. J. *Biomaterials* **1999**, 20, 2093-2099.
- (41) Yusa, S.; Kamachi, M.; Morishima Y. *Langmuir* **1998**, 14, 6059.
- (42) Yusa, S.; Kamachi, M.; Morishima Y. *Macromolecules* **2000**, 33, 1224.
- (43) Goodby, J. M. *Liquid Crystals* **1998**, 24, 25-38.
- (44) Liu, X. M.; Pramoda, K. P.; Yang, Y. Y.; Chow, S. Y.; He, C. *Biomaterials* **2004**, 25, 2619.
- (45) Aki yoshi, K.; Deguchi, S.; Morigushi, N.; Yamaguchi, S.; Sunamoto, J. *Macromolecules* **1993**, 26, 3062.
- (46) Akiyoshi, K.; Sunamoto, J. *Supramol. Sci.* **1996**, 3, 157
- (47) Akiyoshi, K.; Deguchi, S.; Tajima, H.; Nishikawa, T.; Sunamoto, J. *Macromolecules* **1997**, 30, 857.
- (48) Akiyoshi, K.; Deguchi, S.; Tajima, H.; Nishikawa, T.; Sunamoto, J. *Proc. Jpn. Acad.* **1995**, 71(B), 15.
- (49) Akiyoshi, K.; Kobayashi, S.; Shichibe, S.; Mix, D.; Baudys, M.; Kim, S. W.; Sunamoto, J. *J. Controlled Release* **1998**, 54, 313.
- (50) Akiyoshi, K.; Kang, E.-C.; Kurumada, S.; Sunamoto, J.; Principi, T.; Winnik, F. M. *Macromolecules* **2000**, 33, 6752.
- (51) Ikuta, Y.; Katayama, N.; Wang, L.; Okugawa, T.; Takahashi, Y.; Schmitt, M.; Gu, X.; Watanabe, M.; Akiyoshi, K.; Nakamura, H.; Kuribayashi, K.; Sunamoto, J.; Shiku, H. *Blood* **2002**, 99, 3717.
- (52) Le, T. P.; Moad G.; Rizzardo E.; Thang S. H., WO 98/01478, **1998**.

-
- (53) Charmot, D.; Corpart, P.; Adam, H.; Zard, S. Z.; Biadatti, T.; Bouhadir, G. *Macromol. Symp.* **2000**, 150, 23-32.
- (54) Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne R. T. A.; Meijs G. F.; Moad C. L.; Moad G.; Rizzardo E.; Thang S. H. *Macromolecules* **1998**, 31, 5559.
- (55) Chiefari, J.; Mayadunne, R. T. A.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. WO 99/31144, **1999**.
- (56) Mayadunne, R. T. A.; Rizzardo, E.; Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Moad, G.; Thang, S. H. *Macromolecules* **1999**, 32, 6977.
- (57) Mayadunne, R. T. A.; Rizzardo, E.; Chiefari, J.; Krstina, J.; Moad, G.; Postma, A.; Thang, S. H. *Macromolecules* **2000**, 33, 243.
- (58) Stenzel-Rosenbaum, M.; Davis, T. P.; Chen, V.; Fane, A. G. *J. Polym. Sci, Part A : Polym Chem* **2001**, 39 (16), 2777-2783.
- (59) Le, T. P.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Int. Pat.* 9801478 [Chem. Abstr. **1998**, 128, 115390f].
- (60) Chiefari, J.; Mayadunne, R. T. A.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Int. Pat.* 9931144 [Chem. Abstr. **1999**, 131, 45250w].
- (61) Rizzardo, E.; Thang, S. H.; Moad, G. *Int. Pat.* 9905099 [Chem. Abstr. **1999**, 130, 154069u].
- (62) Rizzardo, E.; Chiefari, J.; Mayadunne, R. T. A.; Moad, G.; Thang, S. H., *ACS Symp. Ser.* **2000**, 768, 278.
- (63) Moad, G.; Chiefari, J.; Krstina, J.; Postma, A.; Mayadunne, R. T. A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polym. Int.* **2000**, 49, 993.

-
- (64) Chong, Y. K.; Krstina, J.; Le, T. P.; Moad, G.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules* **2003**, 36, 2256.
- (65) Chiefari, J.; Mayadunne, R. T. A.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Postma, A.; Skidmore, M. A.; Thang, S. H. *Macromolecules* **2003**, 36, 2273.
- (66) Hu T.; You Y.; Pan C.; Wu C. *J. Phys. Chem. B.* **2002**, 106, 6659-6662.
- (67) Lowe A. B.; Sumerlin B. S.; Donovan M. S.; McCormick C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11562-11563.
- (68) Arotçaréna M.; Heise B.; Ishaya S.; Laschewsky A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3787-3793.
- (69) Prime, R.B. Thermoset:In Turi E A, *Thermal Characterization of Polymeric Materials*, New-York:Academic Press, **1981**, 435-571.
- (70) Shalaby, W. S. *Polymers of Biological and Biomedical Significance*; American Chemical Society: Washington, DC, **1994**.
- (71) Laukkanen, A.; Valtola L.; Winnik, F.M.; Tenhu, H. *Macromolecules* **2004**, 37, 2268-2274.
- (72) Laukkanen, A.; Valtola L.; Winnik, F.M.; Tenhu, H. *Polymer* **2005**, 46(18), 7055-7065.
- (73) Garret-Flaudy, F.; Freitag, R. *J. Polym. Sci. Part A.* **2000**, 38, 4218.
- (74) Okada, Y.; Tanaka, F. *Macromolecules* **2005**, 38, 4465.
- (75) Lin, L.N.; Brandts, J.F.; Brandts, M.; Plotnikov, V. *Analytical Biochemistry* **2002**, 302, 144.
- (76) Kujawa, P. ; Winnik, F. M. *Macromolecules* **2001**, 34, 4130-4135.
- (77) Espinat, D. *Revue de l'institut français du pétrole* **1990**, 45(6), 775-820.
- (78) Wu, C.; Zhou, S. *Macromolecules* **1995**, 28, 8381.

-
- (79) Wu, C.; Wang, X. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, 80, 4092.
- (80) Wang, X.; Qiu, X.; Wu, C. *Macromolecules* **1998**, 31, 2972.
- (81) Cheng, H.; Shen, L.; Wu, C. *Macromolecules* **2006**, 39, 2325-2329.
- (82) Kujawa, P.; Aseyev, V.; Tenhu, H.; Winnik, F.M. *Macromolecules* **2006**, 39, 7686-7693.

CHAPITRE 2

*An Efficient Synthesis of Telechelic Poly(N-isopropylacrylamides) and
its Application To the Preparation of α,ω -Dicholesteryl and α,ω -
Dipyrenyl Polymers.*

Florence Segui, Xing-Ping Qiu, and Françoise M. Winnik

Accepted by the Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry (09/2007)

* Les travaux de synthèse des α,ω -dipyrenyl PNIPAMs ainsi que leurs caractérisations présentés dans cet article ont été réalisés par Xing-Ping Qiu.

ABSTRACT

Poly(N-isopropylacrylamide)s (PNIPAMs) with cholesteryl or pyrenyl moieties at each chain end (CH-PNIPAMs or Py-PNIPAMs) were prepared via end-group modification of α,ω -dimercapto poly(N-isopropylacrylamides) ranging in molecular weight from $\sim 7,000$ to 45,000 g/mol with a polydispersity index of 1.10 or lower. The telechelic thiol functionalized PNIPAMs were obtained by aminolysis of α,ω -di(isobutylthiocarbonylthio)-poly(N-isopropylacrylamide)s (iBu-PNIPAMs) obtained by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of N-isopropylacrylamide in the presence of the difunctional chain transfer agent, diethylene glycol di(2-(1-isobutyl)sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-methyl propionate) (DEGDIM). The self-assembly of the polymers in water was assessed by fluorescence spectroscopy, using the intrinsic emission of Py-PNIPAM or the emission of pyrene added as a probe in aqueous solutions of CH-PNIPAM.

KEY WORDS

Amphiphilic telechelic polymers, cholesteryl moieties, pyrenyl moieties, poly(N-isopropylacrylamide), self-assembly, fluorescence

INTRODUCTION

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) and its derivatives have been studied extensively as components of stimuli-responsive materials in biotechnology and bioengineering.¹ The property exploited in most applications is the temperature-induced change of the solubility of PNIPAM in water. The polymer is highly soluble in cold water with no tendency towards self-association as long as the solution temperature remains below ~ 32 °C.² Above this temperature, water becomes a poor solvent for the polymer. The chains dehydrate and collapse into globules which undergo further aggregation into mesoglobules.³ Linking a small number of hydrophobic groups to a PNIPAM chain affects its solubility in water. The hydrophobic groups drive the self-assembly of the polymer chains, leading to the formation of polymeric micelles that exist as isolated entities in dilute cold aqueous solutions. Randomly-modified PNIPAMs adopt a loose micellar conformation in which the hydrophobic groups are partly exposed to water.^{4,5} Polymers that carry a hydrophobic group at one chain end tend to form core-shell structures in which the hydrophobic core is insulated from the water by a brush-like corona of PNIPAM chains.^{6, 7,8} Micelles of yet another type form in solutions of PNIPAM carrying a hydrophobic group at each chain end. Thus, α,ω -di-(*n*-octadecyl)-PNIPAMs form flower-like associates consisting of loops of hydrated polymer chains having both end groups entrapped in the micellar core.^{9,10} This association pattern is shared by other telechelic associating polymers, such as telechelic alkyl end-capped poly(ethylene oxides) or hydrophobically-modified ethoxylated urethanes (HEUR),^{11,12,13} an important class of materials used as rheology modifiers in paints, foodstuffs, and various waterborne fluids.

Most HEUR polymers are prepared by modification of the termini of a preformed polymeric precursor carrying reactive groups at each chain end. Until recently, there was no straightforward method to introduce reactive groups at each end of a PNIPAM chain and, consequently, there were only few reports on the properties of telechelic amphiphilic PNIPAMs. Most reported synthetic procedures involved, first, the polymerization of NIPAM with a lipophilic radical initiator and an amine-terminated chain transfer agent to generate chains bearing a hydrophobe group at one terminus, and, second, reaction of alkyl acids or acid chlorides with the amine group on the other chain end. The preparation led to mixtures of semi-telechelic and telechelic polymers, which could not be separated easily.¹⁴ The advent of living/controlled radical polymerization has greatly enhanced the range of polymer architectures accessible to synthetic polymer chemists.¹⁵ By employing these techniques, it is possible to prepare polymers of controlled end-group functionality and narrow size distribution. The reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) controlled radical polymerization has proven to be particularly effective, versatile, and easy to carry out in standard laboratory set-ups.^{16,17,18,19} A RAFT polymerization necessitates the addition to the reaction mixture of a reversible chain transfer agent (CTA), which in the presence of (macro)radical species induces reversible addition-fragmentation transfer reactions, creating an equilibrium between propagating radicals and so-called dormant species. This equilibrium is responsible for the control of the polymerization. The RAFT chain transfer agents contain a thiocarbonylthio ($Z-C(=S)S-R$) group, which interacts with the propagating radicals via well-known mechanistic pathways.²⁰

Kujawa et al reported recently the preparation and properties of α,ω -di-n-octadecyl-PNIPAMs of various molecular weights that were obtained by RAFT

polymerization of NIPAM in the presence of a CTA carrying two octadecyl groups.⁹ Extensive studies carried out on aqueous solutions of these telechelic polymers raised questions concerning the effects of structural parameters on polymer self-assembly. In particular, it became important to assess the impact of the end-groups on polymer association and to study the self-assembly of a gamut of PNIPAMs of identical molecular weight but different end-groups. The methodology deployed to prepare α,ω di-n-octadecyl-PNIPAMs needed to be modified, since it required the preparation of a different CTA for each end-group. We devised a more efficient strategy, based on initial work of Qiu et al.,²¹ who prepared telechelic poly(N-isopropylacrylamide)s carrying mercaptan functions at each chain end (SH-PNIPAM). The thiol groups on the chain ends can serve as reactive centers for further modifications^{22,23, 24,25,26} providing an easy entry into families of telechelic PNIPAMs.

We used this strategy to prepare two new classes of telechelic PNIPAMs: di-cholesteryl-PNIPAM (CH-PNIPAM) and dipyrenyl-PNIPAM (Py-PNIPAM). The selection of the two end-groups was prompted by the following considerations. Cholesteryl groups are known to act as exceptionally strong physical crosslinking points and to drive the assembly of polymers, such as pullulans,²⁷ poly[(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine],¹⁴ poly(ethylene oxide),^{28,29} various copolymers of NIPAM,³⁰ and poly(sodium 2-(acrylamido)-2-methylpropanesulfonate).³¹ Moreover, cholesteryl groups interact with receptors on the cell surface,³² a property which may be taken into advantage in designing CH-PNIPAM materials with biomedical applications. Pyrene and other aromatic labels have been used extensively in studies of associating polymers, such as poly(ethylene oxides) in water,³³⁻³⁶ the associative character being provided by the hydrophobic pyrene. Since the photophysical properties of pyrenyl groups respond to changes in

their environment following well-established patterns,³⁷ they can provide mechanistic insights into the solution properties of telechelic polymers. This article describes the preparation and characterization of CH-PNIPAMs and Py-PNIPAMs ranging in molecular weight from 7,000 to 45,000 g/mol. Special emphasis is placed on the assessment of the degree of end group modification at each step of the synthesis. A preliminary study of the photophysical properties Py-PNIPAMs in water is presented as an illustration of their tendency towards self-assembly.

EXPERIMENTAL

Materials

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co, unless otherwise stated. Azobisisobutyronitrile (AIBN, 98%) was recrystallized from methanol prior to use. Cholesterol (95%), 4-(1-pyrenyl)butanol, sodium iodide, 1,6-hexanediol (97%), p-toluenesulfonyl chloride ReagentPlus (>99%), tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCPE) were used as received. Cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyl ether was prepared from cholesterol following a reported protocol.³⁸ Diethyleneglycol di(2-(1-isobutyl)sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-methylpropionate) (DEGDIM) and the pyrene containing initiator, bis(*N*-(1-pyrenylbutyl))-4,4'-azobis-(4-cyanopentanamide) (BPAC) were prepared as described earlier.²¹ N-isopropylacrylamide (stabilized, 99%) was obtained from Acros Organics and was recrystallized from acetone/hexanes (4:6, v/v). 1,4-Dioxane, hexanes, N,N-dimethylformamide (DMF) and tetrahydrofuran (THF) were purified by a solvent purification system with two packed columns of activated alumina provided by Innovative Technology Inc. All other solvents were reagent grade and used as received. Water was deionized using a Millipore MilliQ system.

RAFT polymerization of N-isopropylacrylamide (iBu-NIPAM)

The polymerizations were performed according to a procedure reported previously.²¹ The following procedure leading to iBu-PNIPAM-10k is typical. A solution of the chain transfer agent (DEGDIM, 165 mg, 0.29 mmol), the initiator (AIBN, 8.06 mg, 0.029 mmol) or BPAC (22.9 mg, 0.029 mmol) for the synthesis of iBu-PNIPAM which will be converted to Py-PNIPAM and the monomer (NIPAM, 2 g, 17.7 mmol) in 1,4-dioxane (12 mL) was placed in a round bottom flask with rubber septa. The solution was de-oxygenated by bubbling nitrogen for 30 min at room temperature. The reaction flask was placed in an oil bath preheated to 65 °C. The polymerization was allowed to proceed for 6 hrs under constant magnetic stirring. At the end of this polymerization, the solution was cooled to room temperature. The polymer was isolated by precipitation in diethyl ether. It was purified further by two consecutive reprecipitations from THF into diethyl ether.

Yield: 95%. ¹H NMR (δ, ppm, CDCl₃): 1.03 (d, -CH₂CH(CH₃)₂), 1.16 (s, -NHCH(CH₃)₂), 1.30-2.40 (multiplets, polymer backbone protons), 3.29 (s, -SCH₂-), 3.74 (s, -OCH₂-), 4.03 (s, -NHCH), 4.22 (s, -C(=O)OCH₂-), 6.46 (br s, -C(=O)NH); UV-Vis (CHCl₃) 310 nm.

Specific reagent amounts and reaction times employed to prepare all polymers are listed in Table 1.

Preparation of α, ω-dimercapto poly(N-isopropylacrylamides) (SH-PNIPAM)

The following procedure is typical. n-Butylamine (0.219 g, 3 mmol, 10-fold molar excess of thiocarbonylthio moieties) and a small amount of the reducing agent, tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP, catalytic amount) were added to a

solution of α, ω -isobutyldithiocarbonylthio poly(*N*-isopropylacrylamide) (iBu-PNIPAM-10k, 1.5 g, 0.3 mmol of thiocarbonylthio moieties) in THF (13 mL). The resulting solution was stirred for 2 hours at room temperature under a N_2 atmosphere. The product was recovered by precipitation in diethyl ether and purified by two consecutive reprecipitations from THF into diethyl ether.

Yield: 86%. 1H NMR (δ , ppm, $CDCl_3$): 1.15 (s, $-NHCH(CH_3)_2$), 1.30-2.40 (multiplets, polymer backbone protons), 3.76 (s, $-OCH_2-$), 4.02 (s, $-NHCH$), 4.21 (s, $-C(=O)OCH_2-$), 6.40 (br s, $-C(=O)NH$).

Preparation of α, ω -di(cholest-5-en-3 β -yl 6-oxyhexylthio) poly(*N*-isopropylacrylamide) (CH-PNIPAM)

The following procedure is typical. Sodium carbonate (0.30 g, 2.8 mmol) was added to a solution of cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyl ether (0.013 g, 0.022 mmol, 1.1 eq.) and α, ω -dimercapto poly(*N*-isopropylacrylamide) (SH-PNIPAM-10K, 0.092 g, 0.02 mmol of SH, 1.0 eq.) in distilled DMF (4.5 mL). A crystal of TCEP was added to the mixture to prevent disulfide bond formation. The solution was stirred under nitrogen for 24 hrs. The polymer was recovered by precipitation in diethyl ether and purified by two consecutive reprecipitations from THF into diethyl ether.

Yield: 93%. 1H NMR (δ , ppm, $CDCl_3$): 0.70 (s, 3H, $-C(C(18)H_3$ of cholesteryl), 0.89 (d, 6H, $C(26)H_3$ and $C(27)H_3$), 0.95 (d, 3H, $-CH(C(21)H_3$ of cholesteryl), 1.02 (s, 3H, $-C(C(19)H_3$ of cholesteryl), 1.17 (s, $-NHCH(CH_3)_2$), 1.25-2.40 (multiplets, polymer backbone protons), 3.14 (m, 1H $-C(3)H$ of cholesteryl), 3.29 (s, $-SCH_2-$), 3.45 (t, 2H, $-CH_2O$), 3.74 (s, $-OCH_2$), 4.03 (s, $-NHCH$), 4.20 (s, $-C(=O)OCH_2$), 5.35 (m, 1H $-HC(6)=$ of cholesteryl), 6.39 (br s, $-C(=O)NH$).

Preparation of 4-(1-pyrenyl)butyl tosylate.

A solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (2.1 g, 11.0 mmol) in pyridine (5.0 mL) was added dropwise into a solution of 4-(1-pyrenyl)butanol (1.0 g, 3.65 mmol) in pyridine (5.0 ml) cooled in an ice-water bath. At the end of the addition, the reaction mixture was brought to room temperature and stirred under N_2 atmosphere for 5 hours. It was poured into ice, extracted with methylene chloride (3 x 20 mL). The methylene chloride solutions were combined, washed twice with water, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under vacuum and the solid product was purified by flash chromatography on silica gel using CH_2Cl_2 /hexanes (8:2) as eluent.

Yield: 1.1 g, 71.2%. 1H NMR ($CDCl_3$) ppm, δ 1.80 (m, 2H, $PyCH_2CH_2-$), 1.88 (m, 2H, $PyCH_2CH_2CH_2-$), 3.31 (t, 2H, $PyCH_2-$), 4.08 (t, 2H, $-OCH_2-$), 7.26 (d, 2H, aromatic, phenyl group), 7.76 (m, 3H, phenyl and pyrenyl), 8.00 – 8.18 (m, 8H, pyrenyl).

Preparation of 4-(1-pyrenyl)butyl iodide

4-(1-Pyrenyl)butyl tosylate (1.1 g, 2.6 mmol) and sodium iodide (3.9 g, 26 mmol) were dissolved in acetone (40 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight. The acetone was removed under vacuum. The remaining solid was dissolved in methylene chloride (50 mL), washed twice with water, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . The product was purified by a flash chromatography over silica gel using CH_2Cl_2 /hexanes (8:2) as eluent.

Yield: 0.65 g, 65.4%. 1H NMR ($CDCl_3$) ppm, δ 2.02 (m, 4H, $PyCH_2CH_2CH_2-$), 3.28 (t, 2H, $PyCH_2-$), 3.40 (t, 2H, ICH_2-), 7.88 – 8.28 (m, 9H, pyrenyl).

Preparation of α , ω -di-[4-(1-pyrenyl)butylthio] poly(*N*-isopropylacrylamide)s (Py-PNIPAM)

The typical reaction conditions are exemplified for α , ω -dimercapto poly(*N*-isopropylacrylamide)-12K. α , ω -Dimercapto poly(*N*-isopropylacrylamide, 12K) (0.60 g, 0.05 mmol) and 4-(1-pyrenyl)butyl iodide (0.058 g, 0.150 mmol) were dissolved in DMF (5 mL) containing a catalytic amount of TCEp to prevent the formation of disulfides. Sodium carbonate (0.30 g, 2.8 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature under N_2 atmosphere overnight. The polymer was recovered by precipitation into diethyl ether. It was purified by two consecutive precipitations from THF into diethyl ether.

Yield: 90 %. 1H NMR (δ , ppm, $CDCl_3$): 1.17 (s, $-NHCH(CH_3)_2$), 1.25-2.40 (multiplet, polymer backbone protons), 3.29 (s, $-SCH_2-$), 3.45 (t, 2H, $-CH_2O$), 3.74 (s, $-OCH_2$), 4.03 (s, $-NHCH$), 4.20 (s, $-C(=O)OCH_2$), 6.39 (br s, $-C(=O)NH$), 7.80-8.35 (multiplet, pyrenyl protons); UV (H_2O) 266, 328, 344 nm.

Determination of the M_n values of iBu-PNIPAMs by UV/Vis absorption spectroscopy.

To determine the M_n values of iBu-PNIPAMs by UV-Vis absorption we used equation 1:

$$M_n = \frac{w}{c_{CTA}} \quad (1)$$

where w is the weight of polymer sample in the solution analyzed (in g), c_{CTA} is the amount of thiocarbonylthio residues in the polymer sample (in mol) determined experimentally by application of Beer's law, and using the molar extinction coefficient of DEGDIM in chloroform ($\epsilon_{310} = 28,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).²¹ Note that equation 1

does not take into account the small fraction of the polymer chains that derives from the initiator decomposition. This fraction is < 5 %, as reported previously.²¹

Determination of the M_n values of iBu-PNIPAMs by ^1H NMR spectroscopy.

To M_n values of iBu-PNIPAMs were estimated using equation (2):

$$M_n = \frac{[H3]}{[H2]} \times 4 \times M_0 + M_{DEGDIM} \quad (2)$$

where [H2] and [H3] represent the areas of the protons H2 and H3 respectively, M_0 is the molecular weight of the NIPAM unit and M_{DEGDIM} is the molecular weight of DEGDIM.

Quantitative thiol analysis by the Ellman method

The thiol content of the polymers was determined by colorimetric analysis according to Ellman's procedure.³⁹ The Ellman reagent was prepared by dissolving 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) at the concentration of 0.4 mg/mL (1.0 mmol/mL). A thiol substituted polymer (2 – 10 mg depending on M_n to obtain a thiol group concentration of ~ 0.67 mmol) was dissolved in 3.0 mL of deionized water and the resulting solution was brought to pH 8.0 by addition of an aqueous pH 8.0 phosphate buffer (6.0 mL). Both the deionized water and the phosphate buffer were deoxygenated by bubbling with N_2 for 30 minutes before use. An aliquot of Ellman's reagent (1.0 mL) was added to the polymer solution. The resulting solution was mixed by swirling and kept in the dark at room temperature for ~15 min. The absorbance of the solution at 412 nm was recorded. A solution prepared by adding 1.0 mL of Ellman's reagent to a solution obtained by mixing deionized water (3.0 mL) and an aqueous pH 8.0 phosphate buffer solution (6 mL) was used as a blank. All the measurements were performed in triplicate.

Determination of the molecular weight of CH-PNIPAMs by end-group analysis

A ^1H NMR spectroscopy analysis of CH-PNIPAMs was carried using polymer solutions in CDCl_3 , a good solvent for PNIPAM and the cholesteryl groups. The M_n value of the polymers was calculated using equation 3:

$$M_n = \frac{[\text{H3}]}{[\text{H18c}]} \times 6 \times M_0 + M_{\text{chol}} + M_{(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2} \quad (3)$$

where [H3] and [H18c] are the areas of the signals due to the proton H3 and H18c (Figure 4), respectively, M_0 is the molecular weight of a NIPAM unit, and M_{chol} is the molecular weight of the cholesteryl-6-thiohexylether group.

Determination of the degree of substitution of Py-PNIPAMs.

The amount of pyrenyl groups linked to the polymer was determined by UV absorbance spectroscopy, using the absorbance of the pyrenyl chromophore at 342 nm in methanol. The molar extinction coefficient of the pyrenyl group in methanol was determined using a solution of 4-(1-pyrenyl)butanol in methanol as a standard ($\epsilon_{342} = 36,400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Instrumentation.

^1H NMR spectra were recorded on a Bruker AMX-400 (400 MHz) instrument. The chemical shifts are referenced to tetramethylsilane (TMS). UV-visible spectra were recorded on an Agilent 8452A photodiode array spectrometer. Gel permeation chromatography (GPC) was performed with a GPC system consisting of an Agilent 1100 isocratic pump, a set of TSK-gel α -M (particle size 13 μ , exclusion limit 1×10^7 Da for polystyrene in DMF) and a TSK-gel α -3000 (particle size 7 μ , exclusion limit 1×10^5 Da for polystyrene in DMF) (Tosoh Biosep) columns, a Dawn EOS multi-angle

laser light scattering detector $\lambda = 690$ nm (Wyatt Technology Co.) and an Optilab DSP interferometric refractometer $\lambda = 690$ nm (Wyatt Technology Co.) under the following conditions: injection volume, 100 μ L; flow rate, 0.5 mL/min; eluent, DMF; temperature, 40 $^{\circ}$ C. The dn/dc value of PNIPAM was determined to be 0.0738 mL/g at 690 nm in DMF at 40 $^{\circ}$ C using an Optilab DSP interferometric refractometer (Wyatt Technology Corp).

Fluorescence spectroscopy measurements

Steady-state fluorescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse spectrometer equipped with a GRAMS/32 data analysis system. Temperature control of the samples was achieved using a water-jacketed cell holder connected to a Cary circulating water bath. The temperature of the sample fluid was measured with a thermocouple immersed in a water-filled cell placed in one of the four cell holders in the sample compartment. All measurements were carried out at 20 $^{\circ}$ C unless otherwise stated.

The critical association concentration (CAC) of the CH-PNIPAMs in water was estimated by fluorescence spectroscopy using pyrene, a hydrophobic fluorescence probe that preferentially partitions into the hydrophobic core of the micelle. It undergoes changes in its photophysical properties as a result of the change in the micropolarity it experiences upon diffusion from bulk water (hydrophilic environment) into the micelle core (hydrophobic environment).⁴⁰ An estimation of the CAC value was obtained by monitoring the changes in the ratio of the pyrene emission intensities at $\lambda = 374$ nm (I_1) and $\lambda = 385$ nm (I_3) as a function of polymer concentration. The critical association concentrations are taken as the polymer concentration corresponding to the onset of the decrease in the ratio I_1/I_3 .

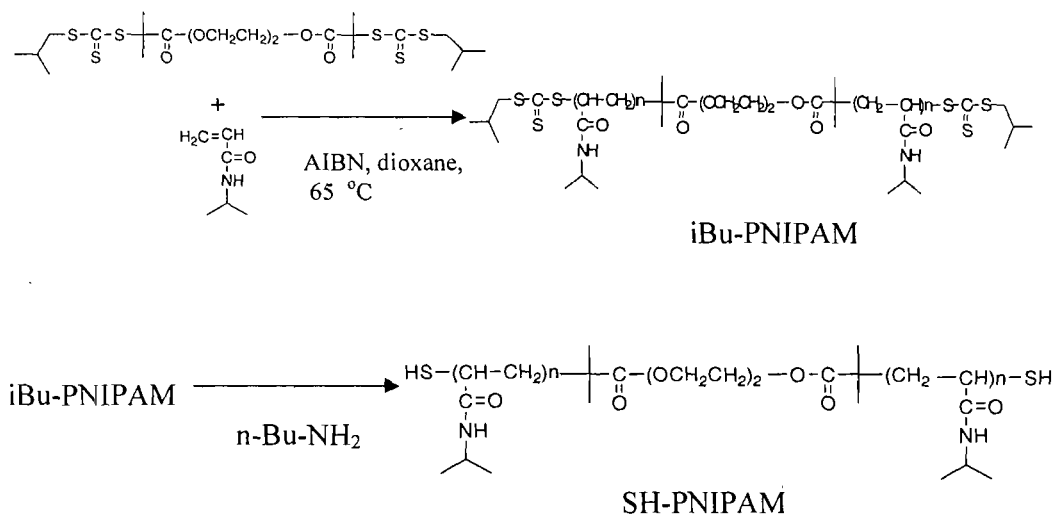
Samples for spectroscopic analysis were prepared as follows: A solution of pyrene (Py, 0.325 $\mu\text{mol/L}$) in deionized water was prepared by adding in a flask a solution of Py in ethanol (0.1 mmol/L, 20 μL), followed by evaporation of the solvent under a flow of nitrogen and subsequent addition of water (500 mL) to the flask. Polymer stock solutions (6.0 g/L) were prepared in pyrene/water. They were left to equilibrate under agitation over 24 h away from light. Subsequently, the stock solutions were diluted with Py in water to obtain solutions of varying polymer concentrations (0.001 to 6.0 g/L), which were further equilibrated under agitation for 24 h. For measurements of the emission spectra, the excitation and emission slits were set at 5 nm and 2.5 nm, respectively. The excitation wavelength was set at 334 nm and spectra were recorded from 350 to 550 nm.

For experiments with Py-PNIPAM, the excitation and emission slits were set at 2.5 nm. The excitation wavelength was set at 344 nm and spectra were recorded from 360 to 600 nm. Solutions for fluorescence analysis were prepared from an aqueous polymer stock solution of concentration of 1.0 g/L obtained by dissolving the polymer powder (Py-PNIPAM-13K) in deionized water at 5 $^{\circ}\text{C}$ for 24 hrs. Polymer solutions of concentration ranging from 0.01 to 0.80 g/L were prepared by diluting the stock polymer solution with an appropriate amount of deionized water. The dilute solutions were mixed and kept at 5 $^{\circ}\text{C}$ for 3 – 4 hrs. They were brought to room temperature (~ 23 $^{\circ}\text{C}$) and thermostated at 20 $^{\circ}\text{C}$ for at least 10 min before each measurement. The pyrene excimer emission intensity I_E was taken as the emission intensity at 480 nm. The pyrene monomer emission was calculated as the half sum of the emission intensities at 376 and 396 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of α,ω -dimercapto PNIPAMs.

Telechelic dimercapto PNIPAMs (SH-PNIPAM) were prepared in two steps, as depicted in Scheme 1. First, NIPAM was polymerized at 65 °C in dioxane in the presence of the difunctional CTA diethylene glycol di(2-(1-isobutyl)sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-methylpropionate (DEGDIM) and AIBN acting as initiator. All polymerizations were left to proceed to high conversion (92 to 96%).



Scheme 1: Preparation of α,ω -dimercapto poly-(N-isopropylacrylamide) (SH-PNIPAM) by a two step procedure involving 1) the RAFT-polymerization of N-isopropylacrylamide (NIPAM) in the presence of DEGDIM and AIBN and 2) aminolysis of the isobutylthiocarbonyl end groups with n-butylamine (n-Bu).

The $[\text{NIPAM}]/[\text{DEGDIM}]$ molar ratio in the polymerization mixture was adjusted (Table 1) to attain polymers of molecular weights ranging from 7,000 to 45,000

g/mol. The GPC elution profiles (Figure 1) were monomodal and symmetrical and the polydispersity index of all polymer samples were low (Table 1).

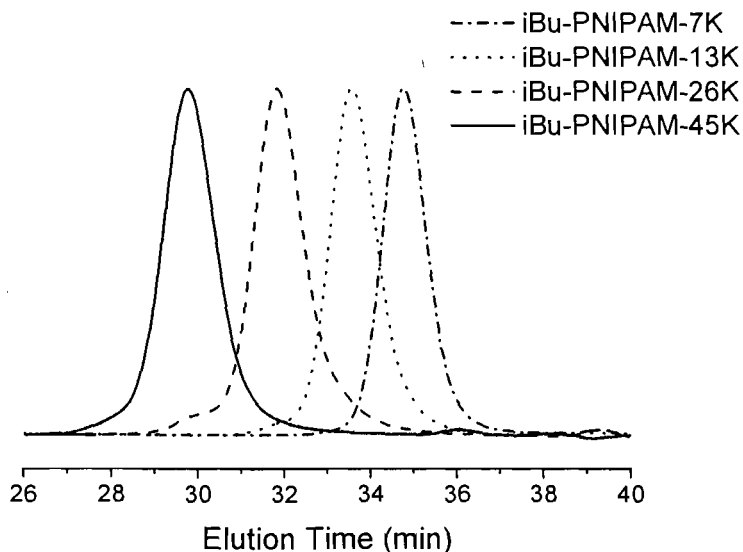


Figure 1: Normalized gel permeation chromatography (GPC) traces monitored with a refractive index detector of poly(*N*-isopropylacrylamides) (iBu-PNIPAM) prepared by polymerization of NIPAM in the presence of the RAFT agent DEGDIM and AIBN at 65 °C in 1,4-dioxane starting with the [NIPAM]/[DEGDIM] ratios listed in Table 1.

The structure of the polymers was ascertained by analysis of their ^1H NMR spectrum, which presents resonances at δ 1.02 and 3.28 ppm originating, respectively, from the isobutyl methylene protons H_5 and the methyl protons H_6 , as well as signals ascribed to protons of the NIPAM units, in particular a broad singlet centered at δ 4.02 ppm due to the isopropyl methine proton (H_3) and two weak singlets at δ 4.22 and 3.66 ppm, assigned to the methylene protons H_2 and H_1 of the diethylene glycol fragment originating from DEGDIM. Figure 2 presents the ^1H NMR spectrum of the polymer iBu-PNIPAM-10K. It is possible to extract M_n values from the ^1H NMR spectra of

iBu-PNIPAMs, using the areas of the signal H₃ (4.02 ppm) and H₂ (3.28 ppm). As shown in Table 1, the NMR-derived M_n values were slightly lower than the corresponding values determined by GPC. The difference may be partially due to the fact that the area of the signal due to H₂ cannot be integrated with sufficient precision, especially in the case of the polymers of higher molecular weight.

Sample	Time (hr)	$\frac{[\text{NIPAM}]_0}{[\text{DEGDIM}]_0}$	M _n (kg mol ⁻¹)			M _w /M _n ^c (GPC)	Conversion (%)
			MALLS ^a	NMR ^b	UV		
iBu-PNIPAM-7k	2.0	66	7.8	6.7	7.0	1.03	92.5
iBu-PNIPAM-10k	6.0	83	9.8	9.5	9.4	1.04	95.0
iBu-PNIPAM-13k	3.0	120	13.7	11.8	13.7	1.04	95.0
iBu-PNIPAM-18k	7.0	190	18.0	15.0	13.3	1.04	93.1
iBu-PNIPAM-23k	4.5	210	24.4	22.3	23.5	1.08	96.6
iBu-PNIPAM-26k	4.5	250	26.8	-	26.5	1.04	94.1
iBu-PNIPAM-28k	7.0	290	27.3	-	24.3	1.10	95.9
iBu-PNIPAM-45k	5.0	500	44.5	---	44.8	1.08	93.2

a) multi angle laser light scattering

b) from ¹H NMR spectra of the polymers in CDCl₃, using equation (2; experimental section)

c) from GPC data recorded on a system equipped with a MALLS detector and a refractive index detector (see experimental section)

Table 1: Preparation and characterization of PNIPAM samples obtained by azobisisobutyronitrile (AIBN) initiated polymerization of N-isopropylacrylamide (NIPAM) in the presence of the diethylene glycol di(2-(1-isobutyl)sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-methyl propionate (DEGDIM) at a temperature of 65 °C.

The M_n values were determined also from the UV-Vis spectrum of the polymers, which exhibits a strong absorbance centered at 310 nm ascribed to the thiocarbonylthio moiety (Figure 3, full line). The UV-Vis-derived M_n values are in good agreement with the value obtained via GPC with MALLS detection (Table 1).

The isobutylthiocarbonylthio termini of iBu-PNIPAM samples were converted to thiols by aminolysis, using a 10-molar excess of n-butylamine, with respect to thiocarbonylthio groups, in order to ensure completeness of the reaction. Aminolysis proceeded rapidly at room temperature, reaching near completion within 1 hr, as confirmed by the disappearance of the absorbance at 310 nm in the UV-Vis spectrum (Figure 3, dotted line)⁴¹ of the resulting polymers (SH-PNIPAM). A small amount of the reducing agent tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) was added to the reaction mixture in order to minimize oxidative coupling of the α,ω -dithiol PNIPAMs. A quantitative analysis of the thiol content of the polymers, performed using the colorimetric test developed by Ellman,³⁹ confirmed the high degree of thiol functionality of all polymers prepared. Confirmation of the success of the aminolysis was provided by the disappearance of the signals at δ 1.03 and 3.29 ppm characteristic of the isobutylsulfanylthiocarbonylsulfanyl moieties in the ¹H NMR spectrum of SH-PNIPAM, in which could not be detected (Figure 2). Signals due to the NIPAM units and the DEGDIM diethyleneglycol fragment remain visible and appear at identical chemical shift values, compared to the precursor polymer.

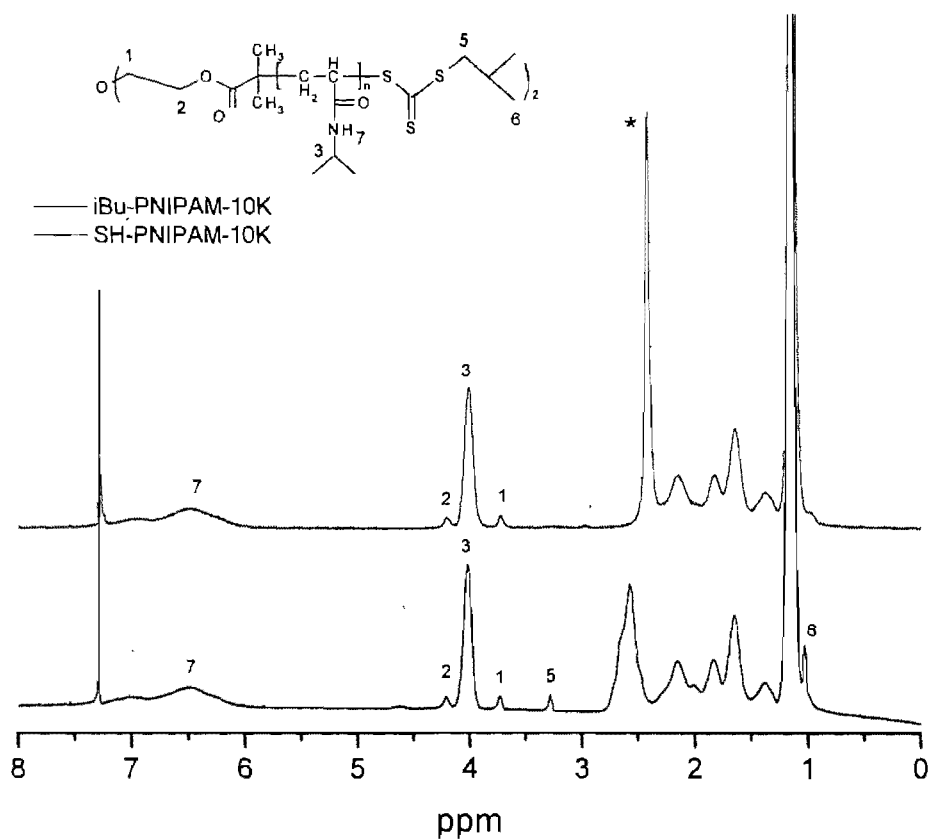


Figure 2: ^1H NMR spectra of α,ω -di(isobutylthiocarbonylthio)-poly(N-isopropylacrylamide) (iBu-PNIPAM-10K; bottom) and α,ω -dimercapto-poly(N-isopropylacrylamide) (SH-PNIPAM, top) (solvent: CDCl_3); * residual water of hydration bound to the polymer.

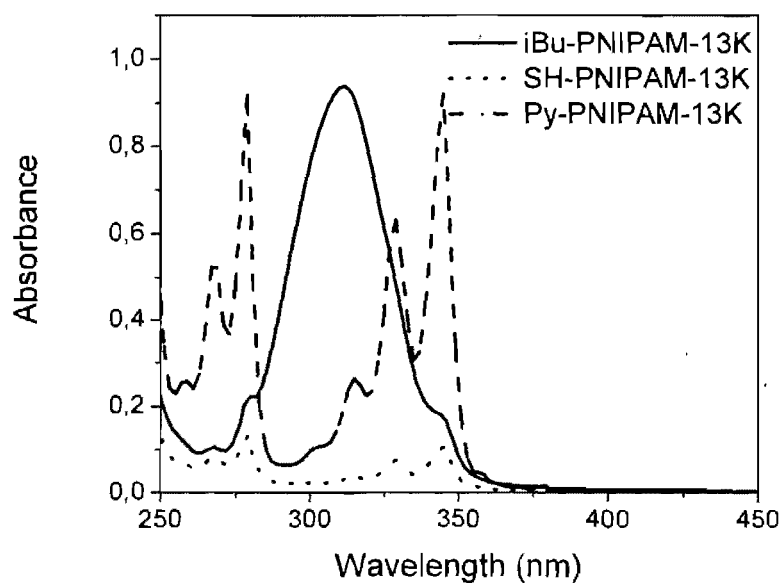
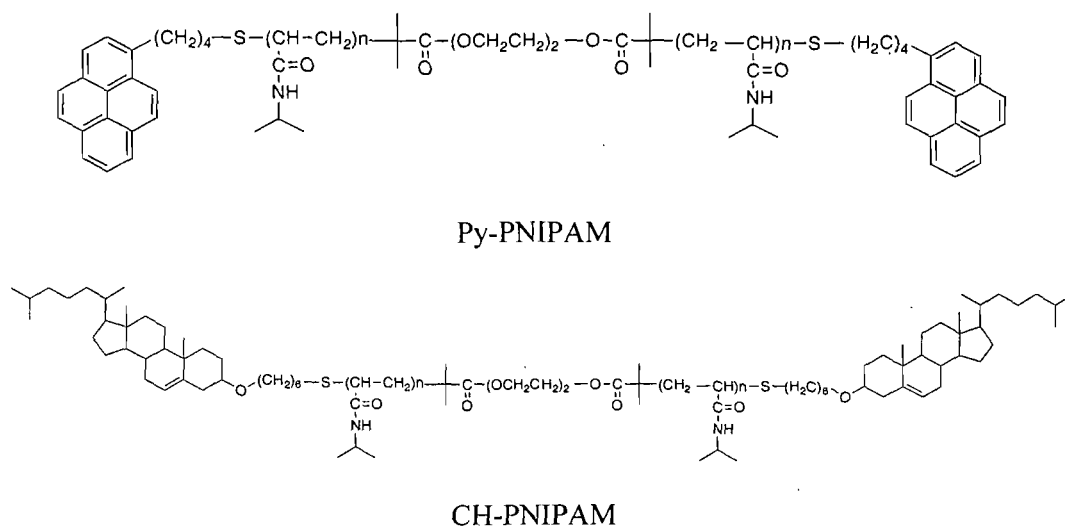


Figure 3: UV-absorption spectra of α,ω -di(isobutylthiocarbonylthio)-poly(*N*-isopropylacryl-amide) (iBu-PNIPAM-13K), α,ω -(dimercapto)-poly(*N*-isopropylacrylamide) (SH-PNIPAM-13K) and α,ω -di[4(1-pyrenyl)butyl](poly(*N*-isopropylacrylamide) (Py-PNIPAM-13K) in methanol.

Preparation of α,ω -di(cholest-5-en-3 β -yl-6-oxyhexylthio) PNIPAMs (CH-PNIPAM) and α,ω -di[4-(1-pyrenyl)butylthio] PNIPAMs (Py-PNIPAM)

The nucleophilic properties of the thiol group were taken into advantage to conjugate hydrophobic groups to the ends of PNIPAM chains. To prepare cholesteryl-modified polymers the coupling reaction (Scheme 2) involved reaction of cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyl ether and SH-PNIPAM in DMF containing sodium carbonate.



Scheme 2: Preparation of α, ω -di(cholest-5-en-3 β -yl-6-oxyhexylthio) PNIPAMs (CH-PNIPAM) and α, ω -di[4(1-pyrenyl)butyl] PNIPAMs (Py-PNIPAM).

The evolution of the reaction was assessed by measuring the residual thiol concentration in aliquots of the reaction mixture taken at various time intervals. A reaction time of 24 hrs was sufficient to ensure completion of the reaction. Specific reaction parameters are listed in Table 2, together with the molecular parameters of the resulting polymers. The isolated polymers were subjected to extensive purification to remove any residual low-molecular weight cholesteryl derivatives. The level of functionalization, assessed by the Ellman test for residual thiols, was greater than 95 % in the case of CH-PNIPAM-10K and CH-PNIPAM-19K, and ~ 90 % in the case of the polymer of highest molecular weight (CH-PNIPAM-28K). The ^1H NMR spectrum of the purified telechelic di-cholesteryl-PNIPAM in CDCl_3 , presented in Figure 4 (top), displayed signals characteristic of PNIPAM, as well as several sharp signals between 0.6 and 1.02 ppm, ascribed to the resonances of the protons linked to the carbons 18, 19, 21, 26 and 27 of the cholesteryl group (Figure 4, inset). Signals due to the other cholesteryl protons are masked by the signals corresponding to the

PNIPAM-linked protons, except for the signals due to the C3 and C6 protons, which can be detected at δ 3.14 and 5.35 ppm.

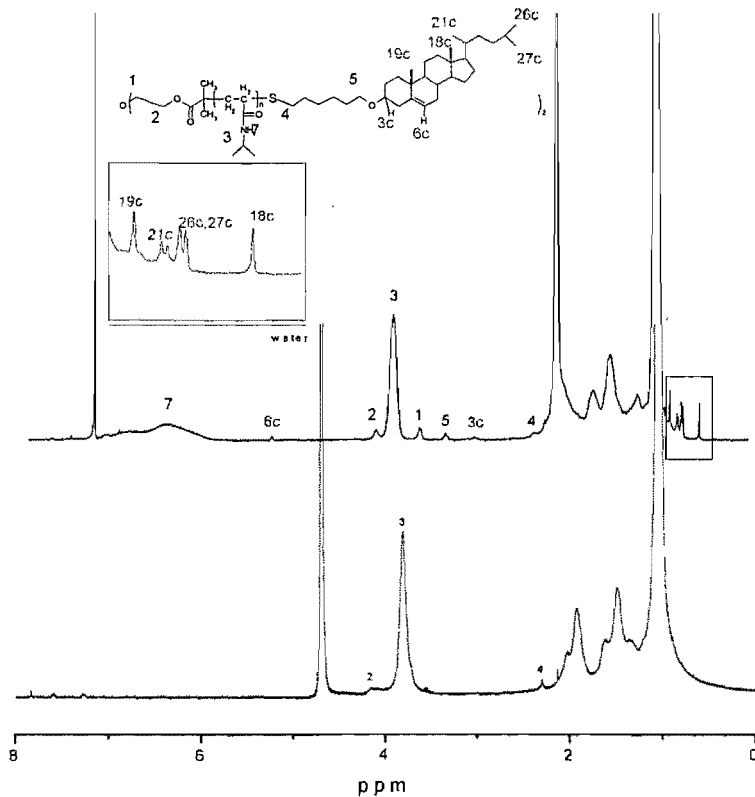


Figure 4: ^1H NMR spectra of α , ω -di(cholest-5-en-3 β -yl-6-oxyhexylthio)-poly(N-isopropylacrylamide) (CH-PNIPAM-10K) in CDCl_3 (top) and in D_2O , 24 $^\circ\text{C}$ (bottom).

4-(1-Pyrenylbutyl) groups were linked to the ends of PNIPAM by the same approach as in the case of the cholesteryl end-modified NIPAMs, starting with 4-(1-pyrenyl)butyl iodide and SH-PNIPAMs of various molecular weights, except that the precursor polymers were obtained using the pyrene-containing initiator (BPAC). This initiator was employed, rather than AIBN, in order to minimize the fraction of chain ends which do not carry pyrenyl groups. In RAFT polymerizations ~ 5 to 10 % of the chains originate from the decomposition of the initiator and not the CTA agent.

For photophysical studies of dipyrenyl telechelic polymers, it is important to have near quantitative end-group functionality.³⁴ The reaction conditions and the characteristics of the polymers are listed in Table 2.

Sample	Time (hr)	R-I ^a mol/mol SH	M _n (kg/mol)			M _w /M _n (GPC)
			MALLS	UV	NMR	
Py-PNIPAM-7k	12	1.5	8.15	7.6	1.08	
Py-PNIPAM-13k	12	1.5	13.4	13.6	1.10	
Py-PNIPAM-26k	12	1.5	28.1	27.4	1.07	
Py-PNIPAM-45k	12	1.5	45.2	49.5	1.10	
CH-PNIPAM-10k	24	1.1		---	8.8	
CH-PNIPAM-18k	24	1.1		---	17.3	
CH-PNIPAM-28k	24	1.1		---	26.1	

^a R-I: 4-(1-Pyrenyl)-butyl iodide for the preparation of Py-PNIPAM or cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyl ether for the preparation of CH-PNIPAM.

^b using the absorbance at $\lambda = 344$ nm of the pyrene chromophore

^c using equation 3 (experimental section)

Table 2: Preparation and characterization of α , ω -di-[4-(1-pyrenyl)butyl] poly(*N*-isopropylacrylamides) (Py-PNIPAM) and of α , ω -di(cholest-5-en-3 β -yl 6-oxyhexylthio) poly(*N*-isopropylacrylamides) (CH-PNIPAM)

The successful incorporation of pyrenyl groups on the polymer chain was confirmed by the presence of the characteristic absorption of the 1-pyrenyl chromophore, with maxima at 342 nm, in the UV-Vis spectrum of Py-PNIPAM in methanol, (Figure 3, dashed line). The level of Py incorporation derived from the polymer absorbance at

342 nm was $\sim 95\%$ in all four syntheses. A multiplet due to the 1-pyrenyl aromatic protons was observed in the ^1H NMR spectrum (δ 7.8 to 8.3 ppm) of Py-PNIPAMs in CDCl_3 as well as singlets at δ 2.6 and 3.4 ppm ascribed to the methylene protons α to the sulfide and to the aromatic group, respectively (Figure 5, top).

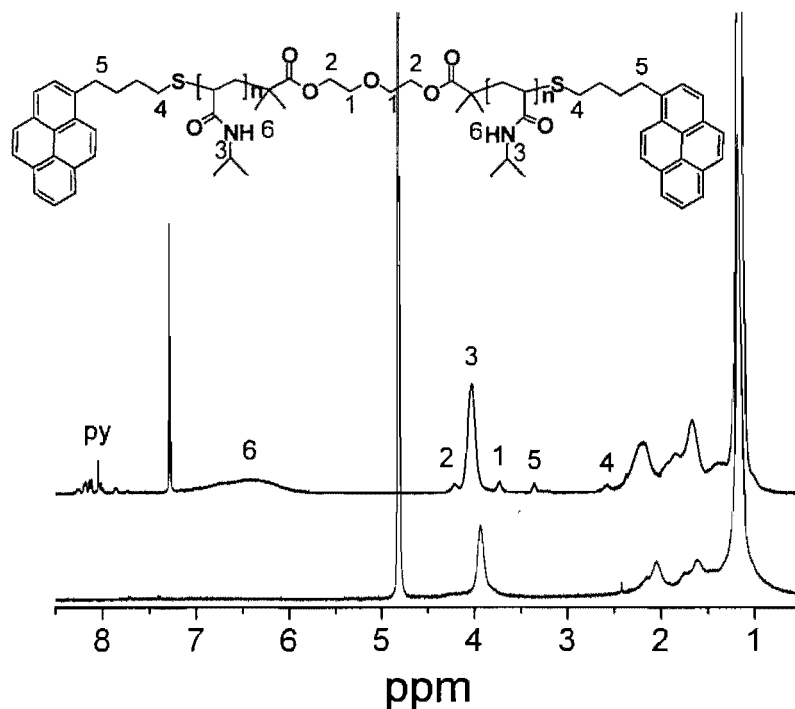


Figure 5: ^1H NMR spectra of α , ω - di[4(1-pyrenyl)butyl]poly(N-isopropylacrylamide) (Py-PNIPAM-13K) in CDCl_3 (top) and in D_2O , 24 $^\circ\text{C}$ (bottom).

Self-assembly of CH-PNIPAM and Py-PNIPAM in water.

Evidence from ^1H NMR spectroscopy

Preliminary indication of the formation of hydrophobe-driven assemblies in aqueous solutions of CH-PNIPAM and Py-PNIPAM was derived from the ^1H NMR spectra of aqueous solutions of the two sets of polymers. Comparing, first, the ^1H NMR spectra of CH-PNIPAM-10K in D_2O and in CDCl_3 (Figure 4), we note that the

signals in the δ 0.6 to 1.02 ppm range of the spectrum of the CDCl_3 solution have vanished in the spectrum of this polymer in D_2O . In contrast, the signals due to the PNIPAM-linked protons retain their sharpness in the spectrum recorded for the polymer in D_2O . The trends noted in the case of CH-PNIPAM solutions were observed also with solutions of Py-PNIPAM: the signals attributed to the pyrenyl protons were not detected in the spectrum of Py-PNIPAM-13K in D_2O (Figure 5), while the resolution of the signals due to the PNIPAM chain was approximately the same as in the spectrum of the CDCl_3 solutions. These observations can be taken as indications of the restricted mobility of the cholesteryl moieties as a result of their entrapment in hydrophobic nanodomains.^{14,31} The polymer chains retain their mobility in water, which is a good solvent for PNIPAM at 20 °C.

Evidence from fluorescence spectroscopy.

The CH-PNIPAM concentration corresponding to the onset of self-assembly (critical association concentration, CAC) was deduced from a fluorescence assay, based on the changes in the photophysics of pyrene, a hydrophobic probe added in minute amounts to a polymer solution. This probe partitions preferably in hydrophobic microenvironments and its emission spectrum is sensitive to changes in the polarity of its environment.⁴⁰ Hence the ratio of the emission intensity at 374 nm (I_1) to that at 385 nm (I_3) takes a high value (~ 1.72) in water and a value of ~ 1.10 in hydrophobic solvents or within the hydrophobic core of surfactant micelles.⁴² Plots of the I_1/I_3 ratio versus the logarithm of the concentration of aqueous solutions of CH-PNIPAM-10K and CH-PNIPAM-28K are shown in Figure 6, together with emission spectra of Py in water (A) and in CH-PNIPAM-10K (5.0 g/L) (B). The CAC values of the two polymers in water, taken as the concentration corresponding to the onset to

the drop in I_1/I_3 , were nearly identical (~ 0.01 g/L, or $\sim 1.0 \times 10^{-7}$ mol cholesteryl/L). This value is much lower than the cmc of typical low-molecular weight surfactants, but of the same order of magnitude as that of other CH-based amphiphilic polymers⁴³ and α,ω -di-*n*-octadecyl-PNIPAM of similar molecular weights.¹⁰

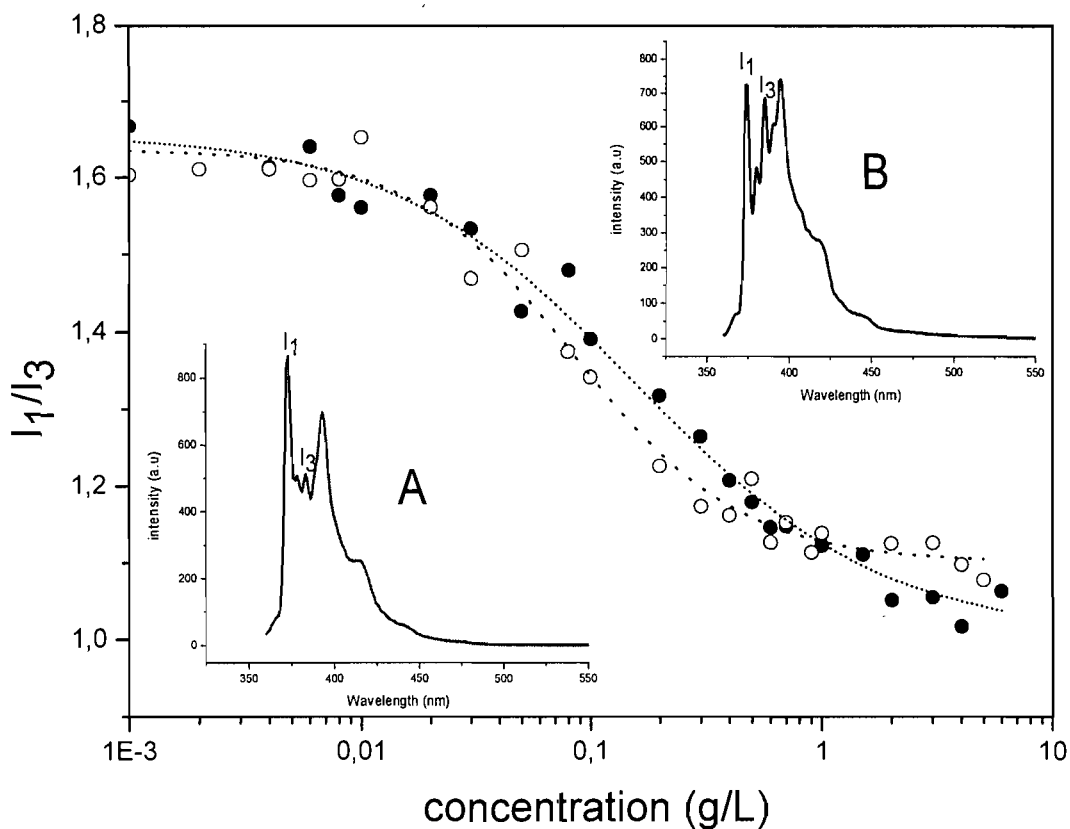


Figure 6: Plot of the changes as a function of CH-PNIPAM concentration in water of the ratio (I_1/I_3) of the emission intensity of pyrene at 376 nm (I_1) and at 385 nm (I_3); also shown are the emission spectra of pyrene in water (A) and in a solution of CH-PNIPAM-10K in water (5.0 g/L); (B) ○ CH-PNIPAM-10K; ● CH-PNIPAM-28K; temperature 20 °C.

Fluorescence spectroscopy was used also to monitor the association of Py-PNIPAM samples in water, taking advantage of the intrinsic fluorescence of the polymers. The

fluorescence spectrum of Py-PNIPAMs in water presents contributions from both pyrene monomer emission (intensity I_M) with the (0,0) band at 376 nm and pyrene excimer emission (intensity I_E) centered at 480 nm. For analogous pyrenyl-end-capped poly(ethylene oxides) Char et al.³³ and later Duhamel et al.³⁴ proposed that a fraction of the polymer end-groups are pre-associated and that the excimer emission originates, at least in part, from Py associated in the ground-state, a common occurrence in the case of aqueous solutions of pyrene-labeled polymers.³⁷ Evidence from UV-Vis absorbance spectra and from the excitation spectra monitored for the monomer and excimer species, suggests that Py/Py ground state preassociation also occurs in aqueous solutions of Py-PNIPAM. The contributions of the monomer and excimer emissions to the spectrum of Py-PNIPAMs depend markedly on the polymer concentration, as observed in Figure 7, where we present the variations of the ratio I_E/I_M as a function of the concentration of Py-PNIPAM-13K in water. Excimer emission occurs even in the case of the most dilute sample tested (0.01 g/L or 1.56 μmol Py), indicating the occurrence of intra- or inter-polymeric association. The fraction of Py excimer emission increases with polymer concentration, reaching a plateau value for solutions of ~ 1.0 g/L.

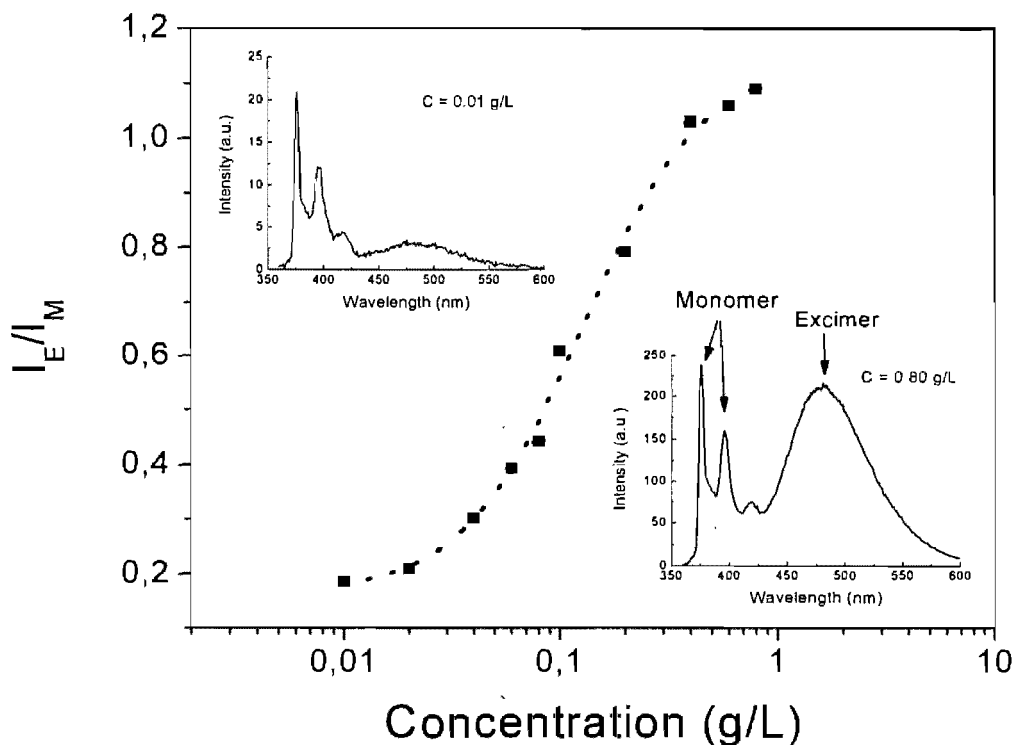


Figure 7: Plot of the changes as a function of Py-PNIPAM-13K in water of the ratio (I_E/I_M) of the intensity of the pyrene excimer emission and monomer emission; temperature: 20 °C; also shown are emission spectra of solutions of Py-PNIPAM-13K (0.01 g/L and 0.8 g/L).

CONCLUSIONS

Two families of amphiphilic telechelic PNIPAMs bearing either cholesteryl or pyrenyl moieties were prepared from identical precursor polymers under conditions yielding levels of end-group functionality > 90 %. The self assembly of the polymers in water was detected by ^1H NMR spectroscopy and fluorescence measurements. Our methodology provides an easy entry into telechelic polymers of well-defined molecular weight characteristics amenable to study by fluorescence techniques. There have been several reports on the quenching of fluorescence in the case of polymers obtained by RAFT polymerization.⁴⁴ The conversion of the isobutylthiocarbonylthio

end groups into sulfide groups alleviates this intrinsic drawback of RAFT polymerization. Further work is in progress aimed at characterizing the size and shape of the nanoparticles formed in solutions of CH-PNIPAM and Py-PNIPAM in water, below and above the solutions cloud point.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a research grant of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to FMW.

REFERENCES

1. Rzaev, Z. M. O. D., S.; Piskin, E. *Progr. Polym. Sci.* 2007, 32, 534-595.
2. Heskins M.; Guillet J.E. *J. Macromol. Sci. Chem.* 1968, A2, 1441-.
3. Aseyev, V. O.; Tenhu, H.; Winnik, F. M. In *Conformation-Dependent Design of Sequences in Copolymers II*; Kohklov, A., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2006, p 1-85.
4. Ringsdorf, H.; Venzmer, J.; Winnik, F. M. *Macromolecules* 1991, 24, 1678-1686.
5. Cao, Z.; Liu, W.; Gao, P.; Yao, K.; Li, H.; Wang, G. *Polymer* 2005, 46, 5268-5277.
6. Nakayama, M.; Okano, T. *Biomacromolecules* 2005, 6, 2320-2327.
7. Winnik, F. M.; Davidson, A. R.; Hamer, G. K.; Kitano, H. *Macromolecules* 1992, 25, 1876-1880.
8. Winnik, F. M.; Adronov, A.; Kitano, H. *Can J Chem* 1995, 73, 2030-2040.
9. Kujawa, P.; Seguí, F.; Shaban, S.; Diab, C.; Okada, Y.; Tanaka, F.; Winnik, F. M. *Macromolecules* 2006, 39, 341-348.
10. Kujawa, P.; Tanaka, F.; Winnik, F. M. *Macromolecules* 2006, 39, 3048-3055.
11. Winnik M.A.; Yekta A. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* 1997, 2, 424-436.
12. Pham Q.T.; Russel W.B.; Thibeault J.C.; Lau W. *Macromolecules* 1999, 32, 2996-3005.
13. Beaudoin, E.; Hiorns, R. C.; Borisov, O.; Francois, J. *Langmuir* 2003, 19, 2058-2066.
14. Sugiyama, K.; Shiraishi, K.; Matsumoto, T. *J Pol Sci Part A-Polym Chem* 2003, 41, 1992-2000.
15. *Advances in Controlled/Living Polymerization*; American Chemical Society: Washington, DC, 2003.

16. Bathfield, M.; D'Agosto, F.; Spitz, R.; Charreyre, M.-T.; Delair, T. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 2546-2547.
17. Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Aust J Chem 2005, 58, 379-410.
18. Gondi, S. R.; Vogt, A. P.; Sumerlin, B. S. Macromolecules 2007, 40, 474-481.
19. Ganachaud, F.; Monteiro, M. J.; Gilbert, R. G.; Dourges, M. A.; Thang, S. H.; Rizzardo, E. Macromolecules 2000, 33, 6738-6745.
20. Rizzardo, E.; Chen, M.; Chong, B.; Moad, G.; Skidmore, M.; Thang, S. H. Macromol Symposia 2007, 248, 104-116.
21. Qiu, X. P.; Winnik, F. M. Macromolecules 2007, 40, 872-878.
22. Lima, V.; Jiang, X.; Brokken-Zijp, J.; Schoenmakers, P. J.; Klumperman, B.; Van Der Linde, R. J Polym Sci, Part A: Polym Chem 2005, 43, 959-973.
23. Thomas, D. B.; Convertine, A. J.; Myrick, L. J.; Scales, C. W.; Smith, A. E.; Lowe, A. B.; Vasilieva, Y. A.; Ayres, N.; McCormick, C. L. Macromolecules 2004, 37, 8941-8950.
24. Xue, C. H.; Jog, S. P.; Murthy, P.; Liu, H. Y. Biomacromolecules 2006, 7, 2470-2474.
25. Goh, Y. K.; Monteiro, M. J. Macromolecules 2006, 39, 4966-4974.
26. Whittaker, M. R.; Goh, Y. K.; Gemici, H.; Legge, T. M.; Perrier, S.; Monteiro, M. J. Macromolecules 2006, 39, 9028-9034.
27. Akiyoshi, K.; Deguchi, S.; Moriguchi, N.; Yamaguchi, S.; Sunamoto, J. Macromolecules 1993, 26, 3062-3068.
28. Qiu, Y. J.; Xu, J. T.; Xue, L.; Fan, Z. Q.; Wu, Z. H. J Appl Polym Sci 2007, 103, 2464-2471.
29. Yao, N.; Jamieson, A. M. Polymer 2000, 41, 2925-2930.
30. Liu, X. M.; Yang, Y. Y.; Leong, K. W. J Coll Interf Sci 2003, 266, 295-303.

31. Yusa, S.; Kamachi, M.; Morishima, Y. *Macromolecules* 2000, 33, 1224-1231.
32. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell*; Garland: New York, 1989.
33. Char, K.; Gast, A. P.; Frank, C., W. *Macromolecules* 1989, 22.
34. Duhamel, J.; Yekta, A.; Hu, Y. Z.; Winnik, M. A. *Macromolecules* 1992, 25, 7024-7030.
35. Siu, H.; Duhamel, J. *J Phys Chem B* 2005, 109, 1770-1780.
36. Haldar, B.; Chakrabarty, A.; Mallick, A.; Mandal, M. C.; Das, P.; Chattopadhyay, N. *Langmuir* 2006, 22, 3514-3520.
37. Winnik, F. M. *Chem Rev* 1993, 93, 587-614.
38. Chabala, J. C.; Shen, T. Y. *Carbohydrate Res* 1978, 67, 55-63.
39. Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* 1958, 74, 443-450.
40. Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99.
41. The weak absorbance at 330 and 344 nm in the spectrum of SH-PNIPAM-13K is attributed to the pyrenyl end groups originating from the dipyrenyl initiator employed (see experimental section)
42. Winnik, F. M.; Regismond, S. T. A. *Colloids Surf A-Physicochem Eng Aspects* 1996, 118, 1-39.
43. Xu, J. P.; Ji, J.; Chen, W. D.; Shen, J. C. *Macromolecular Biosci* 2005, 5, 164-171.
44. Farinha, J. P. S.; Relogio, P.; Charreyre, M. T.; Prazeres, T. J. V.; Martinho, J. M. G. *Macromolecules* 2007, 40, 4680-4690.

CHAPITRE 3

Autres essais de synthèse des α,ω -dicholesteryl PNIPAMs et caractérisations des solutions aqueuses des CH-PNIPAMs

1. Introduction

Le poly(N-isopropylacrylamide) est un polymère hydrosoluble dont la solubilité dépend fortement de la température. En effet, sa solution aqueuse devient turbide au dessus de sa température critique minimale de solubilisation (LCST) à environ $32^{\circ}\text{C}^{1,2,3}$. Sa solubilité dépend aussi des modifications qui peuvent être apportées à ses chaînes. Comme il a déjà été présenté dans le chapitre 1, la modification des bouts de chaînes par des groupements hydrophobes diminue la solubilité du polymère dans l'eau. De plus, cette modification permet une certaine organisation des chaînes en-dessous de la LCST, comme par exemple la formation de micelles, de vésicules, ou d'autres structures plus complexes. Ce chapitre va s'attacher essentiellement à la caractérisation de solutions aqueuses de PNIPAM téléchéliques ayant des bouts cholestérols.

Dans un premier temps, ce troisième chapitre décrit la synthèse multi-étapes employée pour préparer le dérivé du cholestérol qui sera ensuite utilisé pour modifier le PNIPAM. La synthèse d'un nouvel agent RAFT permettant la préparation de PNIPAM semi-téléchéliques sera aussi décrite.

Dans un second temps, les solutions aqueuses des polymères téléchéliques ayant deux bouts cholestérols caractérisés dans le chapitre 2, seront étudiées par diverses méthodes : par des méthodes calorimétriques (DSC et PPC), par diffusion de la lumière, ainsi que par différentes méthodes d'imagerie (AFM et TEM).

2. Partie expérimentale

2.1 Matériel utilisé

Tous les produits chimiques proviennent de Sigma-Aldrich Chemicals. Le cholestérol (95%), l'iodure de sodium, le 1,6-hexanediol (97%), le chlorure de tosylo (>99%), la thiourée, le carbonyldiimidazole et l'isopropylamine ont été utilisés comme reçus. Lorsqu'un solvant anhydre a été utilisé, il a été purifié par un système de purification contenant deux colonnes d'alumine activée fournies par Innovative Technology Inc. L'eau a été déionisée avec un système Millipore MilliQ.

2.2 Synthèse multi-étapes du cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyléther.

La figure 1 représente le schéma réactionnel global de cette synthèse qui a déjà été réalisée par Chabala et al.⁴

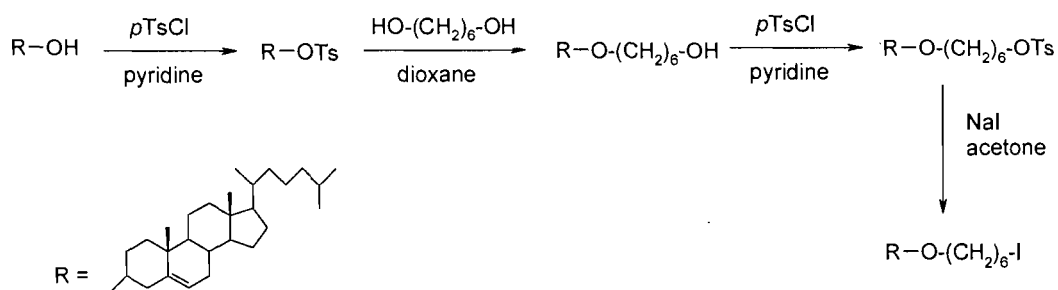


Figure 1 : schéma réactionnel de synthèse.

2.2.1 Synthèse du cholest-5-en-3 β -yl [(*p*-tolylsulfonyl)oxy] éther.

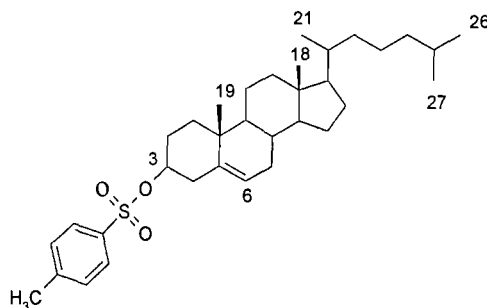


Figure 2: cholest-5-en-3 β -yl [(*p*-tolylsulfonyl)oxy] éther

Le cholestérol (5 g, 13 mmol) est dissout dans la pyridine anhydre (10 mL). Cette solution est ensuite agitée dans un bain de glace sous atmosphère inerte. Le chlorure de tosyloyle (3.72 g, 19.5 mmol) est alors ajouté petit à petit. Le milieu réactionnel est alors agité pendant 4 heures à température ambiante, puis dilué avec du dichlorométhane (50 mL) et laissé à température ambiante pendant 12 h (toujours sous agitation). Enfin, du dichlorométhane (150 mL) est ajouté à cette solution. La phase organique est ensuite lavée deux fois avec de l'eau (100 mL) et une fois avec une solution d'acide chlorhydrique (1N) (100 mL). La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium puis filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Un solide blanc est obtenu après trois recristallisations dans l'hexane. Le rendement de cette réaction est de 72% (5.1g).

Point de fusion : 114-115 °C

RMN ^1H (CDCl_3) ppm, δ 0.67 (s, 3H, $-\text{C}(\text{CH}_3)$ (18) du cholestérol), 0.87 (2d, 6H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (26,27) du cholestérol), 0.92 (d, 3H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)$ (21) du cholestérol), 0.98 (s, 3H, $-\text{C}(\text{CH}_3)$ (19) du cholestérol), 1.01-2.45 (m, 27H, H des CH_2-CH_2 et $\text{CH}-\text{CH}_2$ du cholestérol), 2.46 (s, 3H, $-\text{ArCH}_3$), 4.34 (m, 1H, $-\text{C}(3)\text{H}$), 5.32 (m, 1H, $-\text{C}(6)\text{H}=\text{C}$), 7.35 (d, 2H, 2CH_{Ar}), 7.81 (d, 2H, 2CH_{Ar}).

IR: 2950 (CH), 1354 and 1180cm^{-1} (S=O).

2.2.2 Synthèse du cholest-5-en-3 β -yl 6-hydroxyhexyl éther.

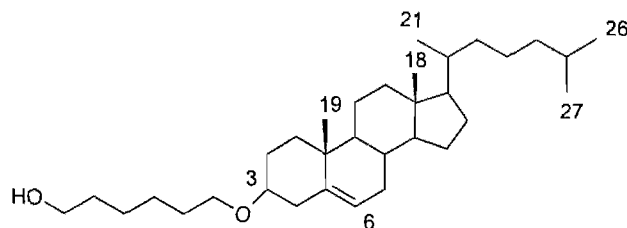


Figure 3 : cholest-5-en-3 β -yl 6-hydroxyhexyl éther

Le cholest-5-en-3 β -yl [(*p*-tolylsulfonyl)oxy] éther (2 g, 3.8 mmol) et le 1,6-hexanediol (9.0 g, 76 mmol) sont dissouts dans du 1,4-dioxane (27 mL). Le milieu réactionnel est alors chauffé à reflux pendant 4 heures sous azote. Il est ensuite refroidi à température ambiante, et placé dans 1 L d'eau déionisée. La suspension est alors laissée à température ambiante pendant 12 heures pour que le solide décante et soit ensuite isolé par filtration. Le solide jaune pâle ainsi obtenu est dissout dans du dichlorométhane et 3 extractions avec de l'eau sont réalisées pour éliminer l'excès de diol. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium et le solvant éliminé par évaporation sous pression réduite. Le rendement de cette réaction est de 70% (1.26 g).

RMN ^1H (CDCl_3) ppm, δ 0.70 (s, 3H, $-\text{C}(\text{CH}_3)$ (18) du cholestérol), 0.89 (2d, 6H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (26,27) du cholestérol), 0.94 (d, 3H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)$ (21) du cholestérol), 1.02 (s, 3H, $-\text{C}(\text{CH}_3)$ (19) du cholestérol), 1.03-2.40 (m, 27H, H des CH_2-CH_2 et $\text{CH}-\text{CH}_2$ du cholestérol), 3.15 (m, 1H, $-\text{C}(3)\text{H}$), 3.48 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}$), 3.67 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 5.37 (m, 1H, $-\text{C}(6)\text{H}=\text{C}$).

IR: 3550-3250 (OH), 2945 (CH), 1107 and 1086 (C-O-C) cm^{-1} .

2.2.3 Synthèse du cholest-5-en-3 β -yl 6-[(*p*-tolylsulfonyl)oxy]hexyl éther.

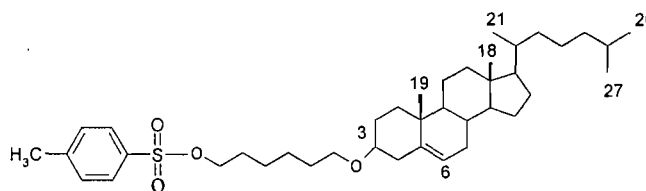


Figure 4: cholest-5-en-3 β -yl 6-[(*p*-tolylsulfonyl)oxy]hexyl éther

Le cholest-5-en-3 β -yl 6-hydroxyhexyl éther (2 g, 4.45 mmol) et le chlorure de tosyloxy (2.45 g, 13 mmol) sont dissouts dans la pyridine anhydre sous azote. La solution est agitée pendant 4h à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite placé dans un bain d'eau glacée. Une suspension laiteuse est alors formée et est extraite avec précaution avec de petites quantités de dichlorométhane. Les différentes fractions de CH₂Cl₂ sont lavées avec de l'eau (2 fois) et ensuite séchées sur sulfate de sodium. Après évaporation du dichlorométhane, une gomme est obtenue qui est ensuite traitée avec de l'éthanol chaud et ensuite laissée à -5°C pendant 18 h. Le produit brut est purifié par recristallisation dans l'hexane (3 fois) permettant d'obtenir un solide blanc (1,72 g).

RMN ¹H (CDCl₃) ppm, δ 0.70 (s, 3H, -C(CH₃) (18) du cholestérol), 0.89 (2d, 6H, -CH(CH₃)₂ (26,27) du cholestérol), 0.93 (d, 3H, -CH(CH₃) (21) du cholestérol), 1.02 (s, 3H, -C(CH₃) (19) du cholestérol), 1.02-2.43 (m, 27H, H des CH₂-CH₂ et CH-CH₂ du cholestérol), 2.47 (s, 3H, -ArCH₃), 3.12 (m, 1H (3), -CH), 3.43 (t, 2H, -CH₂O), 4.04 (t, 2H, -CH₂OS), 5.36 (m, 1H (6), -CH=C), 7.35 (d, 2H, 2CH_{Ar}), 7.81 (d, 2H, 2CH_{Ar}).

IR: 2930 (CH), 1336 and 1176 (S=O), 1108 and 1084 (C-O-C) cm⁻¹.

2.2.4 Synthèse du cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyl éther.

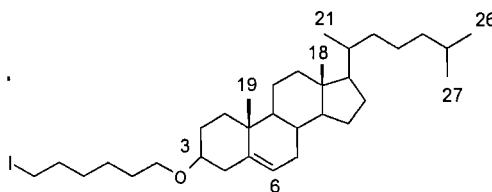


Figure 5: cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyl éther

L'iodure de sodium (2.42 g, 16 mmol) est ajouté à une solution de cholest-5-en-3 β -yl 6-[(p-tolylsulfonyl)oxy]hexyl éther (2.59 g, 4 mmol) dans l'acétone (13 mL).

La solution est chauffée à reflux pendant 24h sous azote. L'acétone est éliminée et le résidu dissout dans le chloroforme. Après deux extractions avec de l'eau et de l'hydrogénocarbonate de sodium, la phase organique est séchée sur sulfate de sodium et le chloroforme évaporé sous pression réduite. Le rendement de cette réaction est de 66% (1.57 g).

RMN ^1H (CDCl_3) ppm, δ 0.70 (s, 3H, $-\text{C}(\text{CH}_3)$ (18) du cholestérol), 0.89 (2d, 6H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (26,27) du cholestérol), 0.94 (d, 3H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)$ (21) du cholestérol), 1.02 (s, 3H, $-\text{C}(\text{CH}_3)$ (19) du cholestérol), 1.03-2.40 (m, 27H, H des CH_2-CH_2 et $\text{CH}-\text{CH}_2$ du cholestérol), 3.15 (m, 1H (3), $-\text{CH}$), 3.21 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{I}$), 3.48 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}$), 5.37 (m, 1H (6), $-\text{CH}=\text{C}$).

IR: 2950 (CH), 1105 and 1080 (C-O-C) cm^{-1} .

2.3 Autres voies de synthèses étudiées pour la modification du PNIPAM par le cholestérol (CH-PNIPAM)

Avant de réaliser la synthèse décrite au chapitre 2, nous avons essayé d'obtenir les CH-PNIPAMs par addition de Michael. Pour cela, le dérivé carbonyl α,β -insaturé a été synthétisé pour réagir dans un second temps sur les fonctions thiols du polymère.

2.3.1 Synthèse d'un dérivé acrylate à partir du cholest-5-en-3 β -yl 6-iodohexyl éther.

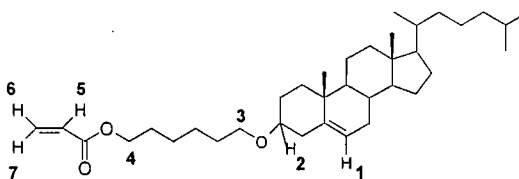


Figure 6 : cholestéryyl 6-hydroxyhexyl éther acrylate

Dans un ballon, le cholestéryl 6-hydroxyhexyl éther (1,84 g, 1 équivalent), et la triéthylamine (1,05 mL, 2 équivalents) sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre (18,7 mL). Ce ballon est placé dans un bain de glace, sous agitation et azote. A cette solution est ajoutée une solution de chlorure d'acryloyle (0,3655 mL (1,2 équivalent) dans 13mL de dichlorométhane anhydre). A la fin de l'addition, le milieu réactionnel est laissé sous agitation dans le bain de glace pendant une heure, puis à température ambiante toute la nuit. Des extractions sont ensuite réalisées avec : de l'eau (1 fois), de l'acide acétique 1N (1 fois), une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (1 fois) et une solution saturée de chlorure de sodium (1 fois). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium, puis filtrée et évaporée. Une huile rouille est obtenue. Une purification par chromatographie sur colonne est ensuite effectuée (éluant : acétate d'éthyle/hexane : 7/3). Le rendement de cette réaction est de 74%.

RMN ¹H (CDCl₃, δ, ppm) : 0.70 (s, 3H, -C(C(18)H₃) du cholestérol), 0.88 (2d, 6H, -C(26)H₃ et C(27)H₃ du cholestérol), 0.93 (d, 3H, -CH(C(21)H₃) du cholestérol), 1.02 (s, 3H, -C(C(19)H₃) du cholestérol), 1.01-2.45 (m, 27H, H from CH₂-CH₂ and CH-CH₂ du cholestérol), 3.13 (m, 1H (f), -C(3)H), 3.47 (t, 2H, -CH₂O), 4.17 (t, 2H, -CH₂O), 5.35 (m, 1H (g), -C(6)H=), 5.82 (dd, 1H, -CH₂=CH), 6.13 (dd, 1H, -CH₂=CH), 6.41 (dd, 1H, -CH₂=CH).

2.3.2 Modification du PSH par le dérivé acrylate du cholestérol.

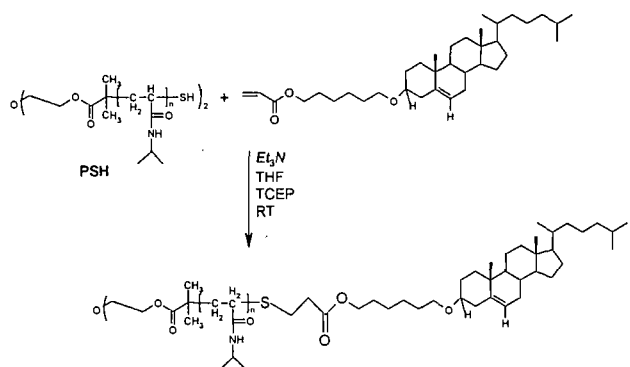


Figure 7 : PNIPAM modifié préparé par addition du dérivé acrylate du cholestérol

Le PSH-20K (0,7 g, 1 équivalent) est dissout dans 8 mL de THF. L'acrylate de cholestérol (85 mg, 2 équivalents) est ensuite ajouté, ainsi que la triéthylamine (20 μ L, 2 équivalents) et un petit cristal d'agent réducteur, le tris(2-carboxyéthyl)phosphine hydrochloride (TCEP). La solution est laissée sous agitation et sous azote pendant 14 heures. Après l'arrêt de la réaction, le polymère est précipité trois fois dans le diéthyléther (le dérivé acrylate du cholestérol y étant soluble alors que le polymère y est insoluble). Le spectre RMN ¹H montre que la réaction est incomplète (les signaux entre 0.7 ppm et 1.2 ppm caractéristiques du cholestérol sont très faibles), ce qui est confirmé par le test colorimétrique d'Ellman montrant une grande proportion de fonction thiol. Le principe de ce test est décrit en annexe 1. Ce même protocole a été suivi en utilisant trois équivalents d'acrylate de cholestérol et en laissant le milieu réactionnel sous agitation pendant quatre jours. La réaction est suivie par RMN ainsi que par le test d'Ellman. Après quatre jours, le test d'Ellman montre qu'il reste environ 15% de fonction thiol, par contre le spectre RMN ¹H n'indique aucun signal correspondant au dérivé polymérique du cholestérol. Le temps de réaction étant long, des réactions secondaires ont pu se produire, comme la formation de disulfides.

Cette méthode n'est donc pas une bonne voie pour la préparation du dérivé du PNIPAM modifié voulu. Comme décrit au chapitre 2, le dérivé a été obtenu par réaction de substitution.

2.4 Synthèse d'un agent de transfert de chaîne ayant un substituant cholestérol

2.4.1 Synthèse du cholest-5-en-3 β -yl 6-thiohexyl éther.

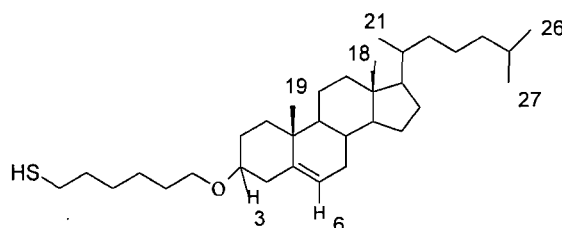


Figure 8 : structure du cholesteryl 6-thiohexyl éther

Le cholesteryl 6-iodohexyl éther (1.318 g, 1 éq.), la thiourée (0.2 g, 1.2 éq.) et l'éthanol (66mL) sont placés dans un ballon et la solution est chauffée à reflux pendant 8 heures. Une solution de NaOH (6.6 mL, 1N dans 50% EtOH/H₂O, v/v) est ensuite ajoutée. La solution est ensuite chauffée à reflux pendant 14 h. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi et l'acide chlorhydrique (1N, 6.6 mL) est ajouté. De l'eau et de l'éther sont ensuite ajoutés. La phase éther est récupérée et la phase aqueuse est extraite 3 fois avec de l'éther. Les fractions combinées d'éther sont ensuite extraites avec de l'eau. La phase organique ainsi obtenue est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée.

RMN ¹H (CDCl₃) ppm, δ 0.70 (s, 3H, -C(CH₃) (18) du cholestérol), 0.89 (2d, 6H, -CH(CH₃)₂ (26,27) du cholestérol), 0.94 (d, 3H, -CH(CH₃) (21) du cholestérol), 1.02 (s, 3H, -C(CH₃) (19) du cholestérol), 1.03-2.40 (m, 27H, H des CH₂-CH₂ et CH-CH₂ du cholestérol), 2.55 (m, 2H, -CH₂S) 3.14 (m, 1H, -C(3)H), 3.47 (t, 2H, -CH₂O), 5.37 (m, 1H, -C(6)H=C).

2.4.2 Synthèse du S-1-n-cholesteryl hexyléther-S'-(α,α' -diméthyl- α' -acide acétique).

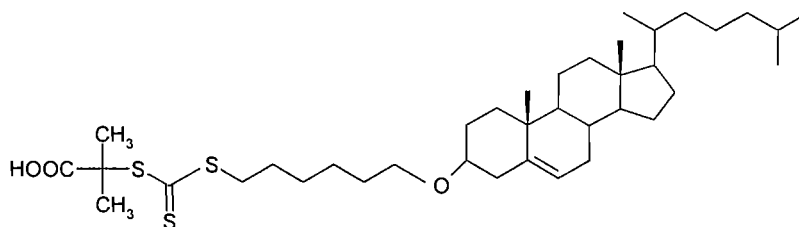


Figure 9 : Structure de l'agent RAFT acide

A température ambiante et sous atmosphère inerte, le cholestéryl 6-thiohexyléther (0.887 g, 1.76 mmol) est dissout dans 6 mL d'acétone et 7.5 mL de THF. Une goutte d'un agent de transfert de phase, le chlorure de tricaprilméthylammonium, est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est mis sous agitation, et le ballon est placé dans un bain de glace. A ce mélange se trouvant à 10°C, une solution d'hydroxyde de sodium saturée (0.2 mL) est ajoutée goutte à goutte. Après 15 minutes d'agitation, une solution de disulfide de carbone (0.1 mL) dans l'acétone (0.22 mL) est ajoutée goutte à goutte. Après 20 minutes d'agitation, du chloroforme (0.88 mL) est ajouté d'un seul coup, suivi par l'addition goutte à goutte d'une solution d'hydroxyde de sodium saturée (0.7 mL). Le ballon est ôté du bain de glace et la solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 15 h. Le milieu est alors refroidi à 10°C, de l'eau (1 mL) est ajoutée d'un seul coup et de l'acide chlorhydrique concentré (0.2 mL) est ajouté goutte à goutte. Un bullage d'azote est ensuite utilisé pour éliminer l'excès d'acétone se trouvant dans le milieu. Le mélange restant est alors filtré et un solide jaune-orangé est obtenu. Ce solide est

rincé avec de l'eau. Une purification par chromatographie sur colonne est ensuite effectuée, en utilisant comme éluent : acétate d'éthyle/hexane : 3/7 ($R_f = 0.51$). Un solide jaune est obtenu avec un rendement de 51%.

RMN ^1H (CDCl_3 , δ , ppm) : 0.70 (s, 3H, $-\text{C}(\text{C}18)\text{H}_3$) du cholestérol), 0.89 (2d, 6H, $-\text{C}(\text{C}26)\text{H}_3$ et $\text{C}(\text{C}27)\text{H}_3$ du cholestérol), 0.94 (d, 3H, $-\text{CH}(\text{C}21)\text{H}_3$) du cholestérol), 1.02 (s, 3H, $-\text{C}(\text{C}19)\text{H}_3$) du cholestérol), 1.77 (s, 6H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.01-2.37 (m, 27H, H du $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ et CH-CH_2 du cholestérol), 3.17 (m, 1H, $-\text{C}(3)\text{H}$), 3.34 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{S}$), 3.50 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}$), 5.37 (m, 1H, $-\text{C}(6)\text{H}=\text{}$).

IR (cm^{-1}) : 2932, 2866 (CH_2 , élongation), 1733 ($\text{C}=\text{O}$, élongation), 1464 (CH_2 , cisaillement), 1243 (C-O , élongation), 1064 (C=S , élongation), 720 (CH_2 , déformation hors-plan).

UV-Vis (CHCl_3) : $\lambda_{\text{max}} = 307\text{nm}$.

2.4.3 Synthèse de S-1-n-cholesteryl hexyléther-S'- $(\alpha,\alpha'$ -diméthyl- α'' - n-isopropylamide).

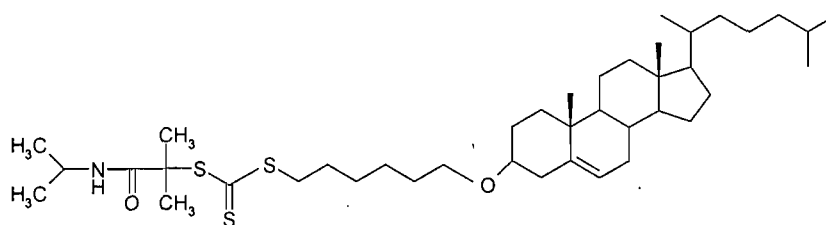


Figure 10 : Structure de l'agent de transfert de chaîne

L'acide S-1-n-cholesteryl hexyléther-S'- $(\alpha,\alpha'$ -diméthyl- α'' -acide acétique) (170 mg, 0,255 mmol) est dissout dans du dichlorométhane anhydre (5 mL). L'agent de couplage, le carbonyldiimidazole (41,35 mg, 0,255 mmol) dans le dichlorométhane (0,4 mL), est ensuite ajouté goutte à goutte au mélange réactionnel et la solution est agitée durant 7 heures. La progression de la réaction est suivie par chromatographie

sur couche mince (éluant THF/hexane : 9/2). Au moment où tout l'acide a disparu une solution d'isopropylamine est ajoutée goutte à goutte (44 μ L dans 2 mL de dichlorométhane) au milieu. Après 36 heures d'agitation, la réaction est arrêtée et la phase organique est extraite avec de l'acide chlorhydrique à 10% (v/v), une solution saturée d'hydrogénocarbonate et enfin, une solution saturée de chlorure de sodium. Elle est ensuite séchée avec du sulfate de sodium, filtrée et le filtrat évaporé. L'huile visqueuse ainsi obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne (éluant : THF/Hexane: 1/10) et un solide jaune est obtenu avec un rendement de 40% (71mg).

RMN ^1H (CDCl_3 , δ , ppm) : 0.70 (s, 3H, $-\text{C}(\text{C}(18)\text{H}_3)$ du cholestérol), 0.89 (2d, 6H, $-\text{C}(\text{C}(26)\text{H}_3)$ et $-\text{C}(\text{C}(27)\text{H}_3)$ du cholestérol), 0.94 (d, 3H, $-\text{CH}(\text{C}(21)\text{H}_3)$ du cholestérol), 1.02 (s, 3H, $-\text{C}(\text{C}(19)\text{H}_3)$ du cholestérol), 1.14 (d, 6H $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.72 (s, 6H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.01-2.37 (m, 27H, H from CH_2-CH_2 and $\text{CH}-\text{CH}_2$ du cholestérol), 3.14 (m, 1H, $-\text{C}(3)\text{H}$), 3.27 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{S}$), 3.46 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}$), 4.04 (m, 1H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 5.36 (m, 1H, $-\text{C}(6)\text{H}=\text{}$), 6.28 (s, 1H, $-\text{NH}$).

IR (cm^{-1}) : 3330 (N-H, amide, élongation), 2931, 2866 (CH_2 , élongation), 1651 ($\text{C}=\text{O}$, élongation), 1529 (N-H déformation plan), 1465 (CH_2 , cisaillement), 1060 ($\text{C}=\text{S}$, élongation), 808 (C-C, groupe isopropyle, élongation).

UV-Vis (CHCl_3) : $\lambda_{\text{max}} = 308\text{nm}$.

2.5 Analyses

Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un appareil BÜCHI 535 (Melting point). Les spectres infrarouges ont été obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre IR Vector 22 de Bruker Optics Inc. en utilisant le module de réflexion interne totale (MVP ATR cell) de Harrick Scientific Corporation comprenant un cristal de ZnSe.

Les spectres RMN ^1H furent réalisés sur un Bruker AMX-400 (400MHz), et les déplacements chimiques ont pour référence le TMS (trimethylsilane).

2.5.1 Mesures de points troubles

Les points troubles des solutions de polymère ont été déterminés en mesurant leurs changements de transmittance à 550nm avec la température. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre à diode Agilent 8452A équipé d'un système Hewlett-Packard 89090A pour contrôler la température. Le point trouble (T_{cp}) a été déterminé à partir des graphes représentant la transmittance en fonction de la température, en prenant la température avant la diminution de l'intensité (changement de pente). L'erreur estimée de ces mesures est de $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

2.5.2 Mesures par calorimétrie différentielle à balayage haute sensibilité (HS-DSC)

Ces mesures ont été réalisées sur un microcalorimètre VP-DSC (MicroCal Inc.) à une pression externe d'environ 180 kPa. Le volume de la cellule était de 0.517 mL. La vitesse de chauffage était de $1.0^\circ\text{C min}^{-1}$. Les données ont été analysées par un logiciel fourni par le fabricant. La gamme de concentration des solutions de polymère analysées est de 0.5 à 5g/L. La température de transition de phase (T_M) correspond au maximum de l'endotherme. L'enthalpie de transition (ΔH) a été déterminée à partir de l'aire se trouvant sous l'endotherme. Quatre mesures ont été effectuées pour chaque solution à une concentration donnée.

2.5.3 Mesures par calorimétrie à perturbation de pression (PPC)

Ces mesures ont été réalisées sur un microcalorimètre VP-DSC équipé d'un accessoire permettant de modifier la pression (MicroCal Inc.). La pression appliquée durant les cycles de compression était de 500 kPa. Les cellules de la référence et de l'échantillon ont un volume identique de 0.517 mL. La gamme de concentration des solutions de polymère était de 1.0 à 5.0 g/L. Le principe de la méthode a été décrit au chapitre 1.

2.5.4 Mesures par diffusion de la lumière

Les expériences de diffusion statique et dynamique de la lumière ont été effectuées avec un goniomètre CGS-3 (ALV GmbH) équipé d'un corrélateur multiple- τ digital ALV/LES-5003, d'un laser He-Ne ($\lambda = 632\text{nm}$) et d'un bain d'eau C25P (Thermo Haake). Les concentrations des solutions analysées sont de 0.22 à 5g/L. Avant les mesures, les solutions sont placées à température ambiante et filtrées directement dans la cellule avec un filtre de 0.45 μm Millex Millipore ayant une membrane PVDF. Dans le cas des expériences où un changement de température est utilisé, la température est changée à l'aide du bain d'eau et les mesures faites comme suit : à la fin d'une mesure effectuée à une température donnée, la solution est chauffée à la température suivante à une vitesse constante d'environ 1°C/min et laissée 20 min à cette température avant une nouvelle mesure. La valeur de dn/dc utilisée est de 0.167 g/dm^3 . Une moyenne sur quatre mesures est effectuée pour chaque résultat.

2.5.5 Mesure par microscopie électronique à transmission (TEM)

Une goutte de 20 μL de solution de polymère est placée sur une grille de 300-mesh en cuivre où un film de carbone a été déposé auparavant. Après 5 min, l'excès de solution a été ôté avec un papier filtre et une goutte de 20 μL d'une solution aqueuse d'acide phosphotungstique à 0.01% a été déposée sur la surface de la grille où se

trouve l'échantillon. Après 3 minutes, l'excès de solution a été éliminé et l'échantillon séché à l'air libre à température ambiante. Les observations ont été faites sur un appareil JEOL JEM-2000FX à un voltage de 80kV. Les images ont été enregistrées par une caméra Gatan Bioscan Model 792 CCD.

2.5.6 Mesures de spectres d'émission par fluorescence

Les spectres ont été réalisés avec un spectromètre Varian Cary Eclipse équipé d'un système d'analyse de données GRAMS/32.

Une solution d'environ 5 µg/ml de Dextran-Rhodamine dans l'eau, ainsi qu'une solution de CH-PNIPAM-20K de 1 mg/mL dans l'éthanol sont préparées. 1 mL de la solution de Dextran-Rhodamine est ensuite ajouté goutte à goutte à 1 mL de la solution de polymère. Cette solution de 2 mL (d'une concentration d'environ 2.5 µg/ml de Dext-Rhod) est placée dans un sac à dialyse ayant des tailles de pores de 6,000-8,000 g/mol. Une dialyse contre l'eau pure est effectuée pendant 3 jours. Des spectres d'émission et d'excitation par fluorescence sont ensuite réalisés (cela représentera le temps 0). Cette solution est ensuite placée dans un sac à dialyse ayant des tailles de pores de 100,000g/mol qui permettra au cours du temps au composé Dex-Rhod non incorporé dans les supposées vésicules de sortir du sac.

Une solution d'environ 2.5 µg/ml de Dext-Rhod est utilisée comme solution témoin pour laquelle des spectres en fluorescence sont effectués avant et après être placée dans le sac à dialyse de taille de pores de 100,000g/mol.

Une solution contrôle est aussi utilisée. Cette solution est préparée à partir du PNIPAM non modifié d'une masse molaire avoisinant 20,000g/mol, et du composé Dext-Rhod : 1 mg de PNIPAM est dissout dans 4 mL d'eau distillée et 1 mL de la solution Dext-Rhod à environ 5 µg/ml est ajouté goutte à goutte. Cette solution est

ensuite mise dans un sac à dialyse avec des tailles de pores de 100,000 g/mol et est dialysée contre de l'eau pure.

Les conditions utilisées lors des mesures sont les suivantes:

- pour le spectre d'émission: - excitation à 558 nm, zone du spectre: 570-750 nm,
 - fente d'excitation : 5 nm, fente d'émission : 2.5 nm
 - voltage : 850V
- pour le spectre d'excitation : - émission : 578 nm, zone du spectre : 400-570 nm
 - fente d'excitation : 2.5 nm, fente d'émission : 5 nm
 - voltage : 850V

2.6 Méthodes de préparation des solutions de CH-PNIPAM.

2.6.1 Par dissolution

Pour le CH-PNIPAM-10K et le CH-PNIPAM-30K, une quantité connue de polymère (25 mg) est placée dans un flacon. De l'eau y est ensuite ajoutée (5 mL) à température ambiante. Cette solution est agitée à température ambiante durant 4 heures, puis laissée à 4°C pendant 24 heures. Cette solution mère est ensuite portée à température ambiante et des solutions de plus basses concentrations sont préparées par dilution. Les solutions sont agitées puis laissées au repos une heure à température ambiante avant utilisation. Pour le CH-PNIPAM-20K, une solution à 0.5g/L a été préparée par dissolution du polymère dans l'eau, des solutions plus concentrées ne pouvant être préparées. En effet, au-dessus de 0,5g/L, la solution devient laiteuse et son analyse en devient beaucoup plus difficile.

2.6.2 Par dialyse

Les CH-PNIPAM-10k, 20K et 30K ont été préparés de la même façon. Des solutions de 1 mL à 1.0 g/L dans l'éthanol ont été préparées. De l'eau (1 mL) a ensuite été ajoutée goutte à goutte. Ces solutions ont ensuite été placées dans des sacs à dialyse ayant des tailles de pores de 6,000 à 8,000g/mol. Cette dialyse est effectuée contre de l'eau pure durant 3 jours. La concentration des solutions obtenues est de 0,22 g/L pour les trois polymères.

D'autres dialyses ont été effectuées pour obtenir des solutions plus concentrées (4.6g/L).

3. Résultats et discussion.

3.1 Caractérisations des CH-PNIPAM 10K, 20K et 30K

Les données obtenues confirmant la synthèse de ces polymères (spectres RMN ^1H) et leurs masses molaires (données GPC, UV-Vis et RMN ^1H) ont été présentées dans le chapitre 2.

Pour la synthèse des CH-PNIPAM, une première méthode a été utilisée impliquant une addition de Michael du dérivé acrylate du cholestérol sur le PNIPAM-SH. Malgré des essais avec différents temps de réaction et différentes quantités d'acrylate utilisées, la réaction ne produisait pas le polymère voulu. Par conséquent, d'autres méthodes ont été utilisées, toujours en utilisant une addition de Michael sur un composé carbonyle α,β -insaturé, c'est-à-dire à partir du dérivé acrylate de cholestérol et du PNIPAM-SH, mais en procédant à deux catalyses différentes. L'une est la catalyse acide ($\text{HCClO}_3/\text{SiO}_2$)⁵ et l'autre, la catalyse basique (utilisation d'un tampon phosphate à $\text{pH}=8$)⁶, mais ces deux méthodes n'ont pas donné de bons

résultats. Dans le cas présent, les protocoles utilisés sont donc efficaces pour des petites molécules mais ne sont pas applicables pour les polymères.

Une réaction de substitution nucléophile à partir du cholestéryl 6-iodohexyl éther et du PNIPAM-SH décrite dans le chapitre 2 a été utilisée ensuite et a permis d'obtenir le PNIPAM téléchélique souhaité dont les chaînes sont terminées par les groupements cholestérols.

3.2 Synthèse du nouvel agent de transfert de chaîne pour la préparation de PNIPAM semi-téléchélique.

La méthode précédente utilisée pour préparer les CH-PNIPAM téléchéliques à l'aide de l'agent RAFT difonctionnel (DEGDIM), suivi de deux modifications successives des bouts de chaînes (voir chapitre 2), ne peut être utilisée pour préparer les CH-PNIPAMs semi-téléchéliques. Une méthode pour préparer ces polymères avec des masses molaires bien définies et une faible polydispersité est de synthétiser un agent de transfert de chaîne ayant un groupement cholestérol.

La synthèse de cet agent à partir d'un dérivé thiol se déroule en deux étapes : la première est la formation de l'acide⁷ et la seconde, la formation de l'amide⁸.

Le mécanisme de la formation de l'acide est complexe et est décrit ci-dessous (Figure 11). Cette réaction fait intervenir une réaction appelée « ketoform »⁹ où une cétone réagit avec du chloroforme et une base pour former un époxyde très réactif. Ce dernier réagira très rapidement avec le thiolate pour former un chlorure d'acide, qui après hydrolyse basique et acidification donnera l'acide carboxylique souhaité⁷.

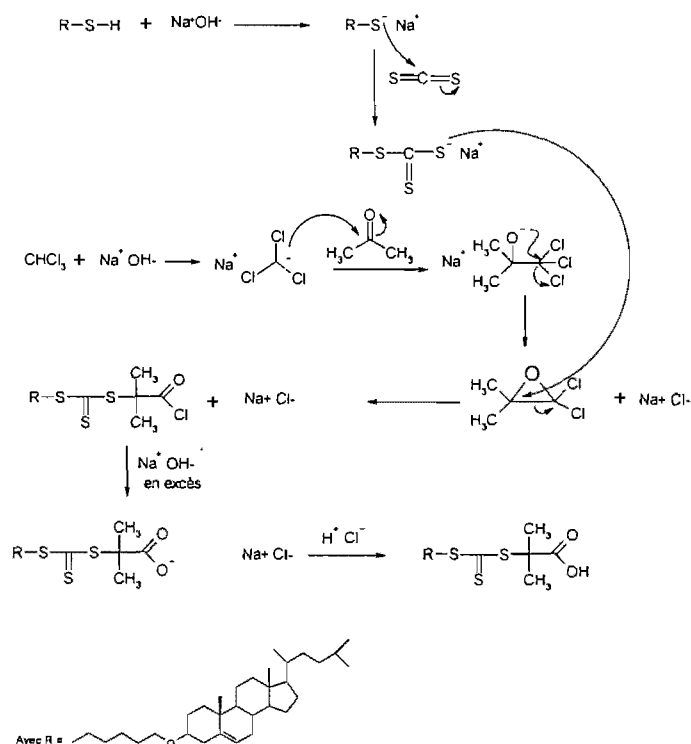


Figure 11 : Mécanisme de la réaction utilisée pour la synthèse de l'acide

La formation de l'amide se fait en deux étapes. La première est l'activation de la fonction acide carboxylique par le carbonyldiimidazole⁸ et la seconde est l'amidation à l'aide de l'isopropylamine (figure 12).

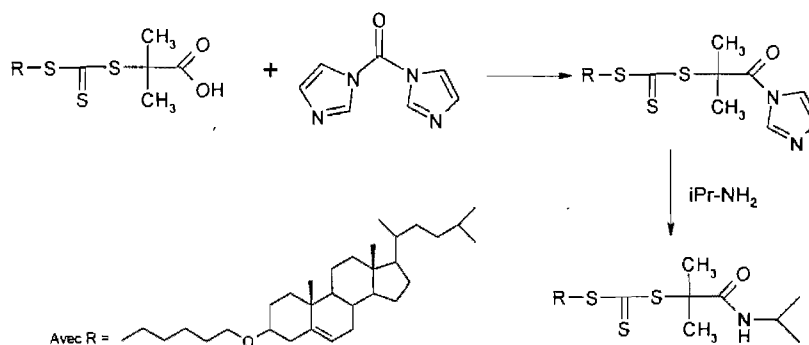


Figure 12 : Schéma réactionnel de formation de l'amide

Ce nouvel agent de transfert de chaîne va permettre la préparation de PNIPAM semi-téléchéliques comme l'indique l'équation suivante (Figure 13):

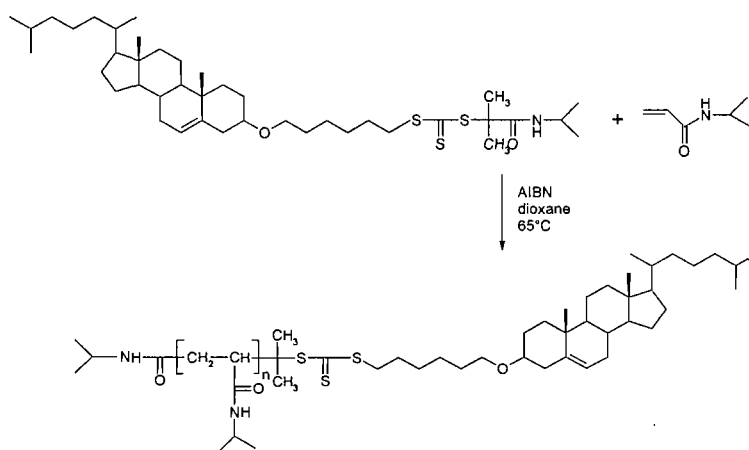


Figure 13 : Equation de la réaction de synthèse du PNIPAM semi-téléchélique

N'ayant pas obtenu une quantité suffisante de l'agent RAFT lors de sa synthèse pour l'utiliser lors de la polymérisation contrôlée du NIPAM, une nouvelle préparation devra être nécessaire pour pouvoir synthétiser le PNIPAM par la suite.

L'étude de ce PNIPAM semi-téléchélique en solution aqueuse pourrait être effectuée pour en comparer les résultats à ceux obtenus pour le PNIPAM téléchélique modifié par le même groupement cholestérol. D'autres formes d'auto-assemblage peuvent être obtenues, comme des micelles, des cylindres, des bicouches. De plus beaucoup de travaux (études en solution, ou à l'état solide) ont été effectués sur divers polymères (PEG, poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine], copolymères d'acrylamides, polyméthacrylate) ayant un bout de chaîne cholestérol^{10,11,12,13,14,15}. Ces polymères ainsi que leur comportement en solution pourront donc être comparés au PNIPAM modifié par ce même groupement.

3.3 Caractérisation des solutions aqueuses de CH-PNIPAM-10, 20 et 30K préparées par dissolution du polymère.

Le chapitre 2 a démontré que nous avons bien obtenu les polymères souhaités. Ce paragraphe va présenter les résultats concernant leur caractérisation et leur comportement en solution aqueuse lorsque les échantillons ont été préparés par la méthode de dissolution du polymère dans l'eau. Une distinction a été faite suivant deux modes de préparation des échantillons (par dissolution directe ou par dialyse) car des résultats très différents ont été obtenus.

3.3.1. Analyses par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et points troubles.

Le tableau 1 résume les principales données obtenues pour les CH-PNIPAM-10K, 20K et 30K, le PNIPAM téléchélique modifié par des chaînes hydrocarbonées C₁₈-PNIPAM-C₁₈ avec une masse molaire de 22K et le PNIPAM non modifié. Ces deux derniers polymères ont été étudiés dans notre groupe et les données déjà publiées¹⁶.

T_M représente la température de transition (sommet de l'endotherme), $\Delta T_{1/2}$ est la largeur de l'endotherme à mi-hauteur et ΔH est l'enthalpie de la transition (aire sous la courbe). T_{cp} (chauffage) représente le point trouble de la solution lors de son chauffage et T_{cp} (refroidissement) son point trouble lors de son refroidissement.

polymère	$T_M/^\circ\text{C}$	$\Delta T_{1/2}$ ($^\circ\text{C}$)	$\Delta H/\text{kJ/mol}$	$T_{cp}(^\circ\text{C})$ (chauffage)	$T_{cp}(^\circ\text{C})$ (refroidissement)
PNIPAM-10K (1g/L)	32,8	3,5	6,93	31.8	---
C_{18} -PNIPAM- C_{18} - 22K (1g/L)	30,9	1,1	4,13	27	---
CH-PNIPAM-10K (1g/L)	$T_{M1} = 30,9$ $T_{M2} = 38,5$	1,8 6,2	1,21 0,77	30,7	---
CH-PNIPAM-20K (1g/L)	31,3	1,3	4,18	29.7	---
CH-PNIPAM-30K (1g/L)	32,1	1,3	4,46	31.0	25.1

Tableau 1 : Propriétés thermiques obtenues par DSC et turbidimétrie des solutions aqueuses de PNIPAM modifiés

La figure 14 représente les endothermes obtenues pour les CH-PNIPAM-10K, 20K et 30K à une concentration de 1g/L dans l'eau.

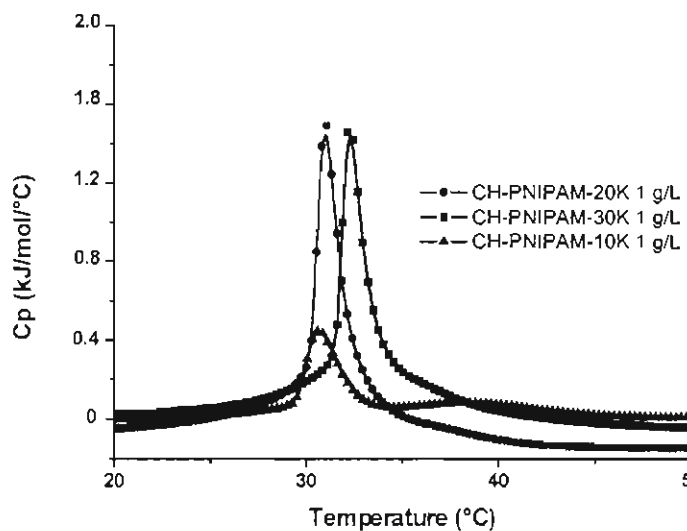


Figure 14 : Endothermes des CH-PNIPAM-10K, 20K et 30K à 1g/L.

Nous pouvons observer que les endothermes correspondants au CH-PNIPAM-20K et 30K sont asymétriques et plus larges par rapport à celui observé pour le C₁₈-PNIPAM-C₁₈-22K. Le maximum de l'endotherme, correspondant à la température de transition T_M, s'est aussi légèrement déplacé vers les températures plus élevées lorsque la masse moléculaire augmente (31,3°C pour le CH-PNIPAM-20K et 32,1°C pour le CH-PNIPAM-30K). Cette variation correspond à celle observée pour le PNIPAM téléchélique modifié par des chaînes hydrocarbonées C₁₈. En effet, de manière générale, plus la masse molaire diminue, et plus la quantité (ou concentration) de groupements hydrophobes en solution est importante et, plus la température de transition diminue¹⁷.

La largeur de l'endotherme ainsi que le léger épaulement observé pour les CH-PNIPAM-20K et 30K sur la figure 14 pourraient correspondre au chevauchement de deux maxima (deux maxima étant observés pour le CH-PNIPAM-10K, figure 14 et 15). Le sommet principal du PNIPAM camouflerait le deuxième, plus petit se situant à une température légèrement supérieure. Ces deux maxima correspondraient à deux phénomènes différents, mais leurs enthalpies ne peuvent pas être dissociées, ce qui expliquerait une enthalpie légèrement supérieure observée pour le CH-PNIPAM-20K et 30K (4,46 kJ/mol) au lieu de 4,13 kJ/mol pour le C₁₈-PNIPAM-C₁₈-22K.

Pour la mesure des points troubles (T_{cp}) par UV-Vis, la vitesse de variation de température est de 1°C/min pour le CH-PNIPAM-20K et 30K. Les solutions commencent à être troubles au début du changement de pente. Le tableau 1 rassemble les températures de transition obtenues par DSC et les points troubles déterminés par turbidimétrie. Les CH-PNIPAM-20K et 30K ont une valeur de T_{cp} bien inférieure à celle de T_M, comme il a été observé pour les C₁₈-PNIPAM-C₁₈¹⁵. La différence observée entre les températures de transition et les points troubles est peut être aussi

due aux précisions des mesures. En effet, la turbidimétrie est une méthode moins exacte que la DSC. Le contrôle de température est moins précis, de plus, la cellule de mesure permet des échanges de chaleur avec le milieu extérieur, elle n'est pas adiabatique comme pour les mesures de DSC, ce qui peut provoquer des modifications au niveau de la solution et donc une modification de la température de transition.

Nous pouvons noter aussi que la température de transition n'est pas la même lorsque la solution est chauffée ou refroidie. Ce phénomène d'hystérèse est dû à la cinétique lente de désenchevêtrement des chaînes précipitées¹⁸.

Une étude calorimétrique en concentration a aussi été réalisée pour le CH-PNIPAM-10K, 20K et 30K. En ce qui concerne le CH-PNIPAM-20K et 30K, le pic reste inchangé à celui présenté à la figure 14 pour une concentration de 0,5g/L à l'exception d'une petite diminution de T_M (0,5°C) lorsque la concentration passe de 0,5 à 5g/L.

Par contre, le CH-PNIPAM-10K présente un comportement thermique tout à fait différent. En effet, les tracés présentent deux endothermes bien distincts, l'un centré à une température de transition T_M de 30,90°C et l'autre, d'intensité plus faible, à 38,5°C pour une concentration de 1g/L. De plus, plus la concentration de la solution de polymère augmente et plus l'endotherme de plus faible intensité se déplace vers le premier (figure 15). Des courbes ayant deux maxima ont aussi été obtenues lors des refroidissements avec un léger déplacement vers des températures plus faibles. Le deuxième endotherme n'étant pas présent pour les C_{18} -PNIPAM- C_{18} , il peut être dû à un changement de phase. Les groupements cholestérols étant plus volumineux et plus rigides que les chaînes C_{18} , et ayant un pouvoir hydrophobe plus grand, les

interactions avec les molécules d'eau sont donc différentes ce qui peut être mis en évidence lors du chauffage de la solution et provoque cette deuxième transition. Mais aucune explication sur l'existence de ce deuxième pic n'a encore été prouvée. Tenhu et al. ont déjà observé ce phénomène pour des solutions aqueuses de cumyl-PNIPAM-MPC (MPC représente la methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) greffés sur des nanoparticules d'or¹⁹, ils expliquent ce phénomène par la présence de deux zones d'hydratation au niveau des chaînes de PNIPAM : une zone moins hydratée avec des associations inter-chaînes fortes et une deuxième plus hydratée. Ceci est peut être aussi notre cas et peut être provoqué par les interactions fortes existant entre les groupes cholestérols.

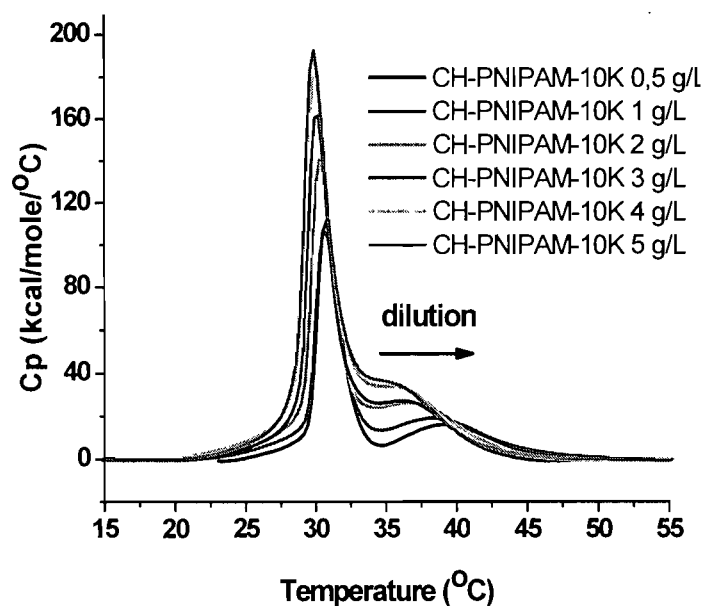


Figure 15: Capacité calorifique en fonction de la température pour le CH-PNIPAM

10K à différentes concentrations (lors du chauffage)

L'enthalpie de ces solutions est aussi beaucoup plus faible par rapport à celles des CH-PNIPAM-20K et 30K, que cela soit pour le pic principal seul ou la somme des deux pics.

3.3.2 Analyses par calorimétrie à perturbation de pression (PPC).

Le tableau 2 résume les données obtenues par calorimétrie à perturbation de pression pour le PNIPAM non modifié et modifié par des chaînes C_{18} ¹⁵, et pour le CH-PNIPAM-10 et 30K.

D'après les données figurant dans le tableau, les chaînes de CH-PNIPAM-30K semblent avoir le même comportement volumique que lorsqu'elles sont terminées par des chaînes C_{18} . Ce qui n'est pas le cas pour le CH-PNIPAM-10K. En effet, son faible changement volumique (0,49) est en accord avec sa faible enthalpie de transition (1,88 kJ/mol pour les deux endothermes), montrant une plus faible hydratation des chaînes de polymère par rapport aux deux autres masses.

Polymère	T_M (°C)	$\Delta V/V$ (%)	$1000\alpha_{25}/\text{deg}^{-1}$
PNIPAM-10K (1g/L)	32,8	1,50	0,99
C_{18} -PNIPAM- C_{18} -22K (1g/L)	30,9	1,05	0,96
CH-PNIPAM-10K (1g/L)	30.0	0.49	1.20
CH-PNIPAM-30K (1g/L)	31.5	1.02	1.10

Tableau 2 : Propriétés thermiques obtenues par PPC des solutions aqueuses de PNIPAM modifiés

T_M représente la température de transition, $\Delta V/V$ est le changement de volume accompagnant la transition par rapport au volume partiel du polymère, et $1000\alpha_{25}$ est le coefficient d'expansion à 25°C multiplié par 1000.

Pour tous les polymères, les températures de transition sont légèrement inférieures à celles obtenues par DSC. Pour les CH-PNIPAM-10K et 30K, elles sont inférieures à celle du PNIPAM non modifié et ces températures de transition diminuent plus la concentration des groupements hydrophobes augmente, ce qui est en accord avec la littérature (chapitre 1). La figure 16 représente les coefficients d'expansion thermique des CH-PNIPAM-10K et 30K pour une concentration de 5g/L. On peut voir une différence très nette d'aire entre les CH-PNIPAM-10K et 30K pour une même concentration. Il se produit un très faible changement volumique lors de la transition pour le CH-PNIPAM-10K par rapport au CH-PNIPAM-30K.

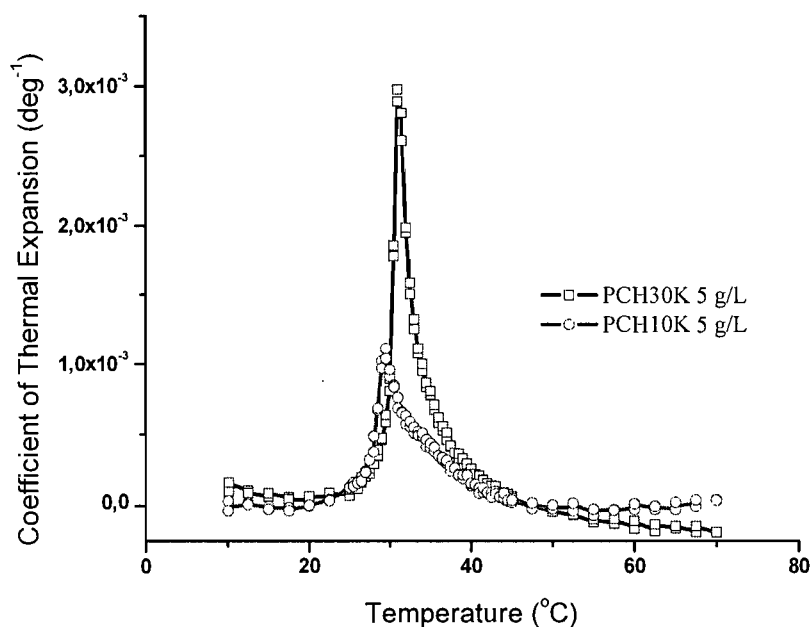


Figure 16 : Coefficient d'expansion thermique en fonction de la température des CH-PNIPAM-10K et 30K

Des études plus poussées devront être réalisées pour comprendre, analyser et déduire le comportement des chaînes de ces polymères et pourquoi leurs comportements sont si différents d'une masse moléculaire à l'autre.

3.3.3. Analyse par diffusion dynamique de la lumière à température ambiante.

Les mesures effectuées par diffusion de la lumière sont faites sur des solutions aqueuses de CH-PNIPAM à une concentration de 1g/L après avoir été filtrées (filtre de 0,45 μm). La figure 17 représente la distribution des rayons hydrodynamiques des CH-PNIPAM-10K, 20K et 30K.

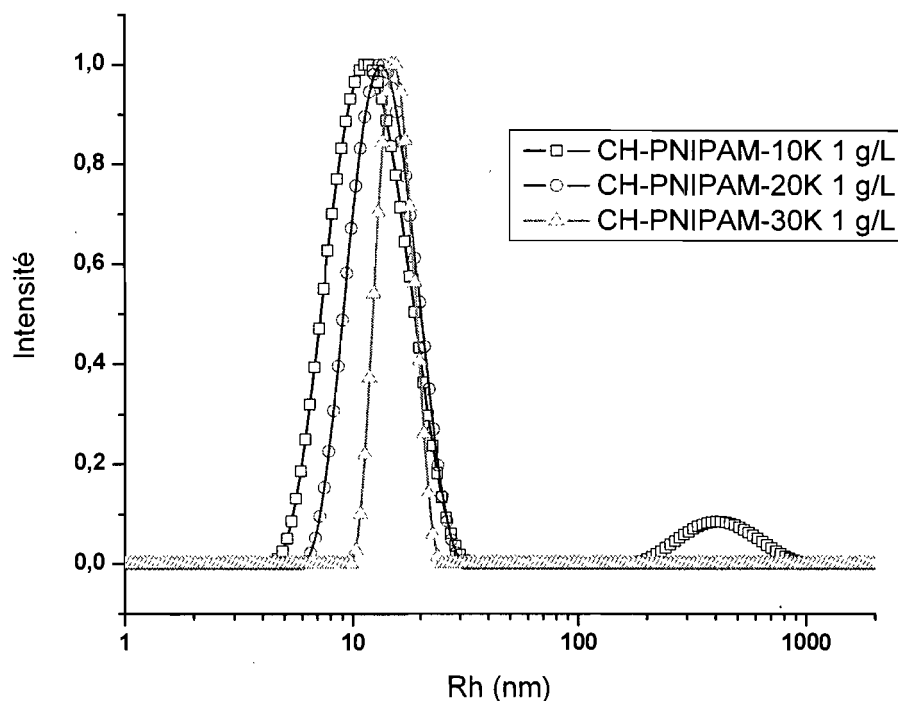


Figure 17 : Rayon hydrodynamique des CH-PNIPAM à 24°C

La distribution en taille des particules formées par les CH-PNIPAM-20K et 30K est unimodale, contrairement au CH-PNIPAM-10K où deux populations de taille sont présentes. Le CH-PNIPAM-10K a à la fois des agrégats de petites et de grandes tailles : les objets de petite taille pourraient correspondre comme pour le CH-PNIPAM-20K et 30K à des micelles « fleurs » et les gros objets (plus faible en proportion) à des agrégats.

Les rayons hydrodynamiques des objets formés par les chaînes de CH-PNIPAM augmentent lorsque la masse moléculaire du polymère augmente, c'est-à-dire quand la longueur de chaîne augmente. Les rayons hydrodynamiques à température ambiante du CH-PNIPAM-10K, 20K et 30K, sont 12,8 nm, 13,5 nm et 16,3 nm respectivement et correspondent à des tailles de micelles fleurs trouvé pour le C₁₈-PNIPAM-C₁₈¹⁶.

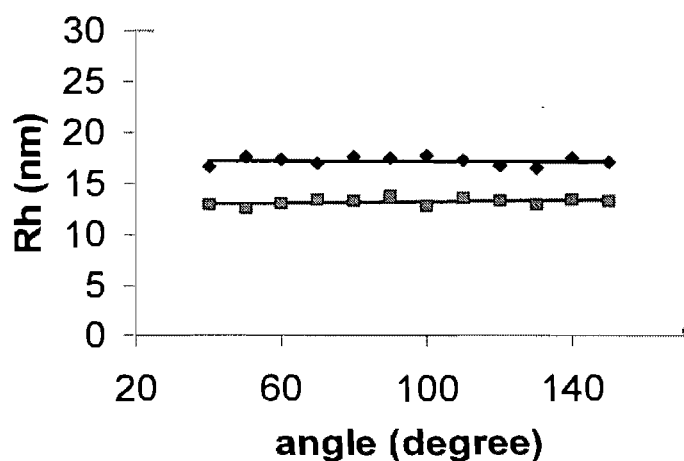
3.3.3.1 Etude de sphéricité des CH-PNIPAM- 20K et 30K

Les rayons hydrodynamiques à température ambiante trouvés par DLS (environ 14 nm et 17 nm) pourraient en effet correspondre à des tailles de micelles « fleurs ». Une étude de sphéricité a donc été réalisée par DLS. Cette étude consiste à déterminer la taille de l'objet pour différents angles de laser. Si l'objet est sphérique, la taille doit rester à peu près identique pour tous les angles étudiés. La figure 18A montre que la taille de l'objet ne varie pas suivant l'angle où il est analysé.

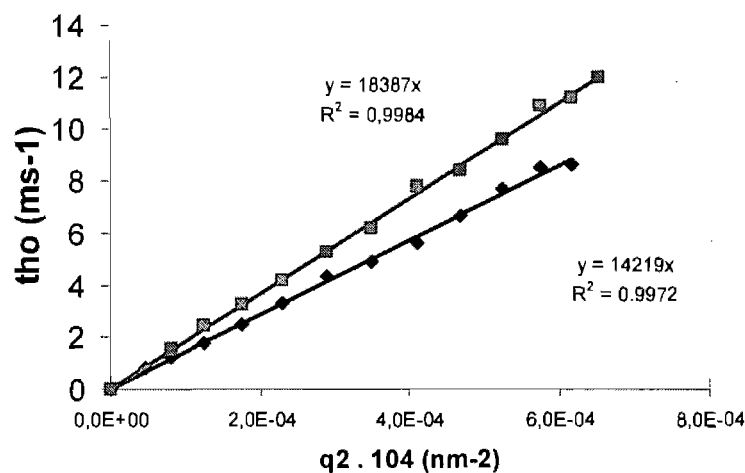
Une autre représentation graphique est d'avantage utilisée : $\Gamma = f(q^2)$, où Γ représente l'inverse du temps en ms⁻¹ et q est un rapport en fonction de l'angle du laser (eq 1) :

$$q = \frac{4\pi n \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} \quad (\text{eq.1})$$

n étant l'indice de réfraction du solvant (dans notre cas, l'eau : 1,332), λ la longueur d'onde du laser (ici, 632,8nm) et θ l'angle du laser en radian.



A



B

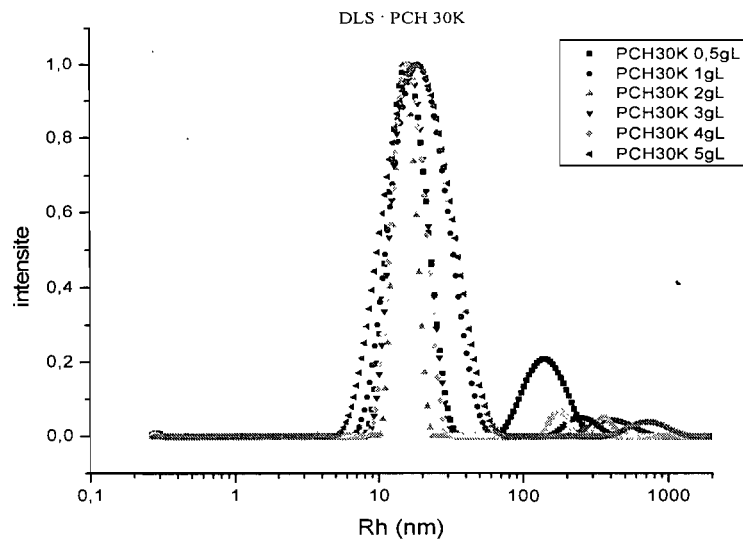
Figure 18: Rayon hydrodynamique en fonction de l'angle pour le CH-PNIPAM-20K (carré) et 30K (losange) à 1 g/L à température ambiante (A) ; Γ en fonction de q^2 pour le CH-PNIPAM-20K et 30K à 1g/L à température ambiante (B)

Selon l'équation 1, pour des objets sphériques, les points doivent former une droite passant par 0. La courbe de tendance linéaire de la figure 18B montre qu'on se trouve dans ce cas. Les particules formées par les chaînes de CH-PNIPAM-30K sont donc sphériques et leur taille correspondrait à celle de micelles « fleurs ». Tout porte

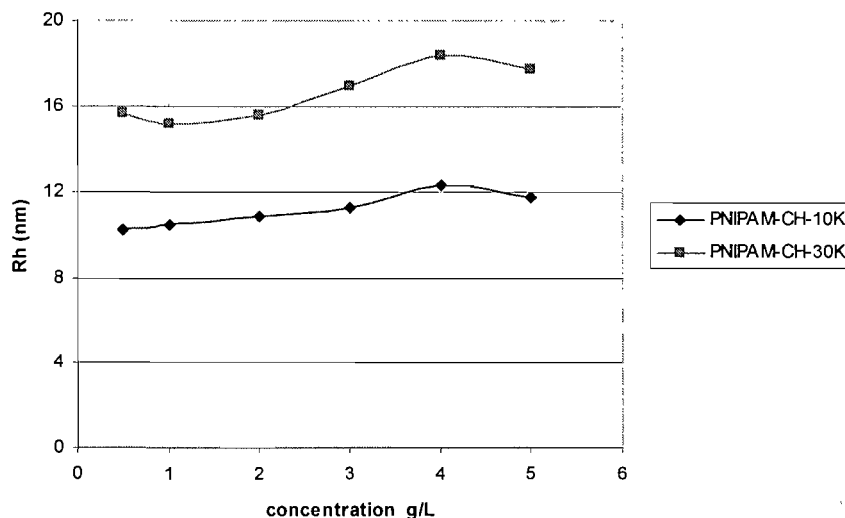
donc à croire que les chaînes de CH-PNIPAM-20K et 30K forment des micelles « fleurs » à température ambiante.

3.3.3.2 Etude en concentration des CH-PNIPAM-10K et 30K

Cette étude en concentration a été effectuée pour les CH-PNIPAM-10K et 30K. Pour le CH-PNIPAM-10K, deux populations d'objets sont présentes pour toutes les concentrations testées (de 0.5 à 5g/L). Les proportions entre les deux pics restent les mêmes (environ 90/10) ainsi que la taille des objets (10-12 nm pour le pic 1 et 100-130nm pour le pic 2). Par contre pour le CH-PNIPAM-30K, à la plus faible concentration (0,5g/L), une petite proportion de gros agrégats (5%) est présente qui disparaît à partir de 1g/L. La taille des particules restent aussi identiques avec l'augmentation de la concentration (16-18 nm) (figure 19B).



A



B

Figure 19 : Rayons hydrodynamiques des CH-PNIPAM-30K à température ambiante (A) ; stabilité des particules suivant la concentration (B)

La figure 19B met en évidence la stabilité des rayons hydrodynamiques pour des concentrations de CH-PNIPAM-10K et 30K de 0,5 à 5g/L. De plus des mesures ont aussi été effectuées sur ces échantillons deux mois après leur préparation et montrent les mêmes tailles et distribution d'objets. Le rayon hydrodynamique reste donc stable avec la concentration mais aussi dans le temps.

3.3.4 Etude par diffusion de la lumière avec variation de température

Le CH-PNIPAM-10K (1g/L). Comme le montre la figure 20, à température ambiante, deux populations sont présentes, l'une de 12-13 nm (70%) et l'autre d'environ 120 nm (30%). Lorsqu'on approche de la température de transition (environ 30°C), il n'y a plus que une seule population présente à 21-22 nm qui reste stable jusqu'à 42°C. Ces nanoparticules conservent cette taille même après 92h passées à

cette température. A une température supérieure à la température de transition, des mésoglobules stables sont peut être formés comme il a été le cas pour le C₁₈-PNIPAM-C₁₈¹⁹. Par contre, après refroidissement, les deux populations d'objets sont à nouveau présentes avec les mêmes tailles et dans les mêmes proportions.

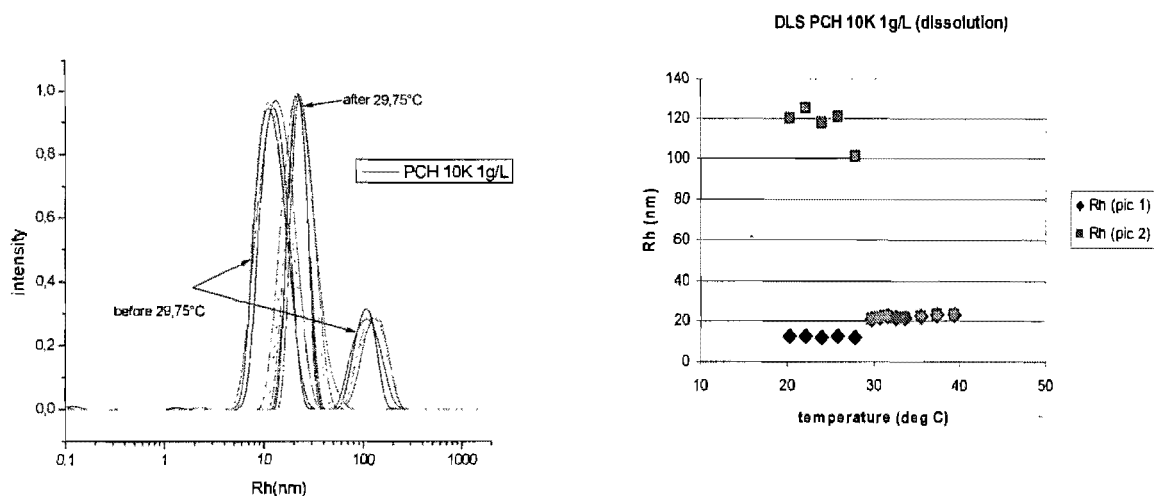


Figure 20 : Variation du rayon hydrodynamique du CH-PNIPAM-10K en fonction de la température

Le CH-PNIPAM-20K et 30K (1g/L). La distribution de taille pour le CH-PNIPAM-20K est donc monodisperse. A température ambiante, la taille est d'environ 14 nm, puis après transition (32°C), la taille augmente jusqu'à 32 nm.

La taille des nanoparticules formées par le CH-PNIPAM-30K augmente de 17nm à 38nm après transition. Les micelles « fleurs » formées à température ambiante s'agrègent lorsqu'elles se trouvent à une température supérieure à la température de transition. Les figures 21 et 22 représentent l'évolution des rayons hydrodynamiques

des CH-PNIAPM avec la température. Il a été constaté une diminution de la polydispersité lorsque la solution est chauffée au-delà de 32°C.

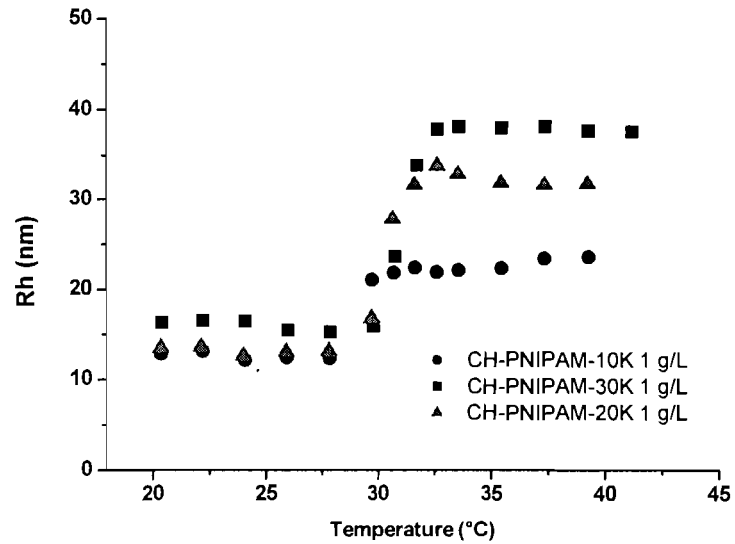


Figure 21 : Variation de Rh en fonction de la température du CH-PNIPAM-10K, 20K et 30K

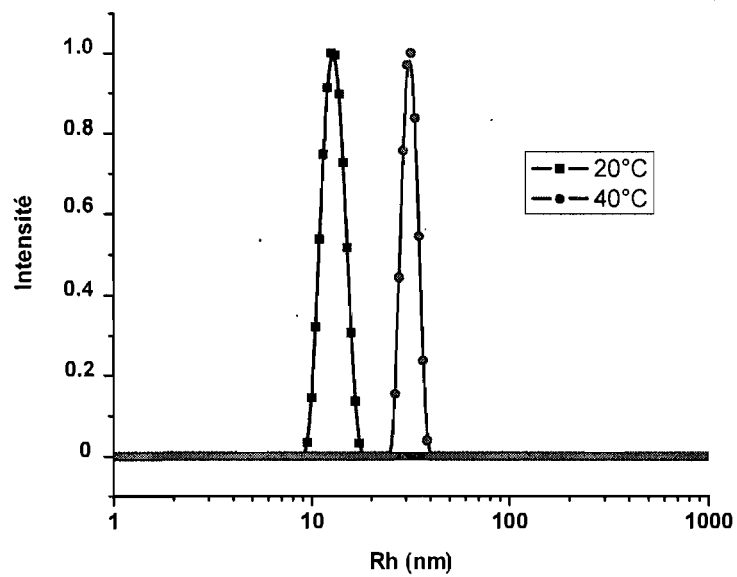


Figure 22 : Variation de Rh en fonction de la température de CH-PNIPAM-20K

3.4 Caractérisation des CH-PNIPAM préparés par dialyse

La deuxième méthode de préparation d'échantillon est la méthode par dialyse. Les résultats obtenus par DLS sont très différents de ceux obtenus pour les échantillons préparés par dissolution et méritent d'être mentionnés ici. Toutes les solutions étudiées par DLS et SLS ont une concentration de 0,22g/L.

3.4.1 Analyse par diffusion dynamique de la lumière à température ambiante et étude de stabilité.

La figure 23 présente la distribution des rayons hydrodynamiques, à température ambiante, pour chaque solution de CH-PNIPAM.

La distribution en taille du CH-PNIPAM-20K est monodisperse avec un rayon d'environ 168 nm. Ce rayon est bien plus important (environ 150 nm) que celui du CH-PNIPAM 20K préparé par simple dissolution dans l'eau.

Par contre, les distributions de taille des objets formés par les CH-PNIPAM-10K et 30K sont bimodales. Une population d'objets formés présente un faible rayon hydrodynamique et avec un pourcentage en intensité sur l'aire globale des pics assez petit, et la deuxième population est de dix fois cette taille et domine en intensité. Pour le CH-PNIPAM-10K, les rayons sont de 12nm (6%) et 130nm, et pour le CH-PNIPAM-30K, elles sont de 15nm (16%) et 140nm.

D'après ces résultats, les solutions aqueuses de CH-PNIPAM-10K et 30K présentent deux populations d'objets. La première, plus petite en taille, pourrait correspondre à des micelles fleurs, et la deuxième à de plus gros agrégats dont la forme n'a pas encore été déterminée.

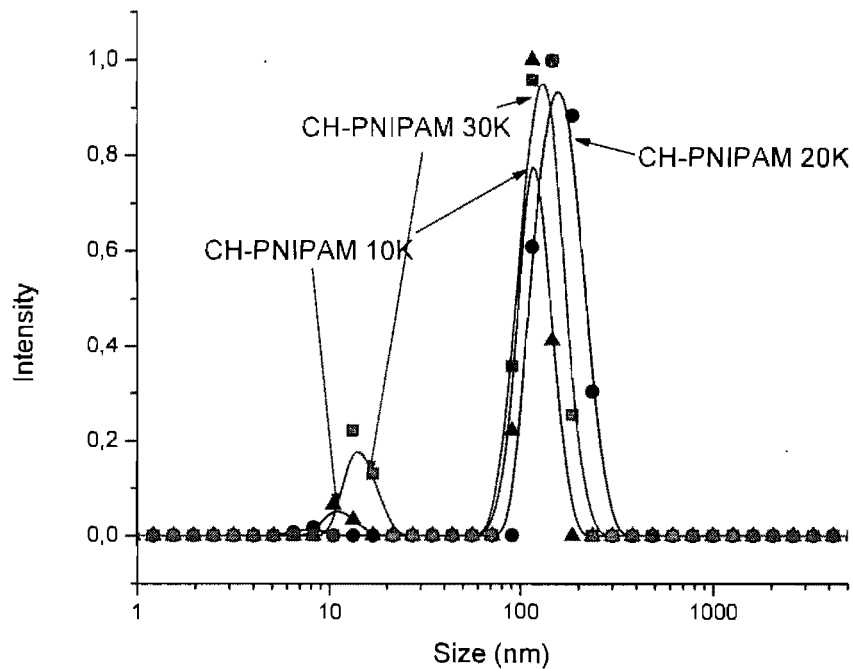


Figure 23 : Distribution des rayons hydrodynamiques des CH-PNIPAM-10K, 20K, et 30K

Ces tailles plus grandes que pour les solutions préparées par dissolution peuvent être expliquées par le fait qu'à un certain ratio eau/éthanol durant la dialyse, le PNIPAM n'est plus soluble²⁰, les chaînes précipitent alors puis se redissolvent quand le ratio change à nouveau. Lors de ce phénomène, l'arrangement des chaînes peut changer et modifier leur assemblage.

Pour étudier la stabilité de ces objets, la diffusion dynamique de la lumière est une bonne technique car elle permet de voir si la taille des agrégats varie au cours du temps. Si les agrégats ne sont pas stables et se dissolvent, leur taille chutera et leur rayon sera très faible. La figure 24 présente le suivi des tailles des différents polymères pendant vingt-cinq jours à température ambiante.

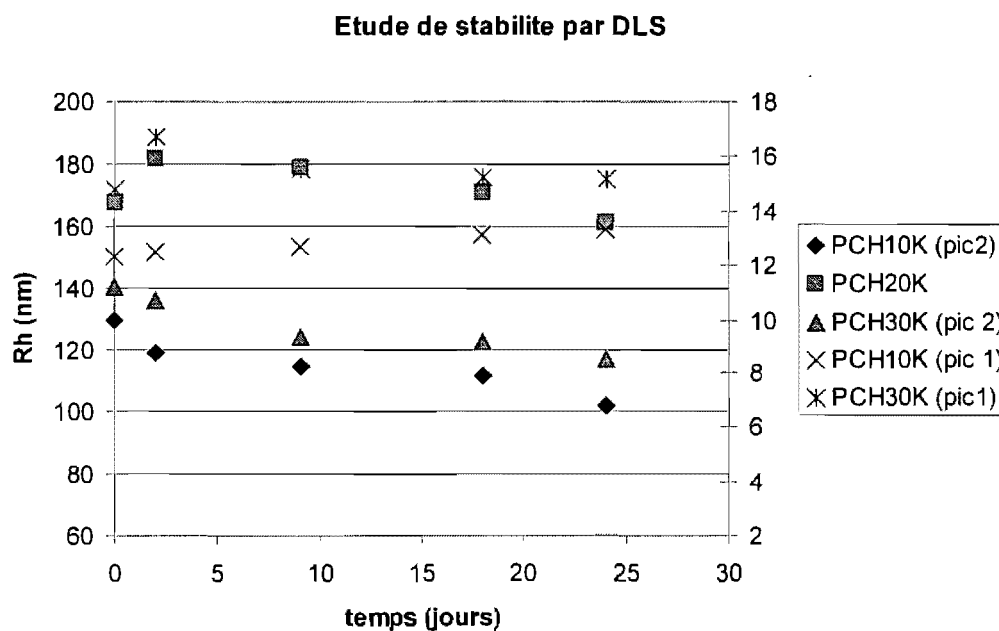


Figure 24 : Variation du rayon hydrodynamique des CH-PNIPAM en fonction du temps à température ambiante

Pour chacun des CH-PNIPAM, les tailles varient d'environ 20 nm pour des tailles de 130 à 170 nm et de 1 à 2 nm pour des tailles de 12 à 17 nm, en vingt-cinq jours. Cette variation étant peu significative, les agrégats (petits et grands) formés par ces chaînes de polymère peuvent donc être considérés comme stables durant cette période.

3.4.2 Etude des solutions de CH-PNIPAM en fonction de la température par diffusion dynamique de la lumière.

Le PNIPAM ayant une LCST, il est intéressant d'étudier l'influence de la température sur les solutions de CH-PNIPAM et de voir l'influence de la température sur la modification de la taille des agrégats.

Le CH-PNIPAM-30K. La solution aqueuse de CH-PNIPAM-30K présente deux populations de particules jusqu'à une température de 30,75°C, puis la distribution devient monodisperse (figure 25). Le rayon hydrodynamique des plus petites particules varie de 14,2 à 46 nm et augmente avec la température ; et celui des plus grosses varie de 135,3 à 46nm et diminue quand la température augmente. La transition s'effectue à 30,75°C. A cette température, les gros agrégats « se désagrègent » (pic 2) et les petits agrégats « s'agrègent » (pic 1).

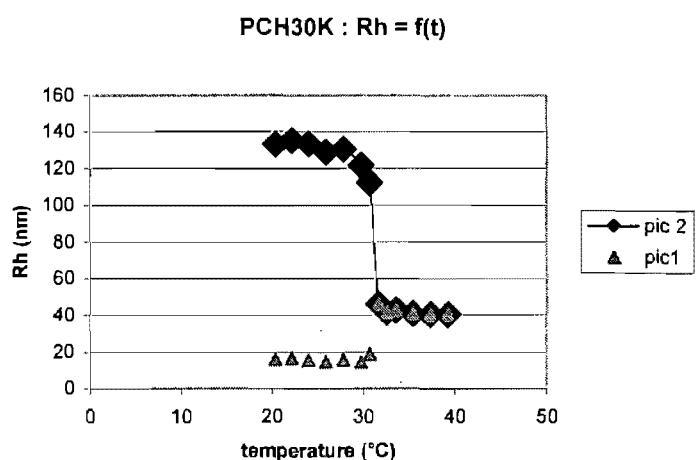


Figure 25 : Rayons hydrodynamiques en fonction de la température pour le CH-PNIPAM-30K

Après la transition, le rayon de giration à 40°C et la masse molaire apparente sont respectivement égal à 65,7 nm et $M_w=4,2 \cdot 10^6$ g/mol d'après l'approximation de Guinier. Les particules formées à haute température seraient donc composées d'environ 140 chaînes de polymère.

Le CH-PNIPAM-20K. La distribution des rayons hydrodynamiques du CH-PNIPAM-20K est monodisperse. Le rayon hydrodynamique varie de 144,5 à 234,3

nm et le rayon de giration de 112 à 161 nm. La transition s'effectue, comme pour le CH-PNIPAM-30K, à 30,75°C.

Il était logique de penser que les gros objets formés par les chaînes du CH-PNIPAM-30K en solution aqueuse étaient les mêmes que ceux formés par celles du CH-PNIPAM-20K, et que leur comportement vis-à-vis des changements de température soit à peu près identique. Or, la variation du R_h en fonction de la température est tout à fait différente (figure 26). Après la transition, le rayon des particules augmente et ne diminue pas comme dans le premier cas. Cette variation ressemble d'avantage à celle observée pour les agrégats de faible taille du CH-PNIPAM-30K (figure 25). Les gros agrégats « s'agrègent » donc pour former des objets de 235 nm après la température de transition. Aucune explication n'a encore été trouvée pour expliquer cette différence.

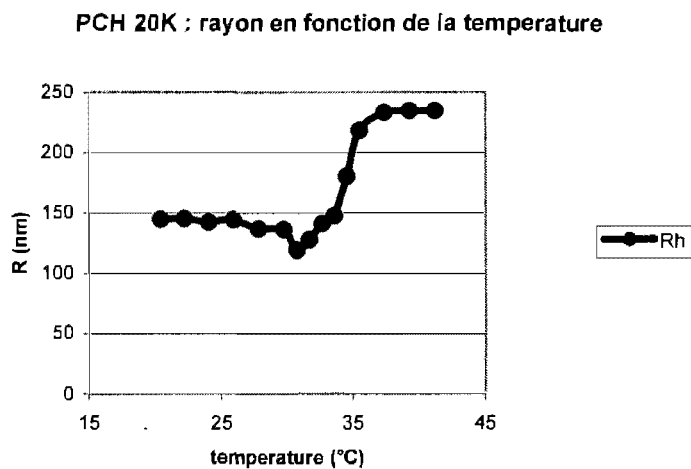


Figure 26 : Rayons hydrodynamiques en fonction de la température pour le CH-PNIPAM-20K

Le CH-PNIPAM-10K. Le CH-PNIPAM-10K, à cette concentration, présente deux populations de rayon hydrodynamique et n'a pas donné de résultats cohérents et exploitables.

3.4.3 Etude d'encapsulation par le CH-PNIPAM-20K.

La technique d'encapsulation de molécules fluorescentes, à l'intérieur de liposomes par exemple, est souvent utilisée pour suivre le transport de substances biologiques actives comme les gènes, les peptides ou encore les protéines^{21,22}.

Cette étude complémentaire a été effectuée pour savoir si le CH-PNIPAM-20K en solution aqueuse pourrait former des vésicules ou des particules pouvant encapsuler des composés hydrophobes. Pour tester cette hypothèse, une étude d'encapsulation du composé Rhodamine B isothiocyanate-Dextran est effectuée. Ce composé a environ une masse molaire d'environ 10,000g/mol et contient 0,002 à 0,01 mole de rhodamine B isothiocyanate par mole d'unité glucose. Le dextran ainsi marqué est détectable lors de mesures de spectres d'émission et d'excitation de fluorescence²³. Ce composé de masse molaire suffisamment grande a été choisi par rapport à la molécule de rhodamine B isothiocyanate seule pour que ce dernier ne puisse pas, par exemple, être incorporé dans des micelles de taille plus petite auquel cas, notre hypothèse ne pourrait pas être vérifiée.

La figure 27 représente la cinétique de dialyse du Dextran-rhodamine en présence de PNIPAM non-modifié de masse molaire 20,000g/mol, et de CH-PNIPAM-20K, ainsi que pour le complexe Dex-Rho seul.

D'après ce graphe, nous pouvons constater que le Dex-Rho. seul sort très rapidement du sac de dialyse car il n'est plus observé à partir de 38h de dialyse.

La cinétique de dialyse du Dextran-rhodamine en présence de PNIPAM non modifié montre qu'il y a des interactions faibles entre le PNIPAM et le complexe Dex-Rho, car ce dernier met quelques jours avant de sortir entièrement du sac de dialyse (environ 8 jours).

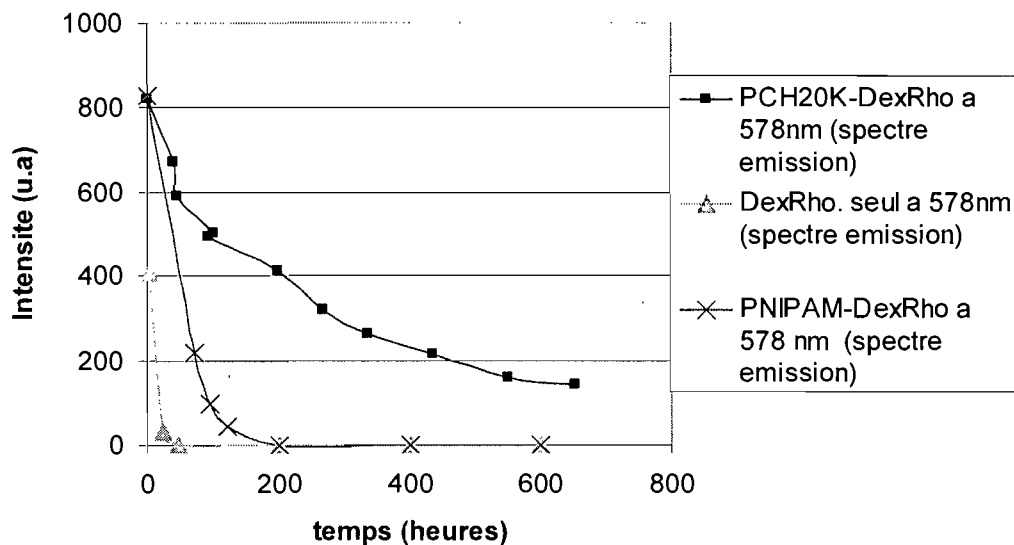


Figure 27 : Intensité à 578nm des spectres d'émission en fonction du temps

En ce qui concerne le CH-PNIPAM-20K, la majorité du complexe est sorti du sac de dialyse après 25 jours, car l'intensité de fluorescence diminue jusqu'à une valeur relativement faible. Par contre il reste tout de même présent.

Les agrégats étant stable durant 25 jours (chapitre 3, section 3.4.1), la diminution d'intensité, donc la perte du complexe Dex-Rho, n'est pas due à la dissociation des particules. Le peu de complexe qu'il reste encore dans le sac est peut être dû à l'interaction qu'il y a entre le polymère et ce dernier. En résumé, ces résultats ne permettent pas d'affirmer qu'une partie de Dex-Rho n'est pas encapsulée.

3.4.4 Image de microscopie à force atomique (AFM).

3.4.4.1 Préparation des plaques AFM.

Pour cette étude, des plaques de silice ont été utilisées. Des morceaux de 3cm sur 1,5cm ont été coupés. Ces plaques doivent être utilisées très propres, elles sont donc trempées dans une solution de Piranha ($3x H_2SO_4 + 1x H_2O_2$ à 30%) durant 10min. Elles sont ensuite rincées abondamment avec de l'eau déionisée. Les solutions de CH-PNIPAM-10K, 20K et 30K à 0,22g/L sont déposées (une goutte) sur la surface de silice propre et sèche. Les plaques sont laissées à l'air libre jusqu'à évaporation avant analyse.

3.4.4.2 Résultats et image.

Pour chaque polymère des formes à peu près sphériques sont observées mais de tailles différentes suivant où la pointe de l'AFM est placée sur la plaque :

- pour le CH-PNIPAM-10K, les diamètres varient de 59nm à 164nm.
- pour le CH-PNIPAM-20K, les diamètres varient de 70nm à 143nm.
- pour le CH-PNIPAM-30K, les diamètres varient de 90nm à 210nm.

Un exemple d'image obtenue pour le CH-PNIPAM-20K est représenté ci-dessous :

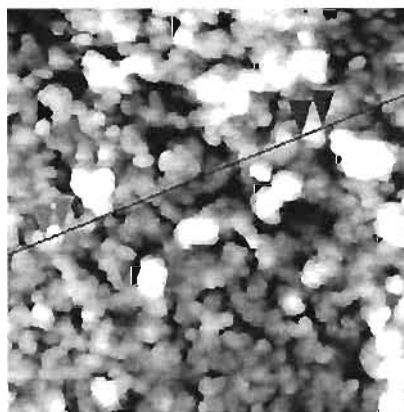


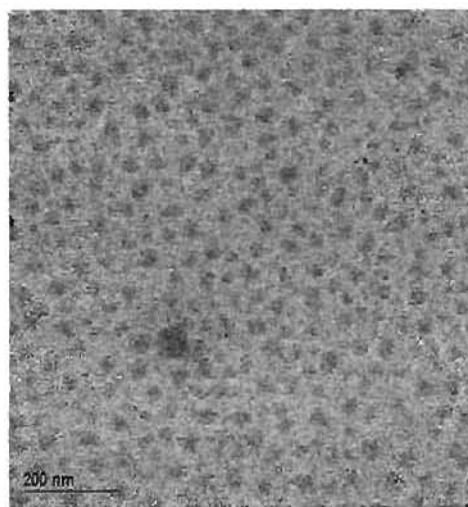
Figure 28 : Image AFM du CH-PNIPAM-20K à 0,22g/L

La grande différence de taille observée pour un même échantillon est peut être due à l'agglomération non homogène des particules lors du séchage de la surface. Une, deux ou trois particules peuvent s'agréger.

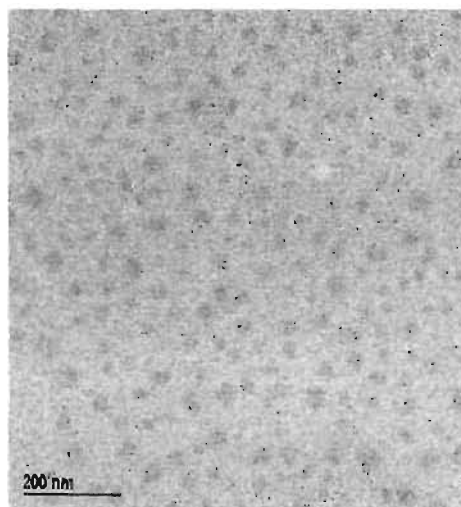
Les tailles obtenues par cette méthode, et peut être aussi la forme de ces particules, ne sont cependant pas comparables aux résultats obtenues par DLS, car les conditions expérimentales sont très différentes : une analyse se fait en solution et l'autre sur un support solide à l'air libre.

3.4.5 Microscopie à transmission électronique (TEM)

Les tailles obtenues par DLS pour les solutions dialysées étant importantes, et les premiers essais d'AFM ayant donné de très larges distributions de taille de particules, le TEM pourrait donner des résultats plus précis sur la taille et la morphologie des particules sur une surface. Les images suivantes (figure 29) sont caractéristiques des échantillons CH-PNIPAM-20 et 30K à une concentration de 4.6g/L :



CH-PNIPAM-20K



CH-PNIPAM-30K

Figure 29 : Images TEM des CH-PNIPAM-20K et 30K

Les particules ainsi préparées sont donc sphériques et aucun agrégat n'est observé. De plus, elles sont dispersées sur le support de façon très homogène.

Sur une centaine de particules, la distribution en taille est la suivante:

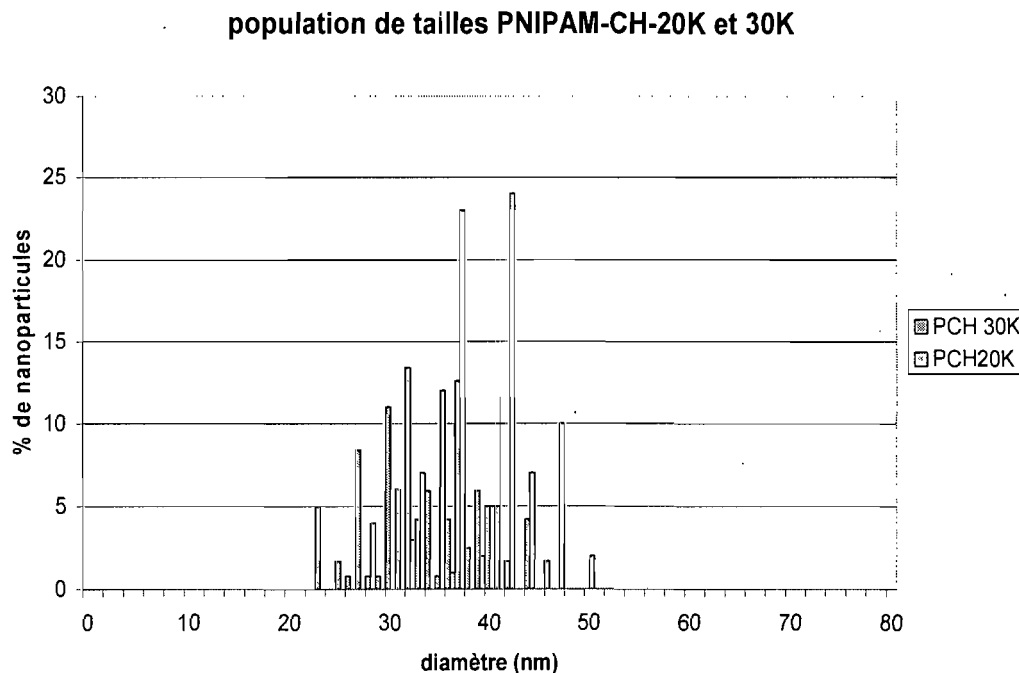


Figure 30 : distribution en taille des CH-PNIPAM-20K et 30K

Pour le CH-PNIPAM-30K, deux populations majoritaires sont observées pour des rayons de 16 et 18,5nm. Ces tailles correspondent à celles obtenues pour ce polymère (en solution) par DLS pour une concentration identique mais préparés par dissolution.

Pour le CH-PNIPAM-20K, les populations majoritaires présentent des rayons de 18,5 et 21nm, ce qui est un peu plus élevé que les tailles obtenues par DLS pour les solutions aqueuses de polymères à cette concentration et préparées par dissolution.

Par cette méthode d'imagerie, on peut constater que comme pour l'AFM, des particules sphériques apparaissent sur le support, mais leurs tailles mesurées par TEM sont très différentes de celles mesurées par AFM.

4. Conclusions.

Le fait que différents résultats aient été obtenus suivant les différentes masses molaires (10, 20 et 30K) et aussi suivant la méthode de préparation des échantillons, rend l'interprétation des résultats complexe. D'autres études sont nécessaires pour comprendre les divers phénomènes qui entrent en jeu lors de ces assemblages.

Les petits agrégats présents pour le CH-PNIPAM-10K (dimodal) et les CH-PNIPAM-20K et 30K (monodisperse) peuvent être associés à des micelles « fleurs ». Les gros agrégats peuvent être associés à l'interconnexion de ces micelles fleurs mais aucune preuve n'a encore été faite de ces auto-assemblages.

Il a aussi été constaté que la méthode par dialyse favorise la formation de ces gros agrégats.

Il a été noté aussi que tous les agrégats restent stables que cela soit en variant la concentration ou dans le temps.

Des méthodes par imagerie ont aussi été utilisées pour essayer de déterminer la morphologie de ces agrégats. Même si les conditions sont différentes, l'AFM et le TEM montrent que ces agrégats ont plutôt tendance à être sphériques.

-
- (1) Heskins, M. ; Guillet, J. E. *J Macromol. Sci. Chem* **1968**, A2, 1441
 - (2) Fujishige, S. ; Kubota, K. ; Ando, I. *J Phys Chem* **1989**, 93, 3311
 - (3) Shild, H. G. *Prog Polym Sci* **1992**, 17, 163
 - (4) Chabala, J. C. S. ; T. Y. *Carbohydrate research* **1978**, 67, 55-63
 - (5) Khan, A. T. ; Ghosh, S. ; Choudhury, L. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2226-2231.
 - (6) Pore, D. M. ; Soudagar, M. S. ; Desai, U. V. ; Thopate, T. S. ; Wadagaonkar, P. P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 9325-9328.
 - (7) Lai, J. T. ; Filla, D. ; Shea, R. *Macromolecules* **2002**, 35, 6754-6756.
 - (8) Winnik, F. M. ; Adronov, A.; Kitano, H. *Can. J. Chem.* **1995**, 73, 2030-2040
 - (9) Lai, J. T. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 557-560.
 - (10) Qiu, Y.-J. ; Xu, J.-T. ; Xue L. ; Fan, Z.-Q. ; Wu, Z.-H. *J. Appl Polym Sci, Part A : Polym Chem*, **2007**, 103, 2464-2471.
 - (11) Sugiyama, K. ; Shiraishi, K. ; Matsumoto, T. *J. Appl Polym Sci, Part A : Polym Chem*, **2003**, 41, 1992-2000.
 - (12) Yusa, S.-I. ; Kamachi, M. ; Morishima, Y. *Macromolecules*, **2000**, 33, 1224-1231
 - (13) Chaw, C.-S. ; Chooi, K.-W.; Liu, X.-M.; Tan, C.-W. ; Wang, L. ; Yang, Y.-Y. *Biomaterials*, **2004**, 25, 4297-4308.
 - (14) Shiraishi, K., Sugiyama, M. ; Okamura, Y. ; Sugiyama, K. *J. Appl Polym Sci, Part A : Polym Chem*, **2007**, 103, 3064-3075.
 - (15) Liu, X.-M. ; Yang, Y.-Y. ; Leong, K. W. *J of Colloid and Interface Sci*, **2003**, 266, 295-303
 - (16) Kujawa, P.; Segui, F.; Shaban, S.; Diab, C.; Okada, Y.; Tanaka, F.; Winnik, F. *M. Macromolecules* **2006**, 39, 341-348.
 - (17) Taylor, L. D.; Cerankowsky, L. D. *Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **1975**, 13, 2551.

-
- (18) Ding, Y. ; Ye, X. ; Zhang, G. *Macromolecules* **2005**, 38, 904-908
- (19) Shan, J.; Chen, J.; Nuopponen, M.; Tenhu H. *Langmuir* **2004**, 20, 4671-4676.
- (20) Winnik, F. M.; Ringsdorf, H.; Venzmer, J. *Macromolecules* **1990**, 23, 2415-2416
- (21) Csaba, N.; Sanchez, A.; Alonso, M. J. *J. Controlled Release* **2006**, 113, 164-172
- (22) Ungaro, F.; Biondi, M.; D'Angelo, I.; Indolfi, L.; Quaglia, F.; Netti, P. A.; La Rotonda M. I. *J. Controlled Release* **2006**, 113, 128-136.
- (23) Debelder, A. N. ; Dranath, K. *Carbohydr. Res.* **1973**, 30, 375.

Conclusion

Une méthode efficace a été mise au point pour la préparation de PNIPAM téléchéliques dont les bouts de chaînes sont terminés par un groupement cholestérol. L'agent de transfert de chaîne utilisé pour cette polymérisation radicalaire est difonctionnel (DEGDIM) et a permis d'obtenir des PNIPAMs de masses molaires précise et avec une faible polydispersité. Après deux modifications de ce polymère, les CH-PNIPAMs ont été obtenus avec succès.

L'étude des solutions aqueuses de CH-PNIPAMs par microcalorimétrie a montré la présence de deux transitions qui n'étaient pas présentes pour des chaînes de PNIPAM téléchéliques terminées par des C_{18} . La présence de ces deux transitions est peut être due à des interactions très fortes entre les groupes cholestérols. Ceci pourra peut être être éclairci par une nouvelles méthode de préparation d'échantillon actuellement en cours : la sonification après dissolution du polymère. Cette technique permettra peut être de rompre ces interactions, et notre hypothèse sera confirmée si la deuxième transition disparaît.

En ce qui concerne les caractérisations des solutions aqueuses de CH-PNIPAMs par diffusion de la lumière, de nombreux résultats ne peuvent encore être expliqués en ce qui concerne la préparation des échantillons par dialyse, et certaines suppositions doivent être confirmées ou infirmées par des expériences supplémentaires pour essayer de connaître la nature des autos-assemblages de grande taille, s'il s'agit par exemple d'interconnexion de certaines micelles fleurs entre elles ou pas. La nouvelle méthode de préparation des solutions par sonification pourra peut être nous permettre d'expliquer ces phénomènes.

De nouvelles caractérisations à l'état solide, comme les rayons X (WAXD), sont aussi en cours pour étudier le degré de cristallinité de ces polymères.

Ces travaux de recherche ont donc permis de mettre en évidence le comportement complexe et inattendu de ce polymère thermosensible modifié par des groupements cholestérols. Une plus grande compréhension de ces résultats sera sûrement possible avec les informations obtenues par les études en cours.

La synthèse d'un nouvel agent RAFT portant un groupe cholestérol a été mise au point et la synthèse de PNIPAM semi-téléchéliques grâce à cet agent pourra être effectuée. La comparaison du comportement des solutions aqueuses de ces PNIPAM téléchéliques et semi-téléchéliques pourra être intéressante pour la suite.

ANNEXE 1 :

Analyse quantitative des fonctions thiols par le test d'Ellman

1. Principe de la méthode.

Pour voir si la conversion des groupes trithiocarbonates en thiols, ou encore celle des thiols en groupement cholestérol a bien été réalisée, le pourcentage de fonction thiols peut être déterminé par le test d'Ellman¹. C'est un test colorimétrique. La figure 1 représente la structure du réactif d'Ellman.

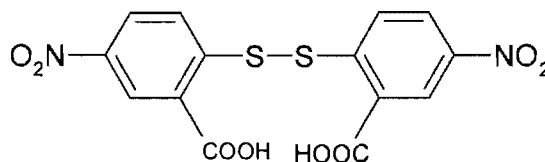


Figure 1 : acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque), ou DTNB ou réactif d'Ellman

Le DTNB est un chromogène (composé incolore qui après réaction chimique se transforme en composé ayant des propriétés chromatiques). Les fonctions thiols du polymère réduisent le DTNB en TNB (acide 5-thio 2-nitrobenzoïque), composé jaune ayant une absorbance maximale à 412-415nm. L'augmentation de la coloration indique une plus grande quantité de thiol présent sur la chaîne de polymère.

2. Mode opératoire.

Le réactif d'Ellman (figure 1) est préparé en dissolvant l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) dans une solution tampon phosphate (à pH=8) à une concentration de 0,4mg/mL (1 mmol/mL). Le polymère possédant des groupements thiols (2 à 10mg pour avoir environ 0.67 mmol) est ensuite dissout dans 3mL d'eau déionisée. Le pH de la solution est alors ajusté à 8 en ajoutant la solution aqueuse de tampon phosphate pH=8 (6mL). L'eau déionisée et la solution tampon sont toutes deux désoxygénées par bullage d'azote pendant 30 minutes avant leurs utilisations. Le réactif d'Ellman est ajouté (1 mL) à la solution de polymère. Le milieu est agité et laissé dans le noir pendant 15 minutes. L'absorbance de la solution est mesurée à une longueur d'onde de 412 nm.

Une solution préparée à partir d'1mL de réactif d'Ellman, 3mL d'eau déionisée et 6mL de tampon phosphate (pH=8) est utilisée comme blanc.

L'absorbance de la solution de polymère est mesurée. En se basant sur le nombre théorique de fonction thiol qu'il devrait y avoir sur la chaîne de polymère, le nombre de fonctions thiol effectivement présents peut être calculé d'après les mesures d'absorbances.

(i) Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, 74, 443-450.