



HAL
open science

Élaboration de copolymères amphiphiles à base de poly (3-hydroxyalcanoate)s

Julien Babinot

► **To cite this version:**

Julien Babinot. Élaboration de copolymères amphiphiles à base de poly (3-hydroxyalcanoate)s. Autre. Université Paris-Est, 2012. Français. NNT : 2012PEST1111 . tel-00804248

HAL Id: tel-00804248

<https://theses.hal.science/tel-00804248>

Submitted on 25 Mar 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

présentée pour obtenir le titre de DOCTEUR de l'Université Paris-Est en
Chimie et Sciences des Matériaux

ELABORATION DE COPOLYMÈRES AMPHIPHILES À BASE DE POLY(3-HYDROXYALCANOATE)S

Julien Babinot

Soutenue publiquement le 12/12/2012 devant un jury composé de :

| | | |
|-------------------------------|--|------------------------------|
| <i>Rapporteurs</i> | Fabrice Burel, Professeur | INSA de Rouen |
| | Sophie Guillaume, Directeur de Recherche | Université de Rennes 1 |
| <i>Examineur</i> | Pierre Lutz, Directeur de Recherche | ICS Strasbourg |
| <i>Co-directeurs de thèse</i> | Valérie Langlois, Professeur | Université Paris-Est Créteil |
| | Estelle Renard, Professeur | Université Paris-Est Créteil |



Thèse réalisée au Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est
Equipe Systèmes Polymères Complexes
2-8 rue Henri Dunant
94320 Thiais

Tél : +33 (0)1 49 78 11 81

Fax : +33 (0)1 49 78 11 66

Web : <http://www.icmpe.cnrs.fr/>

Sous la direction de Professeur Valérie Langlois langlois@icmpe.cnrs.fr

Co-direction Professeur Estelle Renard renard@icmpe.cnrs.fr

Avant Propos

Excepté le chapitre bibliographique, cette thèse a été rédigée sous la forme d'un recueil de cinq publications parues ou acceptées dans des revues à comité de lecture. L'indulgence du lecteur est donc sollicitée pour les répétitions et redites inhérentes à cette forme de rédaction choisie.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Systèmes Polymères Complexes de l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est à Thiais. Je tiens à remercier tout d'abord l'ensemble des membres du laboratoire pour leur gentillesse et leur disponibilité tout au long de ma thèse. Cet environnement de travail particulièrement agréable a contribué au bon déroulement de ces années riches en émotions.

Je désire exprimer ma sincère reconnaissance à Madame Sophie Guillaume, directeur de recherche à l'Université de Rennes 1 et à Monsieur Fabrice Burel, professeur à l'INSA de Rouen pour avoir accepté de juger ce travail et pour la discussion qui a suivi la soutenance. Je remercie également Monsieur Pierre Lutz, directeur de recherche à l'institut Charles Sadron pour avoir accepté d'examiner ce travail et présidé le jury.

Mes profonds remerciements vont à ma directrice de thèse, Valérie Langlois, ainsi qu'à ma co-directrice de thèse, Estelle Renard, pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse au sein de leur groupe. Je leur suis très reconnaissant pour la confiance et la liberté qu'elles m'ont accordées pour effectuer ce travail.

Je souhaite remercier le Laboratoire de Physico-Chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie (Université Paris Sud, Châtenay-Malabry) et particulièrement Simona Mura, Julien Nicolas et Patrick Couvreur pour avoir effectué les tests de viabilité cellulaire et pour nos discussions enrichissantes.

Je tiens à remercier Brice Kerber, délégué régional de la délégation CNRS Ile-de-France Est pour avoir financé mon inscription.

Un grand merci à Sylvie Boileau pour ses conseils toujours avisés et pour avoir relu et corrigé mon manuscrit. Merci également à Amani El Fagui, Benjamin le Droumaguet, Davy-Louis Versace, Nelly Lacoudre et Véronique Wintgens pour leur aide précieuse.

Merci aux anciens thésards Nicolas Illy et Xavier Samain, qui m'ont donné envie de

me lancer dans cette aventure. Votre passion a été communicative !

Merci également à Julien Ramier, Pierre Lemechko, David Le Strat, Davy-Louis Versace, Benjamin Carbonnier, Mohamed Guerrouache, Sandrine Lépinay, Amani El Fagui, Thanh-Xuan Lav et Wendy Garcia pour tous nos bons moments au labo ou ailleurs.

Merci à tous les stagiaires que j'ai pu cotoyer au SPC et qui ont toujours contribué à l'excellente ambiance y régnant : Nicolas, Romain, Marie, Estelle, Kévin, Romain et tous les autres. Un merci tout particulier à Sabrina pour sa gentillesse et son aide sur l'oxydation du PHOU.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à M. Jacques Nicolas, qui fût mon professeur de physique-chimie au collège d'Aigues-Mortes. Votre pédagogie, votre enthousiasme et votre passion pour la science m'ont profondément influencé. Ma gratitude va également à M. Claude Chavis, professeur de chimie organique de synthèse (aaaahhh la COS...) à l'Université Montpellier II. Votre enseignement passionné et passionnant a été déterminant dans ma scolarité.

Cette thèse a été rédigée sous $\text{L}\text{\AA}\text{X}$, un logiciel libre permettant la création de document $\text{L}\text{\AA}\text{T}\text{E}\text{X}$. Je remercie Matthieu Perreira Da Silva, maître de conférences à Polytech Nantes pour avoir mis à disposition son template de thèse.

Je souhaite exprimer mes profonds remerciements à tous mes amis, qui m'ont toujours soutenu dans les épreuves et qui ont été une bulle d'oxygène.

Je remercie mes parents et mon frère pour leur soutien sans faille. Rien de tel qu'une visite dans le sud pour se ressourcer !

Enfin, merci à Inga d'avoir toujours été là pour m'encourager.

Table des matières

| | |
|---|-------------|
| Avant Propos | i |
| Remerciements | iii |
| Table des matières | v |
| Table des figures | xi |
| Liste des tableaux | xvii |
| Introduction générale | 1 |
| 1 Revue bibliographique sur les poly(3-hydroxyalcanoate)s bactériens | 5 |
| 1.1 Introduction | 5 |
| 1.2 Production bactérienne des PHAs | 6 |
| 1.2.1 Présentation des PHAs | 6 |
| 1.2.2 Conditions de culture | 7 |
| 1.2.3 Nature des inclusions | 7 |
| 1.2.4 Procédés d'extraction des PHAs | 9 |
| 1.2.5 Biosynthèse des PHAs | 11 |
| 1.2.5.1 Les PHA-scl | 12 |
| 1.2.5.2 Les PHA-mcl | 13 |
| 1.3 Propriétés des PHAs | 15 |
| 1.3.1 Biodégradabilité | 15 |
| 1.3.1.1 Dégradation intracellulaire | 16 |
| 1.3.1.2 Dégradation extracellulaire | 16 |

TABLE DES MATIÈRES

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1.3.2 | Biocompatibilité | 18 |
| 1.3.3 | Propriétés physico-chimiques | 22 |
| 1.3.3.1 | Les PHA-scl | 22 |
| 1.3.3.2 | Les PHA-mcl | 23 |
| 1.4 | Fonctionnalisation des PHAs | 24 |
| 1.4.1 | Biosynthèse de PHAs fonctionnalisés | 24 |
| 1.4.2 | Modifications chimiques des PHAs | 25 |
| 1.4.2.1 | Modification chimique du squelette de PHA | 25 |
| 1.4.2.2 | Oligomérisation | 29 |
| 1.5 | Synthèse de copolymères à base de PHAs | 33 |
| 1.5.1 | PHA-scl | 33 |
| 1.5.1.1 | Copolymères à blocs | 33 |
| 1.5.1.2 | Copolymères greffés | 36 |
| 1.5.2 | PHA-mcl | 38 |
| 1.5.2.1 | Copolymères à blocs | 38 |
| 1.5.2.2 | Copolymères greffés | 41 |
| 1.6 | Applications des PHAs dans le domaine biomédical | 45 |
| 1.6.1 | Ingénierie tissulaire | 45 |
| 1.6.1.1 | Ingénierie tissulaire cardiovasculaire | 46 |
| 1.6.1.2 | Guides pour la croissance de nerfs | 48 |
| 1.6.1.3 | Reconstruction osseuse | 48 |
| 1.6.1.4 | Reconstruction cartilagineuse | 49 |
| 1.6.2 | Libération contrôlée de principes actifs | 50 |
| 1.6.2.1 | Les implants | 51 |
| 1.6.2.2 | Les micro/nanoparticules | 54 |
| 1.7 | Conclusion | 57 |
| | Références | 59 |
| 2 | Préparation d'un PHA « clickable » et synthèse de copolymères amphiphiles greffés | 85 |
| | Présentation de l'article | 87 |
| 2.1 | Abstract | 91 |

| | | |
|-------------------|---|------------|
| 2.2 | Introduction | 91 |
| 2.3 | Experimental Part | 92 |
| 2.3.1 | Materials | 92 |
| 2.3.2 | Synthesis of PHOU oligomers (1) | 92 |
| 2.3.3 | Oxidation of PHOU oligomers (2) | 93 |
| 2.3.4 | Synthesis of PHOD-alkyne (3) | 93 |
| 2.3.5 | Synthesis of PEG azide | 93 |
| 2.3.5.1 | Tosylation of PEG ₅₅₀ | 93 |
| 2.3.5.2 | Azidation procedure for PEG ₅₅₀ -OTs and PEG ₅₀₀₀ -OMs | 93 |
| 2.3.6 | Synthesis of PHA-g-PEG (4) | 94 |
| 2.3.7 | Polymer Characterization | 94 |
| 2.4 | Results and Discussion | 94 |
| 2.5 | Conclusion | 100 |
| References | | 101 |
| | | |
| 3 | Synthèse de copolymères amphiphiles diblocs PHA-<i>b</i>-PEG par chimie « click » | 105 |
| | Présentation de l'article | 107 |
| 3.1 | Abstract | 111 |
| 3.2 | Introduction | 111 |
| 3.3 | Experimental Part | 112 |
| 3.3.1 | Materials | 112 |
| 3.3.2 | Synthesis of Poly(ethylene glycol) (PEG) azide | 113 |
| 3.3.2.1 | Mesylation of MeO-PEG ₅₀₀₀ | 113 |
| 3.3.2.2 | Azidation of MeO-PEG ₅₀₀₀ -OMs | 113 |
| 3.3.3 | Preparation of PHAs oligomers | 113 |
| 3.3.4 | Functionalization of PHAs oligomers | 114 |
| 3.3.5 | Synthesis of Poly(3-hydroxyalkanoate)- <i>b</i> -poly(ethylene glycol) (PHA- <i>b</i> -PEG) | 115 |
| 3.3.6 | Polymer Characterization | 115 |
| 3.4 | Results and Discussion | 116 |
| 3.4.1 | Synthesis of PHAs oligomers | 116 |
| 3.4.2 | Functionalization of PHA oligomers | 117 |

TABLE DES MATIÈRES

| | | |
|--|---|------------|
| 3.4.3 | Synthesis and characterization of diblock copolymers | 119 |
| 3.5 | Conclusion | 124 |
| References | | 125 |
| 4 Etude de la micellisation de copolymères amphiphiles diblocs à base de PHA-mcl | | |
| | | 129 |
| | Présentation de l'article | 131 |
| 4.1 | Abstract | 135 |
| 4.2 | Introduction | 135 |
| 4.3 | Experimental section | 136 |
| 4.3.1 | Materials | 136 |
| 4.3.2 | Synthesis | 137 |
| 4.3.2.1 | Functionnalization of PHOHHx oligomers | 137 |
| 4.3.2.2 | Mesylation of MeO-PEG ₅₀₀₀ | 137 |
| 4.3.2.3 | Azidation of MeO-PEG ₅₀₀₀ -OMs | 137 |
| 4.3.2.4 | Synthesis of PHOHHx- <i>b</i> -PEG | 138 |
| 4.3.3 | Sample Preparation | 138 |
| 4.3.3.1 | Dynamic Light Scattering (DLS) | 138 |
| 4.3.3.2 | Critical Micelle Concentration (CMC) | 138 |
| 4.3.3.3 | Cryo-Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM) | 139 |
| 4.3.4 | Instrumentation | 139 |
| 4.4 | Results and Discussion | 140 |
| 4.4.1 | Copolymer Synthesis and Characterization | 140 |
| 4.4.2 | Characterization and properties of PHOHHx- <i>b</i> -PEG micelles | 142 |
| 4.5 | Conclusion | 148 |
| References | | 149 |
| 5 Synthèse de copolymères amphiphiles greffés par addition thiol-ène et élaboration de polymersomes | | |
| | | 153 |
| | Présentation de l'article | 155 |
| 5.1 | Abstract | 159 |
| 5.2 | Communication | 159 |

| | | |
|-------------------|--|------------|
| 5.3 | Electronic Supplementary Information | 164 |
| 5.3.1 | Experimental Part | 164 |
| 5.3.1.1 | Materials | 164 |
| 5.3.1.2 | Synthesis of PEG-SH | 165 |
| 5.3.1.3 | Synthesis of PHOU oligomers[31] | 166 |
| 5.3.1.4 | Typical synthesis of PHOU- <i>g</i> -PEG | 167 |
| 5.3.1.5 | Sample Preparation | 167 |
| 5.3.1.6 | Instrumentation | 168 |
| References | | 173 |
| 6 | Copolymères amphiphiles fluorés PHA-<i>g</i>-(F ;PEG) pour l'élaboration de micelles multicompartimentées | 177 |
| | Présentation de l'article | 179 |
| 6.1 | Abstract | 183 |
| 6.2 | Introduction | 183 |
| 6.3 | Experimental Section | 184 |
| 6.3.1 | Materials | 184 |
| 6.3.2 | Synthesis of PHOU oligomers | 185 |
| 6.3.3 | Typical synthesis of PHOU- <i>g</i> -F | 185 |
| 6.3.4 | Typical synthesis of PHOU- <i>g</i> -(F ; PEG) | 186 |
| 6.3.5 | Sample Preparation | 187 |
| 6.3.5.1 | Dynamic Light Scattering (DLS) | 187 |
| 6.3.5.2 | Critical Micelle Concentration (CMC) | 187 |
| 6.3.5.3 | Cryo-Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM) | 187 |
| 6.3.6 | Cell culture | 187 |
| 6.3.7 | Cell viability assay | 188 |
| 6.3.8 | Instrumentation | 188 |
| 6.4 | Results and Discussion | 189 |
| 6.4.1 | Conclusion | 194 |
| 6.5 | Electronic supplementary information | 194 |
| 6.5.1 | Synthesis of PEG-SH | 194 |
| 6.5.1.1 | Tosylation of PEG ₅₅₀ | 194 |

TABLE DES MATIÈRES

| | | |
|----------------------------|--|------------|
| 6.5.1.2 | Synthesis of PEG ₅₅₀ -thioacetate | 195 |
| 6.5.1.3 | Synthesis of PEG ₅₅₀ -SH | 195 |
| References | | 199 |
| Conclusion générale | | 205 |

Table des figures

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Formule générale des poly(3-hydroxyalcanoates). | 7 |
| 1.2 | Inclusions de PHB chez <i>Azobacter chroococcum</i> en microscopie électronique à transmission. | 8 |
| 1.3 | Représentation schématique d'un granule de PHA.[11] | 8 |
| 1.4 | Procédé de purification et d'isolation de PHA-mcl à partir de bactéries lyophilisées.[17] | 10 |
| 1.5 | Organisation des gènes codant pour les enzymes des deux classes principales. phaC/C1/C2 : gènes codant la PHA synthase. phaA : gène codant la β-cétothiolase. phaB : gène codant l'acétoacétyl-CoA réductase. phaZ : gène codant la PHA dépolymérase.[31] | 11 |
| 1.6 | Biosynthèse du PHB chez <i>Ralstonia eutropha</i> : (1) β-cétothiolase, (2) acétoacétyl-CoA réductase, (3) PHB polymérase. | 12 |
| 1.7 | Détails des voies métaboliques de biosynthèse des PHA-mcl (CoA = Co-enzymeA, ACP = Acyl Carrier Protein) ; (1) Hydratases, (2) Epimérasés, (3) Réductases, (4) Transacylases (adapté de la référence [35]). | 14 |
| 1.8 | Dégradation intracellulaire du PHB.[51] | 17 |
| 1.9 | Images par microscopie électronique à balayage de films de PHB. (a) Film de PHB, (b) Film de PHB en présence de <i>Streptomyces</i> MG à 50°C, (c) Film de PHB lavé après 72h d'incubation. Barre d'échelle = 10 μm.[53] | 19 |
| 1.10 | Dynamique de la synthèse de protéines matricielles par des fibroblastes NIH 3T3 cultivés sur : (1) verre (contrôle), (2) PHB, (3) PHBHV 15 mol% HV, (4) PHBHV 28 mol% HV.[71] | 20 |

TABLE DES FIGURES

| | | |
|------|---|----|
| 1.11 | Réponse tissulaire à l'alkaline phosphatase par la méthode de Gomori après implant de PHB : (a) une semaine après l'implant et (b) quatre semaines après l'implant. L'image montre une diminution de l'inflammation et de l'épaisseur du tissu fibreux (barre d'échelle : 0,01 mm).[77] | 21 |
| 1.12 | Structures obtenues après chloration du PHB.[103] | 27 |
| 1.13 | Modifications chimiques du PHOU par oxydation de la chaîne latérale insaturée. (A)(B) hydroxylation ;[104, 105] (C) formation de diols ; [106] (D) époxydation ; [97, 107] (E)(F)(G) formation d'acides carboxyliques. [108–110] | 28 |
| 1.14 | Synthèse du poly(3-hydroxyoctanoate- <i>co</i> -3-hydroxy-11-(bis(2-hydroxyéthyl)-amino)-10-hydroxyundécanoate)) (PHON), protonable à pH physiologique .[99] | 30 |
| 1.15 | Structure des oligomères de PHAs obtenus après traitement thermique, transestérification par des diols, hydrolyse, méthanolyse et transestérification par l'alcool propargylique. | 31 |
| 1.16 | Mécanisme de β -élimination ou transposition de Mc Lafferty des PHA-scl. | 31 |
| 1.17 | Synthèse de copolymères triblocs PNIPAAm- <i>b</i> -PHB- <i>b</i> -PNIPAAm par A-TRP.[133] | 34 |
| 1.18 | Réaction de transestérification entre du PHB et du PEG à 190°C.[135] Cette réaction est en compétition avec la dégradation thermique du PHA. | 35 |
| 1.19 | Synthèse de copolymères multiblocs à base de PHB et de PCL.[122] | 36 |
| 1.20 | Synthèse de copolymères alternés à base de P3HB4HB et de PEG.[149] | 37 |
| 1.21 | Micromatrigage de films de PHBHV (A) image AFM (A') profil du film et (B) image par microscopie optique après 400 s d'irradiation.[155] | 39 |
| 1.22 | Condensation de greffons de PHAs sur des films de cellulose. | 40 |
| 1.23 | Préparation de copolymères multiblocs et alternés à base de PHB-diol, PHO-diol et d'adipate de divinyle par condensation enzymatique (<i>Candida antarctica</i> lipase B, CALB). | 41 |
| 1.24 | Synthèse de copolymères greffés PHO- <i>g</i> -PMMA, PHO- <i>g</i> -PS, PHO- <i>g</i> -PBMA et PHO- <i>g</i> -(PMMA- <i>b</i> -PS). | 42 |
| 1.25 | Synthèse de copolymères greffés « en peigne » à base de PHOU. | 43 |
| 1.26 | Greffage d'oligomères de PEG et de PLA sur du PHO-COOH et taux de conversion en fonction de la masse molaire de l'oligomère greffé. | 44 |

| | | |
|------|--|-----|
| 1.27 | Différentes applications des PHAs dans l'ingénierie tissulaire : (A) oesophage artificiel, (B) greffon vasculaire, (C) conduit pour la croissance de nerfs, (D) cartilage artificiel. | 47 |
| 1.28 | Evolution de la concentration en principe actif (PA) au niveau du site d'action en fonction du temps. Pointillés : profil de délivrance lors de l'administration répétée de PA. Trait plein : système de délivrance idéal. | 51 |
| 1.29 | Radiographie d'un tibia de lapin infecté par <i>Staphylococcus aureus</i> après implantation d'un batonnet de PHBVH contenant un antibiotique. (A) 1 ^{er} jour d'implant, les signes de l'infection sont marqués par les flèches blanches. (B) 30 ^{ème} jour après implant, les tissus sont redevenus normaux. | 53 |
| 1.30 | Images en microscopie électronique à balayage. (A)et (B) : microsphères de PHBHV/HA-AL (30%HA) ; (C) et (D) microsphères de PHBHV/HA-AL (50%HA) ; microsphères de PHBHV pur. (A, C et E : x200 ; B, d et F : x1000). HA : hydroxyapatite ; AL : alendronate.[231] | 55 |
| 1.31 | Images obtenues en microscopie électronique à transmission de nanoparticules de PHOHH _x , PHOD-10%COOH et PHOD-25%COOH obtenues par nanoprécipitation.[109] | 57 |
| 2.1 | Synthesis route of PHA- <i>g</i> -PEG | 95 |
| 2.2 | ¹ H NMR spectrum of PHOU ₅₀₀₀ oligomers | 96 |
| 2.3 | (a) ¹ H NMR and (b) COSY spectrum of PHOD-alkyne | 98 |
| 2.4 | ¹ H NMR spectra of PHA ₅₀₀₀ - <i>g</i> -PEG ₅₅₀ | 99 |
| 3.1 | Preparation of PHAs oligomers by thermal degradation. | 116 |
| 3.2 | Synthesis route to PHAs- <i>b</i> -PEG. | 117 |
| 3.3 | ¹ H NMR spectrum of PHBHV ₁ -≡. | 118 |
| 3.4 | ¹ H NMR spectrum of PHOHH _{x1} - <i>b</i> -PEG. | 120 |
| 3.5 | COSY spectrum of PHOHH _{x1} - <i>b</i> -PEG. | 121 |
| 3.6 | Size exclusion chromatography (SEC) traces of (a) PHBHH _x oligomer and (b) PHBHH _x - <i>b</i> -PEG. | 122 |
| 3.7 | TGA curves for (a) MeO-PEG ₅₀₀₀ , (b) PHOHH _{x1} - <i>b</i> -PEG and (c) PHOHH _{x1} oligomer. | 122 |
| 4.1 | Synthesis of PHOHH _x - <i>b</i> -PEG diblock copolymers. | 140 |

TABLE DES FIGURES

| | | |
|-----|--|-----|
| 4.2 | Determination of PHOHHx content in copolymers using TGA : (a) PHOHHx ₁₅₀₀ - <i>b</i> -PEG, (b) PHOHHx ₃₈₀₀ - <i>b</i> -PEG, (c) PHOHHx ₆₈₀₀ - <i>b</i> -PEG and (d) PHOHHx ₇₇₀₀ - <i>b</i> -PEG. | 142 |
| 4.3 | (a) Fluorescence emission spectra of the pyrene probe for PHOHHx ₆₈₀₀ - <i>b</i> -PEG copolymer at various concentrations ([pyrene]= 7x10 ⁻⁷ M) and (b) Plots of the intensity ratio I ₁ /I ₃ as a function of different concentrations of PHOHHx- <i>b</i> -PEG copolymers. | 143 |
| 4.4 | Influence of PHOHHx block length on (a) CMC of the copolymer and (b) micelles size and polydispersity. | 144 |
| 4.5 | Particle size distribution of PHOHHx ₆₈₀₀ - <i>b</i> -PEG. | 146 |
| 4.6 | Micelles of PHOHHx ₆₈₀₀ - <i>b</i> -PEG observed by cryo-TEM at 1 g.L ⁻¹ | 146 |
| 4.7 | Colloidal stability of PHOHHx ₆₈₀₀ - <i>b</i> -PEG micelles against NaCl concentration. | 147 |
| 5.1 | Synthesis of PHOU- <i>g</i> -PEG. | 160 |
| 5.2 | Vesicles of PHOU _{14%} - <i>g</i> -PEG prepared by nanoprecipitation observed by cryo-TEM at 1 g/L. Center : schematic representation of a vesicle with focus on the bilayer wall (PHOU in grey, PEG in black). The mean wall thickness is 8-9 nm. | 162 |
| 5.3 | a) Vesicle size distribution of nanoprecipitated polymersomes determined by DLS and b) Determination of the CAC of PHOU _{14%} - <i>g</i> -PEG vesicles by plotting the intensity ratio I ₁ /I ₃ of pyrene probe at different concentrations. | 163 |
| 5.4 | ¹ H NMR of a) PHOU _{14%} oligomers and b) PHOU _{14%} - <i>g</i> -PEG. | 169 |
| 5.5 | SEC chromatograms of a) PHOU _{14%} oligomer and b) PHOU _{14%} - <i>g</i> -PEG. | 170 |
| 5.6 | Cryo-TEM picture of PHOU _{31%} - <i>g</i> -PEG in water at 1 g.L ⁻¹ | 170 |
| 5.7 | Cryo-TEM picture of PHOU _{14%} - <i>g</i> -PEG prepared by dialysis. The darker area corresponds to the carbon membrane of the grid. | 171 |
| 5.8 | Fluorescence emission spectra of the pyrene probe for PHOU _{14%} - <i>g</i> -PEG copolymer at various concentrations ([pyrene] = 7 x 10 ⁻⁷ M). | 171 |
| 6.1 | ¹ H NMR spectra of PHOU _{0.69} - <i>g</i> -(F _{0.20} ; PEG _{0.11}) copolymer. | 186 |
| 6.2 | Synthesis of PHOU- <i>g</i> -(F;PEG) copolymers. | 190 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 6.3 | Cryo-TEM picture along with DLS particle size distribution for PHOU _{0.69} - <i>g</i> -(F _{0.24} ; PEG _{0.07}) (A,B) and for PHOU _{0.69} - <i>g</i> -(F _{0.20} ; PEG _{0.11}) (C,D). . . | 191 |
| 6.4 | Cell viability (MTT assay) after incubation of NIH/3T3 and J774.A1 cells with PHOU _{0.69} - <i>g</i> -(F _{0.24} ; PEG _{0.07}) (a) and for PHOU _{0.69} - <i>g</i> -(F _{0.20} ; PEG _{0.11}) (b) as a function of the MCMs concentration. | 193 |
| 6.5 | Evolution of the molar mass of PHOU oligomer (a) after the grafting of 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol (b) and thiolated poly(ethylene glycol) (c) for PHOU _{0.69} - <i>g</i> -(F _{0.20} ; PEG _{0.11}) copolymer. | 196 |
| 6.6 | Cryo-TEM picture of PHOU _{0.69} - <i>g</i> -(F _{0.20} ; PEG _{0.11}). | 196 |
| 6.7 | Cryo-TEM picture of PHOU _{0.69} - <i>g</i> -(F _{0.24} ; PEG _{0.07}). | 197 |
| 6.8 | Determination of the CMC of PHOU _{0.69} - <i>g</i> -(F _{0.20} ; 0.11) (a) and PHOU _{0.69} - <i>g</i> -(F _{0.24} ; 0.07) (b) by plotting the intensity ratio I ₁ /I ₃ of pyrene probe at different concentrations. | 198 |

Liste des tableaux

| | | |
|-----|---|-----|
| 1.1 | Propriétés thermiques des PHA-scl.[19, 51] | 22 |
| 1.2 | Propriétés mécaniques des PHA-scl.[83] | 23 |
| 1.3 | Propriétés mécaniques des PHA-mcl. | 24 |
| 1.4 | Obtention de PHAs fonctionnalisés par <i>Pseudomonas oleovorans</i> | 26 |
| 2.1 | Characteristics of modified PHAs | 95 |
| 3.1 | Molecular characteristics of PHA oligomers. | 114 |
| 3.2 | Alkyne functionalization of PHA oligomers. | 114 |
| 3.3 | Molecular characteristics of PHA- <i>b</i> -PEG copolymers. | 115 |
| 3.4 | Thermal characteristics of oligomers and diblock copolymers. | 123 |
| 4.1 | Molecular characteristics of PHOHHx- <i>b</i> -PEG copolymers with fixed PEG block (5000 g.mol ⁻¹) and varying PHOHHx segment. | 141 |
| 4.2 | Characteristics of PHOHHx- <i>b</i> -PEG micelles. | 145 |
| 5.1 | Molecular characteristics of modified PHOUs. | 161 |
| 6.1 | Molecular characteristics of modified poly(3-hydroxyoctanoate- <i>co</i> -hydroxy- undecenoates)s (PHOUs). | 190 |
| 6.2 | Effect of 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol molar ratio on PHOU functiona- lization. | 195 |

Introduction générale

LES POLYMÈRES se sont progressivement imposés dans la plupart des domaines de l'activité humaine tels que le bâtiment, le transport, les équipements électriques et électroniques, l'emballage, l'ameublement, etc... Plus récemment et grâce à l'essor des nanotechnologies, les polymères trouvent aussi des applications dans le domaine biomédical, notamment en ce qui concerne le développement de systèmes de délivrance de principes actifs. En effet, certaines maladies telles que le cancer nécessitent des traitements lourds, avec des effets secondaires néfastes pour le reste de l'organisme. Par ailleurs, la solubilité limitée de principes actifs hydrophobes en milieu aqueux peuvent limiter leur utilisation. Face à ces problématiques, le développement de systèmes de vectorisation, permettant l'encapsulation d'un principe actif et son acheminement vers les tissus malades constitue une voie extrêmement prometteuse. Outre sa capacité d'encapsulation du principe actif, un vecteur se doit de circuler le plus longtemps possible dans l'organisme afin d'atteindre les tissus malades. Cette capacité est définie par le terme de furtivité, permettant ainsi au vecteur d'échapper au système immunitaire et à son élimination par l'organisme. Ainsi, les vecteurs particuliers à base de polymères reposent sur la formation de nano-objets (micelles, vésicules...) issus de l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles dont la partie hydrophobe sert à l'encapsulation du principe actif; la partie hydrophile assure quant à elle d'une part la stabilisation des nano-objets en milieu aqueux et d'autre part la furtivité du vecteur.

Les poly(3-hydroxyalcanoate)s, ou PHAs, sont des polyesters aliphatiques produits par des bactéries après fermentation de matières premières naturelles et accumulés sous forme d'inclusions intracytoplasmiques. En fonction de la souche bactérienne et de la nature du substrat utilisé lors de la fermentation, des polyesters de différentes compositions peuvent être obtenus. Cette différence de composition réside dans la longueur de

leurs chaînes latérales ; les PHAs sont généralement classés en deux sous-groupes : les PHA-scl (short chain length), à courtes chaînes latérales, et les PHA-mcl (medium chain length), à moyennes chaînes latérales. La composition des PHAs est directement reliée à leurs propriétés physico-chimiques, les PHA-scl étant cristallins, rigides et cassants alors que les PHA-mcl, peu cristallins, présentent un caractère élastomère. Dans tous les cas, le processus de synthèse par voie enzymatique génère des carbones asymétriques de configuration (R) et explique l'isotacticité de ces polymères.

Outre leur origine biologique, la biodégradabilité et la biocompatibilité de ces polymères les rendent particulièrement attrayants. Au-delà des possibilités d'applications industrielles en tant que matériaux biodégradables, les PHAs sont des polymères spécialement prometteurs pour des applications dans le domaine biomédical. Différentes études ont montré qu'ils pouvaient être utilisés dans la fabrication d'implants, de vaisseaux sanguins artificiels ou de fils de suture. Par ailleurs, il a également été montré que le poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) permettait l'encapsulation de principes actifs ; cependant, leur vitesse de libération s'est avérée trop rapide (effet « burst ») en raison de la grande cristallinité du PHB.

Dans ce contexte, l'utilisation de PHA-mcl apparaît plus adaptée à cette application ; en effet, ils sont beaucoup moins cristallins que les PHA-scl et leur grande hydrophobie devrait faciliter l'encapsulation d'une quantité importante de principe actif. L'objectif de cette thèse est donc d'une part la synthèse de copolymères amphiphiles à base de PHAs, et d'autre part l'étude de leur auto-association en milieu aqueux pour la mise au point de nouveaux agents de vectorisation. Des oligomères de poly(éthylène glycol), reconnus pour leur effet furtif vis-à-vis du système immunitaire, seront utilisés comme partenaires hydrophiles. Enfin, la diversité chimique des PHA-mcl permettra la synthèse et l'étude physico-chimique de copolymères amphiphiles de type diblocs ainsi que greffés. L'étude de leurs propriétés d'auto-assemblage permettra d'établir des relations de structure-propriétés entre l'architecture moléculaire et la morphologie des agrégats obtenus.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à une revue bibliographique présentant un état de l'art concernant la biosynthèse des PHAs, leurs propriétés physico-chimiques et les modifications chimiques permettant d'adapter leurs propriétés à diverses utilisations. Puis la synthèse de copolymères à base de PHAs ainsi que quelques exemples d'applications dans le domaine biomédical sont présentés.

Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes attachés à mettre au point une méthode

permettant la synthèse de copolymères amphiphiles greffés à base de PHA-mcl et d'oligomères de poly(éthylène glycol) (PEG) grâce à la cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre (I) (CuAAC) (chimie « click »).

La mise au point de cette méthode nous permettra, dans le troisième chapitre, de synthétiser une série de copolymères amphiphiles d'architecture dibloc avec un partenaire hydrophile de masse molaire fixe et un partenaire hydrophobe de masse molaire variable à base de PHA-scl et de PHA-mcl.

Dans le quatrième chapitre, une étude physico-chimique de l'auto-assemblage en milieu aqueux d'une série de copolymères amphiphiles diblocs à base de PHA-mcl est présentée.

Dans le cinquième chapitre nous nous sommes tout d'abord attachés à optimiser la synthèse de copolymères amphiphiles greffés grâce à l'utilisation d'une autre réaction de chimie « click », l'addition thiol-ène. Afin d'établir un lien entre l'architecture moléculaire et la structure des agrégats en milieu aqueux, les propriétés d'auto-association des copolymères greffés sont ensuite étudiées.

Enfin, le sixième chapitre présente la synthèse de copolymères amphiphiles greffés porteurs de chaînes perfluorées. L'introduction de ce partenaire, lipophile et hydrophobe, permettra l'élaboration de structures complexes multicompartimentées. Finalement, la cytotoxicité de ces structures sera évaluée.

Chapitre 1

Revue bibliographique sur les poly(3-hydroxyalcanoate)s bactériens

1.1 Introduction

Le premier poly(3-hydroxyalcanoate) (PHA) découvert fut le poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), isolé par Lemoigne en 1927 chez la bactérie *Bacillus megaterium*. [1] Originellement identifié comme une « substance grasse », il fallut attendre 1953, largement après l'introduction du concept de macromolécule dans les années 30 par Staudinger, [2] pour que la nature macromoléculaire des inclusions soit confirmée. [3] Outre la bactérie *Bacillus megaterium*, le PHB a également été mis en évidence dans un nombre important de microorganismes comme par exemple les archées, les bactéries Gram-négatif et Gram-positif et les cyanobactéries... [4] En 1974, Wallen et Rohwedder [5] ont identifié de nouveaux PHAs différents du PHB, qui sont des copolymères contenant des unités 3-hydroxyvalérate (3-HV) et 3-hydroxyhexanoate (3-HHx). Par la suite, l'analyse de différents composés a permis d'isoler d'autres types de PHAs ; plus de 100 unités monomères différentes ont été recensées. [6] La découverte de ces nouveaux polyesters, possédant des propriétés originales, a permis d'élargir leur champ d'applications et a eu un impact considérable sur l'intérêt économique et sur la recherche portés à ces polymères.

A partir des années 80, le développement de la recherche sur les PHAs a concerné le clonage et la caractérisation des gènes impliqués dans le processus de biosynthèse de ces composés. Les gènes codant pour les enzymes responsables de la synthèse de ces

polymères ont été identifiés et clonés dans des bactéries modèles comme *Escherichia coli*. [7] Il a ainsi été possible de faire produire des PHAs par des organismes génétiquement modifiés par exemple pour augmenter la productivité, pour mieux comprendre les mécanismes de biosynthèse ou pour étudier la synthèse de structures non usuelles. [8] Avec l'émergence des biotechnologies, les modifications chimiques de PHAs se sont révélées être un puissant outil afin d'adapter les propriétés des PHAs à l'application visée. En effet, l'utilisation de la chimie permet de contrôler les fonctionnalités introduites ou d'élaborer des architectures plus complexes inaccessibles par bioconversion.

Cette étude bibliographique vise tout d'abord à passer brièvement en revue les mécanismes de biosynthèse et les propriétés des différents PHAs, puis à présenter les réactions de modifications chimiques ainsi que les différents copolymères existants à base de PHAs. Enfin, nous présenterons quelques utilisations potentielles de ces biopolyesters dans le domaine biomédical, en particulier la libération contrôlée de molécules bioactives et l'ingénierie tissulaire.

1.2 Production bactérienne des PHAs

1.2.1 Présentation des PHAs

Les PHAs sont des polyesters naturels, produits par des bactéries, possédant des chaînes latérales R de longueur variable et dont la nature dépend du substrat carboné et de la souche bactérienne. Ces polymères possèdent un carbone asymétrique sur leur chaîne principale de configuration (R); ce sont donc des polymères isotactiques. Cette isotacticité qui leur confère un caractère cristallin est due à la stéréospécificité des enzymes responsables de leur biosynthèse; elle explique par ailleurs le caractère biodégradable de ces polymères, les enzymes dégradant les PHAs étant elles aussi stéréospécifiques.

Selon la longueur de la chaîne latérale, deux types de PHAs peuvent être différenciés : les PHAs à chaînes latérales courtes et moyennes (Figure 1.1).

- Les PHAs à chaînes latérales courtes ou PHA-scl (short chain length) possèdent 1 à 2 atomes de carbone dans leur chaîne latérale ($R = CH_3$ ou C_2H_5).
- Les PHAs à chaînes latérales moyennes ou PHA-mcl (medium chain length) possèdent au moins 3 atomes de carbone sur leur chaîne latérale ($R = C_3H_5$ ou plus).

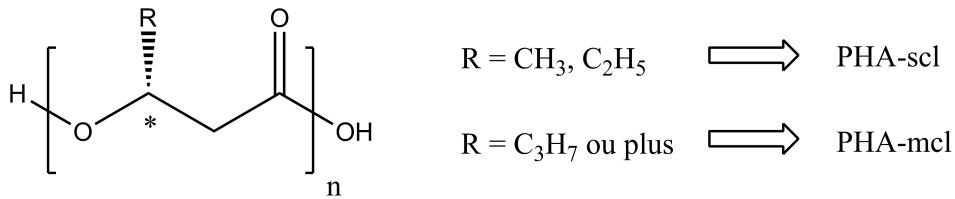


Figure 1.1: Formule générale des poly(3-hydroxyalcanoates).

1.2.2 Conditions de culture

Lorsqu'elles sont dans un milieu favorable, les bactéries utilisent les nutriments à leur disposition pour synthétiser les constituants nécessaires à leur métabolisme, leur croissance et leur multiplication. Si un nutriment vient à manquer, ou se trouve en quantité limitée, certaines bactéries détournent leur métabolisme au profit de la synthèse de PHAs, ceux-ci leur servant de réserves intracellulaires d'énergie et de carbone. La production de ces polymères a notamment été observée en cas de pénurie en magnésium, sulfate, azote, phosphate et/ou oxygène.[9, 10]

1.2.3 Nature des inclusions

Les PHAs se présentent *in vivo* sous la forme de granules intracytoplasmiques de 0,2 à 1 μm de diamètre (Figure 1.2).

Leur nature chimique est parfaitement adaptée à leur rôle de réserve d'énergie. En effet, leur caractère hydrophobe leur confère une insolubilité dans l'eau, et par conséquent ils ne modifient pas la pression osmotique ni le pH au sein de la bactérie. Les granules sont composés d'un coeur de PHA hydrophobe amorphe, et entourés par une membrane constituée de phospholipides mais aussi de protéines structurantes appelées phasine et de protéines de régulation (Figure 1.3). Les phasines sont des protéines non catalytiques, amphiphiles, servant à la formation et à la stabilisation de l'inclusion. Les protéines de régulation servent à contrôler la synthèse des granules de PHA.[11]

Barnard *et al.* ont montré par spectroscopie RMN ^{13}C que le PHB était amorphe dans les granules intracytoplasmiques.[12, 13] Cette étude a permis de comprendre notamment les différences de dégradabilité entre le polymère *in vivo* et après les étapes d'extraction qui entraînent sa cristallisation. Cependant la question se pose à propos

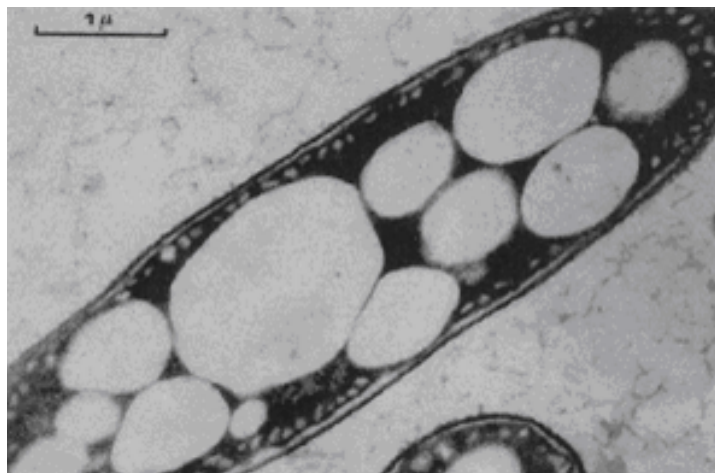


Figure 1.2: Inclusions de PHB chez *Azobacter chroococcum* en microscopie électronique à transmission.

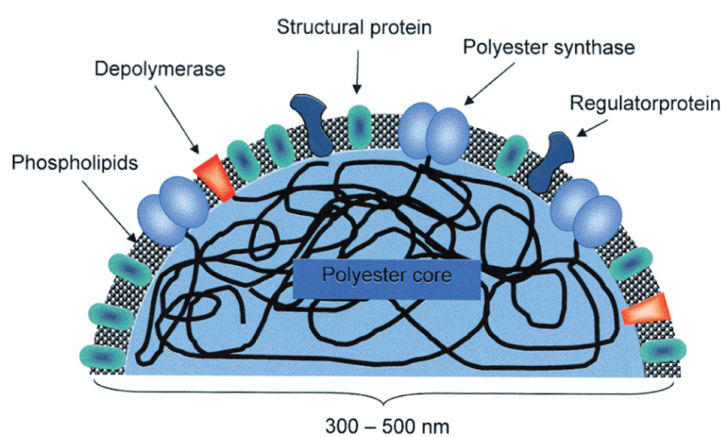


Figure 1.3: Représentation schématique d'un granule de PHA.[11]

des raisons qui empêchent la cristallisation du polymère *in vivo*. Dekoning *et al.* ont montré que l'état amorphe du polymère pouvait s'expliquer simplement par la cinétique de cristallisation.[14] Cette conservation du caractère amorphe dans les granules est importante pour les bactéries car les PHA-dépolymérase agissent préférentiellement sur le polymère amorphe.

1.2.4 Procédés d'extraction des PHAs

Des études ont montré que le chloroforme est un bon solvant des PHAs. La solvataion s'expliquerait d'une part par l'interaction polaire entre le chlore et l'atome de carbone du carbonyle du PHA, et d'autre part par la formation d'une liaison hydrogène entre l'oxygène du carbonyle et l'hydrogène déficitaire en électron.[15, 16] Cette structure forme alors un cycle à cinq atomes qui la stabilise.

Les PHAs peuvent donc être extraits de cellules bactériennes lyophilisées par le chloroforme ou le dichlorométhane. Par cette technique, les lipides sont également co-extraits ; pour les éliminer, le polymère est purifié par précipitations successives dans un non solvant adéquat (méthanol ou éthanol). Une méthode récente permet de diminuer sensiblement les quantités de solvant utilisées pour extraire les PHA-mcl.[17, 18] Après extraction du PHA-mcl de la biomasse par du methyl tert-butyl éther (MTBE), la solution est filtrée plusieurs fois sur du charbon activé avant d'être précipitée une fois dans du méthanol (ou éthanol). Cette méthode a donc le mérite de ne pas utiliser de solvants chlorés, et de diminuer la quantité globale de solvants utilisés (Figure 1.4).

L'utilisation de l'hypochlorite de sodium constitue une alternative à l'utilisation de solvants organiques. En effet, l'emploi d'une solution aqueuse à 30% d'hypochlorite de sodium pendant 30 à 60 minutes permet la destruction de la membrane bactérienne et donc la libération des granules de polyester.[19, 20] Il est cependant nécessaire de ne pas excéder 60 minutes de traitement afin d'éviter une dégradation des chaînes du polyester. Les granules de polymère ainsi obtenus sont précipités dans du méthanol ou de l'éthanol afin d'éliminer les lipides membranaires.

Enfin, un traitement enzymatique détruisant tous les composés cellulaires excepté le PHB constitue une autre méthode d'extraction du polymère.[21] Le procédé implique un traitement aux ultrasons des cellules traitées au lysozyme pour permettre la libération des granules de PHB. Les granules sont ensuite séparés des débris cellulaires par centri-

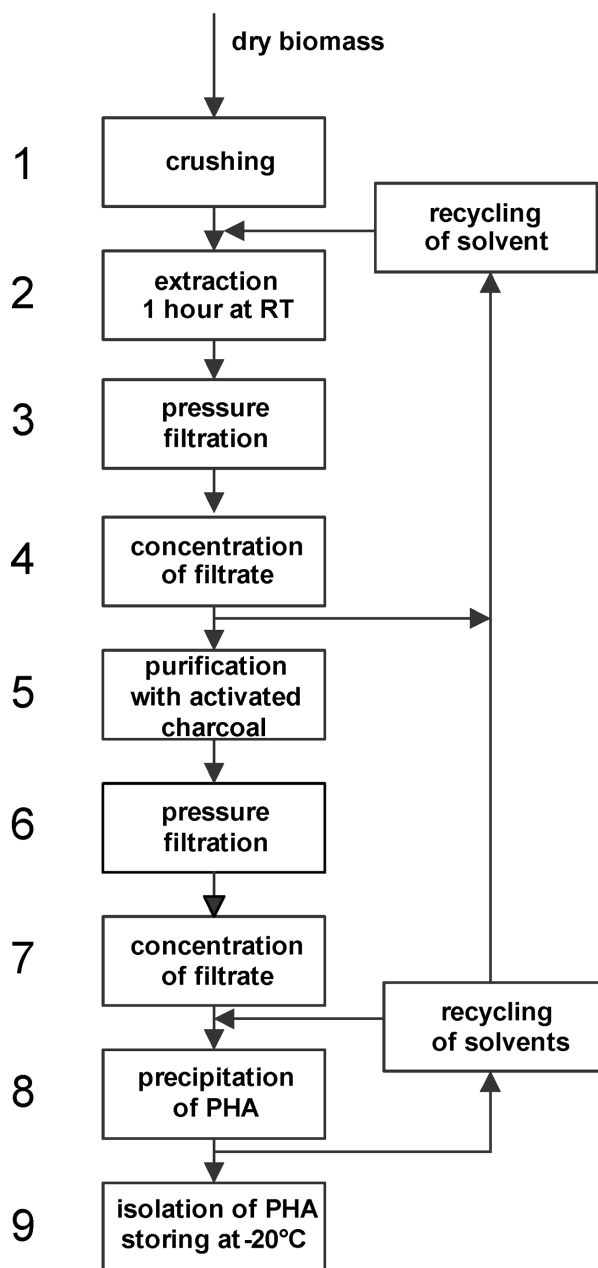


Figure 1.4: Procédé de purification et d'isolation de PHA-mcl à partir de bactéries lyophilisées.[17]

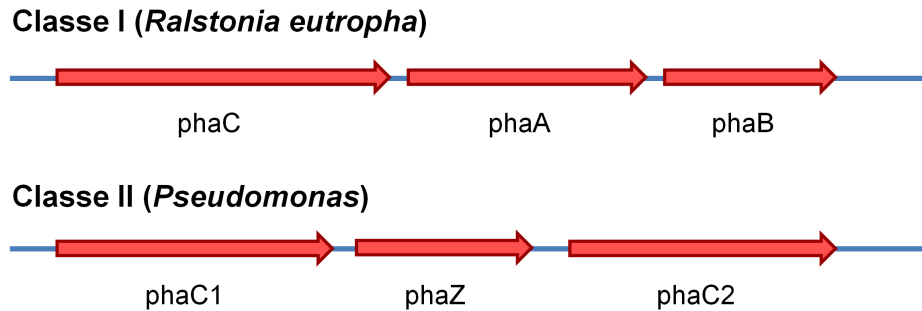


Figure 1.5: Organisation des gènes codant pour les enzymes des deux classes principales. *phaC/C1/C2* : gènes codant la PHA synthase. *phaA* : gène codant la β -cétotliolase. *phaB* : gène codant l'acétoacétyl-CoA réductase. *phaZ* : gène codant la PHA dépolymérase.[31]

fugation à faible vitesse. Un processus similaire a été employé avec succès pour extraire des PHA-mcl.[22, 23]

1.2.5 Biosynthèse des PHAs

Les PHA synthases, enzymes responsables de la biosynthèse des PHAs, montrent une affinité pour une large gamme de substrats. Par exemple, des substrats complexes comme la mélasse de la canne à sucre, des huiles végétales, des alcanes ou même de simples carbohydrates ont été utilisés avec succès comme substrats pour la biosynthèse de PHAs.[24–30] Les voies métaboliques intervenant dans la synthèse de PHAs peuvent être regroupées en deux classes principales. La première est représentée par *Ralstonia eutropha* et regroupe les microorganismes synthétisant principalement des PHA-scl. Les *Pseudomonas* sont caractéristiques de la deuxième classe et synthétisent principalement les PHA-mcl. Ces deux familles d'organismes capables de synthétiser des PHAs possèdent chacune des enzymes spécifiques impliquées dans la synthèse des PHAs dont les gènes codant ont été identifiés (Figure 1.5). Les gènes *phaC*, *phaC1* et *phaC2* codent pour des PHA-synthases et *phaZ* pour la PHA-dépolymérase. Dans le cas des bactéries de la classe I, les gènes codant pour la β -cétotliolase (*phaA*) et l'acétoacétyl-CoA réductase (*phaB*), deux enzymes impliquées dans la biosynthèse des PHA-scl, ont été identifiés.

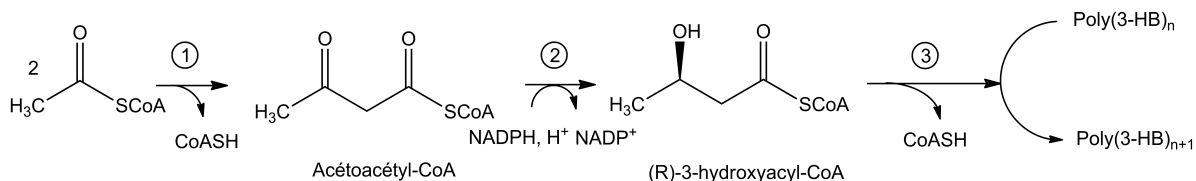


Figure 1.6: Biosynthèse du PHB chez *Ralstonia eutropha* : (1) β -cétotliolase, (2) acétoacétyl-CoA réductase, (3) PHB polymérase.

1.2.5.1 Les PHA-scl

La biosynthèse des PHA-scl fait intervenir trois enzymes à partir de l'acétyl-CoenzymeA (acétyl-CoA) (Figure 1.6) [32]. Celui-ci est un intermédiaire clé du métabolisme primaire, produit à la fois lors de l'oxydation des acides gras et des sucres.

- La première réaction est catalysée par la β -cétotliolase qui par condensation de Claisen lie deux molécules d'acétyl-CoA entre elles pour former l'acétoacétyl-CoA. *Ralstonia eutropha* possède deux β -cétotliolases (A et B) capables de jouer un rôle dans la synthèse du PHB. La différence entre ces deux enzymes concerne leur spécificité de substrat. L'enzyme A catalyse la synthèse de l'acétoacétyl-CoA et est impliquée dans la biosynthèse du PHB. L'enzyme B possède une gamme de substrat plus étendue, et est plutôt impliquée dans le catabolisme des acides gras et peut fournir les unités 3-HV lors de la synthèse du poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalérate) (PHBHV).
- Dans un deuxième temps, la réductase, NADPH dépendante, réduit le carbonyle en alcool pour donner le (R)-3-hydroxyacyl-CoA.
- La PHB polymérase, la dernière enzyme, catalyse les étapes successives de condensation des résidus 3-hydroxyacyl-CoA pour aboutir à la synthèse du PHB. Cette enzyme est stéréospécifique et ne reconnaît que les (R)-3-hydroxyacyl-CoA.

Le PHB peut être accumulé à partir de différents substrats comme les esters butyriques, le glucose, le dioxyde de carbone, le méthanol ou l'éthanol.

1.2.5.2 Les PHA-mcl

Le métabolisme de synthèse des PHA-mcl est totalement différent de celui des PHA-scl. En effet, il ne constitue pas une voie métabolique mais plutôt une déviation des voies métaboliques impliquant les acides gras. Selon le substrat présent dans le milieu de culture, le métabolisme anabolique ou catabolique des acides gras est activé et la biosynthèse des PHA-mcl utilise les intermédiaires métaboliques de ces deux voies. Celles-ci sont :

- La dégradation des acides gras par β -oxydation, qui est la voie principale quand les acides gras sont utilisés comme substrats.
- La biosynthèse *de novo* des acides gras qui est la voie principale lors de la croissance bactérienne sur des sucres.[33]

Le métabolisme de synthèse à partir d'acides gras est directement associé au métabolisme catabolique des acides gras (β -oxydation) (cercle bleu, Figure 1.7). [34, 35] Plusieurs intermédiaires sont utilisés pour la synthèse des PHAs (cercle vert, Figure 1.7) via l'utilisation d'hydratases, d'épimérasas ou de réductases.

Lorsque l'acide gras (source de carbone) comporte 6 à 12 atomes de carbone, les PHAs formés comportent, dans la plupart des cas, des unités de répétition avec un nombre d'atomes de carbone égal à celui de la source de carbone ou avec deux atomes de carbone en moins. Par exemple, la culture de *Pseudomonas sp. GPo1* en présence d'octanoate de sodium[36] comme seule source de carbone conduit à la synthèse d'un copolymère statistique,[37] le poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHOHHx), possédant comme unité majoritaire le 3-hydroxyoctanoate.[38]

L'utilisation de mélanges d'acides gras, d'alcanes et d'alcènes comme source de carbone se traduit par la formation de PHAs dont la composition est le plus souvent le reflet du ratio de chacun des composants du milieu de culture.[39] Il est à noter que l'utilisation de n-alcanes ou de n-alcènes comme substrat n'est possible que si la bactérie possède le plasmide OCT qui contient les gènes permettant l'oxydation des alcanes ou des alcènes en acides carboxyliques.[40]

Si la bactérie est cultivée sur un mélange d'octane et d'octène, le ratio de monomères présentant une insaturation est fonction de la quantité initiale d'octène. De plus, l'introduction dans le milieu de culture de différents alcanes substitués en tant que co-substrats (7-méthyl-octanoate, 8-bromo-octanoate, phénylundécénoate, cyanophénoxy-

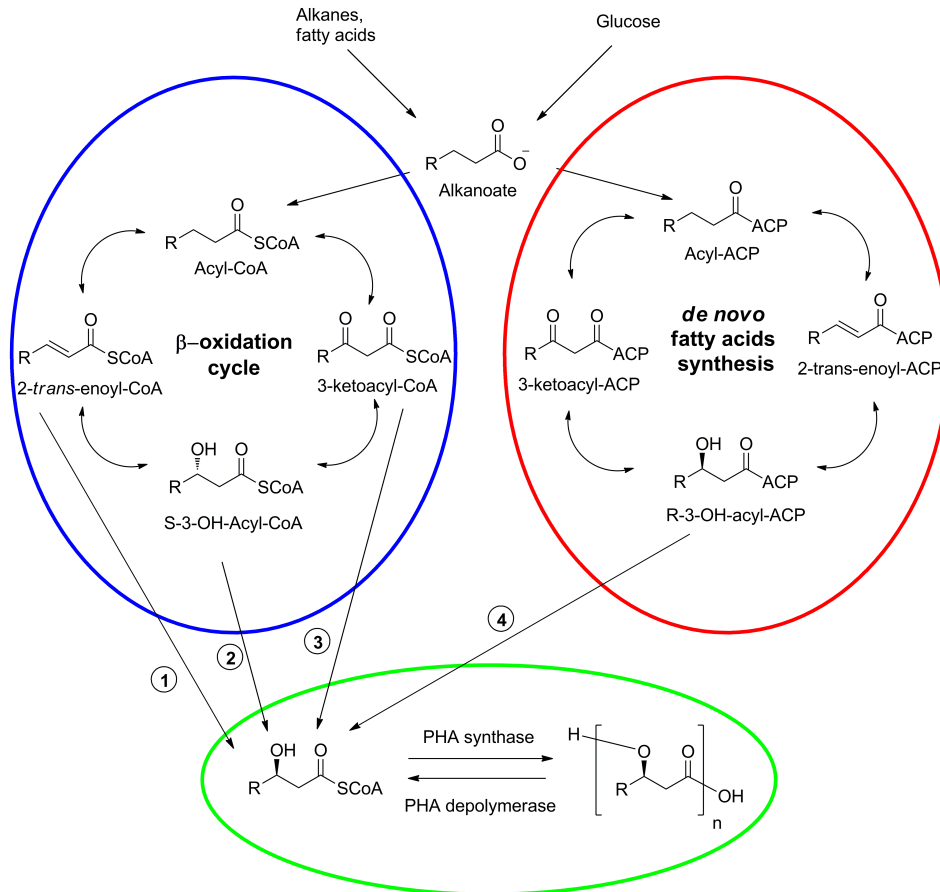


Figure 1.7: Détails des voies métaboliques de biosynthèse des PHA-mcl (CoA = CoenzymeA, ACP = Acyl Carrier Protein); (1) Hydratases, (2) Epimérasés, (3) Réductases, (4) Transacylases (adapté de la référence [35]).

hexanoate) permet de synthétiser des polymères originaux du point de vue de leur composition.[41–44] Cette facilité à incorporer directement des monomères exotiques explique en partie la diversité des copolymères de PHAs générés par les bactéries.

Lorsque la source de carbone est composée de sucres, principalement le glucose, le PHA accumulé dans les bactéries est majoritairement composé de monomères constitués de 8 à 10 atomes de carbone.[45–47] Ces monomères dérivent de la biosynthèse *de novo* des acides gras (cercle rouge, Figure 1.7). Les différentes étapes de la biosynthèse des acides gras se déroulent grâce à un complexe multi-enzymatique de grande taille, l'ACP (Acyl-Carrier-Protein). A l'issue de cette suite de réactions, un dérivé (R)-3-hydroxyacyl-CoA quitte le site actif de l'ACP via une enzyme transacylase. Ce composé est ensuite polymérisé grâce à une PHA synthase (cercle vert, Figure 1.7). La composition du PHA accumulé reflète la composition chimique des intermédiaires métaboliques de la biosynthèse des acides gras ainsi que l'affinité de la PHA synthase pour ces différents substrats.

De nombreuses espèces de *Pseudomonas* utilisent les deux voies métaboliques, c'est le cas de *Pseudomonas putida* pour laquelle le cycle de la β -oxydation et la synthèse *de novo* des acides gras contribuent à la formation des substrats de la PHA synthase.[46, 48]

Les voies de synthèse présentées ici ne sont pas les seules voies existantes. De nombreux travaux ont été réalisés pour élucider les voies de synthèse chez d'autres bactéries sauvages ou recombinantes.[35, 49]

1.3 Propriétés des PHAs

Les PHAs peuvent être obtenus à partir de ressources renouvelables (carbohydrates, acides gras...). Ils sont aussi biodégradables, biocompatibles et les nombreuses compositions possibles donnent accès à une large gamme de propriétés physico-chimiques. Toutes ces propriétés font des PHAs des polymères très prometteurs pour de futures applications dans le domaine environnemental ou biomédical.

1.3.1 Biodégradabilité

La biodégradabilité des PHAs repose sur le fait qu'une importante quantité de microorganismes sont capables de les dégrader totalement en dioxyde de carbone et en

eau. En effet, le processus de polymérisation est réversible ; sous l'action d'une PHA dépolymérase, les bactéries sont capables de dégrader le polymère afin de récupérer les métabolites et l'énergie nécessaires à leur survie lorsque les conditions de cultures deviennent défavorables. Le procédé de biodégradation peut être divisé en deux catégories, la biodégradation intracellulaire et la biodégradation extracellulaire.

1.3.1.1 Dégradation intracellulaire

En fonction des besoins cellulaires et afin de pouvoir gérer la quantité de PHAs accumulés, la bactérie a la capacité d'hydrolyser le polymère préalablement synthétisé grâce à la PHA dépolymérase.[50] La Figure 1.8 représente la dégradation intracellulaire du PHB par la PHB dépolymérase ; cette enzyme intra-cytoplasmique est située à la surface des granules de PHAs.

Le cycle de dégradation combiné au cycle de synthèse du PHB représente le métabolisme complet du PHB. Lors de la dégradation, le PHB est dépolymérisé par la PHB dépolymérase en présence d'une hydrolase pour donner l'acide (R)- β -hydroxybutyrique. Cet acide est oxydé par la déshydrogénase pour conduire à l'acide acétoacétique qui est ensuite thioestérifié en acétocacétyl-CoA par la β -cétothiolase. Celle-ci est la seule enzyme à être utilisée à la fois dans la biosynthèse et la dégradation des PHAs. Elle sert de système de régulation pour les deux voies métaboliques. En présence d'oxygène, l'acétyl-CoA issu de la dégradation des PHAs peut rentrer dans le cycle de l'acide citrique pour être oxydé en deux molécules de dioxyde de carbone.

1.3.1.2 Dégradation extracellulaire

Certains organismes sécrètent dans l'environnement des PHAs dépolymérases et hydrolases capables de dégrader les PHAs en nutriments assimilables par de nombreux microorganismes. Une des propriétés très particulières des PHAs est leur biodégradabilité dans différents environnements aérobies ou anaérobies.[52] En milieu naturel, des microorganismes tels que des bactéries ou des champignons sont capables de sécréter des enzymes extracellulaires de dégradation des PHAs leur permettant d'hydrolyser le PHA en oligomères ou monomères solubles dans l'eau ; ceux-ci jouent alors le rôle de nutriments et sont transformés en molécules de base telles que le dioxyde de carbone, l'eau ou le méthane. Un exemple de biodégradation *in vitro* de film de PHB est donné en

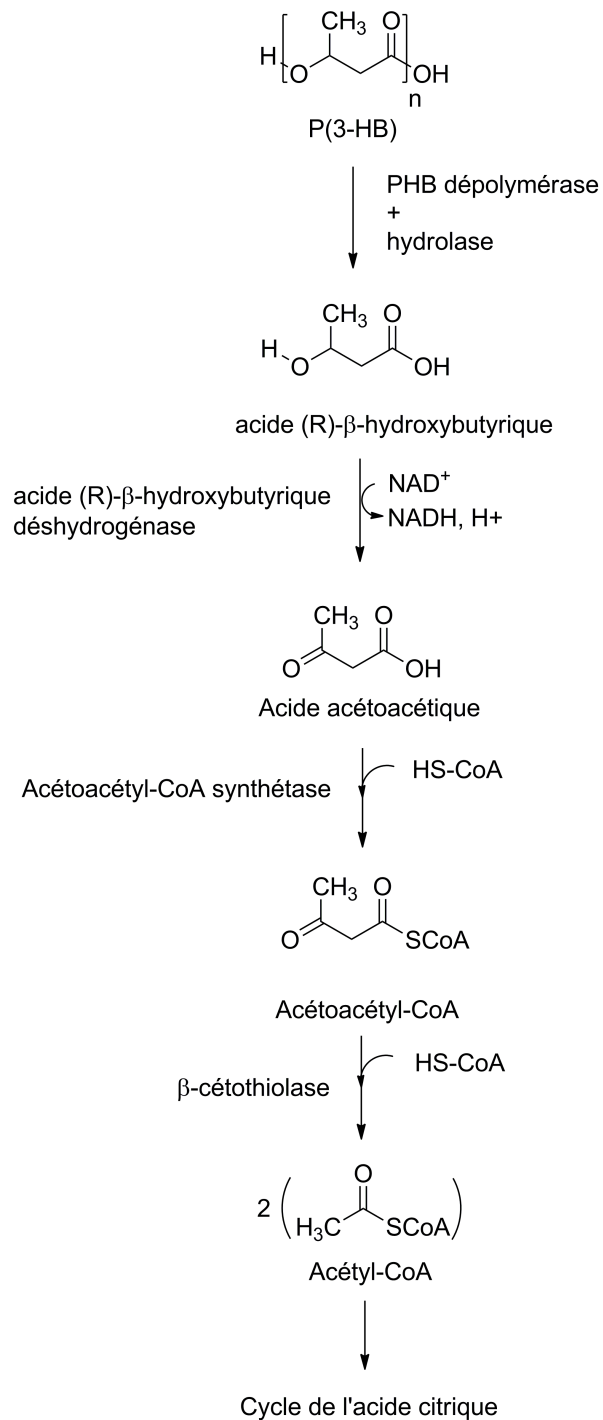


Figure 1.8: Dégradation intracellulaire du PHB.[51]

Figure 1.9. Après 72h d'incubation en présence de *Streptomyces* MG à 50°C, le film est lavé et observé par SEM. La surface présente des trous et cavités, attribués à l'action de *Streptomyces* MG. Le film de PHB est alors complètement dégradé en 6 jours à 50°C.[53]

La biodégradabilité des PHAs en milieu naturel a été étudiée et il a été montré que cette propriété repose sur de nombreux facteurs. Des facteurs environnementaux comme le type de milieu : sols,[54, 55] eau douce,[56, 57] eau de mer,[58, 59] la température, le pH, le taux d'humidité, la quantité de nutriments mais aussi des facteurs relatifs aux PHAs comme leur composition monomère, leur cristallinité, la présence d'additifs et également le type de surface du matériau.[53, 60] Il a été déterminé que la vitesse de biodégradation diminuait lorsque la cristallinité du polymère augmentait. Par exemple, Weng *et al.* ont étudié la biodégradation de différents PHA-scl par un procédé accéléré de compost aérobie. Les vitesses de dégradation se classent comme suit : P3HB4HB (poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)) > PHBHV (20% 3-HV) > PHBHV (3% 3-HV) > PHB[61] quels que soient les différents environnements de biodégradation. Il est à noter que la biodégradation se fait par érosion de la surface vers le coeur ; la forme et la surface du matériau sont donc deux paramètres importants. Les masses molaires des polymères évoluent peu au cours de la dégradation, on a donc une dépolymérisation des chaînes des PHAs par les enzymes et non des coupures statistiques.

Les PHA dépolymérase extracellulaires sont divisées en deux groupes, PHA-scl dépolymérase et PHA-mcl dépolymérase suivant leurs substrats spécifiques. Jusqu'à maintenant, plus de 80 PHA dépolymérase ont été isolées et caractérisées à partir de nombreux microorganismes mais la plupart de ces enzymes sont des PHA-scl dépolymérase. Même si plusieurs bactéries sont capables de décomposer des PHA-mcl,[62] seul un nombre restreint de PHA-mcl dépolymérase ont été isolées.[63–65] Kim *et al.* ont listé les espèces connues dégradant les PHA-mcl et ont conclu que les principaux microorganismes présents dans le sol capables de dégrader les PHA-mcl appartiennent au genre *Pseudomonas* ou *Stenotrophomonas*.[66]

1.3.2 Biocompatibilité

La biocompatibilité peut être définie comme la capacité d'un biomatériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique.[67] Il existe un certain nombre de travaux relatifs à la biocompatibilité des PHAs et notamment celle du

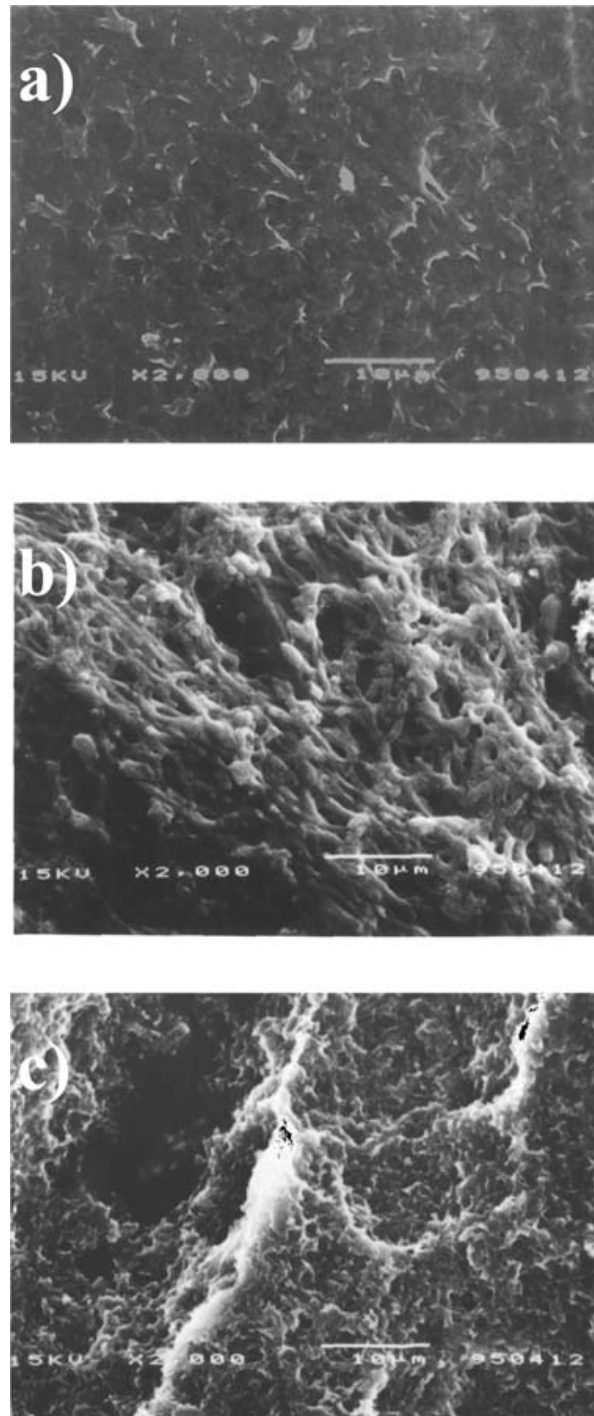


Figure 1.9: Images par microscopie électronique à balayage de films de PHB. (a) Film de PHB, (b) Film de PHB en présence de *Streptomyces* MG à 50°C, (c) Film de PHB lavé après 72h d'incubation. Barre d'échelle = 10 µm.[53]

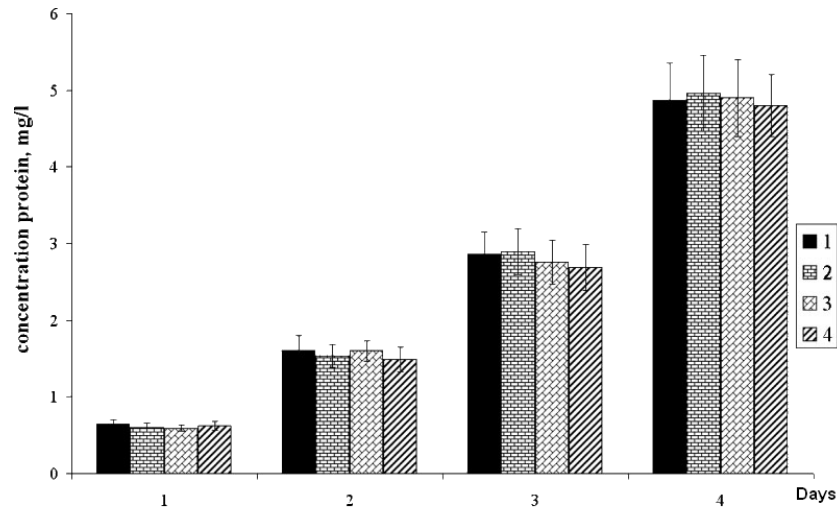


Figure 1.10: Dynamique de la synthèse de protéines matricielles par des fibroblastes NIH 3T3 cultivés sur : (1) verre (contrôle), (2) PHB, (3) PHBHV 15 mol% HV, (4) PHBHV 28 mol% HV.[71]

PHB. La biocompatibilité du PHB est en parfaite adéquation avec le fait que l'unité monomère, l'acide 3-(R)-hydroxybutyrique, mais également des oligomères de PHB soient présents dans le plasma humain à des concentrations comprises entre 0,3 et 1,3 mM pour le monomère et 0,6 et 18,2 mg.L⁻¹ pour les oligomères.[68–70] Des tests de cytotoxicité *in vitro* sur des films de PHB et de PHBHV ont été menés sur des cellules fibroblastes NIH 3T3.[71] Ceux-ci ont montré que quel que soit le support (PHB et PHBHV), la viabilité cellulaire des fibroblastes n'était pas affectée (99,8±0.2% de cellules viables). Il en est de même pour la capacité de synthèse protéique des cellules, reflétant leur viabilité, qui n'a pas montré de différences avec le contrôle après trois jours de culture (Figure 1.10). Par ailleurs, les PHA-mcl tels que le poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) ont montré leur non-toxicité pour l'attachement, la prolifération et la différenciation de cellules aortiques de lapin.[72]

Les tests de biocompatibilité *in vivo* consistent à implanter les polymères, le plus souvent sous la peau. A l'interface du biomatériau et des tissus environnants, de nombreuses réactions biologiques peuvent provoquer des réactions non désirées (inflammatoires, mutagènes, carcinogènes) dès les premières minutes de contact. Elles peuvent durer plusieurs jours, plusieurs mois ou même plusieurs années, ce qui entraîne alors de graves

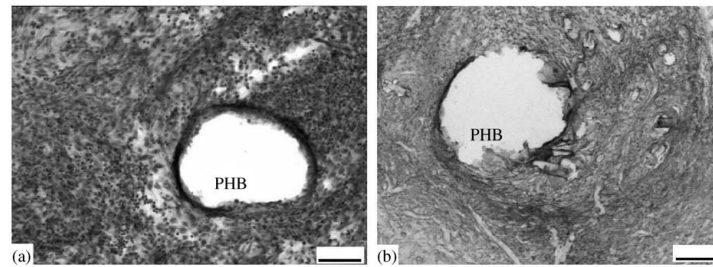


Figure 1.11: Réponse tissulaire à l'alkaline phosphatase par la méthode de Gomori après implant de PHB : (a) une semaine après l'implant et (b) quatre semaines après l'implant. L'image montre une diminution de l'inflammation et de l'épaisseur du tissu fibreux (barre d'échelle : 0,01 mm).[77]

dommages cellulaires.[73–75] L'infiltration des tissus environnants par les macrophages, les fibroblastes, et la formation d'une capsule fibreuse vascularisée autour de l'implant sont caractéristiques de la réponse tissulaire.[76] L'endommagement que pourrait provoquer l'implant sur les tissus voisins reflète donc la biocompatibilité d'un matériau.

Le PHB et ses copolymères PHBHV sont bien tolérés par les tissus quand ils sont implantés sous la peau de souris puisqu'aucune formation d'abcès ou de nécrose des tissus environnants n'est observée.[77, 78] Il est à noter qu'après une semaine *in vivo*, une réaction inflammatoire apparaît avec la formation d'une capsule fibreuse de 200 μm ; cependant, l'inflammation diminue et l'épaisseur de la capsule décroît à 40-60 μm après 4 semaines d'implantation (Figure 1.11). Finalement, aucune inflammation suppurative, nécrose, calcification ou formation de tumeur maligne n'est observée après un an d'implantation.

Concernant les PHA-mcl, une étude a été menée sur différents types d'implants de PHOHHx (microsphères, tubes, pastilles...). Les différents types d'échantillons ont été implantés puis retirés après 2, 4, 8, 12 et 40 semaines. La biocompatibilité des implants a été évaluée en déterminant le degré d'apparition de tissus fibreux ainsi que de cellules inflammatoires. Après 2 semaines, les analyses histologiques ont montré que les tubes et pastilles présentaient une capsule fibreuse de faible épaisseur (4 à 6 cellules de fibroblastes entourées de collagène). Aucune trace de macrophage n'a été détectée. Après 4 et 8 semaines, aucune inflammation n'a été observée. A 12 semaines, aucune augmentation de l'épaisseur des tissus fibreux n'a été reportée. Enfin, aucune inflammation ou augmentation de la quantité de tissus fibreux n'a été observée après 40 semaines

| Composition (%mol) | | | T_g (°C) | T_f (°C) | Cristallinité (%) |
|--------------------|------|-------|------------|------------|-------------------|
| 3-HB | 3-HV | 3-HHx | | | |
| 100 | — | — | 10 | 177 | 60 |
| 97 | 3 | — | 8 | 170 | 59 |
| 91 | 9 | — | 6 | 162 | 58 |
| 86 | 14 | — | 4 | 150 | 57 |
| 80 | 20 | — | -1 | 145 | 56 |
| 75 | 25 | — | -6 | 137 | 54 |
| 98,5 | — | 2,5 | -4 | 177 | 42 |
| 90 | — | 10 | -1 | 127 | nd ^a |
| 80 | — | 20 | 4 | 52 | 18 |

^and : non déterminé

TABLE 1.1: Propriétés thermiques des PHA-scl.[19, 51]

d'implantation.

Plus généralement, certains auteurs mettent en avant l'influence du degré de pureté des PHAs sur les réactions inflammatoires observées. En effet, si la purification est insuffisante, il peut rester des débris cellulaires, des endotoxines et/ou des acides gras qui sont responsables d'une inflammation et de la formation d'une couche fibreuse épaisse autour de l'implant.[79, 80] Malgré cela, il est important de souligner que la plupart des PHAs provoquent des réactions inflammatoires d'intensité plus faible que celles généralement observées avec d'autres polyesters comme le poly(acide lactique) (PLA) ou le poly(acide lactique-*co*-glycolique) (PLGA).[81]

1.3.3 Propriétés physico-chimiques

1.3.3.1 Les PHA-scl

Les PHA-scl sont des polymères très cristallins dont les propriétés thermiques varient avec la présence d'unités monomères de différentes natures. Introduire des monomères 3-HV dans du PHB permet de diminuer la T_g et la T_f mais a peu d'incidence sur le taux de cristallinité, ces deux monomères pouvant co-cristalliser. Mais l'introduction d'unités portant des chaînes latérales plus longues comme le 3-HHx entraîne une perturbation de la cristallisation et diminue ainsi le taux de cristallinité. Une liste de ces propriétés est donnée dans le tableau 1.1.

| Composition (%) | | | Module d'Young (GPa) | Contrainte à la rupture (MPa) | Elongation à la rupture (%) |
|-----------------|------|-------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 3-HB | 3-HV | 3-HHx | | | |
| 100 | — | — | 3,5 | 40 | 4 |
| 97 | 3 | — | 2,9 | 38 | 5 |
| 91 | 9 | — | 1,9 | 37 | 8 |
| 86 | 14 | — | 1,5 | 35 | 12 |
| 80 | 20 | — | 1,2 | 32 | 50 |
| 75 | 25 | — | 0,7 | 30 | — |
| 98,5 | — | 2,5 | 0,6 | 43 | 6 |
| 90 | — | 10 | 0,2 | 21 | 400 |
| 80 | — | 20 | 0,1 | 20 | 850 |

TABLE 1.2: Propriétés mécaniques des PHA-scl.[83]

Les propriétés mécaniques du PHB telles que le module d'Young (3,5 GPa) et la contrainte à la rupture (40 MPa) sont proches de celles du polypropylène (1,7 GPa et 38 MPa). En revanche, son allongement à la rupture (4%) est très inférieur à celui du polypropylène (400%). C'est donc un matériau plus rigide et plus cassant que le polypropylène.[39, 82] L'introduction d'unités monomères telles que le 3-HV ou 3-HHx modifie grandement ces propriétés. Un récapitulatif est donné dans le tableau 1.2.

1.3.3.2 Les PHA-mcl

Les PHA-mcl sont des thermoplastiques élastomères possédant une faible cristallinité (20 à 40%) due à la présence de chaînes pendantes de différentes tailles perturbant la cristallisation des chaînes polyester.[84] Les polymères sont donc constitués d'une partie amorphe et d'une partie cristalline jouant le rôle de point de réticulation physique.[85] Ils présentent des T_g comprises entre -25 et -62°C et des T_f comprises entre 42 et 65°C.[83]

Ces caractéristiques impliquent que les propriétés mécaniques des PHA-mcl sont très différentes de celles des PHA-scl. Une des premières études a été menée sur un copolymère principalement constitué d'unités 3-HO ; [86] le module d'Young a été mesuré à 17 MPa et l'élongation à la rupture à 250-350%. D'autres études sur des copolymères de PHO ont montré que l'augmentation de la proportion de co-monomère augmentait significativement leur flexibilité (élongation à la rupture) et diminuait leur rigidité (module d'Young).[85–89] Ces propriétés sont regroupées dans le tableau 1.3.

| PHA-mcl | Module d'Young (MPa) | Contrainte à la rupture (MPa) | Elongation à la rupture (%) |
|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| P(3-HO) | 17 | — | 250-350 |
| P(3-HO-co-12%3-HHx) | 0,008 | 9 | 380 |
| P(3-HO-co-12%3-HHx-co-2%3-HD) | 7,6 | 9,3 | 380 |
| P(3-HO-co-4,6%3-HHx) | 599,9 | 22,9 | 6,5 |
| P(3-HO-co-5,4%3-HHx) | 493,7 | 23,9 | 17,6 |
| P(3-HO-co-7%3-HHx) | 288,9 | 17,3 | 23,6 |
| P(3-HO-co-8,5%3-HHx) | 232,3 | 15,6 | 34,3 |
| P(3-HO-co-9,5%3-HHx) | 155,3 | 8,8 | 43,0 |

TABLE 1.3: Propriétés mécaniques des PHA-mcl.

1.4 Fonctionnalisation des PHAs

Les PHAs possèdent des qualités intrinsèques particulièrement intéressantes, telles que la biodégradabilité ou la biocompatibilité, et ils constituent donc une classe de polymères très prometteurs pour des applications dans le domaine environnemental ou biomédical. Cependant, l'apport de certaines fonctionnalités ou le greffage d'autres polymères peut s'avérer nécessaire pour concevoir des matériaux sur mesure correspondant au cahier des charges des applications auxquelles ils sont destinés. Par exemple, l'introduction de fonctions polaires modifie la nature hydrophobe des PHAs et, grâce à certaines fonctions comme les acides carboxyliques, il devient possible de greffer des molécules bioactives.

Deux démarches peuvent être envisagées pour synthétiser des PHAs fonctionnalisés, ces deux démarches pouvant même être associées.

- La biosynthèse directe du PHA fonctionnalisé par la bactérie en introduisant dans le milieu de culture un substrat qui permettra l'introduction de fonctions spécifiques au sein du polymère.
- La modification chimique du PHA après biosynthèse.

1.4.1 Biosynthèse de PHAs fonctionnalisés

Selon le choix du microorganisme, de la source de carbone et des conditions de culture utilisées, il est possible d'orienter la bactérie vers la synthèse de nombreux homopolymères et copolymères comportant des unités très différentes. Le tableau 1.4 illustre la

diversité des PHAs fonctionnalisés obtenus par cette méthode.[90] Bien qu'attrayante, cette démarche reste limitée principalement à cause de la toxicité de certains substrats vis-à-vis de la bactérie, du coût de certains substrats et des faibles rendements en polymère généralement observés. Le PHA fonctionnalisé le plus courant est le poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-hydroxyundécénoate) (PHOU), portant des insaturations sur ses chaînes latérales. La production de ces PHAs, contenant entre 0 et 100% d'unités de répétition insaturées, est maintenant relativement bien contrôlée.[91, 92]

1.4.2 Modifications chimiques des PHAs

Comme nous l'avons vu précédemment, la biosynthèse de PHAs fonctionnalisés présente un certain nombre de limites. Certaines d'entre elles peuvent être dépassées grâce à la modification chimique de PHAs, offrant un éventail de possibilités plus large. Pour chaque famille de PHAs (PHA-scl et PHA-mcl), nous présenterons tout d'abord des modifications chimiques du squelette ou des chaînes latérales de PHAs, permettant de moduler leurs propriétés, puis nous passerons en revue les différentes méthodes existantes permettant de produire des oligomères de PHAs de taille contrôlée.

1.4.2.1 Modification chimique du squelette de PHA

De par leur nature, les PHA-scl ne portent pas de fonctionnalités chimiques sur leurs chaînes latérales ; les réactions de modification sont par conséquent limitées. Cependant, Arkin *et al.* ont développé une méthode permettant de fonctionnaliser le squelette du PHB.[103] Pour cela, du chlore gazeux est mis à barboter dans une solution de PHB dissous dans un mélange $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$. Selon la quantité de chlore introduite, différentes structures ont été obtenues (Figure 1.12) présentant un taux variable de chloration (entre 5,45 et 23,81 % en masse). Malgré une hydrolyse partielle du polymère, le PHB modifié présente un changement de ses propriétés physiques, avec une T_g allant de -20 à 10°C et une T_f réduite à 148°C. Par ailleurs, des modifications ultérieures ont permis de convertir partiellement les fonctions chlore de ce polymère en ammonium quaternaire, sel de sulfate ou dérivé phényle.

Grâce à leurs chaînes latérales fonctionnalisées, les PHA-mcl, et plus particulièrement le poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-hydroxyundécénoate) (PHOU), sont plus facilement sujets à des réactions de modifications ultérieures. Différents travaux de modifications

| Groupe ment fonctionnel | Source de carbone | Rendement en cellules (g/L) | Rendement en polymère (g/L) | % molaire de groupements fonctionnels | Référence |
|-------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|--------------|
| Chlore | Chlorooctane/octane | 2,6 | 0,13 | 59 | [19] |
| Brome | Alcanes bromés/acide nonanoïque | 0,42-0,68 | 0,019-0,092 | 25-38 | [93] |
| Fluor | Tyr-, hepta-, nona-, trideca- Acides alcanoïques fluorés/ Acide nonanoïque | 0,9 | 0,01-0,52 | <1,0-6,2 | [94] |
| Cyano | Cyanoundécane/acide nonanoïque | 0,8-0,9 | 0,18-0,29 | 17-32 | [93] |
| Vinyl | Octène | nd ^a | nd | 54 | [34] |
| | Nonène | nd | nd | 39 | |
| | Decène | nd | nd | 12 | |
| | Acide 3-hydroxy-7-octénoïque Acide/acetate 3-hydroxy-7-octénoïque (séquentiel) | 0,62 0,86 | 0,06 0,08 | 64 nd | [95] [95] |
| | Acide 10-undécénoïque/acide nonanoïque | 0,6-1,1 | 0,2-43 | 41-98 | [96] |
| | Acide 10-undécénoïque/acide octanoïque | 3,5-4,9 | 0,63-1,12 | 13-99 | [97] |
| | Acide 10-undécénoïque/acide nonanoïque (séquentiel) | 0,3-1,4 | 0,1-0,5 | nd | [98] |
| | Acide 10-undécénoïque/octanoate de sodium | nd | nd | 5-94 | [92] |
| | Acide 10-undécénoïque/octanoate de sodium | 0,6-2,1 | 0,03-0,37 | 42 | [99] |
| Aleyme | Acide 10-undécénoïque/acide nonanoïque | 0,5-1,1 | 0,17-0,25 | 32-100 | [100] |
| Ester | Octanoate de méthyle | 1,0-2,0 | 0,01-0,4 | 11-35 | [101] |
| | Nonanoate de méthyle | | | Depend de l'oxygénation | |
| | Décanoate de méthyle/acide octanoïque | | | | |
| | Heptanoate de méthyle, éthyle et propyle | 1,1-2,0 | 0,003-0,09 | 2,5-60,0 | [102] |
| Epoxyde | Acide 10-époxyundécénoïque/acide octanoïque | 0,33-5,5 | 0,01-1,2 | 10 | [97] |

^a non disponible

TABLE 1.4: Obtention de PHAs fonctionnalisés par *Pseudomonas oleovorans*.

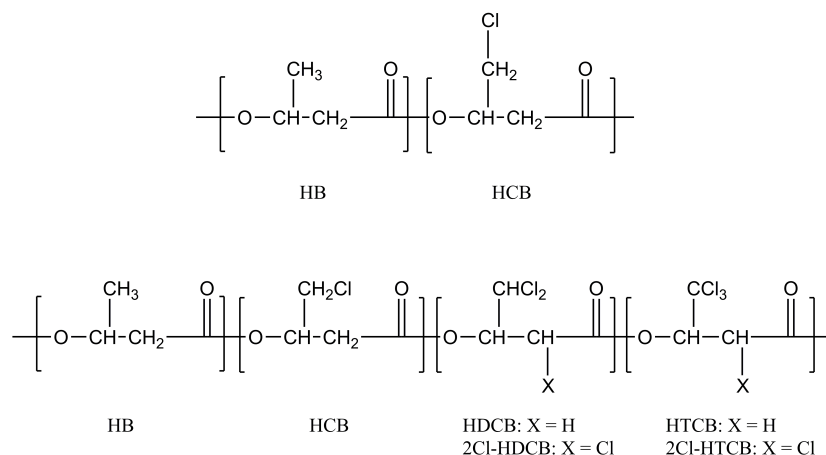


Figure 1.12: Structures obtenues après chloration du PHB.[103]

chimiques ont été menés et ont permis d’obtenir de nouveaux matériaux possédant des chaînes latérales porteuses de nouvelles fonctions. Un récapitulatif de ces structures est donné en Figure 1.13.

La conversion des groupements alcène en groupes hydroxyle a été rapportée par plusieurs auteurs. La réticulation d’un PHOU portant 25% d’insaturations par du borane suivie d’une coupure du réseau par l’ajout de NaOH/H₂O₂ a permis l’hydroxylation quantitative des chaînes pendantes.[104] Une faible diminution de la masse molaire a été observée, celle-ci passant de 86000 à 56000 g.mol⁻¹. Eroglu *et al.*[105] ont rapporté une procédure similaire en utilisant le 9-bicyclononane (9-BBN) sur un PHA portant exclusivement des chaînes pendantes insaturées, le poly(3-hydroxyundécènoate) (PHU). Une conversion proche de 100% a été observée, avec cependant une forte diminution de la masse molaire du polymère, de 32000 à 8100 g.mol⁻¹. Dans ces deux cas, le polymère obtenu voit son hydrophilie augmentée et devient soluble dans des solvants polaires tels que le méthanol ou l’éthanol.

L’introduction de diols vicinaux sur des PHOU s portant de 45 à 93% de monomères insaturés a été démontrée grâce à l’utilisation de KMnO₄/Na₂CO₃ à 20°C.[106] Bien qu’aucune baisse sévère de la masse molaire ne soit observée, la conversion en diol ne dépasse pas 60%, quel que soit le PHOU ou les conditions expérimentales utilisés. Cependant, l’hydrophilie du polymère est grandement augmentée, le rendant soluble dans des solvants polaires tels que le méthanol, le DMSO ou un mélange 80/20 (v/v) acétone/eau.

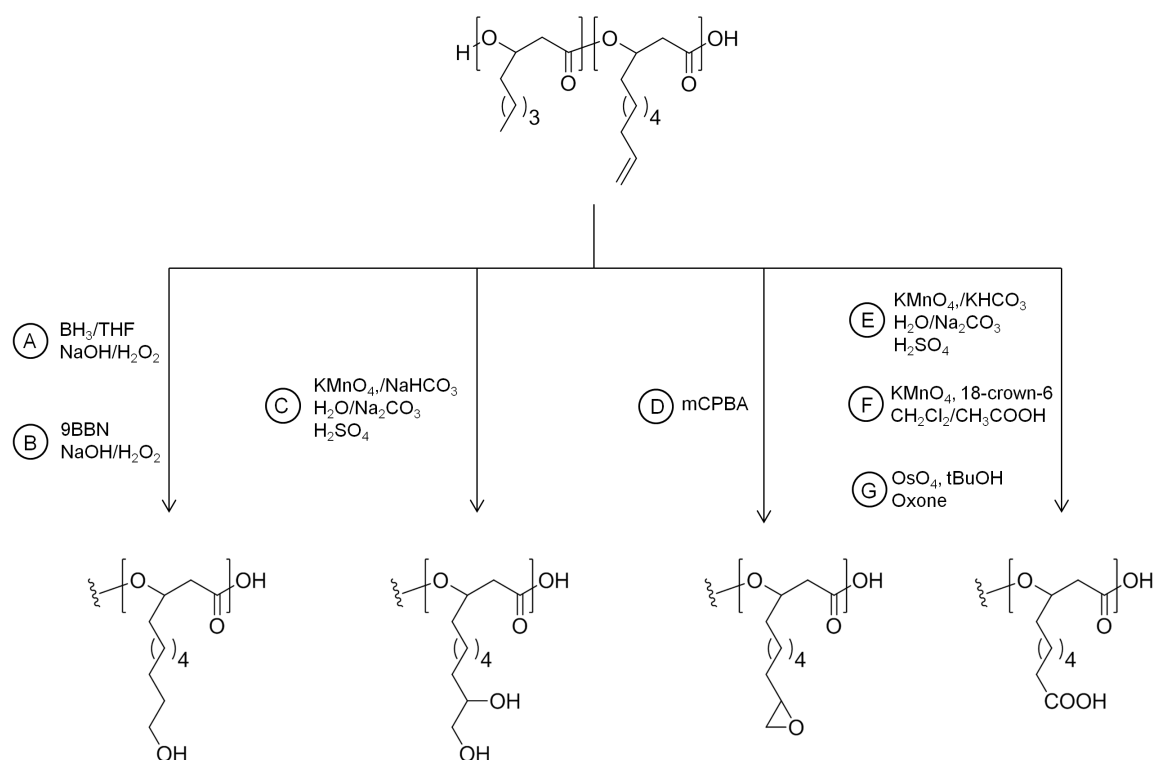


Figure 1.13: Modifications chimiques du PHOU par oxydation de la chaîne latérale insaturée. (A)(B) hydroxylation ; [104, 105] (C) formation de diols ; [106] (D) époxydation ; [97, 107] (E)(F)(G) formation d'acides carboxyliques. [108–110]

Parallèlement à la production de PHAs fonctionnalisés par des époxydes par bioconversion, l'époxydation de PHOU est possible en présence d'acide métachloroperbenzoïque (mCPBA). Cette méthode permet l'époxydation quantitative des PHAs insaturés, sans réaction secondaire ou diminution de la masse molaire.[97, 107]

L'oxydation des insaturations en acides carboxyliques a tout d'abord été rapportée par Lee *et al.*[108] grâce à une méthode dérivée de la formation de diols sur le PHOU. En effet, l'utilisation de $\text{KMnO}_4/\text{KHCO}_3$ à 55°C permet la formation de fonctions acide carboxylique terminales. Cependant, cette méthode comporte certaines limitations, comme une conversion maximale de 50% et une forte diminution de la masse molaire, celle-ci passant de 137000 à 19000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. La conversion quantitative d'un PHOU comportant 25% d'insaturations a été démontrée par Kurth *et al.*[109] grâce à l'utilisation de KMnO_4 en présence d'éther couronne 18-couronne-6 dans un mélange acide acétique/dichlorométhane. En plus d'une excellente conversion, cette méthode permet de ne pas affecter notablement la masse molaire du polymère. Par ailleurs, il est important de noter que l'introduction de fonctions acide carboxylique permet d'augmenter grandement la vitesse d'hydrolyse du polymère; celui-ci est totalement hydrolysé à $\text{pH} = 11$ en 24h. Le tétraoxyde d'osmium OsO_4 permet également d'oxyder quantitativement les insaturations du PHOU en acides carboxyliques sans diminution de la masse molaire du polymère.[110]

Enfin, des PHAs cationiques ont été préparés à partir de PHAs époxydés (Figure 1.14).[99] Le cycle époxyde du poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-(3-hydroxy-10-époxyundécénoate) (PHOE) est ouvert par de la diéthanolamine pour former du poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxy-11-(bis(2-hydroxyéthyl)amino)-10-hydroxyundécanoate)) (PHON). Ce procédé provoque une diminution de la masse molaire du polymère due à l'aminolyse du squelette mais permet surtout la synthèse d'un PHA hydrosoluble; en effet, l'amine tertiaire résultante, dont le pK_a est estimé entre 8 et 8,5, transforme ce polymère en un polycation hydrosoluble à pH neutre.

1.4.2.2 Oligomérisation

L'utilisation de PHAs pour la synthèse de copolymères peut nécessiter la préparation d'oligomères à partir de PHAs natifs de masse molaire élevée. Selon la méthode employée, différents types d'oligomères sont obtenus. Ces méthodes incluent le traitement

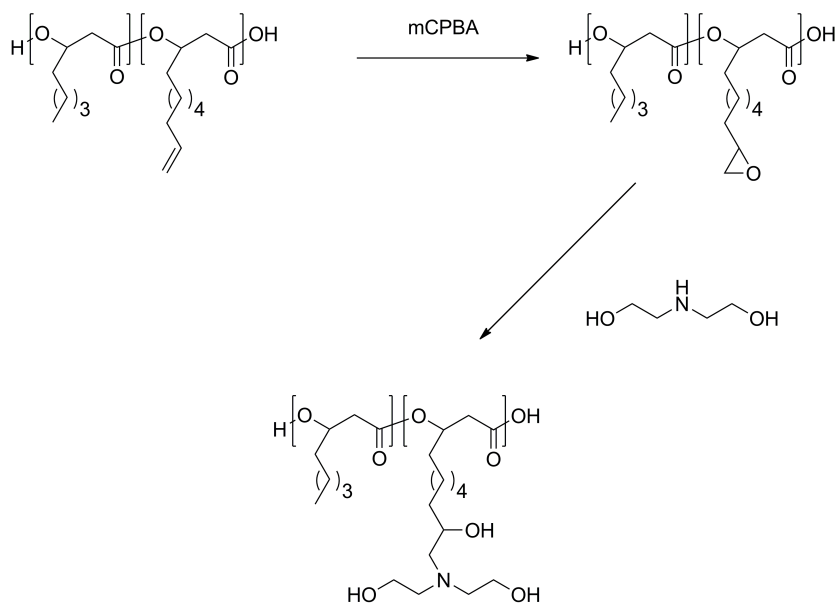


Figure 1.14: Synthèse du poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxy-11-(bis(2-hydroxyéthyl)amino)-10-hydroxyundécanoate)) (PHON), protonable à pH physiologique .[99]

thermique ,[111–113] les réactions de transestérification,[114–116] l'hydrolyse [117] et la méthanolyse.[118, 119] La Figure 1.15 donne un aperçu des structures obtenues par ces différentes méthodes.

Les PHAs sont connus comme étant des composés instables thermiquement ; en effet, ils se dégradent *via* une coupure aléatoire de leur chaîne principale sous l'action de la chaleur. Les PHA-scl se coupent *via* un mécanisme de β -élimination (transposition de Mc Lafferty) (Figure 1.16).[120] Des oligomères de PHB, PHV et PHBHV ont été synthétisés par traitement thermique à 190°C, générant des masses de 1200 à 38300 g.mol⁻¹ suivant le temps de réaction. Les oligomères formés possèdent des extrémités bien définies, avec une fonction crotonate de configuration E et une fonction acide carboxylique.

Récemment, Chan Sin *et al.* ont observé que le mécanisme de dégradation thermique des PHA-mcl différait de celui des PHA-scl.[121] En effet, la coupure de chaîne s'effectue dans ce cas par hydrolyse du squelette PHA ; à 190°C, cette hydrolyse est suivie d'une déshydratation de l'alcool terminal formant ainsi une extrémité crotonique. Enfin, la préparation d'oligomères par chauffage micro-ondes a été étudiée sur différents types de PHA-scl et mcl.[113] Il a été montré que cette méthode permettait d'obtenir des oligo-

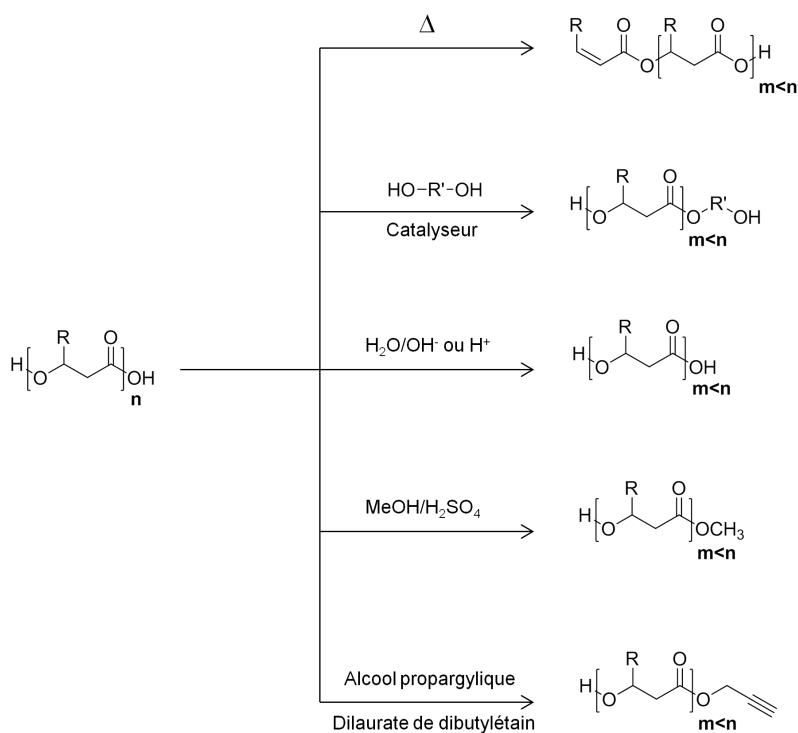


Figure 1.15: Structure des oligomères de PHAs obtenus après traitement thermique, transestérification par des diols, hydrolyse, méthanolyse et transestérification par l'alcool propargylique.

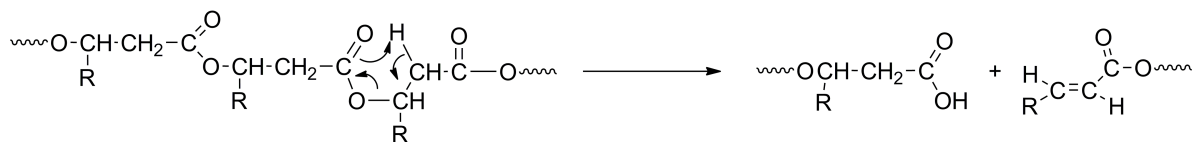


Figure 1.16: Mécanisme de β -élimination ou transposition de Mc Lafferty des PHA-scl.

mères de PHAs de faibles masses ($310 < \overline{M}_n < 1350 \text{ g.mol}^{-1}$) avec des temps de réaction très courts (15 min au plus). Cependant, il est à noter que les polymolécularités obtenues avec cette méthode sont plus importantes qu'avec un chauffage conventionnel. Ceci est attribué au caractère inhomogène du chauffage micro-ondes, générant un gradient de température et donc des vitesses de dégradation différentes selon les zones concernées.

Des oligomères dihydroxytélchéliques de PHB, PHBHV et de PHO ont été préparés par transestérification des polymères natifs de masse molaire élevée avec de l'éthylène glycol [115, 122] ou d'autres diols.[118, 123, 124] Les réactions avec l'éthylène glycol ont été les plus étudiées notamment par Hirt, et trois types d'extrémités ont été identifiés suivant le catalyseur, le solvant et la température employés.[114] La réaction optimisée produit majoritairement le dérivé dihydroxytélchélique dans le diglyme à 140°C, en utilisant du dilaurate de dibutylétain comme catalyseur. Les autres conditions testées conduisent à un mélange d'oligomères comportant des extrémités insaturées (dues à la déshydratation de l'alcool secondaire), acide carboxylique et diol. Récemment, Lemechko *et al.* ont mis au point une méthode de transestérification des PHAs par l'alcool propargylique afin de produire des oligomères de PHAs modifiables par chimie « click ».[116] Effectuée dans le chloroforme en présence de dilaurate de dibutylétain, cette réaction produit des oligomères de PHA-scl et -mcl de 2700 à 44500 g.mol^{-1} ; ces conditions permettent en outre l'obtention d'oligomères très bien définis, l'utilisation de chloroforme anhydre permettant de réduire considérablement les réactions secondaires d'hydrolyse.

Une autre méthode consiste à préparer des oligomères de PHB ou de PHBHV par hydrolyse.[117] Dans ces conditions, les produits obtenus sont constitués d'une extrémité hydroxyle et d'une extrémité acide carboxylique. Pour le PHO, plusieurs conditions d'hydrolyse ont été étudiées par Timbart *et al.*[119] Les résultats de ces travaux révèlent qu'en cas d'hydrolyse basique, la distribution des masses est bimodale; en cas de catalyse acide (APTS), la formation de macrocycles a été mise en évidence par MALDI-TOF.

Enfin, la méthanolyse réalisée en présence de méthanol et d'acide sulfurique a été employée pour la synthèse d'oligomères de PHB.[118, 125] Cette méthode permet d'obtenir des oligomères bien définis possédant une extrémité hydroxyle et une extrémité ester méthylique. C'est aussi une méthode de choix pour la synthèse d'oligomères de PHA-mcl bien définis, sans formation de sous produits.[119]

1.5 Synthèse de copolymères à base de PHAs

1.5.1 PHA-scl

1.5.1.1 Copolymères à blocs

La synthèse de copolymères à blocs peut être réalisée par condensation directe entre oligomères ou par polymérisation d'un monomère à partir d'un macromonomère. Cette dernière méthode implique l'utilisation d'un macromonomère de PHA, synthétisé par une des méthodes précédemment exposées. Ainsi, différents copolymères diblocs PHB-*b*-PCL [126] ou triblocs PCL-*b*-PHBHV-*b*-PCL [127] ont été synthétisés par polymérisation par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone sur un macromonomère de PHB ou de PHBHV. De la même manière des copolymères diblocs PHB-*b*-PLA, PHBHV-*b*-PLA, PHBHHx-*b*-PLA [126, 128, 129] ou triblocs PHB-*b*-PLA-*b*-PCL [130] ont été synthétisés par polymérisation par ouverture de cycle du lactide. Cette méthode permet l'obtention de copolymères bien définis, présentant une distribution unimodale. D'une manière générale, l'introduction de blocs PLA ou PCL de différentes longueurs permet de moduler les propriétés mécaniques et/ou les propriétés de dégradation du nouveau matériau. D'autres auteurs ont rapporté l'utilisation de l'ATRP pour la synthèse de copolymères triblocs à base de PHB.[131, 132] Après la dérivatisation d'un oligomère de PHB diol en macroamorceur di-bromé, Loh *et al.* ont rapporté la synthèse d'un copolymère triblocs poly(N-isopropylacrylamide)-*b*-PHB-*b*-poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm-*b*-PHB-*b*-PNIPAAm) par ATRP (Figure 1.17).[133] Grâce aux blocs PNIPAAm, ce copolymère hydrosoluble s'auto-associe en micelles de 139 à 550 nm au dessus de sa température critique inférieure de solubilité de 28-29°C (Lower Critical Solution Temperature, LCST).

Par ailleurs, des copolymères diblocs [125] et triblocs [134] ont été préparés par condensation d'un oligomère de PHB diol avec des segments de poly(éthylène glycol) (PEG) portant une extrémité méthoxy et une extrémité acide carboxylique, en présence de N-N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de 4-(diméthylamino)pyridine (DMAP). Cependant, cette méthode offre de faibles rendements et nécessite de fastidieuses étapes de purification.[135]

Enfin, des copolymères à blocs PHBHV-*b*-PEG et P3HB4HB-*b*-PEG ont été synthé-

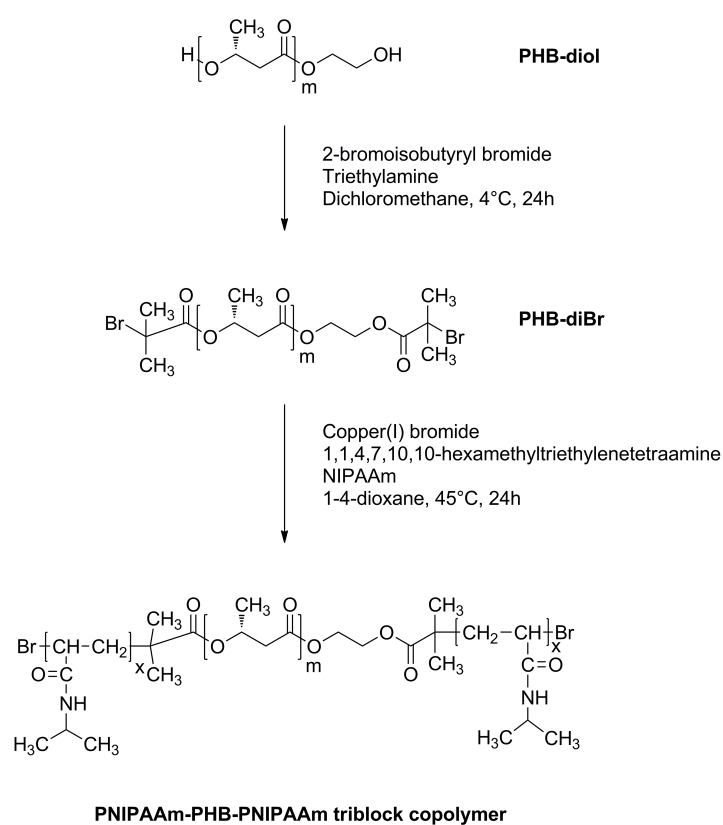


Figure 1.17: Synthèse de copolymères triblocs PNIPAAm-*b*-PHB-*b*-PNIPAAm par ATRP.[133]

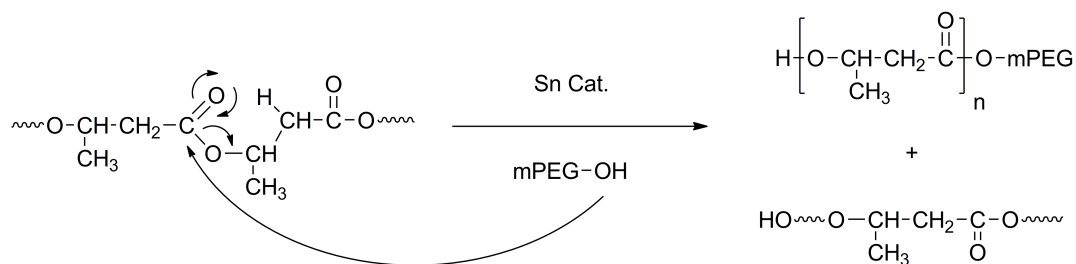


Figure 1.18: Réaction de transestérification entre du PHB et du PEG à 190°C.[135]
 Cette réaction est en compétition avec la dégradation thermique du PHA.

tisés par une méthode de transestérification mise au point par Ravenelle *et al.*. [135–138] Cette méthode implique la transestérification directe à 190°C à l'état fondu d'un polymère de PHA par un PEG portant une extrémité hydroxyle et une extrémité éther méthylique (Figure 1.18). Toutefois, cette méthode met en compétition deux réactions : la dégradation thermique du PHA par β -élimination et la transestérification du PHA par le PEG. Il en résulte que la longueur finale du bloc PHA est peu contrôlable et que les copolymères sont mal définis.

La préparation de copolymères multiblocs par formation de liaisons uréthane a largement été étudiée. Hirt *et al.* ont rapporté la synthèse de copolymères multiblocs comprenant des blocs « rigides » de PHB et des blocs « souples » de poly(ϵ -caprolactone) (PCL).[122] Des macromonomères de PHB-diol et de PCL-diol sont couplés grâce à l'utilisation d'un diisocyanate (Figure 1.19). Des copolymères de masses molaires en poids comprises entre 50000 et 152000 g.mol⁻¹ ont été obtenus sans l'aide de catalyseurs. Ces matériaux présentent de nouvelles propriétés mécaniques, avec une augmentation de la contrainte à la rupture et une diminution de l'élongation à la rupture en fonction de la proportion de PHB.

Des copolymères multiblocs à base de PHA-scl et de PCL,[122, 139] de PLA,[140, 141] de poly(butylène glycol adipate) [124] ou de PEG [142–146] ont été synthétisés de la même manière. Dans ce dernier cas, l'hydrophilie et les propriétés de dégradation du polymère sont aussi modifiées en plus des propriétés mécaniques. Par ailleurs, leur hémocompatibilité et leur biodégradabilité ont été démontrées, faisant donc de ces nouveaux polymères des candidats prometteurs comme nouveaux biomatériaux implantables.[147, 148] Enfin, des copolymères multiblocs alternés ont été synthétisés par Pan *et al.* [149]

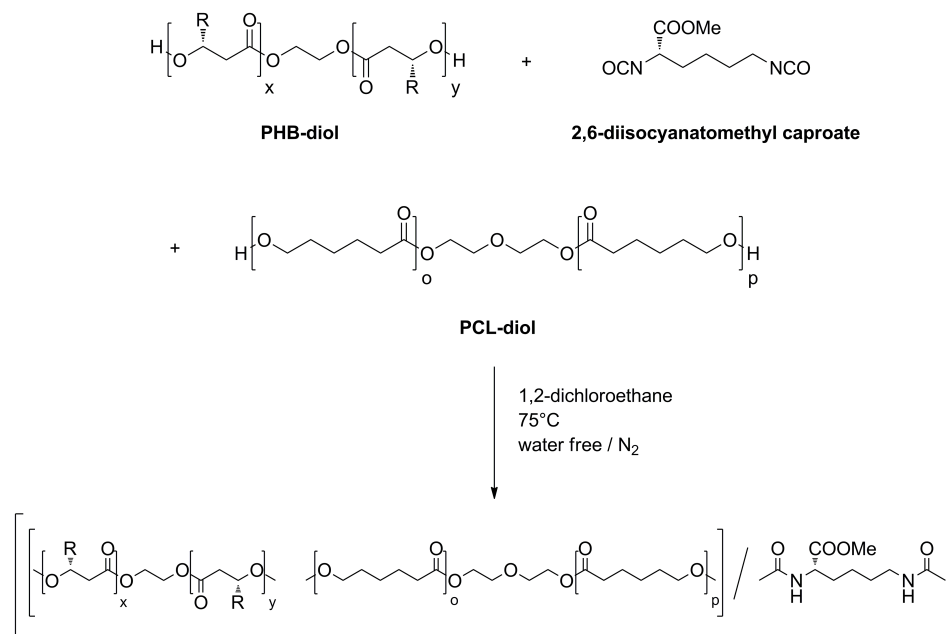


Figure 1.19: Synthèse de copolymères multiblocs à base de PHB et de PCL.[122]

(Figure 1.20).

Dans ce cas, le 1,6-hexaméthylène diisocyanate est tout d'abord couplé avec le polyéthylène glycol, puis le PEG-diisocyanate généré est couplé avec du PHB-diol ; cette stratégie assure donc la synthèse de copolymères à blocs parfaitement alternés. Le contrôle de l'architecture du matériau est par conséquent plus précis, permettant une meilleure compréhension des relations structure-propriétés.

1.5.1.2 Copolymères greffés

Les PHA-scl ne possédant pas de chaînes latérales pouvant être fonctionnalisées, une première approche pour synthétiser des copolymères greffés consiste à arracher le proton tertiaire en α de la chaîne latérale par voie radicalaire. Des copolymères greffés PHB et PEG ont ainsi été synthétisés en solution par réaction entre du PHB et du PEG diacrylate, générant un polymère réticulé plus hydrophile.[150, 151] Une autre approche consiste à ne greffer que sur la surface d'un matériau afin de moduler ses propriétés de surface sans altérer ses propriétés mécaniques. Du poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (PHEMA) a ainsi été greffé à la surface de films de PHBHV en utilisant plusieurs types

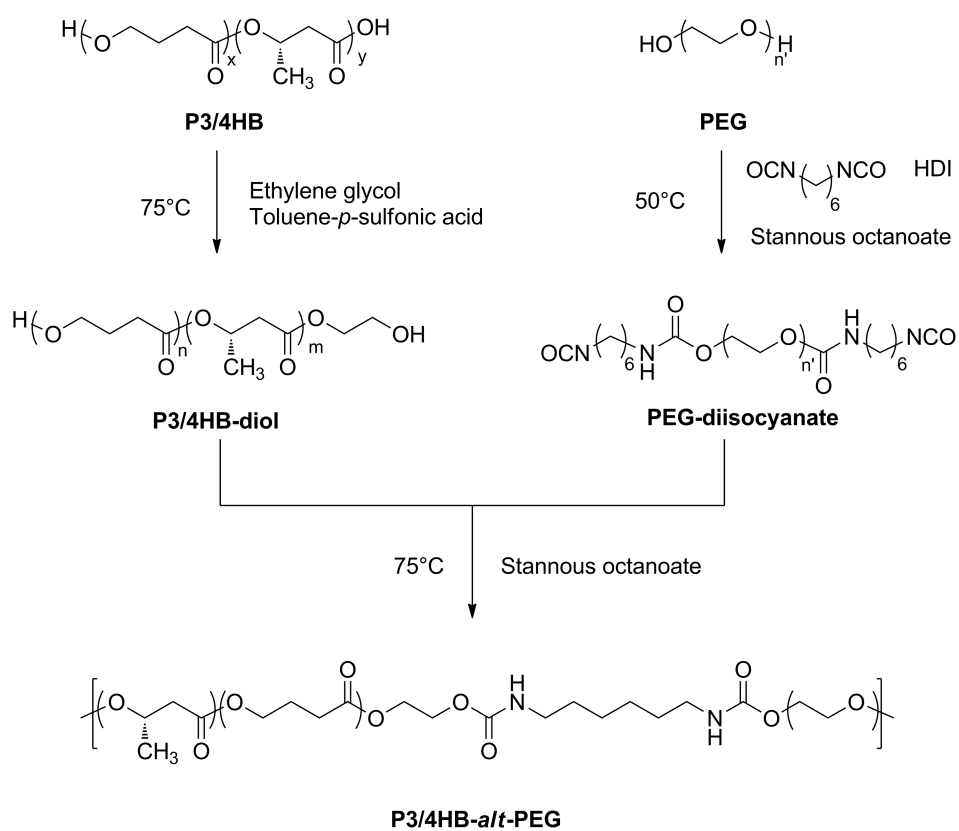


Figure 1.20: Synthèse de copolymères alternés à base de P3HB4HB et de PEG.[149]

de polymérisation : polymérisation radicalaire amorcée par voie thermique (peroxyde de benzoyle), par irradiation UV en présence d'eau oxygénée ou de benzophénone et également par polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP) pour contrôler la longueur des chaînes greffées.[152–154] Cette dernière méthode se fait à température ambiante et limite le greffage à la surface du film, tandis que les méthodes précédentes favorisent aussi un greffage plus en profondeur. Enfin, la polymérisation de 2-hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA) et d'acide méthacrylique (MAA) sur un film de PHBHV a récemment été rapportée grâce à une méthode photochimique impliquant l'utilisation d'hexafluoroantimonate de triarylsulfonium.[155] De plus, cette méthode a démontré son efficacité pour le micromatçage de la surface, permettant sa fonctionnalisation fine et ainsi le développement de microsystemes pour des applications dans le domaine biomédical (Figure 1.21).

Enfin, d'autres types de copolymères impliquent l'utilisation de PHAs comme greffons sur des squelettes de polysaccharides tels que la cellulose, le chitosan ou leur dérivés. Arslan *et al.* ont greffé des oligomères de PHBHV sur du chitosan par condensation entre l'extrémité acide carboxylique des PHAs et les fonctions amine du chitosan.[156] Ce greffage modifie les propriétés de solubilité comparé au chitosan, le copolymère devenant insoluble dans l'acide acétique à 2%. Récemment, divers oligomères de PHAs ont été greffés sur de la cellulose par condensation entre les extrémités acide carboxylique des PHAs, activées en chlorure d'acide par du chlorure de thionyle, et les alcools primaires de la cellulose (Figure 1.22).[157] Il a été montré que le caractère hydrophobe des films de cellulose était grandement amélioré après le greffage de PHAs.

1.5.2 PHA-mcl

Les PHA-mcl n'étant pas commerciaux, la littérature disponible concernant les copolymères à base de PHA-mcl est moins fournie que celle concernant les PHA-scl. Néanmoins plusieurs stratégies permettant de synthétiser des copolymères à blocs ou greffés ont été rapportées.

1.5.2.1 Copolymères à blocs

Andrade *et al.* ont rapporté la synthèse de copolymères multiblocs PHB-PHOHHx.[158] Des macromonomères de PHB-diol (segment « rigide ») et de PHOHHx-diol (seg-

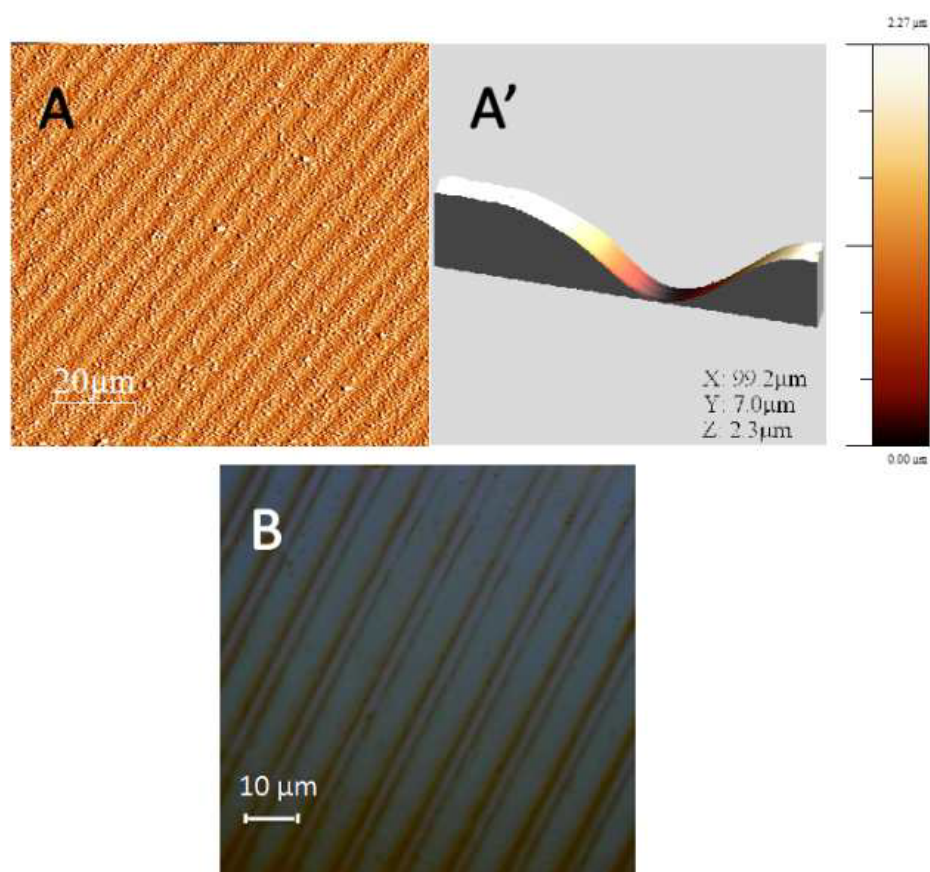
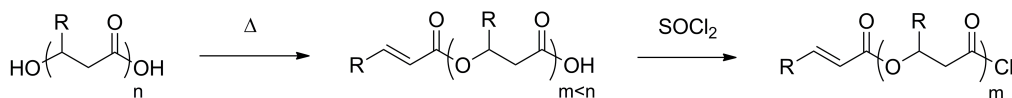


Figure 1.21: Micromatrigage de films de PHBV (A) image AFM (A') profil du film et (B) image par microscopie optique après 400 s d'irradiation.[155]

1ère étape: préparation de l'oligomère fonctionnalisé



2ème étape: condensation des oligomères fonctionnalisés sur la cellulose

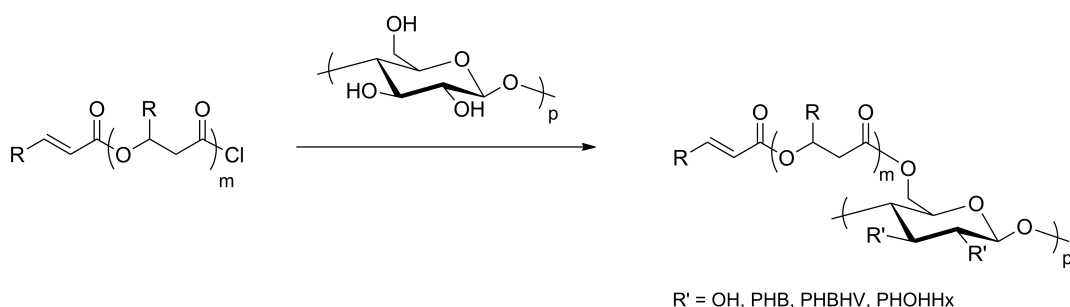


Figure 1.22: Condensation de greffons de PHAs sur des films de cellulose.

ment « souple ») ont été couplés grâce à l'utilisation d'un diisocyanate en présence dilaurate de dibutyl étain comme catalyseur. Le matériau résultant possède une \overline{M}_n de 10600 g.mol^{-1} et comporte environ 2 unités PHOHHx-diol, 2 unités PHB-diol et 5 unités L-lysine méthyl ester diisocyanate (LDI) ; il possède ainsi des propriétés mécaniques et thermiques intermédiaires entre le PHB et le PHOHHx pur. Le même copolymère a aussi été préparé par couplage des PHAs diols avec un dichlorure d'acide (chlorure de téréphtaloyle).[159] Enfin, Dai *et al.* ont rapporté une synthèse « verte » de copolymères PHB-PHO grâce à une condensation de PHO-diol et PHB-diol par voie enzymatique (Figure 1.23).[160]

La condensation enzymatique, réalisée grâce au Novozym® 435 (*Candida antarctica* lipase B immobilisée), permet la synthèse de copolymères multiblocs statistiques ou alternés suivant les conditions d'introduction des réactifs. Les copolymères obtenus possèdent des masses molaires équivalentes à celles des copolymères synthétisés par voie chimique.

La synthèse de copolymères à blocs peut également provenir de la polymérisation par ouverture de cycle d'un monomère à partir d'un macromonomère de PHA. Timbart *et al.* ont rapporté la synthèse d'un copolymère à blocs PHO-*b*-PCL par l'ouverture de cycle

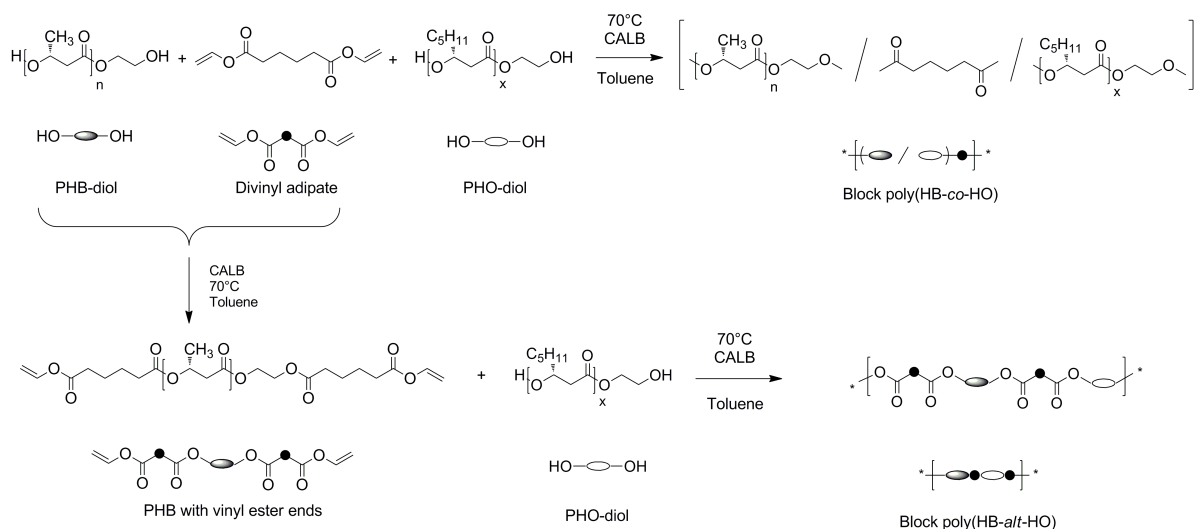


Figure 1.23: Préparation de copolymères multiblocs et alternés à base de PHB-diol, PHO-diol et d'adipate de divinyle par condensation enzymatique (*Candida antarctica* lipase B, CALB).

de l' ϵ -caprolactone en utilisant des macromonomères de PHA-mcl méthanolysés.[161] Les blocs de PHOHH_x ont des masses molaires comprises entre 800 et 20000 g.mol⁻¹ et celle des blocs PCL varie de 12000 à 47700 g.mol⁻¹. Enfin, des copolymères similaires ont été synthétisés de la même manière à partir de macromonomères de PHOU, portant des insaturations en chaînes latérales, permettant ensuite leur oxydation en fonctions acide carboxylique et la formation de copolymères P((HO-COOH)-*b*-CL).[119] Il a été montré que les films de P((HO-COOH)-*b*-CL) s'hydrolysaient plus rapidement que les films de P(HO-*b*-CL) à pH 7.

1.5.2.2 Copolymères greffés

La synthèse de ce type de copolymères peut être réalisée soit par greffage de chaînes préformées sur la chaîne principale (méthode « grafting onto ») soit par polymérisation de monomères à partir de la chaîne principale (méthode « grafting from »). La méthode « grafting onto » ne permet cependant pas de coupler de grandes chaînes de polymère.

Les doubles liaisons portées par les PHA-mcl fonctionnalisés ont été utilisées pour réaliser des réactions de greffage par voie radicalaire par amorçage thermique, par irradiation gamma ou UV.[162, 163] Ces réactions sont relativement faciles à mettre en

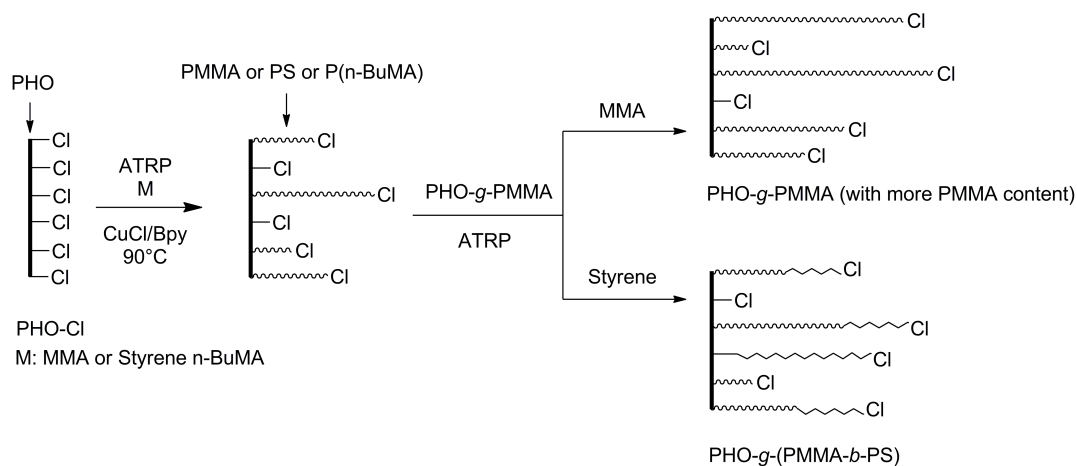


Figure 1.24: Synthèse de copolymères greffés PHO-*g*-PMMA, PHO-*g*-PS, PHO-*g*-PBMA et PHO-*g*-(PMMA-*b*-PS).

œuvre mais les produits obtenus sont mal définis car les réactions conduisent souvent à des produits insolubles en raison de réactions de réticulation. Eroglu *et al.* [164] ont utilisé les radiations gamma afin de greffer du méthacrylate de méthyle (MMA) sur du poly(3-hydroxynonanoate) (PHN); le copolymère P(HN-*g*-MMA) ainsi formé possède une meilleure résistance mécanique que le PHN. La contrainte à la rupture passe de 1,4 MPa pour le PHN à 42,4 MPa pour le copolymère contenant 50% de MMA. Du MMA a par ailleurs été greffé sur les insaturations d'un PHA fonctionnalisé grâce à un amorçage thermique (peroxyde de benzoyle).[165] Arslan *et al.* ont rapporté la synthèse d'un PHO modifié par ATRP.[166] En utilisant la méthode énoncée dans la partie 1.4.2.1, le PHO a été chloré sur sa chaîne principale. Les atomes de chlore ont alors été utilisés pour polymériser par ATRP des monomères de méthacrylate de méthyle (MMA), de styrène (S) ou de n-butyl méthacrylate (BMA) (Figure 1.24).

Il est par ailleurs possible de faire re-réagir les copolymères PHO-*g*-PMMA afin d'augmenter leurs longueurs de chaînes (greffage de MMA) ou bien de copolymériser un autre monomère (greffage de PS). Enfin, il est à noter que cette méthode de greffage cause une forte diminution de la masse molaire, les copolymères ayant une \overline{M}_n comprise entre 1570 et 7710 g.mol⁻¹ alors que les précurseurs chlorés présentent une \overline{M}_n comprise entre 29450 et 64590 g.mol⁻¹.

Hany *et al.* ont décrit la synthèse de copolymères greffés « en peigne » à partir de

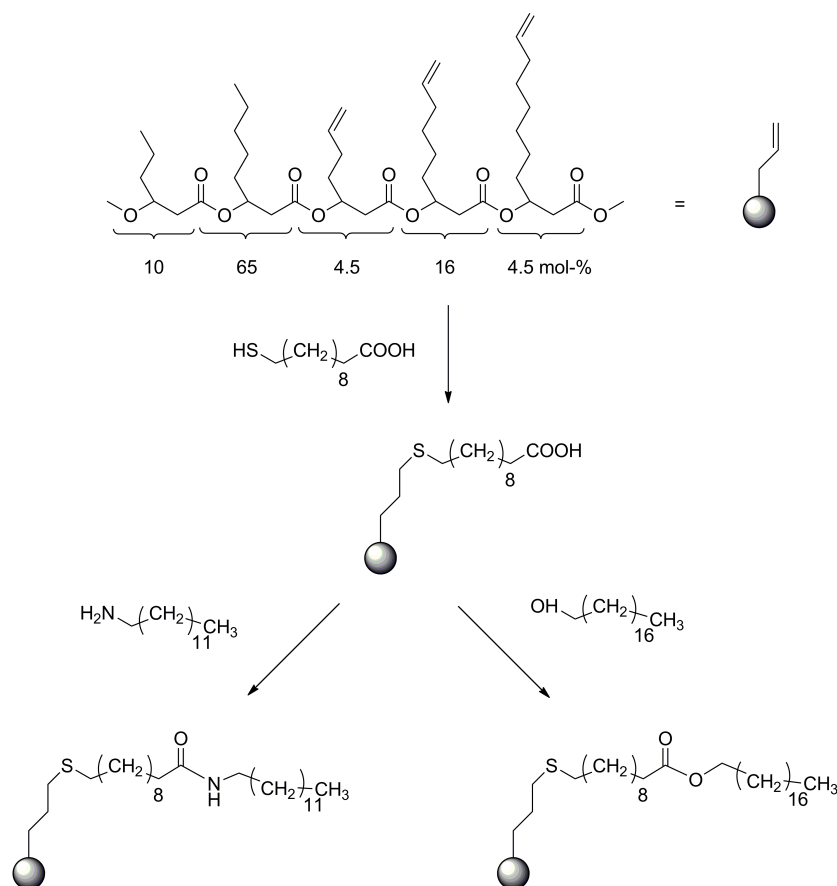


Figure 1.25: Synthèse de copolymères greffés « en peigne » à base de PHOU.

PHOU par addition thiol-ène d'acide 11-mercaptoundécanoïque (Figure 1.25).[167] L'addition radicalaire du composé thiolé se fait par addition anti-Markovnikov sur les doubles liaisons du PHOU dans le toluène en présence d'AIBN. Par la suite, le groupement acide carboxylique est soit estérifié avec de l'octadécane soit amidifié avec de la tridécylamine afin d'augmenter la longueur de la chaîne. Le copolymère obtenu est semi-cristallin et la diffraction des rayons X permet de mettre en évidence la présence d'une structure organisée en deux phases, l'une riche en polyéthylène, l'autre constituée de domaines de PHA.

En utilisant la même méthode, du 11-mercapto-1-décane a été greffé sur PHOU, permettant par la suite le greffage par estérification d'acide cinnamique et d'acide zostérique.[168] Il en résulte un matériau non-toxique possédant des propriétés antisalissures.

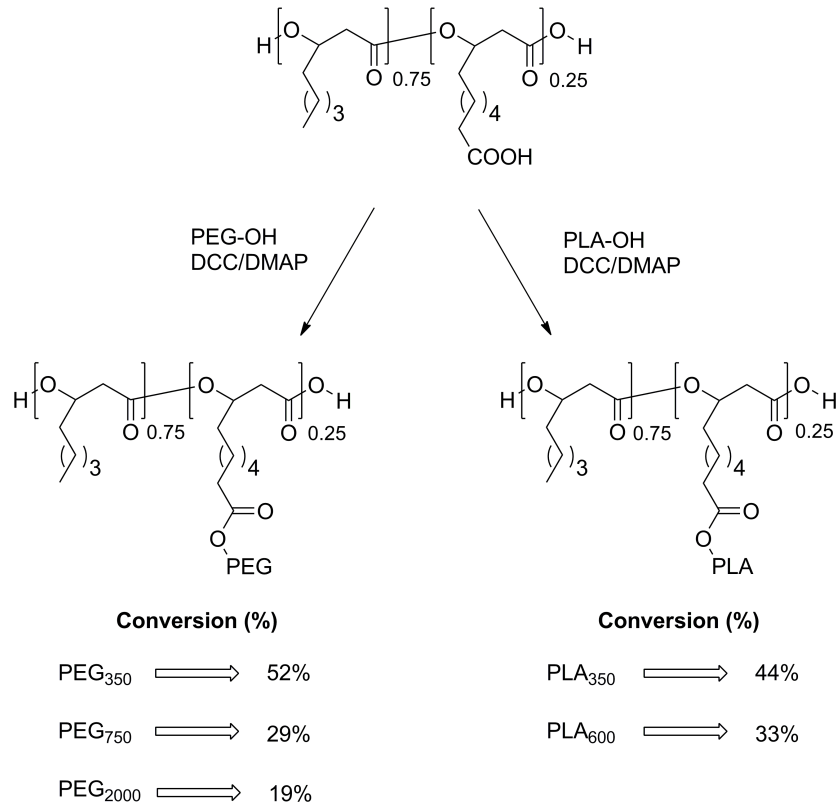


Figure 1.26: Greffage d'oligomères de PEG et de PLA sur du PHO-COOH et taux de conversion en fonction de la masse molaire de l'oligomère greffé.

Le PHOU a également été greffé par du silsesquioxane polyhédral thiolé (POSS-SH) par addition thiol-ène.[169] Il a été montré que l'introduction de tels groupements conférerait au matériau un effet mémoire de forme.[170]

Enfin, des copolymères greffés ont également été obtenus par des réactions d'estérification entre les fonctions COOH réactives introduites sur les chaînes latérales de PHOU et des oligomères de PLA et de PEG (Figure 1.26).[171–173] Ces couplages sont effectués par l'utilisation de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de diméthylaminopyridine (DMAP). Le taux de conversion est directement relié à la masse molaire de l'oligomère couplé; en effet, celui-ci passe de 52% pour le greffage d'un oligomère de PEG de 350 g.mol⁻¹ à 19% pour le greffage d'un oligomère de PEG de 2000 g.mol⁻¹.

1.6 Applications des PHAs dans le domaine biomédical

Depuis environ trente ans, les applications impliquant l'utilisation de PHAs sont en constante progression. Grâce à leur biodégradabilité, les premières applications concernaient principalement l'emballage, avec l'élaboration de bouteilles de shampoing, d'emballages de produits cosmétiques, mais ils ont aussi été utilisés comme hydrophobisant pour papier, carton et couches de bébés, ou bien encore comme produits d'utilisation courante comme des peignes ou des stylos.[174–177]. Ce n'est que plus récemment que l'attention s'est portée sur l'utilisation des PHAs dans le domaine biomédical, tirant parti de la biocompatibilité de ces polymères. Les principales applications biomédicales impliquant l'utilisation de PHAs sont l'ingénierie tissulaire (implants, valves cardiaques, guides, support de régénération osseuse ou cartilagineuse, stents...) et la libération contrôlée de principes actifs.

1.6.1 Ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire (tissue engineering) est un domaine en pleine évolution, à la recherche de nouveaux biomatériaux pouvant apporter des solutions durables aux dommages tissulaires. L'approche de base nécessite la complémentarité des cellules, d'un support et de facteurs bioactifs. Par exemple pour la régénération de tissus cartilagineux, des chondrocytes (cellules responsables de la formation du cartilage) sont placés dans un support biodégradable macroporeux de poly(acide lactique-*co*-glycolique) possédant de l'acide hyaluronique greffé en surface, celui-ci étant un facteur de croissance des chondrocytes.[178] Le support doit idéalement présenter les propriétés suivantes : [179]

- Se dégrader de façon contrôlée.
- Promouvoir l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules ainsi que la production de matrice extracellulaire (à base de collagène).
- Permettre la diffusion des nutriments nécessaires aux cellules et l'évacuation des déchets.
- Adhérer aux tissus environnants.
- Pouvoir combler intégralement le défaut.
- Avoir les mêmes propriétés mécaniques que le tissu remplacé.

Les PHAs ont principalement été utilisés dans l'ingénierie tissulaire cardiovasculaire (valves, greffons), comme guide pour la croissance de nerfs, pour l'ingénierie tissulaire osseuse ou du cartilage (Figure 1.27).

1.6.1.1 Ingénierie tissulaire cardiovasculaire

Actuellement, le principal défaut concernant la chirurgie des valves cardiaques est dû au fait qu'aucun des matériaux utilisés ne permet la croissance cellulaire et donc la régénération des tissus. Plusieurs interventions chirurgicales sont donc parfois nécessaires, spécialement sur les patients les plus jeunes.[180] L'ingénierie tissulaire s'intéresse donc au développement de matériaux capables non seulement de prendre la forme et la fonction de valves cardiaques, mais aussi permettant l'ensemencement de cellules capables de régénérer les tissus. Différents matériaux tels que l'acide poly(glycolique) (PGA) [181, 182] l'acide poly(lactique) (PLA) [181] ou la polycaprolactone (PCL) [183] ont été utilisés pour l'élaboration de valves cardiaques. Comparés au PGA et au PLA, les PHA-mcl sont plus flexibles et donc plus adaptés à la fonction de valve. Sodian *et al.* ont étudié l'implantation d'une valve en PHOHHx ensemencée de cellules autologues chez l'agneau.[184] Après 120 jours d'implantation, aucune thrombose n'a été détectée mais une légère sténose a été observée. Les résultats ont été améliorés en utilisant un mélange de PGA et de PHOHHx; dans ce cas l'implant se montre parfaitement fonctionnel 6 mois après l'implantation, sans formation de thrombose ou de sténose.[185] D'autres auteurs ont utilisé du PHB imprégné sur une matrice tissulaire aortique de porc générant ainsi une valve hybride biomatrice/polymère. Dans ce cas, les valves présentent d'excellentes propriétés biologiques, démontrant par exemple une résistance élevée à la coagulation plasmatique ainsi qu'à la calcification.[186] Enfin, il a été montré que des valves à base de PGA et de P(4-HB) voyaient leur volume augmenter de 19 à 23 mm après leur implantation *in vivo* chez l'agneau, ceci suivant la croissance de l'animal.[187] Ces résultats sont donc très encourageants pour le développement de valves cardiaques destinées à l'enfant, capables de s'adapter à leur croissance.

Les greffes vasculaires sont une alternative intéressante pour beaucoup de pathologies cardiaques. En effet, alors que les gros vaisseaux peuvent être remplacés par des matériaux généralement à base de PTFE, les vaisseaux de faibles diamètres (< 6 mm) posent des problèmes d'endothélialisation incomplète ou de survenue de thrombose.[188]

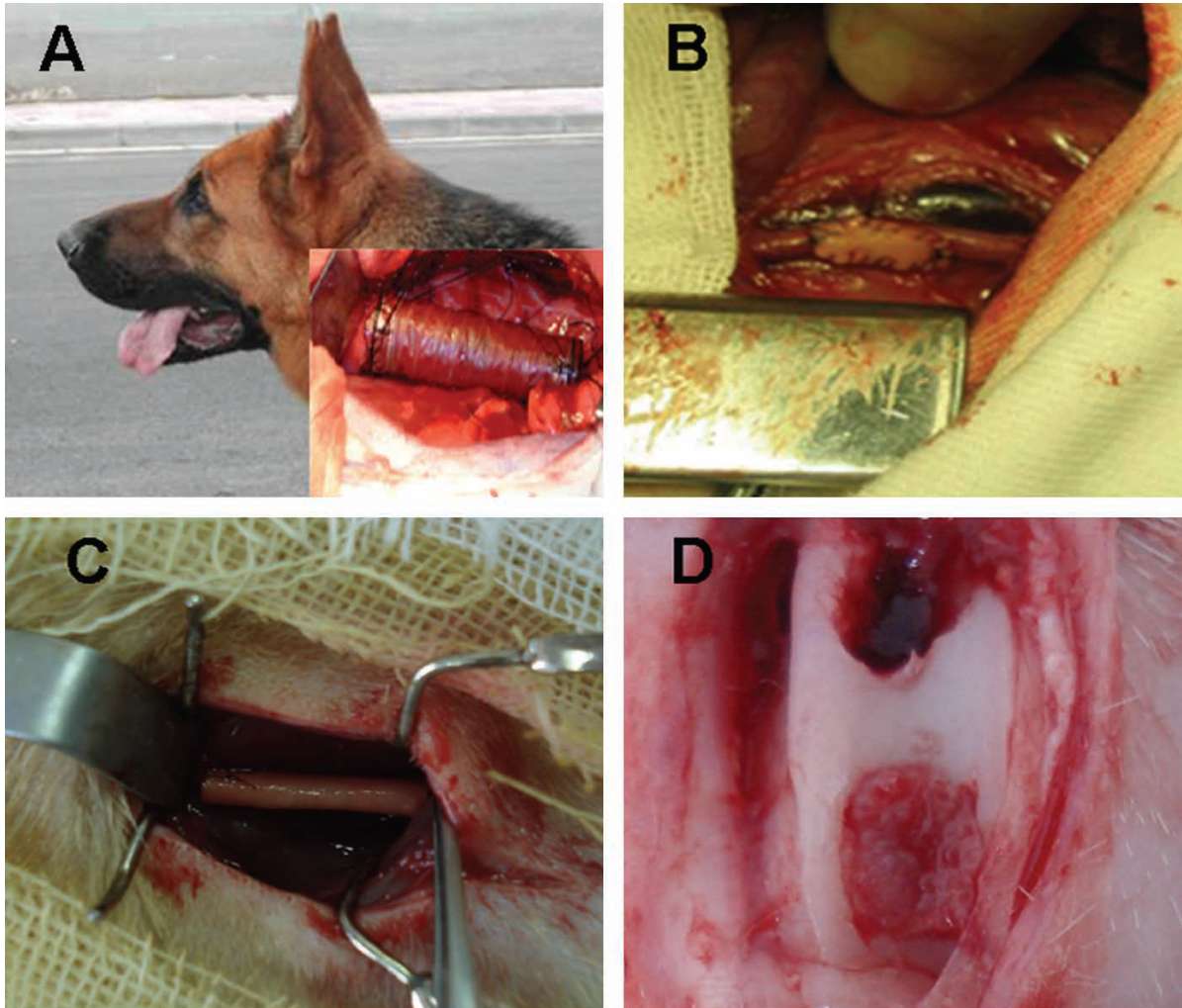


Figure 1.27: Différentes applications des PHAs dans l'ingénierie tissulaire : (A) oesophage artificiel, (B) greffon vasculaire, (C) conduit pour la croissance de nerfs, (D) cartilage artificiel.

Stock *et al.* ont rapporté la fabrication de greffons poreux de P(4HB)ensemencés de cellules autologues vasculaires ovines. Ces greffons ont ensuite été implantés sur une artère pulmonaire de mouton. Après 169 jours, une résorption quasi complète du polymère ainsi que la formation de nouveaux tissus fonctionnels a été observée, sans formation de thrombose, sténose ou dilatation.[189] De plus, des greffons de PGA-PHOHHx ensemencés par des cellules autologues ont été implantés chez l'agneau.[190] Après 5 mois, aucun des vaisseaux ne s'est bouché et aucun anévrisme n'a été détecté. Enfin, des tests de traction-allongement ont montré que les propriétés mécaniques du vaisseau greffé avec du PGA-PHOHHx se rapprochaient de celles de vaisseaux natifs.

1.6.1.2 Guides pour la croissance de nerfs

De nos jours, la technique utilisée pour la reconstruction nerveuse implique le greffage de nerfs autologues, ce qui présente d'inévitables inconvénients tels que l'utilisation excessive de la chirurgie. Le développement de conduits artificiels pour favoriser la croissance nerveuse apparaît donc comme une solution intéressante. Un conduit biodégradable idéal doit permettre de conserver l'intégrité des tissus, de favoriser la communication intercellulaire et donc la croissance cellulaire lors du processus de régénération.[191] Des conduits de PHB ont été utilisés avec succès pour la reconstruction d'une partie d'un nerf sciatique de rat de 10 mm.[192] Une bonne régénération ainsi qu'une bonne biocompatibilité ont été observées. Afin d'améliorer encore la régénération, la surface interne de conduits de PHB a été couverte de matrice extracellulaire, de cellules de Schwann ou de facteurs de croissance.[193–196] Les cellules de Schwann se sont développées à la surface du PHB et ont conservé leurs propriétés favorisant la croissance nerveuse. Cette dernière méthode s'est révélée optimale pour la régénération nerveuse.[195]

1.6.1.3 Reconstruction osseuse

Les os devant présenter une forte résistance mécanique, la recherche s'est principalement concentrée sur l'étude de PHA-scl tels que le PHB ou le PHBHV. De plus, l'adjonction d'hydroxyapatite (HA), constituant de la matrice osseuse (60-70%), est communément utilisée comme élément additionnel aux biomatériaux. Des études *in vitro* ont montré que les propriétés mécaniques des composites pouvaient être ajustées en contrôlant la quantité d'HA.[197–200] Galego *et al.* [201] ont montré qu'un composite P(HB-co-8%HV)/HA

(30% en poids) avait une résistance à la compression de 62 MPa, celle-ci étant du même ordre de grandeur que celle de l'os humain. Il a par ailleurs été démontré qu'en utilisant des mélanges PHB/HA contenant de 10 à 20% de HA, la croissance et la prolifération d'ostéoblastes de moëlle osseuse était optimale.[202] L'utilisation d'une matrice de PHBHV renforcée avec des nanoparticules de HA a par ailleurs démontré une meilleure réponse inflammatoire ainsi que de meilleurs taux de minéralisation.[203] Enfin, différentes études *in vivo* sur des matrices de PHB et de PHB/HA ont démontré que le matériau favorisait la régénération osseuse tout en prévenant toute inflammation chronique pendant 12 mois ; un nouveau tissu osseux fortement organisé s'est rapidement développé.[204, 205]

1.6.1.4 Reconstruction cartilagineuse

Le tissu cartilagineux, exclusivement constitué de chondrocytes, recouvre l'extrémité des os formant une jonction. Ce tissu a la particularité de posséder la plus faible densité cellulaire parmi les tissus constituant le corps humain. Une fois endommagé, il a une très faible capacité d'auto-guérison, ce qui provoque de l'arthrose et une perte de mobilité. Afin de régénérer le cartilage abimé, des structures tridimensionnelles poreuses peuvent être utilisées afin de fournir un environnement biochimique et biomécanique approprié à la prolifération cellulaire et au développement des tissus. L'efficacité de cet environnement peut être évaluée en suivant la prolifération cellulaire ainsi que la production de matrice extracellulaire. Il a été montré *in vitro* que les chondrocytes proliféraient tout en gardant leur phénotype sur du PHB, du PHBHHx, un mélange PHBHHx/PHB ainsi que du PHBHV.[206, 207] Les structures à base de mélange PHBHHx/PHB sont celles qui permettent la meilleure croissance et prolifération cellulaire.[208] Le PHBHHx a un effet positif sur la production de matrice extracellulaire ; il a été montré par microscopie multiphotons par génération de seconde harmonique ainsi que par microscopie confocale à fluorescence que le mélange PHBHHx/PHB possédait les meilleures propriétés de surface pour l'ancrage de filaments de collagène de type II ainsi que pour leur pénétration dans la structure tridimensionnelle.[209] La réparation de cartilage *in vivo* a été investiguée grâce à l'utilisation de matrices de PHBHV et comparée à un mélange collagène/phosphate de calcium. Il a ainsi été démontré que les matrices de PHBHV favorisaient la formation précoce de tissus cartilagineux, et que la régénération tissulaire

était plus prononcée qu'avec le mélange collagène/phosphate de calcium.[210] Enfin, des matrices tridimensionnelles de PHBHHxensemencées de chondrocytes ont été implantées dans une articulation endommagée de lapin.[211] Après 16 semaines, du nouveau tissu cartilagineux s'est développé dans l'articulation, et aucun effet secondaire n'a été constaté. Cependant, une étude sur des temps d'implantation plus importants est nécessaire afin de suivre la dégradation du matériau ainsi que les effets potentiels des produits de dégradation sur les tissus régénérés.

1.6.2 Libération contrôlée de principes actifs

Les polymères sont largement employés dans le domaine pharmaceutique et entrent dans la composition de différentes formes galéniques comme les comprimés, les capsules, où ils sont utilisés en tant qu'excipients, adjuvants ou agents émulsifiants.[212] L'administration conventionnelle du principe actif (PA) d'un médicament consiste à le mettre à disposition de l'organisme de manière directe ; il se distribue alors *in vivo* en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques (polarité, masse molaire...). L'efficacité de ce mode d'administration peut être limitée par la stabilité, la solubilité ou la toxicité des principes actifs. L'intérêt de la vectorisation consiste à protéger le PA de la dégradation et du milieu environnant et de le distribuer en quantité suffisante sur son site d'action.[213] Les systèmes de vectorisation doivent donc permettre d'encapsuler un principe actif et de le libérer de manière contrôlée au cours du temps afin de limiter les effets secondaires et les prises répétées du médicament.[214, 215] Les critères principaux qui définissent les caractéristiques d'un vecteur idéal sont les suivants : [216, 217]

- délivrer le médicament au moment et à l'endroit approprié dans l'organisme.
- éviter (pour une durée équivalente) des injections répétées de PA et donc améliorer l'observance des patients (Figure 1.28).
- être biocompatible, biodégradable et non toxique.
- être capable d'incorporer des quantités suffisantes de PA permettant une action efficace.
- assurer le franchissement des barrières biologiques.

De nombreux systèmes d'encapsulation ont été mis au point, leurs différences résidant dans leur mode de préparation, la nature des composés utilisés, la voie d'administration et le mode de libération du principe actif (diffusion, bio-érosion, système gonflant,

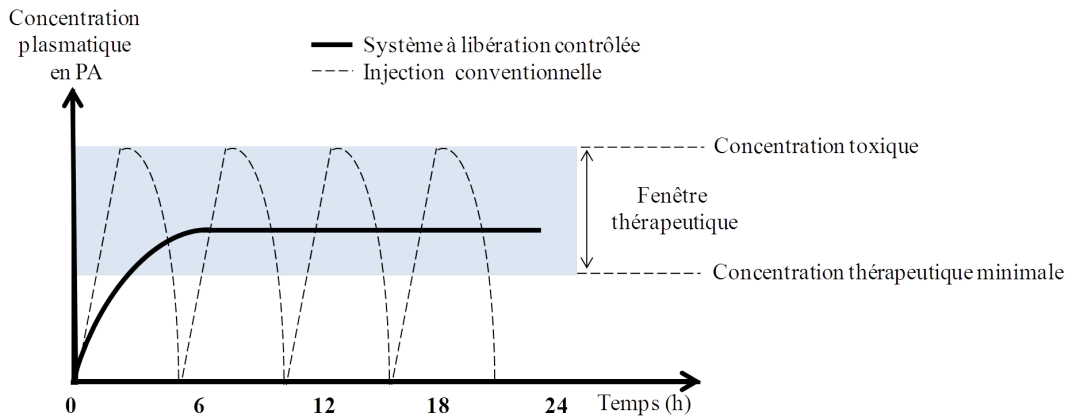


Figure 1.28: Evolution de la concentration en principe actif (PA) au niveau du site d'action en fonction du temps. Pointillés : profil de délivrance lors de l'administration répétée de PA. Trait plein : système de délivrance idéal.

système osmotique). De plus, le contrôle de la dégradation de la matrice permet une libération contrôlée du principe actif afin d'éviter l'effet de toxicité lié à une libération trop rapide et trop importante. La cristallinité et la nature chimique du polymère influencent également ces propriétés telles que la vitesse et le mécanisme de dégradation, la biocompatibilité, la diffusion et la libération du médicament.

L'utilisation de polymères à base de PHAs comme systèmes de libération contrôlée de principes actifs est envisagée depuis le début des années 90.[213] En effet, en plus d'être biodégradables et biocompatibles, les produits de dégradation des PHAs ne sont pas toxiques et peuvent être facilement éliminés par l'organisme. Les PHAs sont utilisés sous forme de particules (micro ou nanoparticules), de comprimés ou sous forme de patchs pour une libération transdermique.

1.6.2.1 Les implants

Les PHAs peuvent être utilisés sous forme d'implants capables de relarguer un principe actif. Korsatko *et al.* ont étudié la libération *in vitro* et *in vivo* de la 7-hydroxyéthylthéophylline (analeptique cardiaque ou respiratoire) à partir d'implants à base de PHB préparés par compression en présence de l'agent thérapeutique.[218, 219] La libération *in vitro* dépend du taux d'encapsulation. Si l'implant contient 60 à 80% de principe actif, la libération intervient en 24h ; s'il en contient 5 à 30%, la libération se fait sur 50 jours.

Dans le second cas, la différence de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de l'implant n'est pas suffisante pour induire un gradient de diffusion élevé. La libération du principe actif est donc plus lente. De plus, il a été montré que la libération *in vivo* était plus lente, l'implant étant placé sous la peau de l'animal ; ceci est lié à la faible quantité d'eau présente autour de l'implant limitant la diffusion du principe actif. D'autres études ont notamment porté sur l'emploi de PHBHV dans le cadre du traitement de l'ostéomyélite chronique.[220–222] L'objectif est de lutter contre les foyers infectieux difficilement accessibles aux antibiotiques dans le cas des ostéomyélites où l'administration systémique d'antibiotiques peut être inefficace à cause d'une vascularisation défectueuse. L'antibiotique est intégré dans des bâtonnets de PHBHV (22%HV) qui sont implantés dans le tibia d'un lapin infecté par *Staphylococcus aureus*. Il a été montré que le principe actif relargait complètement après une semaine ; le temps de relargage a été augmenté à 2 semaines en effectuant un revêtement des bâtonnets incorporant le principe actif avec du PHBHV. Il a par ailleurs été montré que l'infection était réduite au 15^{ème} jour d'implant et que la guérison était complète après un mois (Figure 1.29).

Du PHBHV, PHO, PHO-COOH et PHBHV-*b*-PLA contenant du sirolimus (un agent anti-proliférant), ont été déposés sur des stents métalliques.[223] Le sirolimus est relargué avec un très fort effet « burst » avec plus de 80% de relargage en quelques heures sauf pour le copolymère PHBHV-*b*-PLA où l'effet est moins prononcé. Cependant, il a été montré qu'en rajoutant une couche de PHBHV ne contenant pas de principe actif, sa libération est fortement ralentie.

Les PHAs ont aussi été utilisés comme système de délivrance transdermique.[224] Le système étudié est composé d'une matrice de PHOHHx renfermant de la tamsulosine (α -bloquant utilisé dans le traitement de l'hypertrophie de la prostate). La matrice est obtenue par mélange du PHA et de l'agent thérapeutique puis moulée sous forme d'une plaque. Un dendrimère de polyamidoamine est ajouté à la matrice pour améliorer la pénétration de la tamsulosine. La libération de la tamsulosine à travers la matrice de PHA est de $24 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$, ce qui correspond à la vitesse de libération requise ($20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$). D'autres études ont également porté sur des systèmes contenant du kétoprofène (un anti-inflammatoire) et de la clonidine (un anti-hypertenseur). Dans tous les cas, les résultats montrent que les PHAs se révèlent être de bons systèmes pour ce type d'applications.[225]

Enfin, des gels à base de PHO greffé avec du monoacrylate de poly(éthylène glycol)



Figure 1.29: Radiographie d'un tibia de lapin infecté par *Staphylococcus aureus* après implantation d'un batonnet de PHBVH contenant un antibiotique. (A) 1^{er} jour d'implant, les signes de l'infection sont marqués par les flèches blanches. (B) 30^{ème} jour après implant, les tissus sont redevenus normaux.

(PEGMA-*g*-PHO) ont été utilisés pour étudier le relargage d'une molécule modèle, l'ibuprofène.[226] Il a été montré que la cinétique de relargage dépendait du taux de greffage en PEGMA. Il est important de noter qu'alors que les PHA-scl présentent un fort effet « burst » dû à leur forte cristallinité, ce système à base d'un PHA-mcl, le PHO, permet une libération constante d'ibuprofène en 9 jours sans effet « burst ».

1.6.2.2 Les micro/nanoparticules

Les PHAs sont aussi utilisés dans le domaine de l'encapsulation sous forme de microparticules ou de nanoparticules. Des microsphères de PHB chargées en rifampicine, un antibiotique, ont été testées comme agent de chimio-embolisation contre les embolies cancéreuses.[227, 228] Les embolies sont caractérisées par la migration d'un composant anormal (embole), qui se retrouve dans la circulation sanguine. L'embole peut être un caillot qui obture une artère plus ou moins grosse, ou il peut s'agir d'un embole de cellules cancéreuses stoppées dans des vaisseaux sanguins de petits calibres (capillaires), donnant alors naissance à une métastase. Afin de provoquer la nécrose de la tumeur, un matériau solide peut être délibérément injecté pour boucher l'artère nourricière principale d'une tumeur (embolisation) afin de la priver d'apport sanguin. La technique de chimio-embolisation combine à la fois la technique de l'embolisation et celle de la chimiothérapie. Des microsphères de PHB ont été employées dans cet objectif. Les microsphères sont préparées par la technique d'émulsion-évaporation de solvant avec l'alcool polyvinylique comme émulsifiant, l'eau comme milieu dispersant et le dichlorométhane comme solvant. La taille des microsphères obtenues est comprise entre 5 et 100 μm mais elles peuvent être séparées par centrifugation. Il a été montré que la vitesse de libération du principe actif, la rifampicine, est très élevée ; en effet, 90% du principe actif est relargué en 24h.

Sendil *et al.* [229] ont rapporté un comportement similaire en utilisant des microsphères et des microcapsules de PHBHV chargées avec de la tétracycline (antibiotique) sous ses formes acide et neutre. Cette dernière s'encapsule mieux que la forme acide (52 à 65%) ; cependant, une libération très rapide est observée dans les deux cas sans signe de dégradation du polymère.

Afin de ralentir la cinétique de relargage, des microsphères composites PHBHV/wollastonite encapsulant de la gentamicine ont été synthétisées.[230] Il a été montré que l'in-

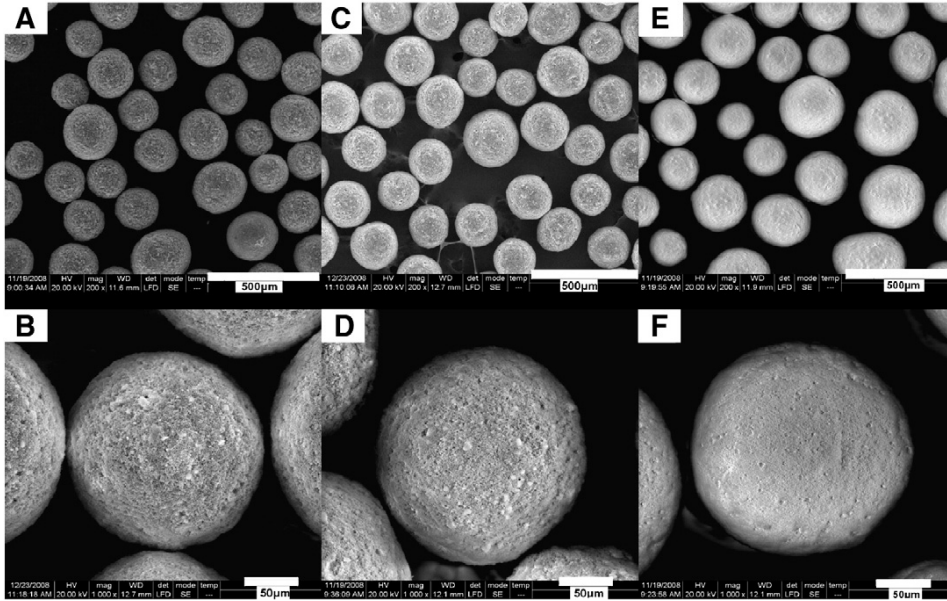


Figure 1.30: Images en microscopie électronique à balayage. (A) et (B) : microsphères de PHBV/HA-AL (30%HA) ; (C) et (D) microsphères de PHBV/HA-AL (50%HA) ; microsphères de PHBV pur. (A, C et E : x200 ; B, d et F : x1000). HA : hydroxyapatite ; AL : alendronate.[231]

corporation de wollastonite permettait de ralentir la vitesse de diffusion du principe actif dans du tampon phosphate salin (PBS). En effet, 90% du principe actif est relargué en 22 jours, contre 8 jours pour des microsphères de PHBV pur. Une stratégie similaire a été employée par Huang et al. [231] grâce à l'incorporation d'hydroxyapatite (HA) dans des microsphères de PHBV (Figure 1.30). Malgré un léger effet burst les 6 premiers jours, le principe actif, l'alendronate (AL), est constamment libéré sur une période de 26 jours.

L'utilisation de nanoparticules pour l'encapsulation et le relargage de principes actifs présente de nombreux avantages.[232, 233] En effet, leur taille leur confère des propriétés intéressantes telles qu'une grande surface spécifique et une grande stabilité ; mais surtout ce sont leur capacité à esquiver les défenses du système immunitaire et leur capacité à cibler une population de cellules qui en font des vecteurs prometteurs. Des nanoparticules à base de PHBV et permettant la protection et la délivrance d'enzymes modèles ont été synthétisées par un procédé de double émulsion et évaporation de solvant.[234] Des PHBV de différentes masses molaires ont été utilisés (297000 à 21000 g.mol⁻¹) et il a été

démontré que l'emploi de PHBHV de faible masse favorisait l'activité enzymatique *via* une meilleure perméabilité. Bien que la quantité d'enzyme encapsulée reste relativement faible, l'ajustement du pH de l'eau a permis d'obtenir un taux d'encapsulation six fois supérieur à celui obtenu dans les conditions initiales (PHBHV de grande masse et eau à pH neutre).

Des copolymères à blocs à base de PHBHV, PHV, P(3HB-*co*-4HB), P(3HV-*co*-4HB) et de PEG ont été synthétisés par transestérification des PHAs par du monométhyl éther de PEG en présence d'octanoate de sodium.[136–138] Des nanoparticules sont préparées par émulsion-évaporation de solvant en présence de désoxycholate de sodium comme stabilisant. Les nanoparticules ont un diamètre moyen de 112 à 162 nm mais avec une distribution en taille relativement élevée (polydispersité de 0,22 à 0,72). Ceci est probablement dû à la méthode de synthèse des copolymères diblocs ;[135] en effet, le processus de transestérification est peu contrôlable et génère des copolymères mal définis. De la thymoquinone ainsi que du cisplatine ont été encapsulés ; lors du relargage, un effet « burst » relativement important de 30 à 40% en 10h a été observé quel que soit le PHA de départ utilisé. Cependant, un relargage plus progressif est observé jusqu'à 100h, où 70 à 80% du principe actif est relargué.

Enfin, Kurth *et al.* ont étudié l'élaboration de nanoparticules à base de PHO-COOH par nanoprécipitation.[109] La présence de fonctions acide carboxylique tend à limiter la formation d'agrégats. En effet, les nanoparticules à base de PHOHHx coalescent immédiatement après leur formation, celles à base de PHOD-10%COOH forment quelques agrégats et ne sont pas stables dans le temps alors que celles à base de PHOD-25%COOH sont bien isolées (Figure 1.31).

Renard *et al.* ont étudié le relargage de doxorubicine (anticancéreux) de nanoparticules à base de copolymères à blocs PHO-25%COOH-*b*-PCL.[235] L'introduction de PCL permet d'augmenter la stabilité des particules. Un faible effet « burst » de 10% après 10h est observé, puis le pourcentage de principe actif relargué atteint 25% après 80h. Par ailleurs, il a été montré que la présence de fonctions acide carboxylique favorisait la dégradation du polymère à pH 7,3 à 37°C.

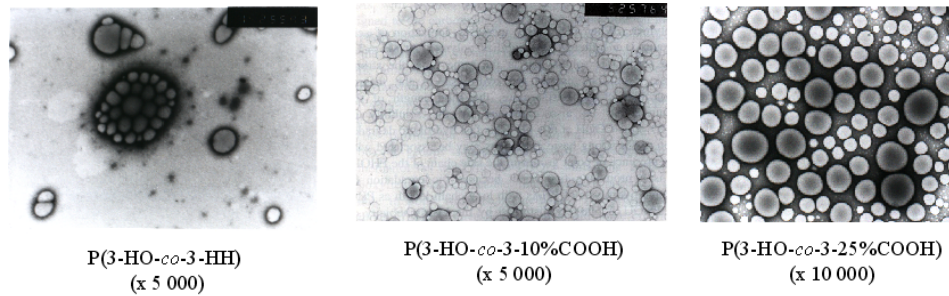


Figure 1.31: Images obtenues en microscopie électronique à transmission de nanoparticules de PHOHHx, PHOD-10%COOH et PHOD-25%COOH obtenues par nanoprécipitation.[109]

1.7 Conclusion

A travers ce chapitre, il se révèle clairement que les PHAs d'origine bactérienne présentent un fort potentiel pour des applications dans le domaine biomédical telles que l'ingénierie tissulaire ou le relargage contrôlé de principes actifs. Cependant, il apparaît aussi quelques limitations. Du point de vue de la synthèse de copolymères, les réactions chimiques utilisées lors de l'utilisation d'oligomères préformés ne permettent pas la formation de copolymères bien définis ; les réactions d'estérification ne permettent pas d'obtenir des taux de conversion satisfaisants, et les réactions de transestérification génèrent des mélanges de produits. D'autre part, il apparaît aussi que les PHA-mcl sont beaucoup moins étudiés que les PHA-scl, probablement à cause de leur non-disponibilité commerciale. Pourtant, de nombreux auteurs s'accordent sur le potentiel des PHA-mcl pour des applications biomédicales, notamment grâce à leur température de fusion plus faible ainsi que leur plus faible cristallinité.

Dans la suite de ce travail, nous avons choisi de nous intéresser à la synthèse de copolymères amphiphiles à base de PHAs de différentes architectures, puis d'étudier leur auto-assemblage en milieu aqueux. Dans un premier temps, nous nous intéresserons au développement d'une méthode permettant de fonctionnaliser simplement et de manière efficace les PHAs avec des oligomères préformés de poly(éthylène glycol) (PEG). Puis des copolymères amphiphiles à base de PHA-mcl et de PEG de différentes architectures seront synthétisés (copolymères à blocs, greffés) et leur auto-association en milieu aqueux sera étudiée. Enfin, dans le but de synthétiser des nano-objets plus complexes présentant

un coeur multicompartimenté, des copolymères amphiphiles greffés porteurs de chaînes perfluorées seront synthétisés et leur auto-assemblage en milieu aqueux sera étudié.

Références

1. LEMOIGNE, M. Etudes sur l'autolyse microbienne. Origine de l'acide 1-oxobutyrique formé par autolyse. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* **41**, 148–165 (1927).
2. STAUDINGER, H. Viscosity investigations for the examination of the constitution of natural products of high molecular weight and of rubber and cellulose. *Transactions of the Faraday Society* **29**, 18–31 (1933).
3. WEIBULL, C. Characterization of the protoplasmic constituents of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* **66**, 696–702 (1953).
4. FORSYTH, W. G. C., HAYWARD, A. C. & ROBERTS, J. B. Occurrence of Poly-beta-hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria. *Nature* **182**, 800–801 (1958).
5. WALLEN, L. L. & ROHWEDDE, W.K. Poly-beta-hydroxyalkanoate from activated-sludge. *Environmental Science and Technology* **8**, 576–579 (1974).
6. STEINBÜCHEL, A. & VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* **128**, 219–228 (1995).
7. FIDLER, S. & DENNIS, D. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **103**, 231–235 (1992).
8. KHANNA, S. & SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)* **40**, 607–619 (2005).
9. REPASKE, R & REPASKE, A. C. Quantitative requirements for exponential-growth of *Alcaligenes-eutrophus*. *Applied and Environmental Microbiology* **32**, 585–591 (1976).

10. WARD, A. C., ROWLEY, B. I. & DAWES, E. A. Effect of Oxygen and Nitrogen Limitation on Poly-beta-hydroxybutyrate Biosynthesis in Ammonium-grown *Azotobacter beijerinckii*. *Journal of General Microbiology* **102**, 61–68 (1977).
11. GRAGE, K *et al.* Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules : Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **10**, 660–669 (2009).
12. BARNARD, G. N. & SANDERS, J. K. M. Observation of mobile poly(beta-hydroxybutyrate) in the storage granules of *Methylobacterium AM1* by in vivo ¹³C-NMR spectroscopy. *FEBS Letters* **231**, 16–18 (1988).
13. BARNARD, G. N. & SANDERS, J. K. M. The poly-beta-hydroxybutyrate granule in vivo. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 3286–3291 (1989).
14. De KONING, G. J. M. & LEMSTRA, P. J. The amorphous state of bacterial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate]in vivo. *Polymer* **33**, 3292–3294 (1992).
15. TERADA, M & MARCHESSAULT, R. H. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules* **25**, 207–215 (1999).
16. JACQUEL, N, LO, C. W., WU, H. S., WEI, Y. H. & WANG, S. S. Solubility of polyhydroxyalkanoates by experiment and thermodynamic correlations. *AIChE Journal* **53**, 2704–2714 (2007).
17. WAMPFLER, B, RAMSAUER, T, KEHL, K, ZINN, M & THONY-MEYER, L. Application of Activated Charcoal in the Downstream Processing of Bacterial Olefinic Poly(3-hydroxyalkanoates). *Chimia* **64**, 784–788 (2010).
18. WAMPFLER, B *et al.* Isolation and Purification of Medium Chain Length Poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHA) for Medical Applications Using Nonchlorinated Solvents. *Biomacromolecules* **11**, 2716–2723 (2010).
19. DOI, Y. *Microbial polyesters* (Wiley-VCH, 1990).
20. TANIGUCHI, I, KAGOTANI, K & KIMURA, Y. Microbial production of poly(hydroxyalkanoate)s from waste edible oils. *Green Chemistry* **5**, 545–548 (2003).

21. GRIEBEL, R, SMITH, Z & MERRICK, J. M. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* **7**, 3676–& (1968).
22. DEKONING, G. J. M., KELLERHALS, M, VANMEURS, C & WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonads* .2. Process development and economic evaluation. *Bioprocess Engineering* **17**, 15–21 (1997).
23. DEKONING, G. J. M. & WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonads* .1. Solubilization. *Bioprocess Engineering* **17**, 7–13 (1997).
24. KELLERHALS, M. B., KESSLER, B, WITHOLT, B, TCHOUBOUKOV, A & BRANDL, H. Renewable long-chain fatty acids for production of biodegradable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) at laboratory and pilot plant scales. *Macromolecules* **33**, 4690–4698 (2000).
25. BALLISTRERI, A *et al.* Biosynthesis and structural characterization of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas aeruginosa* from fatty acids. *International Journal of Biological Macromolecules* **29**, 107–114 (2001).
26. CHEN, G. Q., XU, J, WU, Q, ZHANG, Z. M. & HO, K. P. Synthesis of copolyesters consisting of medium-chain-length beta-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Reactive & Functional Polymers* **48**, 107–112 (2001).
27. ASHBY, R. D., SOLAIMAN, D. K. Y. & FOGLIA, T. A. Synthesis of short-medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromolecules* **6**, 2106–2112 (2005).
28. SIMON-COLIN, C *et al.* A novel mcl PHA-producing bacterium, *Pseudomonas guezenei* sp nov, isolated from a 'kopara' mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 581–586 (2008).
29. SILVA-QUEIROZ, S. R., SILVA, L. F., PRADELLA, J. G. C., PEREIRA, E. M. & GOMEZ, J. G. C. PHA(MCL) biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *Journal of Biotechnology* **143**, 111–118 (2009).

30. SIMON-COLIN, C *et al.* Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl PHAs) from cosmetic co-products by *Pseudomonas raguenesii* sp nov., isolated from Tetiaroa, French Polynesia. *Bioresource Technology* **100**, 6033–6039 (2009).
31. SOLAIMAN, D. K. Y. & ASHBY, R. D. Rapid Genetic Characterization of Poly(hydroxyalkanoate) Synthase and Its Applications. *Biomacromolecules* **6**, 532–537 (2004).
32. ZINN, M, WITHOLT, B & EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* **53**, 5–21 (2001).
33. WITHOLT, B & KESSLER, B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 279–285 (1999).
34. LAGEVEEN, R. G. *et al.* Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans* : Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 2924–2932 (1988).
35. STEINBÜCHEL, A. & LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* **16**, 81–96 (2003).
36. BRANDL, H, GROSS, R. A., LENZ, R. W. & FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a Source for novel Poly(beta-Hydroxyalkanoates). *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **195**, 103–BETC (1988).
37. BALLISTRERI, A *et al.* Sequence distribution of beta-hydroxyalkanoate units with higher alkyl groups in bacterial copolyesters. *Macromolecules* **23**, 5059–5064 (1990).
38. GAGNON, K. D., LENZ, R. W., FARRIS, R. J. & FULLER, R. C. Crystallization behavior and its influence on the mechanical properties of a thermoplastic elastomer produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* **25**, 3723–3728 (1992).

39. ANDERSON, A. J. & DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* **54**, 450–472 (1990).
40. WITHOLT, B *et al.* Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors : background and economic potential. *Trends in Biotechnology* **8**, 46–52 (1990).
41. FRITZSCHE, K, LENZ, R. W. & FULLER, R. C. An unusual bacterial polyester with a phenyl pendant group. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **191**, 1957–1965 (1990).
42. HAYWOOD, G. W., ANDERSON, A. J., EWING, D. F. & DAWES, E. A. Accumulation of a Polyhydroxyalkanoate Containing Primarily 3-Hydroxydecanoate from Simple Carbohydrate Substrates by *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 3354–3359 (1990).
43. KIM, Y. B., LENZ, R. W. & FULLER, R. C. Preparation and characterization of poly(beta-hydroxyalkanoates) obtained from *Pseudomonas oleovorans* grown with mixtures of 5-phenylvaleric acid and normal alkanolic acids. *Macromolecules* **24**, 5256–5260 (1991).
44. KIM, O. Y., GROSS, R. A. & RUTHERFORD, D. R. Bioengineering of poly(beta-hydroxyalkanoates) for advanced material applications : incorporation of cyano and nitrophenoxy side chain substituents. *Canadian Journal of Microbiology* **41**, 32–43 (1995).
45. EGGINK, G, DEWAARD, P & HUIJBERTS, G. N. M. The role of fatty acid biosynthesis and degradation in the supply of substrates for poly(3-hydroxyalkanoate) formation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Reviews* **9**, 159–163 (1992).
46. HAYWOOD, G. W., ANDERSON, A. J. & DAWES, E. A. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters* **57**, 1–6 (1989).
47. HUIJBERTS, G. N. M., EGGINK, G, DEWAARD, P, HUISMAN, G. W. & WITHOLT, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 536–544 (1992).

48. HUIJBERTS, G. N. M., DERIJK, T. C., DEWAARD, P & EGGINK, G. ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *Journal of Bacteriology* **176**, 1661–1666 (1994).
49. TAPPEL, R. C., WANG, Q & NOMURA, C. T. Precise control of repeating unit composition in biodegradable poly(3-hydroxyalkanoate) polymers synthesized by *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **113**, 480–486 (2012).
50. MOSKOWITZ, G. J. & MERRICK, J. M. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. 2. Enzymatic synthesis of D-(-)-beta-hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* **8**, 2748–& (1969).
51. HOCKING, P & MARCHESSAULT, R. H. dans. *Biopolymers from renewable resources* (éd. KAPLAN, D. L.) 220–244 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998).
52. JENDROSSEK, D. Microbial degradation of polyesters : a review on extracellular poly(hydroxyalkanoic acid) depolymerases. *Polymer Degradation and Stability* **59**, 317–325 (1998).
53. TOKIWA, Y & CALABIA, B. P. Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters* **26**, 1181–1189 (2004).
54. MERGAERT, J, WEBB, A, ANDERSON, C, WOUTERS, A & SWINGS, J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 3233–3238 (1993).
55. MERGAERT, J & SWINGS, J. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **17**, 463–469 (1996).
56. DOI, Y, KANESAWA, Y, TANAHASHI, N & KUMAGAI, Y. Biodegradation of microbial polyesters in the marine environment. *Polymer Degradation and Stability* **36**, 173–177 (1992).
57. VOLOVA, T. G., GLADYSHEV, M. I., TRUSOVA, M. Y. & ZHILA, N. O. Degradation of polyhydroxyalkanoates in eutrophic reservoir. *Polymer Degradation and Stability* **92**, 580–586 (2007).

-
58. KASUYA, K *et al.* Identification of a marine benthic P(3HB)-degrading bacterium isolate and characterization of its P(3HB) depolymerase. *Biomacromolecules* **1**, 194–201 (2000).
 59. VOLOVA, T. G. *et al.* Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in the South China Sea and identification of PHA-degrading bacteria. *Microbiology* **80**, 252–260 (2011).
 60. MOCHIZUKI, M & HIRAMI, M. Structural effects on the biodegradation of aliphatic polyesters. *Polymers for Advanced Technologies* **8**, 203–209 (1997).
 61. WENG, Y. X., WANG, X. L. & WANG, Y. Z. Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. *Polymer Testing* **30**, 372–380 (2011).
 62. QUINTEROS, R, GOODWIN, S, LENZ, R. W. & PARK, W. H. Extracellular degradation of medium chain length poly(beta-hydroxyalkanoates) by *Comamonas* sp. *International Journal of Biological Macromolecules* **25**, 135–143 (1999).
 63. SCHIRMER, A, JENDROSSEK, D & SCHLEGEL, H. G. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria : purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1220–1227 (1993).
 64. RHEE, Y. H., KIM, Y. H. & SHIN, K. S. Characterization of an extracellular poly(3-hydroxyoctanoate) depolymerase from the marine isolate, *Pseudomonas luteola* M13-4. *Enzyme and Microbial Technology* **38**, 529–535 (2006).
 65. PAPANEOPHYTOU, C. P., VELALI, E. E. & PANTAZAKI, A. A. Purification and characterization of an extracellular medium-chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Thermus thermophilus* HB8. *Polymer Degradation and Stability* **96**, 670–678 (2011).
 66. KIM, D. Y., KIM, H. W., CHUNG, M. G. & RHEE, Y. H. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Journal of Microbiology* **45**, 87–97 (2007).

67. PRIME, K. L. & WHITESIDES, G. M. Self-assembled organic monolayers : model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science* **252**, 1164–1167 (1991).
68. REUSCH, R. N., SPARROW, A. W. & GARDINER, J. Transport of poly-beta-hydroxybutyrate in human plasma. *Biochimica et Biophysica Acta* **1123**, 33–40 (1992).
69. WIGGAM, M. I. *et al.* Treatment of diabetic ketoacidosis using normalization of blood 3-hydroxybutyrate concentration as the endpoint of emergency management - A randomized controlled study. *Diabetes Care* **20**, 1347–1352 (1997).
70. YAJNIK, C. S. *et al.* Ketosis resistance in fibrocalculous pancreatic diabetes .2. Hepatic ketogenesis after oral medium-chain triglycerides. *Metabolism-Clinical and Experimental* **46**, 1–4 (1997).
71. SHISHATSKAYA, E. I. & VOLOVA, T. G. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **15**, 915–923 (2004).
72. QU, X. H., WU, Q, LIANG, J, ZOU, B & CHEN, G. Q. Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on in vitro growth and differentiation of smooth muscle cells. *Biomaterials* **27**, 2944–2950 (2006).
73. VANWACHEM, P. B. *et al.* Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials* **6**, 403–408 (1985).
74. KOWALCZYNSKA, H. M. *et al.* Adsorption characteristics of human plasma fibronectin in relationship to cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research* **61**, 260–269 (2002).
75. YOON, J. J., NAM, Y. S., KIM, J. H. & PARK, T. G. Surface immobilization of galactose onto aliphatic biodegradable polymers for hepatocyte culture. *Biotechnology and Bioengineering* **78**, 1–10 (2002).
76. SAAD, B *et al.* Development of degradable polyesterurethanes for medical applications : In vitro and in vivo evaluations. *Journal of Biomedical Materials Research* **36**, 65–74 (1997).

-
77. GOGOLEWSKI, S, JOVANOVIĆ, M, PERREN, S. M., DILLON, J. G. & HUGHES, M. K. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids : polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *Journal of Biomedical Materials Research* **27**, 1135–1148 (1993).
 78. MULLER, H. M. & SEEBACH, D. Poly(hydroxyalkanoates) : a fifth class of physiologically important organic biopolymers. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **32**, 477–502 (1993).
 79. ROUXHET, L, LEGRAS, R & SCHNEIDER, Y. J. Interactions between a biodegradable polymer, poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate), proteins and macrophages. *Macromolecular Symposia* **130**, 347–366 (1998).
 80. SEVASTIANOV, V. I., PEROVA, N. V., SHISHATSKAYA, E. I., KALACHEVA, G. S. & VOLOVA, T. G. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **14**, 1029–1042 (2003).
 81. TAYLOR, M. S., DANIELS, A. U., ANDRIANO, K. P. & HELLER, J. Six bioabsorbable polymers : in vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *Journal of Applied Biomaterials* **5**, 151–157 (1994).
 82. SUDESH, K, ABE, H & DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates : biological polyesters. *Progress in Polymer Science* **25**, 1503–1555 (2000).
 83. RAI, R, KESHAVARZ, T, ROETHER, J. A., BOCCACCINI, A. R. & ROY, I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science & Engineering R-Reports* **72**, 29–47 (2011).
 84. SANCHEZ, R. J. *et al.* Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHA(mcl)) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. *European Polymer Journal* **39**, 1385–1394 (2003).
 85. GAGNON, K. D., LENZ, R. W., FARRIS, R. J. & FULLER, R. C. The mechanical properties of a thermoplastic elastomer produced by the bacterium *Pseudomonas oleovorans*. *Rubber Chemistry and Technology* **65**, 761–777 (1992).

86. MARSCHESSAULT, R. H., MONASTERIOS, C. J., MORIN, F. G. & SUNDARARAJAN, P. R. Chiral poly(beta-hydroxyalkanoates) : an adaptable helix influenced by the alkane side-chain. *International Journal of Biological Macromolecules* **12**, 158–165 (1990).
87. ASRAR, J *et al.* Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) polymers. *Biomacromolecules* **3**, 1006–1012 (2002).
88. HARTMANN, R *et al.* Tailor-made olefinic medium-chain-length poly (R)-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas putida* GPo1 : Batch versus chemostat production. *Biotechnology and Bioengineering* **93**, 737–746 (2006).
89. PREUSTING, H, NIJENHUIS, A & WITHOLT, B. Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkenoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules* **23**, 4220–4224 (1990).
90. SCHOLZ, C. Perspectives to produce positively or negatively charged polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**, 829–837 (2010).
91. BEAR, M. M., RENARD, E, RANDRIAMAHEFA, S, LANGLOIS, V & GUERIN, P. Preparation of a bacterial polyester with carboxy groups in side chains. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Ii Fascicule C-Chimie* **4**, 289–293 (2001).
92. PARK, W. H. & LEE, M. Y. Characterization of bacterial copolyesters with unsaturated pendant groups - Effect of epoxidation on thermal degradation. *Korea Polymer Journal* **6**, 219–224 (1998).
93. LENZ, R. W., KIM, Y. B. & FULLER, R. C. Production of unusual bacterial polyesters by *Pseudomonas oleovorans* through cometabolism. *FEMS Microbiology Reviews* **9**, 207–214 (1992).
94. KIM, O, GROSS, R. A., HAMMAR, W. J. & NEWMARK, R. A. Microbial synthesis of poly(beta-hydroxyalkanoates) containing fluorinated side-chain substituents. *Macromolecules* **29**, 4572–4581 (1996).
95. FRITZSCHE, K, LENZ, R. W. & FULLER, R. C. Production of unsaturated polyesters by *Pseudomonas oleovorans*. *International Journal of Biological Macromolecules* **12**, 85–91 (1990).

-
96. KIM, Y. B., LENZ, R. W. & FULLER, R. C. Poly-3-Hydroxyalkanoates containing unsaturated repeating units produced by pseudomonas oleovorans. *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry* **33**, 1367–1374 (1995).
 97. BEAR, M. M. *et al.* Bacterial poly-3-hydroxyalkenoates with epoxy groups in the side chains. *Reactive and Functional Polymers* **34**, 65–77 (1997).
 98. KIM, Y. B., RHEE, Y. H. & LENZ, R. W. Poly(3-hydroxyalkanoate)s produced by Pseudomonas oleovorans grown by feeding nonanoic and 10-undecenoic acids in sequence. *Polymer Journal* **29**, 894–898 (1997).
 99. SPARKS, J & SCHOLZ, C. Synthesis and characterization of a cationic poly(beta-hydroxyalkanoate). *Biomacromolecules* **9**, 2091–2096 (2008).
 100. KIM, D. Y., KIM, Y. B. & RHEE, Y. H. Bacterial poly(3-hydroxyalkanoates) bearing carbon-carbon triple bonds. *Macromolecules* **31**, 4760–4763 (1998).
 101. SCHOLZ, C, FULLER, R. C. & LENZ, R. W. Production of poly(beta-hydroxyalkanoates) with beat-substituents containing terminal ester groups by pseudomonas oleovorans. *Macromolecular Chemistry and Physics* **195**, 1405–1421 (1994).
 102. SCHOLZ, C, WOLK, S, LENZ, R. W. & FULLER, R. C. Growth and polyester production by Pseudomonas oleovorans on branched octanoic acid substrates. *Macromolecules* **27**, 6358–6362 (1994).
 103. ARKIN, A. H. & HAZER, B. Chemical modification of chlorinated microbial polyesters. *Biomacromolecules* **3**, 1327–1335 (2002).
 104. RENARD, E, POUX, A, TIMBART, L, LANGLOIS, V & GUERIN, P. Preparation of a novel artificial bacterial polyester modified with pendant hydroxyl groups. *Biomacromolecules* **6**, 891–896 (2005).
 105. EROGLU, M. S., HAZER, B, OZTURK, T & CAYKARA, T. Hydroxylation of pendant vinyl groups of poly(3-hydroxy undec-10-enoate) in high yield. *Journal of Applied Polymer Science* **97**, 2132–2139 (2005).
 106. LEE, M. Y., PARK, W. H. & LENZ, R. W. Hydrophilic bacterial polyesters modified with pendant hydroxyl groups. *Polymer* **41**, 1703–1709 (2000).

107. PARK, W. H., LENZ, R. W. & GOODWIN, S. Epoxidation of bacterial polyesters with unsaturated side chains. I. Production and epoxidation of polyesters from 10-undecenoic acid. *Macromolecules* **31**, 1480–1486 (1998).
108. LEE, M. Y. & PARK, W. H. Preparation of bacterial copolyesters with improved hydrophilicity by carboxylation. *Macromolecular Chemistry and Physics* **201**, 2771–2774 (2000).
109. KURTH, N *et al.* Poly(3-hydroxyoctanoate) containing pendant carboxylic groups for the preparation of nanoparticles aimed at drug transport and release. *Polymer* **43**, 1095–1101 (2002).
110. STIGERS, D. J. & TEW, G. N. Poly(3-hydroxyalkanoate)s Functionalized with Carboxylic Acid Groups in the Side Chain. *Biomacromolecules* **4**, 193–195 (2003).
111. KUNIOKA, M. & DOI, Y. Thermal degradation of microbial copolyesters : poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* **23**, 1933–1936 (1990).
112. NGUYEN, S, YU, G. E. & MARCHESSAULT, R. H. Thermal degradation of poly(3-hydroxyalkanoates) : Preparation of well-defined oligomers. *Biomacromolecules* **3**, 219–224 (2002).
113. RAMIER, J., GRANDE, D., LANGLOIS, V. & RENARD, E. Toward the controlled production of oligoesters by microwave-assisted degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s. *Polymer Degradation and Stability* **97**, 322–328 (2012).
114. HIRT, T. D., NEUENSCHWANDER, P & SUTER, U. W. Telechelic diols from poly (R)-3-hydroxybutyric acid and poly{ (R)-3-hydroxybutyric acid -co- (R)-3-hydroxyvaleric acid }. *Macromolecular Chemistry and Physics* **197**, 1609–1614 (1996).
115. ANDRADE, A. P., WITHOLT, B, HANY, R, EGLI, T & LI, Z. Preparation and characterization of enantiomerically pure telechelic diols from mcl-poly (R)-3-hydroxyalkanoates. *Macromolecules* **35**, 684–689 (2002).
116. LEMECHKO, P. *et al.* Functionalized oligoesters from poly(3-hydroxyalkanoate)s containing reactive end group for click chemistry : Application to novel copolymer synthesis with poly(2-methyl-2-oxazoline). *Reactive and Functional Polymers* **72**, 160–167 (2012).

-
117. LAUZIER, C, REVOL, J. F., DEBZI, E. M. & MARCHESSAULT, R. H. Hydrolytic degradation of isolated poly(beta-hydroxybutyrate) granules. *Polymer* **35**, 4156–4162 (1994).
 118. REEVE, M. S., MCCARTHY, S & GROSS, R. A. The chemical degradation of bacterial polyesters for use in the preparation of new degradable block copolymers. *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)* **31**, 437–438 (1990).
 119. TIMBART, L, RENARD, E, TESSIER, M & LANGLOIS, V. Monohydroxylated poly(3-hydroxyoctanoate) oligomers and its functionalized derivatives used as macroinitiators in the synthesis of degradable diblock copolyesters. *Biomacromolecules* **8**, 1255–1265 (2007).
 120. LEHRLE, R. S. & WILLIAMS, R. J. Thermal Degradation of Bacterial Poly(hydroxybutyric acid) : Mechanisms from the Dependence of Pyrolysis Yields on Sample Thickness. *Macromolecules* **27**, 3782–3789 (1994).
 121. CHAN SIN, M., GAN, S. N., MOHD ANNUR, M. S. & PING TAN, I. K. Thermodegradation of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from oleic acid. *Polymer Degradation and Stability* **95**, 2334–2342 (2010).
 122. HIRT, T. D., NEUENSCHWANDER, P & SUTER, U. W. Synthesis of degradable, biocompatible, and tough block-copolyesterurethanes. *Macromolecular Chemistry and Physics* **197**, 4253–4268 (1996).
 123. HORI, Y. *et al.* A novel biodegradable poly(urethane ester) synthesized from poly(3-hydroxybutyrate) segments. *Macromolecules* **25**, 5117–5118 (1992).
 124. SAAD, G. R. & SELIGER, H. Biodegradable copolymers based on bacterial poly((R)-3-hydroxybutyrate) : thermal and mechanical properties and biodegradation behaviour. *Polymer Degradation and Stability* **83**, 101–110 (2004).
 125. MARCHESSAULT, R. H. & YU, G. E. Preparation and characterization of low molecular weight poly(3-hydroxybutyrate)s and their block copolymers with poly(oxyethylene)s. *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)* **40**, 527–528 (1999).

126. REEVE, M. S., MCCARTHY, S. P. & GROSS, R. A. Preparation and characterization of (R)-poly(beta-hydroxybutyrate) poly(epsilon-caprolactone) and (R)-poly(beta-hydroxybutyrate) poly(lactide) degradable diblock copolymers. *Macromolecules* **26**, 888–894 (1993).
127. LIU, Q. S., SHYR, T. W., TUNG, C. H., DENG, B. Y. & ZHU, M. F. Block Copolymers Containing Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly (epsilon-caprolactone) Units : Synthesis, Characterization and Thermal Degradation. *Fibers and Polymers* **12**, 848–856 (2011).
128. SCHRECK, K. M. & HILLMYER, M. A. Block copolymers and melt blends of polylactide with Nodax microbial polyesters : Preparation and mechanical properties. *Journal of Biotechnology* **132**, 287–295 (2007).
129. RAMIER, J., RENARD, E. & GRANDE, D. Microwave-assisted synthesis and characterization of biodegradable block copolyesters based on poly(3-hydroxyalkanoate)s and poly(D,L-lactide). *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry* **50**, 1445–1455 (7 2012).
130. WU, L., CHEN, S., LI, Z., XU, K. & CHEN, G.-Q. Synthesis, characterization and biocompatibility of novel biodegradable poly ((R)-3-hydroxybutyrate)-block-(D,L-lactide)-block-(epsilon-caprolactone) triblock copolymers. *Polymer International* **57**, 939–949 (2008).
131. ZHANG, X. Q. *et al.* Synthesis and characterization of biodegradable triblock copolymers based on bacterial poly (R)-3-hydroxybutyrate by atom transfer radical polymerization. *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry* **43**, 4857–4869 (2005).
132. LOH, X. J., CHEONG, W. C. D., LI, J & ITO, Y. Novel poly(N-isopropylacrylamide)-poly (R)-3-hydroxybutyrate -poly(N-isopropyl acrylamide) triblock copolymer surface as a culture substrate for human mesenchymal stem cells. *Soft Matter* **5**, 2937–2946 (2009).
133. LOH, X. J., ZHANG, Z. X., WU, Y. L., LEE, T. S. & LI, J. Synthesis of Novel Biodegradable Thermoresponsive Triblock Copolymers Based on Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and Poly(N-isopropylacrylamide) and Their Formation of Thermoresponsive Micelles. *Macromolecules* **42**, 194–202 (2009).

-
134. LI, J, LI, X, NI, X. P. & LEONG, K. W. Synthesis and characterization of new biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)-b-poly[(R)-3-hydroxy butyrate]-b-poly(ethylene oxide) triblock copolymers. *Macromolecules* **36**, 2661–2667 (2003).
135. RAVENELLE, F & MARCHESSAULT, R. H. One-step synthesis of amphiphilic diblock copolymers from bacterial poly([R]-3-hydroxybutyric acid). *Biomacromolecules* **3**, 1057–1064 (2002).
136. SHAH, M., NASEER, M. I., CHOI, M. H., KIM, M. O. & YOON, S. C. Amphiphilic PHA-mPEG copolymeric nanocontainers for drug delivery : Preparation, characterization and in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* **400**, 165–175 (2010).
137. SHAH, M., CHOI, M. H., ULLAH, N., KIM, M. O. & YOON, S. C. Synthesis and Characterization of PHV-Block-mPEG Diblock Copolymer and Its Formation of Amphiphilic Nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **11**, 5702–5710 (2011).
138. SHAH, M., ULLAH, N., CHOI, M. H., KIM, M. O. & YOON, S. C. Amorphous amphiphilic P(3HV-co-4HB)-b-mPEG block copolymer synthesized from bacterial copolyester via melt transesterification : Nanoparticle preparation, cisplatin-loading for cancer therapy and in vitro evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **80**, 518–527 (3 2012).
139. LIU, Q. Y., CHENG, S. T., LI, Z. B., XU, K. T. & CHEN, G. Q. Characterization, biodegradability and blood compatibility of poly (R)-3-hydroxybutyrate based poly(ester-urethane)s. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **90A**, 1162–1176 (2009).
140. LENDLEIN, A., NEUENSCHWANDER, P. & SUTER, U. W. Tissue-compatible multiblock copolymers for medical applications, controllable in degradation rate and mechanical properties. *Macromolecular Chemistry and Physics* **199**, 2785–2796 (1998).
141. LENDLEIN, A., COLUSSI, M., NEUENSCHWANDER, P. & SUTER, U. W. Hydrolytic Degradation of Phase-Segregated Multiblock Copoly(ester urethane)s Containing Weak Links. *Macromolecular Chemistry and Physics* **202**, 2702–2711 (2001).

142. LI, X, LOH, X. J., WANG, K, HE, C. B. & LI, J. Poly(ester urethane)s consisting of poly (R)-3-hydroxybutyrate and poly(ethylene glycol) as candidate biomaterials : Characterization and mechanical property study. *Biomacromolecules* **6**, 2740–2747 (2005).
143. LOH, X. J., TAN, K. K., LI, X & LI, J. The in vitro hydrolysis of poly(ester urethane)s consisting of poly (R)-3-hydroxybutyrate and poly(ethylene glycol). *Biomaterials* **27**, 1841–1850 (2006).
144. ZHAO, Q., CHENG, G., LI, H., MA, X. & ZHANG, L. Synthesis and characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) multiblock copolymers. *Polymer* **46**, 10561–10567 (2005).
145. LOH, X. J., WANG, X, LI, H. Z., LI, X & LI, J. Compositional study and cytotoxicity of biodegradable poly(ester urethane)s consisting of poly (R)-3-hydroxybutyrate and poly(ethylene glycol). *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **27**, 267–273 (2007).
146. LIU, Q. S., ZHU, M. F. & CHEN, Y. M. Synthesis and characterization of multiblock copolymers containing poly (3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate) and poly(ethylene glycol). *Polymer International* **59**, 842–850 (2010).
147. LOH, X. J., GOH, S. H. & LI, J. Hydrolytic degradation and protein release studies of thermogelling polyurethane copolymers consisting of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly(ethylene glycol), and poly(propylene glycol). *Biomaterials* **28**, 4113–4123 (2007).
148. LI, Z. B. *et al.* Novel amphiphilic poly(ester-urethane)s based on poly (R)-3-hydroxyalkanoate : synthesis, biocompatibility and aggregation in aqueous solution. *Polymer International* **57**, 887–894 (2008).
149. PAN, J. Y. *et al.* Alternative block polyurethanes based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol). *Biomaterials* **30**, 2975–2984 (2009).
150. ZHIJIANG, C. & ZHIHONG, W. Preparation of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly(ethylene glycol) (PEG) graft copolymer. *Journal of Materials Science* **42**, 5886–5890 (2007).

-
151. CAI, Z. J., HOU, C. W. & YANG, G. Crystallization behavior, thermal property and biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) grafting copolymer. *Polymer Degradation and Stability* **96**, 1602–1609 (2011).
 152. LAO, H. K., RENARD, E, LINOSSIER, I, LANGLOIS, V & VALLEE-REHEL, K. Modification of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) film by chemical graft copolymerization. *Biomacromolecules* **8**, 416–423 (2007).
 153. LAO, H. K., RENARD, E, LANGLOIS, V, VALLEE-REHEL, K & LINOSSIER, I. Surface Functionalization of PHBV by HEMA Grafting via UV Treatment : Comparison with Thermal Free Radical Polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* **116**, 288–297 (2010).
 154. LAO, H. K. *et al.* Functionalization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Films via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization : Comparison with the Conventional Free-Radical Grafting Procedure. *Journal of Applied Polymer Science* **120**, 184–194 (2011).
 155. VERSACE, D.-L. *et al.* Natural biopolymer surface of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-photoinduced modification with triarylsulfonium salts. *Green Chemistry*. <<http://dx.doi.org/10.1039/C2GC16399C>> (2012).
 156. ARSLAN, H., HAZER, B. & YOON, S. C. Grafting of poly(3-hydroxyalkanoate) and linoleic acid onto chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* **103**, 81–89 (2007).
 157. SAMAIN, X., LANGLOIS, V., RENARD, E. & LORANG, G. Grafting biodegradable polyesters onto cellulose. *Journal of Applied Polymer Science* **121**, 1183–1192 (2011).
 158. ANDRADE, A. P. *et al.* Synthesis and characterization of novel copoly(ester-urethane) containing blocks of poly- (R)-3-hydroxyoctanoate and poly- (R)-3-hydroxybutyrate. *Macromolecules* **35**, 4946–4950 (2002).
 159. ANDRADE, A. P., WITHOLT, B, CHANG, D. L. & LI, Z. Synthesis and characterization of novel thermoplastic polyester containing blocks of poly (R)-3-hydroxyoctanoate and poly (R)-3-hydroxybutyrate. *Macromolecules* **36**, 9830–9835 (2003).

160. DAI, S., XUE, L., ZINN, M. & LI, Z. Enzyme-Catalyzed Polycondensation of Polyester Macrodiols with Divinyl Adipate : A Green Method for the Preparation of Thermoplastic Block Copolyesters. *Biomacromolecules* **10**, 3176–3181 (2009).
161. TIMBART, L, RENARD, E, LANGLOIS, V & GUERIN, P. Novel biodegradable copolyesters containing blocks of poly(3-hydroxyoctanoate) and poly (epsilon-caprolactone) : Synthesis and characterization. *Macromolecular Bioscience* **4**, 1014–1020 (2004).
162. GAGNON, K. D., LENZ, R. W., FARRIS, R. J. & FULLER, R. C. Chemical Modification of Bacterial Elastomers .1. Peroxide Cross-Linking. *Polymer* **35**, 4358–4367 (1994).
163. HAZER, B, LENZ, R. W., CAKMAKLI, B, BORCAKLI, M & KOCER, H. Preparation of poly(ethylene glycol) grafted poly(3-hydroxyalkanoate) networks. *Macromolecular Chemistry and Physics* **200**, 1903–1907 (1999).
164. EROGLU, M. S., CAYKARA, T & HAZER, B. Gamma-ray induced graft copolymerization of methyl methacrylate onto poly(beta-hydroxynonanoate). *Polymer Bulletin (Berlin)* **41**, 53–60 (1998).
165. ILTER, S, HAZER, B, BORCAKLI, M & ATICI, O. Graft copolymerisation of methyl methacrylate onto a bacterial polyester containing unsaturated side chains. *Macromolecular Chemistry and Physics* **202**, 2281–2286 (2001).
166. ARSLAN, H, YESILYURT, N & HAZER, B. Brush type copolymers of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxyoctanoate) with same vinyl monomers via "grafting from" technique by using atom transfer radical polymerization method. *Macromolecular Symposia* **269**, 23–33 (2008).
167. HANY, R *et al.* Chemical synthesis of crystalline comb polymers from olefinic medium-chain-length poly [3-hydroxyalkanoates]. *Macromolecules* **37**, 385–389 (2004).
168. HANY, R, BOHLEN, C, GEIGER, T, SCHMID, M & ZINN, M. Toward non-toxic antifouling : Synthesis of hydroxy-, cinnamic acid-, sulfate-, and zosteric acid-labeled poly[3-hydroxyalkanoates]. *Biomacromolecules* **5**, 1452–1456 (2004).

169. HANY, R *et al.* Chemical synthesis and characterization of POSS-functionalized poly 3-hydroxyalkanoates. *Polymer* **46**, 5025–5031 (2005).
170. ISHIDA, K., HORTENSIUS, R., LUO, X. & MATHER, P. T. Soft bacterial polyester-based shape memory nanocomposites featuring reconfigurable nanostructure. *Journal of Polymer Science Part B : Polymer Physics* **50**, 387–393 (2012).
171. RENARD, E., TERNAT, C., LANGLOIS, V. & GUERIN, P. Synthesis of Graft Bacterial Polyesters for Nanoparticles Preparation. *Macromolecular Bioscience* **3**, 248–252 (2003).
172. RENARD, E, TANGUY, P. Y., SAMAIN, E & GUERIN, P. Synthesis of novel graft polyhydroxyalkanoates. *Macromolecular Symposia* **197**, 11–18 (2003).
173. DOMENEK, S, LANGLOIS, V & RENARD, E. Bacterial polyesters grafted with poly(ethylene glycol) : Behaviour in aqueous media. *Polymer Degradation and Stability* **92**, 1384–1392 (2007).
174. HOCKING, P. J. & MARCHESSAULT, R. H. dans. *Chemistry and technology of biodegradable polymers* (éd. GRIFFIN, G. J. L.) 48–96 (Springer, 1994).
175. LAUZIER, C. A., MONASTERIOS, C. J., SARACOVAN, I, MARCHESSAULT, R. H. & RAMSAY, B. A. Film formation and paper coating with poly ([beta]-hydroxyalkanoate), a biodegradable latex. *Tappi Journal; (United States)* **76**, 71–77 (1993).
176. CHEN, G. Q. dans. *Biodegradable polymers for industrial applications* (éd. SMITH, R) 32–56 (Woodhead Publishing, London, 2005).
177. CHEN, G. Q. & WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **26**, 6565–6578 (2005).
178. YOO, H. S., LEE, E. A., YOON, J. J. & PARK, T. G. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **26**, 1925–1933 (2005).
179. CHUNG, C & BURDICK, J. A. Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 243–262 (2008).
180. SCHMIDT, D & HOERSTRUP, S. P. Tissue engineered heart valves based on human cells. *Swiss Medical Weekly* **136**, 618–623 (2006).

181. ENGELMAYR, G. C., HILDEBRAND, D. K., SUTHERLAND, F. W. H., MAYER, J. E. & SACKS, M. S. A novel bioreactor for the dynamic flexural stimulation of tissue engineered heart valve biomaterials. *Biomaterials* **24**, 2523–2532 (2003).
182. SODIAN, R *et al.* Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves. *Asaio Journal* **46**, 107–110 (2000).
183. HUTMACHER, D. W. *et al.* Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research* **55**, 203–216 (2001).
184. SODIAN, R *et al.* Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation* **102**, 22–29 (2000).
185. STOCK, U. A. *et al.* Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **119**, 732–740 (2000).
186. STAMM, C *et al.* Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering. *Annals of Thoracic Surgery* **78**, 2084–2092 (2004).
187. HOERSTRUP, S. P. *et al.* Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* **102**, 44–49 (2000).
188. CASSELL, O. C. S., HOFER, S. O. P., MORRISON, W. A. & KNIGHT, K. R. Vascularisation of tissue-engineered grafts : the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *British Journal of Plastic Surgery* **55**, 603–610 (2002).
189. STOCK, U. A. *et al.* Patch augmentation of the pulmonary artery with bioabsorbable polymers and autologous cell seeding. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **120**, 1158–1167 (2000).
190. SHUM-TIM, D *et al.* Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *Annals of Thoracic Surgery* **68**, 2298–2304 (1999).
191. OH, S. H. *et al.* Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. *Biomaterials* **29**, 1601–1609 (2008).
192. HAZARI, A, WIBERG, M, JOHANSSON-RUDEN, G, GREEN, C & TERENGI, G. A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerve gap repair. *British Journal of Plastic Surgery* **52**, 653–657 (1999).

193. MOSAHEBI, A, FULLER, P, WIBERG, M & TERENGI, G. Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology* **173**, 213–223 (2002).
194. MOSAHEBI, A, WIBERG, M & TERENGI, G. Addition of fibronectin to alginate matrix improves peripheral nerve regeneration in tissue-engineered conduits. *Tissue Engineering* **9**, 209–218 (2003).
195. TERENGI, G & MOSAHEBI, A. dans *Glial Interfaces in the Nervous System : Role in Repair and Plasticity* (éds. ALDSKOGIUS, H & FRAHER, J) 13–20 (IOS Press, 2002).
196. ARMSTRONG, S. J., WIBERG, M, TERENGI, G & KINGHAM, P. J. ECM molecules mediate both Schwann cell proliferation and activation to enhance neurite outgrowth. *Tissue Engineering* **13**, 2863–2870 (2007).
197. NI, J & WANG, M. In vitro evaluation of hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composite. *Materials Science and Engineering : C* **20**, 101–109 (2002).
198. CHEN, L. J. & WANG, M. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. *Biomaterials* **23**, 2631–2639 (2002).
199. BOEREE, N. R., DOVE, J, COOPER, J. J., KNOWLES, J. C. & HASTINGS, G. W. Development of a degradable composite for orthopaedic use : mechanical evaluation of an hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite material. *Biomaterials* **14**, 793–796 (1993).
200. COSKUN, S, KORKUSUZ, F & HASIRCI, V. Hydroxyapatite reinforced poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based degradable composite bone plate. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **16**, 1485–1502 (2005).
201. GALEGO, N *et al.* Characterization and application of poly(beta-hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. *Polymer Testing* **19**, 485–492 (2000).
202. SHISHATSKAYA, E. I., KHLUSOV, I. A. & VOLOVA, T. G. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application : production, in vitro and in vivo investigation. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **17**, 481–498 (2006).

203. COOL, S. M. *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composite biomaterials for bone tissue regeneration : In vitro performance assessed by osteoblast proliferation, osteoclast adhesion and resorption, and macrophage proinflammatory response. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **82A**, 599–610 (2007).
204. DOYLE, C, TANNER, E. T. & BONFIELD, W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials* **12**, 841–847 (1991).
205. LUKLINSKA, Z. B. & BONFIELD, W. Morphology and ultrastructure of the interface between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **8**, 379–383 (1997).
206. DENG, Y, ZHAO, K, ZHANG, X. F., HU, P & CHEN, G. Q. Study on the three-dimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes on polyhydroxyalkanoate scaffolds. *Biomaterials* **23**, 4049–4056 (2002).
207. SUN, J. Y., WU, J, LI, H. Y. & CHANG, J. Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for cartilage tissue engineering. *European Polymer Journal* **41**, 2443–2449 (2005).
208. ZHAO, K, DENG, Y, CHEN, J. C. & CHEN, G. Q. Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* **24**, 1041–1045 (2003).
209. DENG, Y *et al.* Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro. *Biomaterials* **24**, 4273–4281 (2003).
210. KOSE, G. *et al.* Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials* **26**, 5187–5197 (2005).
211. WANG, Y, BIAN, Y. Z., WU, Q & CHEN, G. Q. Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits. *Biomaterials* **29**, 2858–2868 (2008).

-
212. DOMB, A., AMSELEM, S., SHAH, J. & MANIAR, M. Degradable polymers for site-specific drug delivery. *Polymers for Advanced Technologies* **3**, 279–292 (1992).
213. POUTON, C. W. & AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **18**, 133–162 (1996).
214. CHEN, D. R., BEI, J. Z. & WANG, S. G. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. *Polymer Degradation and Stability* **67**, 455–459 (2000).
215. DELLACHERIE, E., GREF, R. & QUELLEC, P. Stealth, nanospheres as new injectable drug carriers : a promising way ? *M S-Medecine Sciences* **17**, 619–626 (2001).
216. UHRICH, K. E., CANNIZZARO, S. M., LANGER, R. S. & SHAKESHEFF, K. M. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews* **99**, 3181–3198 (1999).
217. PANYAM, J. & LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 329–347 (2003).
218. KORSATKO, W., WABNEGG, B., BRAUNEGG, G., LAFFERTY, R. M. & STREMPFL, F. Poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (PHBA) - A biodegradable carrier for long-term medication dosage .1. Development of parenteral matrix tablets for long-term application of pharmaceuticals. *Pharmazeutische Industrie* **45**, 525–527 (1983).
219. KORSATKO, W., WABNEGG, B., TILLIAN, H. M., BRAUNEGG, G. & LAFFERTY, R. M. Poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (PHBA) - A biodegradable carrier for long-term medication dosage .2. The biodegradation in animal organism and in vitro-in vivo correlation of the liberation of pharmaceuticals from parenteral matrix retard tablets. *Pharmazeutische Industrie* **45**, 1004–1007 (1983).
220. YAGMURLU, M. F. *et al.* Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system : In vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis. *Journal of Biomedical Materials Research* **46**, 494–503 (1999).
221. TURESIN, F., GURSEL, I. & HASIRCI, V. Biodegradable polyhydroxyalkanoate implants for osteomyelitis therapy : in vitro antibiotic release. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **12**, 195–207 (2001).

222. GURSEL, I, KORKUSUZ, F, TURESIN, F, ALAEDDINOGLU, N. G. & HASIRCI, V. In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials* **22**, 73–80 (2001).
223. VERGNOL, G., SOW, H., RENARD, E., HAROUN, F. & LANGLOIS, V. Multilayer approach for tuning the drug delivery from poly(3-hydroxyalkanoate)s coatings. *Reactive & Functional Polymers* **72**, 260–267 (2012).
224. WANG, Z. X. *et al.* Mechanism of enhancement effect of dendrimer on transdermal drug permeation through polyhydroxyalkanoate matrix. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**, 537–540 (2003).
225. WANG, Z. X. *et al.* Novel transdermal drug delivery system with polyhydroxyalkanoate and starburst polyamidoamine dendrimer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95**, 541–543 (2003).
226. KIM, H. W., CHUNG, C. W., HWANG, S. J. & RHEE, Y. H. Drug release from and hydrolytic degradation of a poly(ethylene glycol) grafted poly(3-hydroxyoctanoate). *International Journal of Biological Macromolecules* **36**, 84–89 (2005).
227. KASSAB, A. C. *et al.* Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **8**, 947–961 (1997).
228. KASSAB, A. C., PISKIN, E, BILGIC, S, DENKBAS, E. B. & XU, K. Embolization with polyhydroxybutyrate (PHB) microspheres : In-vivo studies. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **14**, 291–303 (1999).
229. SENDIL, D, GURSEL, I, WISE, D. L. & HASIRCI, V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *Journal of Controlled Release* **59**, 207–217 (1999).
230. LI, H. Y. & CHANG, J. Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from PHBV-wollastonite composite microspheres. *Journal of Controlled Release* **107**, 463–473 (2005).
231. HUANG, W, WANG, Y. J., REN, L, DU, C & SHI, X. T. A novel PHBV/HA microsphere releasing system loaded with alendronate. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **29**, 2221–2225 (2009).

-
232. SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R. & RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* **70**, 1–20 (2001).
 233. BRANNON-PEPPAS, L. & BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 1649–1659 (2004).
 234. BARAN, E. T., OZER, N & HASIRCI, V. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy : an in vitro study. *Journal of Microencapsulation* **19**, 363–376 (2002).
 235. RENARD, E, TIMBART, L, VERGNOL, G & LANGLOIS, V. Role of Carboxyl Pendant Groups of Medium Chain Length Poly(3-hydroxyalkanoate)s in Biomedical Temporary Applications. *Journal of Applied Polymer Science* **117**, 1888–1896 (2010).

Chapitre 2

Préparation d'un PHA « clickable » et synthèse de copolymères amphiphiles greffés

Présentation de l'article

Dans le chapitre précédent, l'état de l'art concernant la synthèse de copolymères à base de PHAs a été présenté. Il a été montré que les méthodes permettant la synthèse de copolymères à partir d'oligomères préformés ne sont pas totalement satisfaisantes, celles-ci générant de faibles rendements, nécessitant des étapes complexes de purification ou ne permettant pas la synthèse de copolymères bien définis.

Afin de pallier à ces limitations, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de la chimie « click » pour la synthèse de copolymères amphiphiles greffés à base de PHAs. Le concept de chimie « click » caractérise des réactions sélectives, stéréospécifiques, thermodynamiquement favorisées et assurant de bons rendements. Parmi ces réactions, la cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre (I) (Copper I-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC) est largement utilisée, réunissant au mieux ces propriétés.

Afin d'évaluer l'efficacité de cette réaction pour la synthèse de PHAs amphiphiles, le greffage de chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) de masses molaires de 550 g.mol⁻¹ et de 5000 g.mol⁻¹ (PEG₅₅₀ et PEG₅₀₀₀) a été investigué. Dans un premier temps, des oligomères de poly(3-hydroxyoctanoate)-*co*-(3-hydroxyundécénoate) (PHOU) ont été synthétisés par méthanolyse, puis les doubles liaisons pendantes du PHOU ont été quantitativement oxydées en acides carboxyliques grâce à l'action du KMnO₄ en présence d'éther couronne 18-couronne-6 et d'acide acétique. Les acides carboxyliques ainsi formés ont permis le greffage d'alcool propargylique par estérification, générant un PHA « clickable » porteur de triples liaisons. Enfin, le greffage des oligomères de PEG porteurs de fonction azoture a finalement été réalisé en présence d'iodure de cuivre (CuI) ainsi que de *N,N,N',N'',N'''*-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA) dans le dichlorométhane.

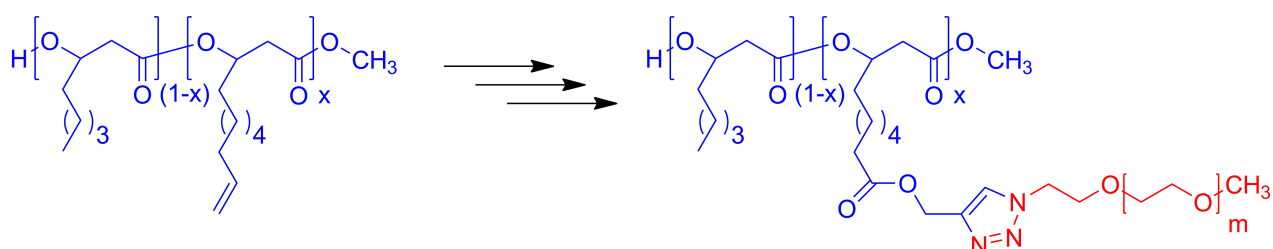
Les résultats ont montré le succès du greffage du PEG de 550 g.mol⁻¹ avec un taux de conversion de 94% ainsi que celui du PEG de 5000 g.mol⁻¹ avec un taux de conversion de 84%. Cette étude démontre donc l'efficacité de la CuAAC pour le greffage d'oligomères préformés, même dans le cas d'oligomères de masses molaires relativement importantes.

Preparation of « clickable » poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) : application to poly(ethylene glycol) (PEG) graft copolymers synthesis

Macromolecular Rapid Communications, 2010, 31, 619-624

JULIEN BABINOT, ESTELLE RENARD, VALÉRIE LANGLOIS

Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE), Systèmes Polymères
Complexes, UMR CNRS 7182, 2-8 rue Henri Dunant 94320 Thiais, France



2.1 Abstract

A new synthesis of amphiphilic biodegradable copolymers consisting of hydrophobic poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) backbone and hydrophilic poly(ethylene glycol) (PEG) units as side chains is described. Poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyundecenoate) (PHOU) was first methanolized and its unsaturated side chains were quantitatively oxidized to carboxylic acid. Esterification with propargyl alcohol led to an alkyne-containing “clickable” PHA in 71% conversion. Its reactivity was successfully demonstrated by grafting azide-terminated PEG chains of 550 and 5000 g.mol⁻¹, respectively. All products were fully characterized using GPC, ¹H and COSY NMR.

2.2 Introduction

Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) are bacterial polyesters that can be considered as promising biopolymers due to their renewability, biodegradability and biocompatibility.[1] These two latter properties make them good candidates for medical applications (tissue engineering, drug delivery carrier);[2] however, their hydrophobic character and their slow hydrolytic degradation often limit their use.[3] Compared to other aliphatic polyesters, poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyundecenoate) (PHOU) has the major advantage to be functionalized on its side chains, allowing post-polymerization modifications; a range of functional groups have been introduced, such as epoxide,[4] carboxylic acid,[5, 6] chlorine,[7] or hydroxyl groups.[8–10] These functional groups can be used to further conjugate oligomers, bioactive compounds or targeting molecules. Poly(ethylene glycol) (PEG), as hydrophilic and biocompatible polyether, is widely used in biomedical research and applications.[11–15] The presence of PEG is of particular interest, as PEG-functionalized polymers can be used in aqueous media, are resistant to protein adsorption and exhibit enhanced resistance time in delivery applications.[16–18] We previously reported grafting of PEG oligomers on poly(3-hydroxyoctanoate-co-9-carboxy-3-hydroxydecanoate) (PHOD) by direct esterification, but the efficiency of the method only allowed grafting of small oligomers.[19] Because of its high selectivity, reliability and tolerance to a broad range of functional groups and reaction conditions, “click chemistry”, especially the Cu-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition (CuAAC)

is a powerful tool for post-polymerization modification of polymers.[20, 21] In this report, we focused on the application of CuAAC to the synthesis of amphiphilic PHA-*g*-PEG copolymers. To achieve this goal, PHOU was first methanolized and double bonds were oxidized to carboxylic acid functions. The resulting PHOD oligomers were esterified with propargyl alcohol using carbodiimide chemistry, leading to an alkyne-functionalized PHA. Finally, grafting of two azide-terminated PEG chains of 550 and 5000 g.mol⁻¹, respectively, was studied. Copolymers were fully characterized using GPC, ¹H and COSY NMR.

2.3 Experimental Part

2.3.1 Materials

Anhydrous MeOH 99.8 %, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC hydrochloride), propargyl alcohol, poly(ethylene glycol) methyl ether average Mn ~550 (PEG₅₅₀), *p*-toluenesulfonyl chloride 99.5% (TsCl), poly(ethylene glycol) monomethyl ether mesylate 5000 (PEG₅₀₀₀-OMs), sodium azide 99.5 %, copper(I) iodide 99.5 %, and *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylenetriamine 99 % (PMDETA) were purchased from Sigma Aldrich. 18-crown-6 99%, acetic acid, 4-dimethylaminopyridine (DMAP) 99% were obtained from Acros Organics. Sulfuric acid 95%, DMSO synthesis grade and pyridine synthesis grade were obtained from SDS. PHOU was obtained from EMPA, Swiss Fed Labs Mat Testing & Res, Lab Biomat, CH-9014 St Gallen, Switzerland, synthesized following a previously reported procedure.[22] Its molar composition is of 14% of unsaturated units and 86% of 3-hydroxyoctanoate, as determined by ¹H NMR. CH₂Cl₂ was obtained from SDS and was distilled over CaH₂ before use. All other materials were used without further purification.

2.3.2 Synthesis of PHOU oligomers (1)

PHOU (250 mg) was dissolved in 10 mL of CH₂Cl₂. 10 mL of anhydrous MeOH were introduced to the solution and 0.75 mL of H₂SO₄ was added. The solution was then stirred at 100°C (the vessel was hermetically closed) for 8 minutes to obtain the desired molar mass. After cooling in an ice bath, 5 mL of distilled water were added ;

after decantation, the organic layer was washed again with distilled water, dried under MgSO_4 and filtered. The solvent was evaporated and the resulting product was dried under vacuum at 40°C (yield 93%).

2.3.3 Oxidation of PHOU oligomers (2)

PHOU oligomers were oxidized following a previously reported procedure.[23]

2.3.4 Synthesis of PHOD-alkyne (3)

2 (0.29 g, 1.95 mmol i.e. 0.27 mmol of COOH groups) was dissolved in 7 mL of CH_2Cl_2 under Argon. Propargyl alcohol (1.14 mL, 19.6 mmol) and EDC hydrochloride (155 mg, 0.81 mmol) were added and the mixture was stirred for 48h at room temperature. 5mL of CH_2Cl_2 were added and the solution was washed twice with 2 mL of NH_4Cl 1M. After drying of the organic phase over MgSO_4 , the solvent was removed under reduced pressure and the polymer was dried under vacuum to yield **3** as a yellow viscous liquid (yield 86%).

2.3.5 Synthesis of PEG azide

2.3.5.1 Tosylation of PEG₅₅₀

PEG (5 g, 9.1 mmol) was dissolved in 30 mL of CH_2Cl_2 / Pyridine (1 :1) solution. p-toluenesulfonyl chloride (2.08 g, 10.9 mmol) and DMAP (56 mg, 0.45 mmol) were added and the solution was stirred for 5h. 40 mL of cold water were added and the aqueous phase was extracted three times with 40 mL of CH_2Cl_2 . The combined organic phases were successively washed with 3x40 mL NH_4Cl sat. solution and 3x40mL NaCl sat. solution. After drying over MgSO_4 , the organic phase was concentrated under reduced pressure and the resulting product (PEG₅₅₀-OTs) dried under vacuum (yield 95%).

2.3.5.2 Azidation procedure for PEG₅₅₀-OTs and PEG₅₀₀₀-OMs

PEG₅₅₀-OTs (3.5 g, 4.97 mmol) was dissolved in 15mL of dry DMF under Argon. NaN_3 (975 mg, 15 mmol) was added and the solution was stirred at 80°C for 24h. After removing DMF under reduced pressure, 50 mL of CH_2Cl_2 were added and the resulting

solution was washed 3 times with 25 mL of H₂O. The organic phase was dried over MgSO₄ and solvent was removed under reduced pressure to give PEG₅₅₀-N₃ in 83% yield. Same procedure was applied for PEG₅₀₀₀-OMs (PEG₅₀₀₀-N₃, 77% yield).

2.3.6 Synthesis of PHA-g-PEG (4)

3 (0.312 g, 2.03 mmol, 0.2 mmol of triple bonds) was dissolved in 6 mL of CH₂Cl₂. Copper (I) iodide (15 mg, 40% mol relatively to triple bonds, 0.08 mmol) and PMDETA (42 μ L, 0.2 mmol) were added to the stirring polymer solution. PEG₅₅₀-N₃ (115 mg, 0.2 mmol) dissolved in a minimum of CH₂Cl₂ (3mL) was added and the reaction mixture was heated at 50 °C for 48h. The solvent was then removed under reduced pressure and the crude product was dissolved in 50 mL of DMSO. **4** was purified by dialysis against water (molecular weight cut off, 6-8 000 Da) for 5 days, and recovered by freeze-drying (yield 73%).

2.3.7 Polymer Characterization

¹H- and COSY-NMR spectra were recorded in CDCl₃ using a Bruker 400 MHz NMR spectrometer. Gel permeation chromatography (GPC) experiments were performed in THF (1 mL.min⁻¹) at room temperature using a Spectra Physics P100 pump, and two PLgel Polymer Laboratories columns (5 μ m Mixte-C). A Wyatt Technology Optilab Rex interferometric refractometer was used as detector. The molar masses were calibrated with polystyrene standards. DSC measurements were conducted on a Perkin Elmer Diamond DSC apparatus. The following protocol was used for each sample : heating from -105 to +150 °C at 10 °C.min⁻¹, cooling to -105 °C at 200°C.min⁻¹ and then heated again to 150 °C at 10 °C.min⁻¹. The glass transition temperatures (T_g) reported in the table 1 correspond to second runs.

2.4 Results and Discussion

In this study, two amphiphilic PHA-*g*-PEG copolymers with controlled segment length and narrow molecular weight distribution were synthesized via “click” chemistry. To find out the influence of PEG length on the reactivity, PEG₅₅₀ and PEG₅₀₀₀, where 550

and 5000 corresponds to their theoretical number-average molecular weight (\overline{M}_n), were considered.

The synthesis route is given by Figure 2.1.

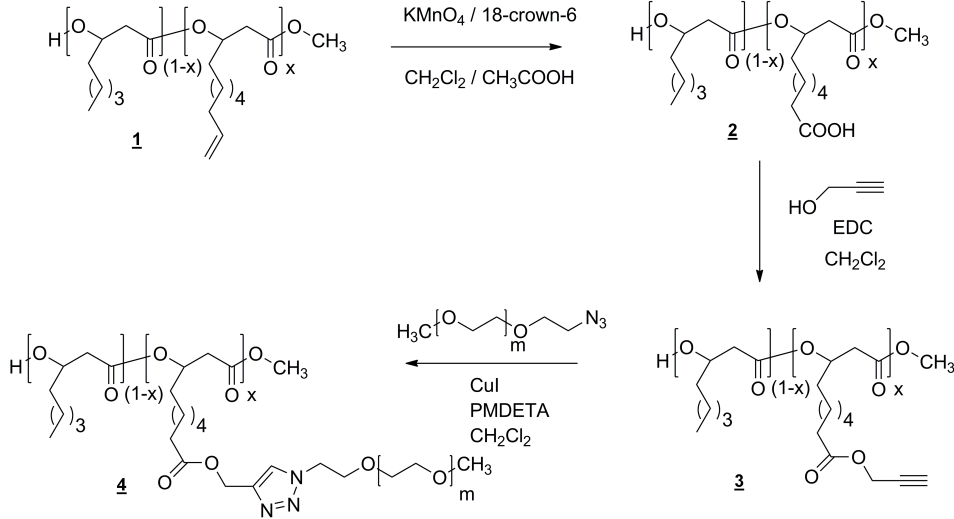


Figure 2.1: Synthesis route of PHA-*g*-PEG

First, well defined PHOU oligomers were prepared by acid-catalyzed methanolysis.[23] By controlling reaction time, oligomers with \overline{M}_n of around 5000 g.mol⁻¹ were obtained in 93% mass yield (Table 2.1).

| Sample ^{a)} | Yield % | Conversion % | \overline{M}_n ^{b)} g.mol ⁻¹ | \overline{M}_n ^{c)} g.mol ⁻¹ | PDI ^{c)} | T_g ^{d)} °C | T_m ^{e)} °C | ΔH_m ^{e)} J.g ⁻¹ |
|---|------------------|-----------------|---|---|-------------------|---------------------------|---------------------------|---|
| PHOU ₅₀₀₀ | 93 ^{f)} | — | 4900 | 5600 | 1.9 | -38 | — | — |
| PHOD | 96 | 100 | 4900 | 4700 | 2.2 | -32 | — | — |
| PHOD-alkyne | 86 | 71 | 5100 | 4400 | 1.9 | -42 | — | — |
| PHA ₅₀₀₀ - <i>g</i> -PEG ₅₅₀ | 73 | 94 | — | 6100 | 1.7 | -40 | — | — |
| PHA ₅₀₀₀ - <i>g</i> -PEG ₅₀₀₀ | 80 | 84 | — | 16300 | 1.8 | — | 54 | 76 |

a)The subscript number are the \overline{M}_n of the oligomers estimated from ¹H NMR measurements;

b)Determined by ¹H NMR; c)Determined by GPC (THF, polystyrene standards); d)Obtained from the second heating run of DSC; e)Obtained from the first heating of DSC; f)Mass yield

TABLE 2.1: Characteristics of modified PHAs

Their molar mass was calculated by integration of the ¹H NMR spectral signal at 3.6

ppm (**i**, OCH_3 PHA backbone) against the signal at 5.15 ppm (**b,b'**, OCHRCH_2 PHA backbone) (Figure 2.2).

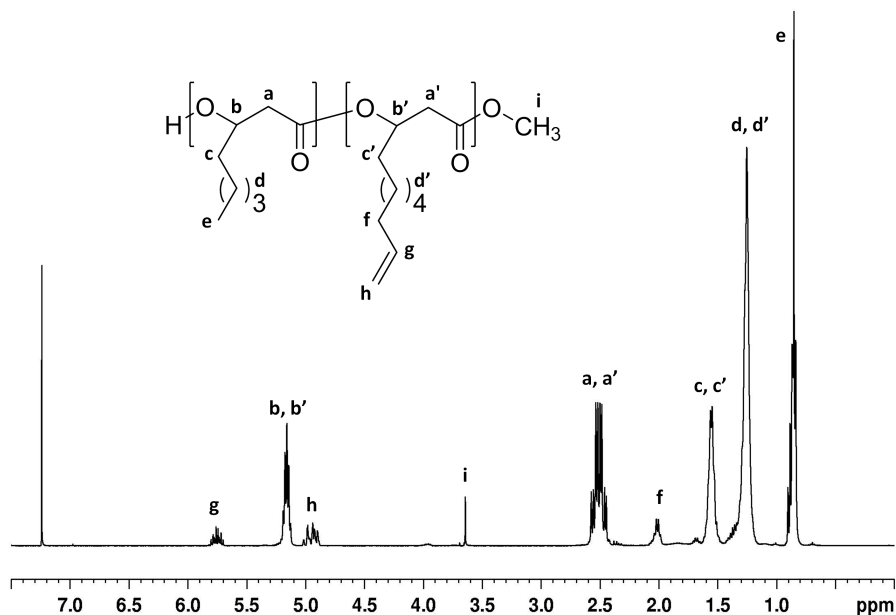


Figure 2.2: ^1H NMR spectrum of PHOU_{5000} oligomers

Values obtained from GPC analysis were in good agreement with ^1H NMR calculation. Furthermore, the percentage of unsaturation was found to be 14%, as in the native PHOU, confirming the insensitivity of double bonds to methanolysis.

PHOU oligomers were converted in PHOD oligomers according to our previous reported procedure.[5] Potassium permanganate and 18-crown-6 as phase transfer agent were used to quantitatively oxidize double bonds to carboxylic acid. The structure of **2** was confirmed by ^1H NMR (data not shown), indicating the total disappearance of the ethylenic protons at 4.95 and 5.75 ppm. No significant modification of the molecular weight was observed after oxidation.

The side terminal carboxylic acid functions of the oligomers were used to acetylene-functionalize PHOD by esterification with propargyl alcohol using EDC hydrochloride as coupling agent. This reaction occurred at room temperature in dichloromethane to give PHOD-alkyne **3** in 86% yield. ^1H NMR investigations (Figure 2.3a) confirmed the structure of **3** with the appearance of new signals at 4.65 ppm (**g**, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) and

2.45 ppm (**h**, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$).

The presence of **h** was validated by COSY NMR (Figure 2.3b), showing overlapping of the signal with the CH_2 polymer backbone protons **a,a'** (correlation **g**→**h**). The conversion in acetylene groups was calculated from the relative integration of signal at 4.65 ppm (**g**) against signal at 5.15 ppm (**b,b'**) (Table 2.1). The optimisation of reaction conditions did not allow increasing the conversion rate; it could be assigned to the fact that COOH side terminal groups did not fully react because of formation of N-acylurea as by product.[24] This compound is unreactive toward alcohol and does not form ester bonds. Molar masses calculated from ^1H NMR analysis, in good agreement with those from GPC analysis, did not show obvious changes compared to PHOD precursor, indicating that the esterification conditions did not cause significant degradation of the polyester. It is noteworthy that T_g of PHOD-alkyne is lower than the PHOD one; it can be attributed to the absence of hydrogen bonding in the esterified product.

α,ω -PEG monomethyl ether azide was synthesized by nucleophilic substitution of mesylated-PEG₅₀₀₀ methyl ether using sodium azide.[25] For PEG₅₅₀ a tosylated PEG derivative was used. The presence of the terminal azide group was characterized by a stretching frequency at 2105 cm^{-1} in the FTIR spectrum and by ^1H NMR (disappearance of tosyl proton signals at 2.39, 7.26 and 7.73 ppm or mesyl protons at 3.04 ppm, respectively) (results not shown).

« Click » CuAAC of **3** with PEG-azide was performed in dichloromethane at 50°C , using CuI and PMDETA as catalyst and base, respectively (Scheme 1). After evaporation of dichloromethane and dissolution in DMSO, the resulting copolymers were purified by dialysis against water in order to remove free unreacted PEG and recovered by freeze-drying. The success of the reaction was confirmed by FTIR with the disappearance of the azide signal at 2105 cm^{-1} and by ^1H NMR. The spectrum of PHA_{5000-g}-PEG₅₅₀ is given in Figure 2.4.

Effective grafting was attested by the shifting of the signal **g**: it becomes more deshielded (from 4.65 ppm to 5.1ppm) in α of triazole ring than in α of triple bond. The HSQC spectrum showed overlapping of this signal with **b,b'** (spectrum not shown). We can also notice the appearance of signals **h** and **i**, corresponding to the triazole proton and the PEG methylene protons in α of triazole ring, respectively. The conversion rate was calculated from the relative integration of signal **m** (OCH_3 PEG end chain) against **a,a'** (OCHRCH_2 PHA backbone) (Table 1). GPC analysis revealed a substantial in-

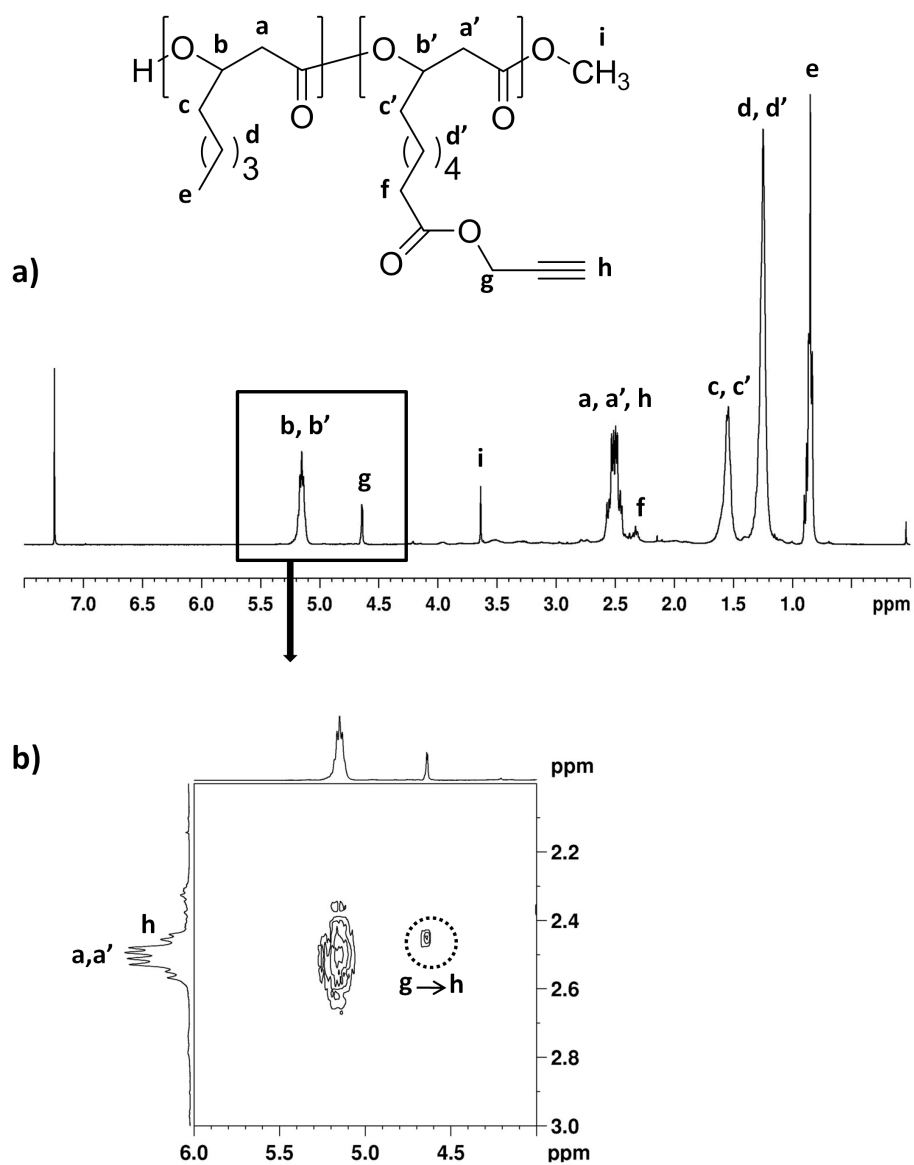


Figure 2.3: (a) ^1H NMR and (b) COSY spectrum of PHOD-alkyne

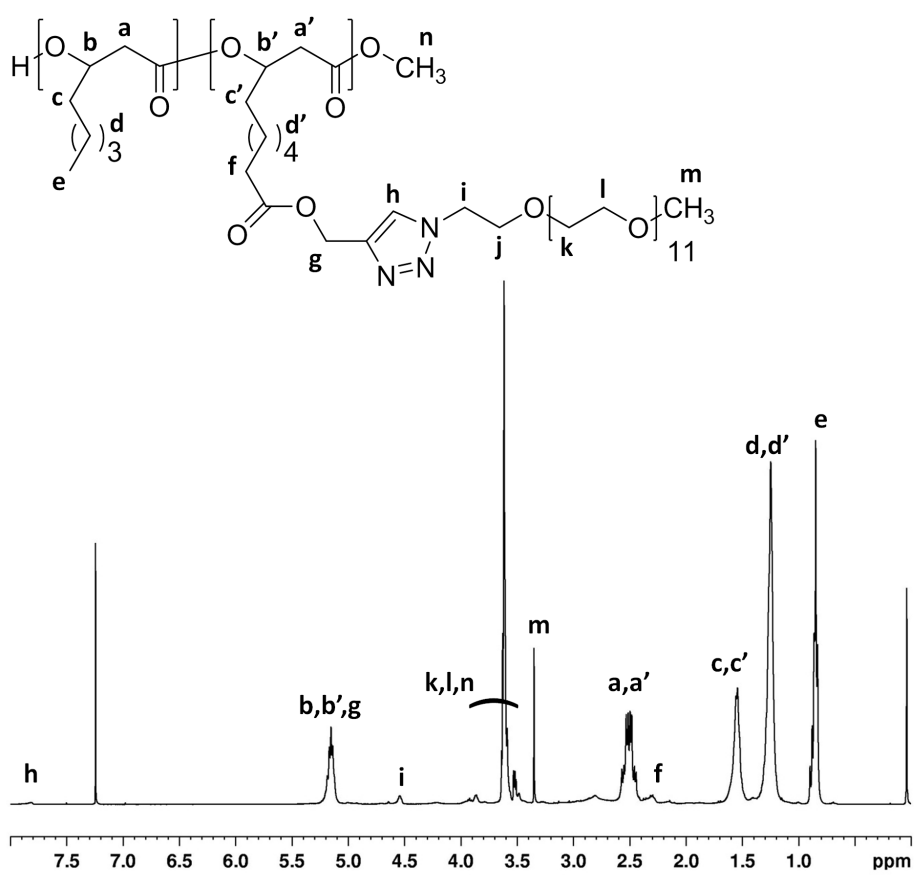


Figure 2.4: ¹H NMR spectra of PHA₅₀₀₀-g-PEG₅₅₀

crease in molecular weight compared to PHOD-alkyne in the expected order of height ; indeed, with a 5000 g.mol^{-1} PHA oligomer esterified at 71%, one can foresee about 3.3 PEG-grafted chains. For $\text{PHA}_{5000}\text{-}g\text{-PEG}_{550}$, the conversion rate is 94%, meaning the grafting of 3.1 PEG chains ; concerning $\text{PHA}_{5000}\text{-}g\text{-PEG}_{5000}$, the conversion rate is 84%, corresponding to 2.8 PEG chains grafted.

DSC analyses of graft copolymers (Table 2.1) were also taken. In $\text{PHA}_{5000}\text{-}g\text{-PEG}_{550}$, the mass fraction of PEG represents 26% ; the incorporation of short and soft segments did not notably modify the T_g of PHA_{5000} . In case of $\text{PHA}_{5000}\text{-}g\text{-PEG}_{5000}$, the mass fraction of PEG is 74%. The copolymer exhibited semi-crystalline behaviour and a melting temperature similar to the melting temperature of native PEG segment (60°C) ; the T_g cannot be detected.

2.5 Conclusion

In summary, a new strategy to functionalize PHAs has been presented. This synthesis relied on alkyne-functionalization of PHA and subsequent grafting of azide-terminated PEG chains using « click » chemistry. More precisely, grafting of PEG_{550} and notably PEG_{5000} chains were performed, demonstrating efficiency of the method on modified PHAs. Consequently, this approach represents a convenient and promising method to further extend PHA's chemical diversity.

Efforts are now focused on studying the amphiphilic properties of copolymers, especially the influence of both PHAs and PEG chains length, as well as their aggregation behaviour in water.

References

1. LENZ, R. W. & MARCHESSAULT, R. H. Bacterial polyesters : Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* **6**, 1–8 (2005).
2. CHEN, Z. F., CHENG, S. T. & XU, K. T. Block poly(ester-urethane)s based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate). *Biomaterials* **30**, 2219–2230 (2009).
3. SENDIL, D, GURSEL, I, WISE, D. L. & HASIRCI, V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *Journal of Controlled Release* **59**, 207–217 (1999).
4. BEAR, M. M. *et al.* Bacterial poly-3-hydroxyalkenoates with epoxy groups in the side chains. *Reactive and Functional Polymers* **34**, 65–77 (1997).
5. KURTH, N *et al.* Poly(3-hydroxyoctanoate) containing pendant carboxylic groups for the preparation of nanoparticles aimed at drug transport and release. *Polymer* **43**, 1095–1101 (2002).
6. STIGERS, D. J. & TEW, G. N. Poly(3-hydroxyalkanoate)s Functionalized with Carboxylic Acid Groups in the Side Chain. *Biomacromolecules* **4**, 193–195 (2003).
7. ARKIN, A. H., HAZER, B & BORCAKLI, M. Chlorination of poly(3-hydroxy alkanates) containing unsaturated side chains. *Macromolecules* **33**, 3219–3223 (2000).
8. EROGLU, M. S., HAZER, B, OZTURK, T & CAYKARA, T. Hydroxylation of pendant vinyl groups of poly(3-hydroxy undec-10-enoate) in high yield. *Journal of Applied Polymer Science* **97**, 2132–2139 (2005).
9. LEE, M. Y., PARK, W. H. & LENZ, R. W. Hydrophilic bacterial polyesters modified with pendant hydroxyl groups. *Polymer* **41**, 1703–1709 (2000).

10. RENARD, E, POUX, A, TIMBART, L, LANGLOIS, V & GUERIN, P. Preparation of a novel artificial bacterial polyester modified with pendant hydroxyl groups. *Biomacromolecules* **6**, 891–896 (2005).
11. CHIU, H. C., CHERN, C. S., LEE, C. K. & CHANG, H. F. Synthesis and characterization of amphiphilic poly(ethylene glycol) graft copolymers and their potential application as drug carriers. *Polymer* **39**, 1609–1616 (1998).
12. GUO, S. R., SHEN, L. J. & FENG, L. X. Surface characterization of blood compatible amphiphilic graft copolymers having uniform poly(ethylene oxide) side chains. *Polymer* **42**, 1017–1022 (2001).
13. HOU, S. S. & KUO, P. L. Synthesis and characterization of amphiphilic graft copolymers based on poly(styrene-co-maleic anhydride) with oligo(oxyethylene) side chains and their GPC behavior. *Polymer* **42**, 2387–2394 (2001).
14. MIHAYLOVA, M. D., KRESTEV, V. P., KRESTEVA, M. N., AMZIL, A & BERLINOVA, I. V. Amphiphilic graft copolymers with poly(oxy ethylene) side chains : supermolecular structure in solid state - I. WAXS studies. *European Polymer Journal* **37**, 233–239 (2001).
15. PARRISH, B & EMRICK, T. Aliphatic polyesters with pendant cyclopentene groups : Controlled synthesis and conversion to polyester-graft-PEG copolymers. *Macromolecules* **37**, 5863–5865 (2004).
16. GAN, D. J. & LYON, L. A. Synthesis and protein adsorption resistance of PEG-modified poly(N-isopropylacrylamide) core/shell microgels. *Macromolecules* **35**, 9634–9639 (2002).
17. LI, S. M. *et al.* Enzymatic degradation of block copolymers prepared from epsilon-caprolactone and poly(ethylene glycol). *Biomacromolecules* **3**, 525–530 (2002).
18. PRIME, K. L. & WHITESIDES, G. M. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide) - A model system using self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 10714–10721 (1993).
19. RENARD, E., TERNAT, C., LANGLOIS, V. & GUERIN, P. Synthesis of Graft Bacterial Polyesters for Nanoparticles Preparation. *Macromolecular Bioscience* **3**, 248–252 (2003).

-
20. BINDER, W. H. & SACHSENHOFER, R. 'Click' chemistry in polymer and materials science. *Macromolecular Rapid Communications* **28**, 15–54 (2007).
 21. BINDER, W. H. & SACHSENHOFER, R. 'Click' chemistry in polymer and material science : An update. *Macromolecular Rapid Communications* **29**, 952–981 (2008).
 22. HANY, R *et al.* Chemical synthesis of crystalline comb polymers from olefinic medium-chain-length poly [3-hydroxyalkanoates]. *Macromolecules* **37**, 385–389 (2004).
 23. TIMBART, L, RENARD, E, TESSIER, M & LANGLOIS, V. Monohydroxylated poly(3-hydroxyoctanoate) oligomers and its functionalized derivatives used as macroinitiators in the synthesis of degradable diblock copolyesters. *Biomacromolecules* **8**, 1255–1265 (2007).
 24. KLAUSNER, Y. S. & BODANSKY, M. Coupling Reagents in Peptide Synthesis. *Synthesis* **1972**, 453–463 (1972).
 25. GARANTI, L & MOLTENI, G. MeOPEG-bounded azide cycloadditions to alkynyl dipolarophiles. *Tetrahedron Letters* **44**, 1133–1135 (2003).

Chapitre 3

Synthèse de copolymères amphiphiles diblocs PHA-*b*-PEG par chimie « click »

Présentation de l'article

Les résultats du chapitre précédent (Chapitre 2) ont montré que la cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre (I) (CuAAC) était une méthode de choix pour la synthèse de copolymères amphiphiles greffés à base de PHAs, spécialement dans le cas de l'utilisation d'oligomères de PEG de masses molaires relativement élevées.

Dans cet article, nous nous sommes intéressés à la synthèse de divers copolymères d'architecture « à blocs » possédant un PEG-N₃ de 5000 g.mol⁻¹ comme partenaire hydrophile et des oligomères de PHAs de différentes natures (PHA-scl et PHA-mcl) et de différentes masses molaires comme partenaires hydrophobes. Des oligomères de poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalérate) (PHBHV), poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) ainsi que de poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHOHHx) ont tout d'abord été préparés par traitement thermique (3800 g.mol⁻¹ < \overline{M}_n < 15000 g.mol⁻¹). Ils ont ensuite été quantitativement fonctionnalisés par de la propargylamine afin d'introduire une fonction alcyne. Enfin, les blocs de PHAs et de PEG ont été couplés par CuAAC en présence d'iodure de cuivre et de PMDETA dans le chloroforme.

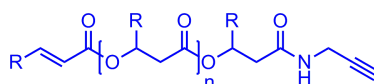
Les analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN), chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et thermogravimétrie (TGA) ont montré le succès du couplage quelle que soit la nature ou la masse molaire du PHA ; des copolymères bien définis de 9900 à 23100 g.mol⁻¹ ont ainsi été obtenus. En résumé, cette méthode permet donc une synthèse modulaire, simple à mettre en oeuvre et efficace de copolymères amphiphiles diblocs à base de PHA-scl et de PHA-mcl. Une étude de l'auto-association en milieu aqueux des copolymères à base de PHA-mcl sera présentée dans le chapitre 4.

Controlled Synthesis of Well Defined Poly(3-hydroxyalkanoate)s-based Amphiphilic Diblock Copolymers Using Click Chemistry

Macromolecular Chemistry and Physics, **2011**, 212, 278-285

JULIEN BABINOT, ESTELLE RENARD, VALÉRIE LANGLOIS

Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE), Systèmes Polymères Complexes, UMR CNRS 7182, 2-8 rue Henri Dunant 94320 Thiais, France

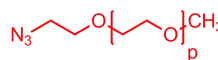


R= CH₃ (0.86), C₂H₅ (0.14): PHBHV

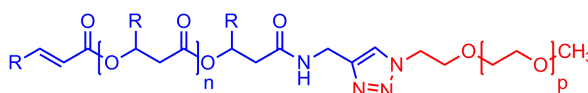
R= CH₃ (0.91), C₃H₇ (0.09) : PHBHHx

R= C₅H₁₁ (0.85), C₃H₇ (0.15) : PHOHHx

Click Ligation



CuI
PMDETA
CH₂Cl₂



3.1 Abstract

A modular synthesis of short chain length and medium chain length poly(3-hydroxyalkanoate)-*b*-poly(ethylene glycol) (PHAs-*b*-PEG) diblock copolymers is described. First, length-controlled oligomers of hydrophobic poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (PHBHV), poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) and poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-hydroxyhexanoate) (PHOHHx) containing a carboxylic acid end group were obtained by thermal treatment, with molar masses ranging from 3800 to 15000 g.mol⁻¹. After quantitative functionalization with propargylamine, ligation with azide-terminated poly(ethylene glycol) of 5000 g.mol⁻¹ was accomplished using the copper (I) catalyzed azide alkyne cycloaddition (CuAAC). Well-defined diblock copolymers were obtained up to 93% yield, with molar masses ranging from 9900 to 23100 g.mol⁻¹. All products were fully characterized using ¹H NMR, COSY, SEC, TGA and DSC.

3.2 Introduction

Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) are a class of natural biodegradable polyesters accumulated by many bacteria as carbon and energy supply when an essential nutrient is limited.[1, 2] Using various substrates, a wide variety of PHAs are synthesized, differing notably by the length of their side chains.[3] Two types are distinguished, one with short-chain-length, or scl-PHAs, possessing alkyl side chains having up to two carbon atoms; medium-chain-length PHAs, or mcl-PHAs, have at least three carbon atoms on their side chains. The length of side chains leads the physical properties of PHAs, rigid and brittle for scl-PHAs, soft and elastomeric for the mcl-PHAs.

With biocompatibility as desirable feature, PHAs are good candidates for biomedical applications, including biomedical devices, tissue engineering or biodegradable drug carriers.[4, 5] For the latter application, the introduction of a hydrophilic polymer is required to achieve amphiphilic structure. Poly(ethylene glycol) (PEG), as biocompatible polyether, is of special interest due to its low toxicity, non-immunogenicity and its resistance to protein adsorption.[6–8] Different strategies were used to build natural PHAs-PEG copolymers. Using the functionalized side chains of poly[(3-hydroxyoctanoate)-*co*-(3-hydroxyundecenoate)] (PHOU), grafted PEG copolymers were synthesized.[9] In

another approach, triblock copolymers were obtained in a two-steps procedure; [10] after transesterification of natural poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) with ethylene glycol, the resulting PHB-diol was coupled to methoxy PEG monopropionic acid via carbodiimide chemistry. Besides, the synthesis of diblock copolymers was achieved in one-step transesterification of PHB with monomethoxy PEG in presence of bis(2-ethylhexanoate) tin as catalyst. [11] However, control in block length is tricky, as only low molar masses copolymers were obtained.

In this paper, we aim to develop a simple and efficient method to synthesize PHA-*b*-PEG diblock copolymers with controlled size and easy purification. With different native physical properties, scl- and mcl- PHAs have been studied : poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (PHBHV), poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) and poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHOHHx). First, well-defined PHAs oligomers were prepared by thermal treatment ; by varying the time of reaction, different block lengths were synthesized, from 3800 to 15000 g.mol⁻¹. The carboxylic acid end-groups of the blocks were then used to quantitatively couple propargylamine. Finally, to achieve copolymers preparation, we used the copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), [12–14] which has been proven to be a very efficient reaction in the ligation of preformed blocks. [15] Azide-terminated PEG of 5000 g.mol⁻¹ was grafted, leading to perfectly defined copolymers. All oligomers and copolymers were fully characterized by ¹H and COSY NMR, SEC, TGA and DSC analysis.

3.3 Experimental Part

3.3.1 Materials

N-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC hydrochloride) commercial grade, *N*-hydroxysuccinimide 98% (NHS), propargylamine 98%, poly(ethylene glycol) methyl ether $\overline{M}_n = 5000$ g.mol⁻¹ (MeO-PEG₅₀₀₀), methanesulfonyl chloride ≥ 99 % (MsCl), sodium azide 99.5 %, copper(I) iodide 99.5 %, anhydrous *N,N*-dimethylformamide 99,8 % (DMF) and *N,N,N',N'',N''*-pentamethyldiethylenetriamine 99 % (PMDETA) were purchased from Sigma Aldrich. PHBHV was supplied from ICI as Biopol. PHBHHX was supplied from Procter and Gamble. PHOHHx was obtained from EMPA, Swiss Fed Labs Mat Testing & Res, Lab Biomat, CH-9014 St Gallen, Swit-

zerland, synthesized following a previously reported procedure.[16] Isopropanol (iPrOH) was obtained from SDS. CH_2Cl_2 and CHCl_3 were obtained from SDS and were distilled over CaH_2 before use. All other materials were used without further purification.

3.3.2 Synthesis of Poly(ethylene glycol) (PEG) azide

3.3.2.1 Mesylation of MeO-PEG₅₀₀₀

Procedure was accomplished according to a modified reported procedure.[17] PEG₅₀₀₀ methyl ether (10 g, 2 mmol) and triethylamine (1.4 mL, 10 mmol) were placed in 30 mL of anhydrous CH_2Cl_2 under Argon at 0°C. MsCl (780 μL , 10 mmol) dissolved in 30 mL of CH_2Cl_2 was added dropwise and the solution was left to stir overnight (0°C to RT). After concentration under vacuum, the solution was precipitated twice in iPrOH; the product was recovered by filtration and dried under vacuum (92% yield).

3.3.2.2 Azidation of MeO-PEG₅₀₀₀-OMs

MeO-PEG₅₀₀₀-OMs (9.89 g, 1.98 mmol) was dissolved in 60 mL of dry DMF under Argon. NaN_3 (643 mg, 9.89 mmol) was added and the solution was stirred at 80°C for 24h. After removing DMF under reduced pressure, 40 mL of CH_2Cl_2 were added. The solution was then filtered to remove the excess of NaN_3 and precipitated twice in 400 mL of iPrOH. The product was recovered by filtration and dried under vacuum (MeO-PEG₅₀₀₀-N₃, 88% yield).

3.3.3 Preparation of PHAs oligomers

500 mg of PHA were placed at 190°C for a determined time. PHBHV and PHBHHx were dissolved in 20 ml of CH_2Cl_2 , precipitated in 200 ml of EtOH, filtered and dried under vacuum. PHOHHx was analyzed without further purification.[18, 19] The molar masses were determined by ^1H NMR and SEC. Polydispersity indexes were determined by SEC (Table 3.1).

| PHA oligomers | Reaction time min | Yield % | \overline{M}_n ^{a)} g.mol ⁻¹ | \overline{M}_n g.mol ⁻¹ | PDI |
|---------------------|----------------------|------------|---|---|-------------------|
| PHBHV ₁ | 60 | 99 | 13300 | 15000 ^{b)} | 1.8 ^{b)} |
| PHBHV ₂ | 90 | 95 | 7000 | 8400 ^{b)} | 1.6 ^{b)} |
| PHBHV ₃ | 240 | 90 | 3400 | 4350 ^{b)} | 1.4 ^{b)} |
| PHBHHx | 420 | 98 | 4100 | 3900 ^{b)} | 1.6 ^{b)} |
| PHOHHx ₁ | 180 | 99 | 8100 | 6900 ^{c)} | 2.2 ^{c)} |
| PHOHHx ₂ | 300 | 99 | 3500 | 3800 ^{c)} | 2 ^{c)} |

a) Determined by ¹H NMR; b) Determined by SEC in CHCl₃, polystyrene standards; c) Determined by SEC in THF, polystyrene standards.

TABLE 3.1: Molecular characteristics of PHA oligomers.

3.3.4 Functionalization of PHAs oligomers

Typical procedure : PHBHV ($\overline{M}_n = 7000$ g.mol⁻¹, 250 mg, 0.036 mmol) was placed in 5 ml of CH₂Cl₂. EDC (34 mg, 0.18 mmol), NHS (20 mg, 0.18 mmol) and propargylamine (23 μ L, 0.36 mmol) were added and the mixture was allowed to stir for 48h. 30 mL of CH₂Cl₂ were added and the solution was washed three times with 30 ml of saturated NH₄Cl, once with saturated NaCl solution, and then dried over MgSO₄. After removing the solvent by rotary evaporation, the product was dried under vacuum (Yield 93%). The same method was applied for PHBHHx and PHOHHx oligomers, and the products were characterized by ¹H NMR and SEC (Table 3.2).

| Functionalized oligomers | Yield % | Conversion ^{a)} % | \overline{M}_n ^{a)} g.mol ⁻¹ | \overline{M}_n g.mol ⁻¹ | PDI |
|--------------------------|------------|-------------------------------|---|---|-------------------|
| PHBHV ₁ -≡ | 95 | 100 | 15100 | 16200 ^{b)} | 1.7 ^{b)} |
| PHBHV ₂ -≡ | 93 | 100 | 7500 | 9200 ^{b)} | 1.5 ^{b)} |
| PHBHV ₃ -≡ | 83 | 100 | 3900 | 5100 ^{b)} | 1.3 ^{b)} |
| PHBHHx-≡ | 91 | 100 | 4500 | 3600 ^{b)} | 1.7 ^{b)} |
| PHOHHx ₁ -≡ | 92 | 100 | 7300 | 5700 ^{c)} | 2.2 ^{c)} |
| PHOHHx ₂ -≡ | 90 | 100 | 3400 | 3600 ^{c)} | 1.9 ^{c)} |

a) Determined by ¹H NMR; b) Determined by SEC in CHCl₃, polystyrene standards; c) Determined by SEC in THF, polystyrene standards.

TABLE 3.2: Alkyne functionalization of PHA oligomers.

3.3.5 Synthesis of Poly(3-hydroxyalkanoate)-*b*-poly(ethylene glycol) (PHA-*b*-PEG)

Typical procedure : Alkyne-terminated PHOHH_x oligomer ($\overline{M}_n = 8100 \text{ g.mol}^{-1}$, 0.390 g, 0.048 mmol) was dissolved in 8 mL of CH₂Cl₂. Copper (I) iodide (4 mg, 40% mol relatively to triple bonds, 0.0019 mmol), PMDETA (10 μ L, 0.048 mmol) and MeO-PEG₅₀₀₀-N₃ (726 mg, 0.144 mmol) were added and the reaction mixture was stirred in closed vessel at 50 °C for 48h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was dissolved in 100 mL of DMSO and diluted with the same volume of water under vigorous stirring. The resulting colloidal suspension was then transferred into an ultrafiltration cell and purified against water (molecular weight cut off 30000 Da) for 5 days. The product was recovered by freeze-drying (yield 73%). The same method was applied for all PHAs, and all copolymers were characterized by ¹H NMR and SEC (Table 3.3).

| Block copolymers | Yield % | $\overline{M}_n^{\text{a)}$ g.mol ⁻¹ | \overline{M}_n g.mol ⁻¹ | PDI | PHA content ^{a)} wt.-% | PHA content ^{d)} wt.-% |
|-------------------------------------|---------|--|---|-----|------------------------------------|------------------------------------|
| PHBHV ₁ - <i>b</i> -PEG | 72 | 25700 | 23100 ^{b)} | 1.5 | 75 | 70 |
| PHBHV ₂ - <i>b</i> -PEG | 84 | 12600 | 20500 ^{b)} | 1.3 | 55 | 56 |
| PHBHV ₃ - <i>b</i> -PEG | 48 | 9400 | 17300 ^{b)} | 1.3 | 39 | 43 |
| PHBHH _x - <i>b</i> -PEG | 53 | 9100 | 7200 ^{b)} | 1.3 | 47 | 48 |
| PHOHH _{x1} - <i>b</i> -PEG | 93 | 15100 | 11100 ^{c)} | 1.6 | 58 | 54 |
| PHOHH _{x2} - <i>b</i> -PEG | 91 | 10400 | 9900 ^{c)} | 1.4 | 46 | 42 |

a) Determined by ¹H NMR; b) Determined by SEC in CHCl₃, polystyrene standards; c) Determined by SEC in THF, polystyrene standards; d) Determined by TGA.

TABLE 3.3: Molecular characteristics of PHA-*b*-PEG copolymers.

3.3.6 Polymer Characterization

¹H and COSY-NMR spectra were recorded in CDCl₃ using a Bruker 400 MHz NMR spectrometer. Size exclusion chromatography (SEC) experiments were performed in THF (1 mL.min⁻¹) and CHCl₃ (1 mL.min⁻¹) at room temperature using a Spectra Physics P100 pump, and two PLgel Polymer Laboratories columns (5 μ m Mixte-C). A Wyatt Technology Optilab Rex interferometric refractometer was used as detector. The molar

masses were calibrated with polystyrene standards. DSC measurements were conducted on a Perkin Elmer Diamond DSC apparatus. The following protocol was used for each sample : heating from -105 to +170 °C at 10 °C.min⁻¹, cooling to -105 °C at 200°C.min⁻¹ and then heated again to 170 °C at 10 °C.min⁻¹. The glass transition temperatures (T_g) reported in the Table 3.4 correspond to second runs. TGA analyses were performed on a Setaram Setsys Evolution 16 apparatus, by heating the samples at a rate of 10°C.min⁻¹ from 20°C to 600°C under argon atmosphere.

3.4 Results and Discussion

3.4.1 Synthesis of PHAs oligomers

A series of scl- and mcl-PHAs oligomers was synthesized by thermal treatment at 190°C using PHBHV, PHBHHx and PHOHHx as native PHAs (Figure 3.1).[18, 19]

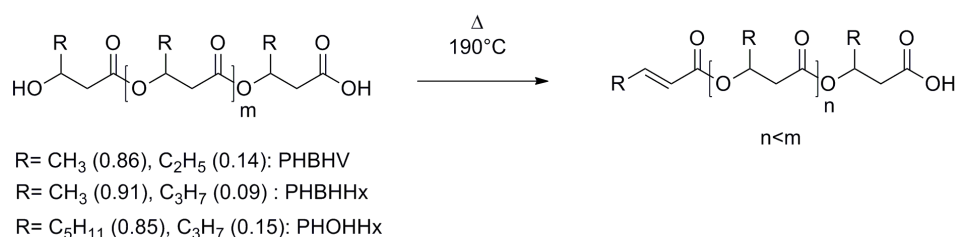


Figure 3.1: Preparation of PHAs oligomers by thermal degradation.

Different reaction times were used to obtain a range of molar masses, from 60 to 420 min. This method has the major advantage to produce well-defined oligomers, with an unsaturated end group on one side and a carboxylic acid on the other side; it results from a β -elimination reaction, following an exponential process.[18] The presence of unsaturated end-groups permitted the ¹H NMR determination of the molar masses by comparing the intensity of ethylenic groups to the methine protons of PHA backbone chain. The molar masses were also calculated by SEC using polystyrene standards as calibration method. The results are summarized in Table 3.1. Oligomers from 3500 to 13300 g.mol⁻¹ were obtained. The crystalline PHBHV and PHBHHx oligomers were purified by precipitation in ethanol. PHOHHx oligomers, as viscous liquids, were used without further purification. This explains the narrower polydispersity index (PDI) of

PHBHV and PHBHHx oligomers than PHOHHx oligomers. Finally, it is noteworthy that thermal resistance of PHOHHx is higher than PHBHV, probably due to the longer pendent side chain lowering the β -elimination speed.

3.4.2 Functionalization of PHA oligomers

To achieve CuAAC coupling of PHAs and PEG blocks, it is necessary to introduce azide and alkyne functions on the oligomers. MeO-PEG₅₀₀₀ was functionalized with azide in a two-step procedure. First, the hydroxyl end groups were converted to leaving groups using MsCl. Sodium azide was then used to quantitatively functionalize the polymer. The reaction was monitored by ¹H NMR, with the disappearance of the mesyl protons at 3.05 ppm and by FTIR with the appearance of the N₃ stretching frequency at 2105 cm⁻¹ (data not shown). For PHAs oligomers, the carboxylic acid end-chains were used to graft propargylamine using EDC and NHS as coupling agents (Figure 3.2).

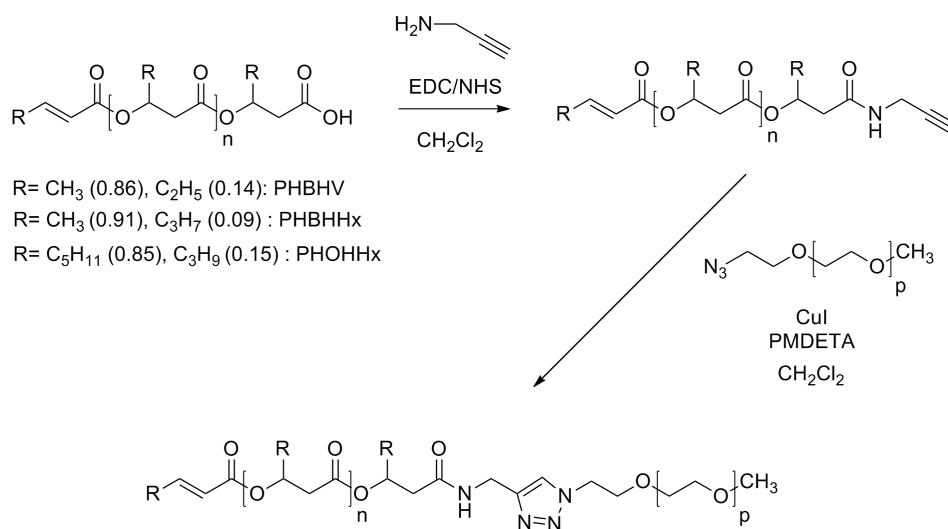


Figure 3.2: Synthesis route to PHAs-*b*-PEG.

The reaction occurred at room temperature in dichloromethane in good yields ranging from 83% to 95% (Table 3.2). ¹H NMR investigations confirmed the structure of the functionalized oligomers. An example is given in Figure 3.3 with the spectrum of PHBHV_{1-≡}.

New signals at 2.21ppm, 4.01 ppm and 6.26 ppm were attributed to the acetylenic

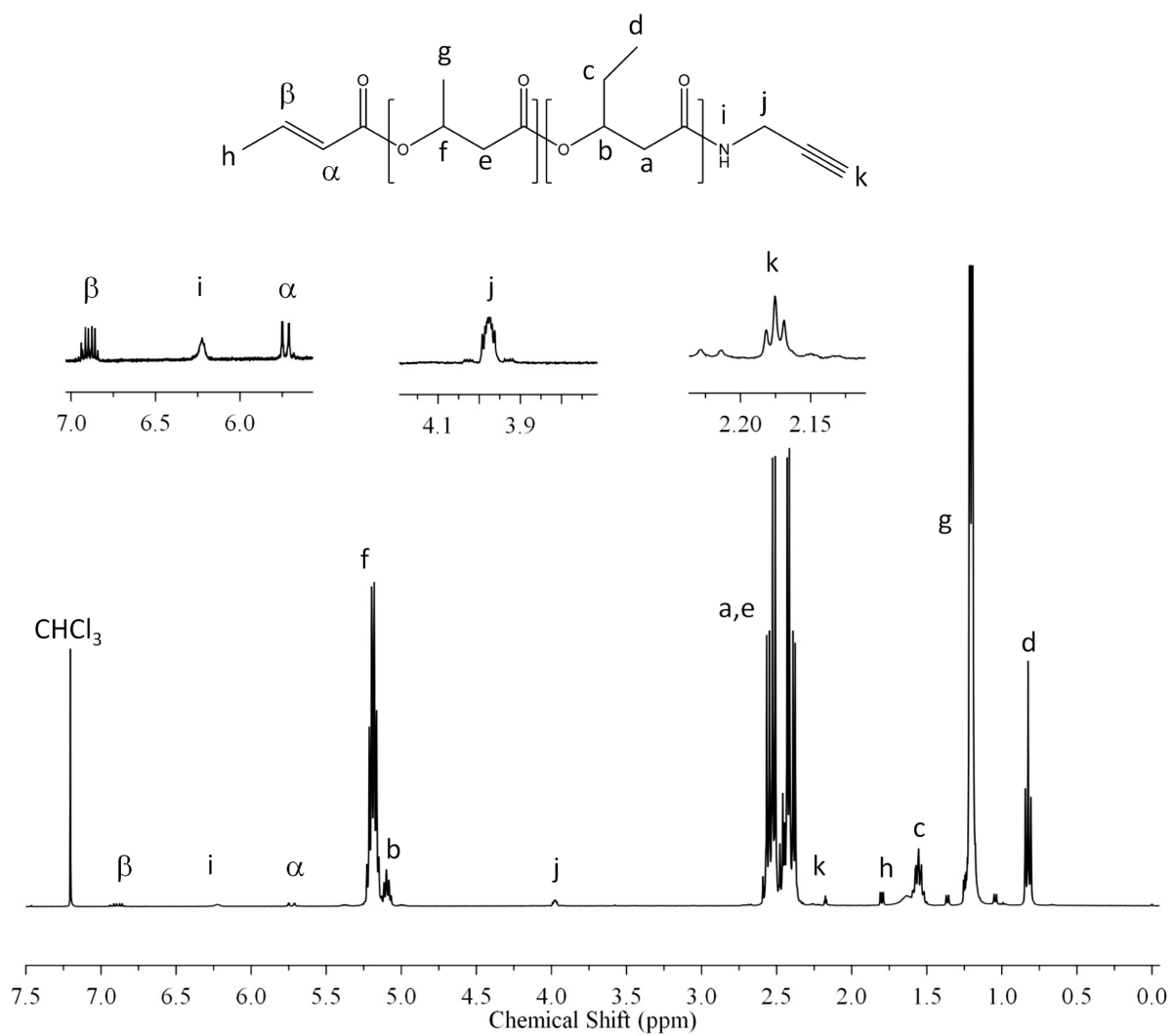


Figure 3.3: ¹H NMR spectrum of PHBHV_{1-≡}.

proton **k**, methylene **j** and -NH- **i**, respectively. The conversion rate was calculated using the relative integration of the ethylenic proton α versus the integration of **j**. The reaction proceeded with quantitative conversion for all oligomers. ^1H NMR and SEC investigations of the molar masses did not show significant changes comparing to the precursors, indicating that amidification conditions did not cause side reactions or degradation of the polyesters.

3.4.3 Synthesis and characterization of diblock copolymers

Ligation of the blocks was accomplished using CuAAC in dichloromethane at 50°C in closed vessel, with copper (I) iodide as copper source and PMDETA as base (Figure 3.2). After the reaction, the crude product was dissolved in DMSO and diluted with the same volume of water under vigorous agitation. All copolymers self-assembled in colloidal suspensions; they were subsequently poured into ultrafiltration cell to remove unreacted PEG, using 30000 Da molecular weight cut off membrane. This membrane appeared to be suitable for all copolymers, since the solution in the cell remained turbid, and only clear solution was salted out in the trash. After purification, PHBHV and PHBHHx-based copolymers were both unstable colloidal suspensions, whereas PHOHHx-based copolymers were present as very stable colloidal suspensions. Our preliminary studies showed that they form stable micelles in aqueous media, with low critical micelle concentrations (results will be reported elsewhere). Yields of the purified copolymers are given in Table 3. It has to be noted that yields of PHBHV₃-*b*-PEG and PHBHHx-*b*-PEG are smaller than PHBHV₁-*b*-PEG and PHBHV₂-*b*-PEG copolymers; since PHBHV₃-*b*-PEG and PHBHHx-*b*-PEG are smaller copolymers, it can be explainable by the removing of more water-soluble chains during the purification process. Concerning PHOHHx copolymers, their relatively good yields can be justified by the higher stability of the colloidal suspensions; since stable micelles are formed, fewer free chains are present in the solution and thus are not removed during ultrafiltration. The chemical structure of the diblock copolymers was investigated by NMR; Figure 3.4 shows ^1H NMR spectrum of PHOHHx₁-*b*-PEG, possessing both PHOHHx and PEG signals.

Coupling was attested by the appearance of the triazole proton **t** at 7.67 ppm. We can also notice the shifts of the -NH- proton **r** to more deblinded field, from 6.33 ppm (^1H NMR spectrum of PHOHHx₁-≡, not shown) to 6.59 ppm, and of the methylene

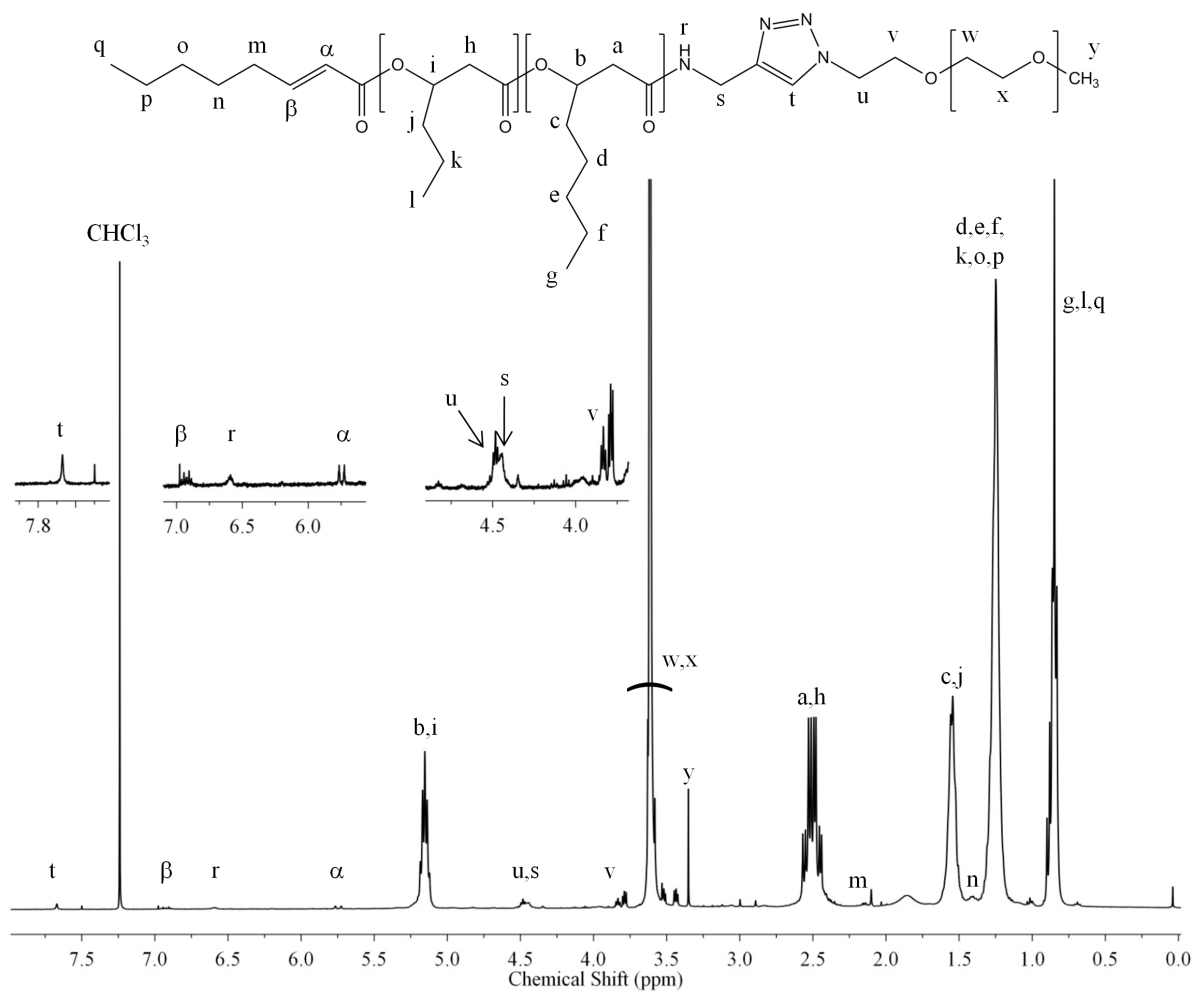


Figure 3.4: ^1H NMR spectrum of PHOHH $_x$ - b -PEG.

s, shifting from 4.01 ppm to 4.44 ppm. The methylene **s** is overlapped with the PEG methylene **u** in α of triazole ring. The attribution of the signals was established thanks to their NMR COSY correlations (Figure 3.5) : **s** correlates with its neighbour **r**, while the PEG methylene **u** correlates with the methylene **v**.

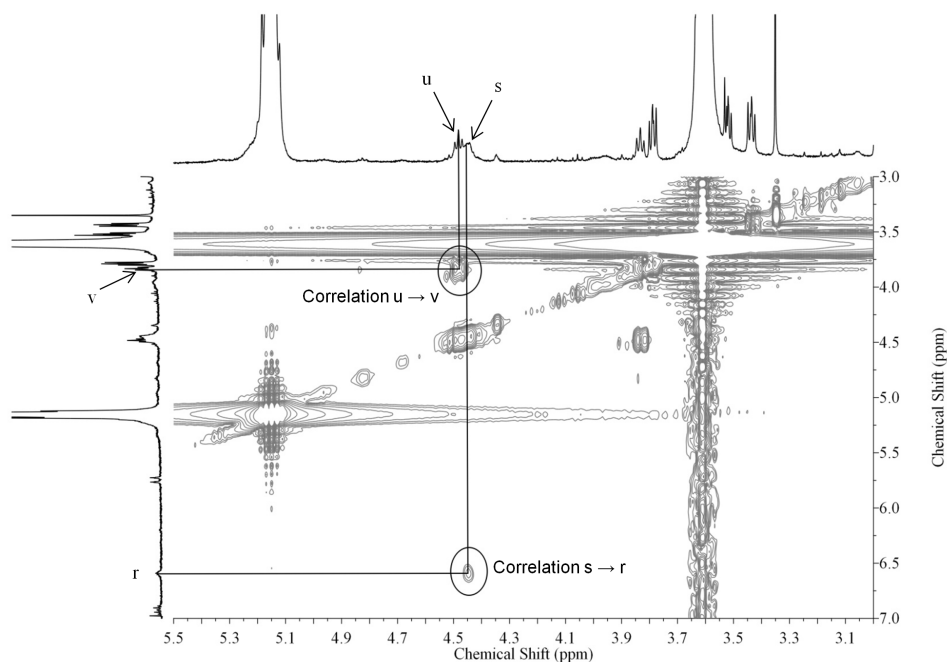


Figure 3.5: COSY spectrum of PHOHH_{x1}-*b*-PEG.

Molar masses of the copolymers were calculated by ¹H NMR using the relative intensity of the ethylenic proton α versus the methylene PHOHH_x backbone protons **b**,**i** and the methoxy PEG protons **y** (Table 3.3).

SEC analyses were also performed to determine molar masses and polydispersity indexes of the copolymers (Table 3.3). All SEC chromatograms exhibit monomodal peaks, attesting for a quantitative coupling; an example is given in Figure 3.6 representing the chromatogram of PHBHH_x-*b*-PEG and its precursor, with a smaller retention time for the copolymer. It has to be noted that polydispersity indexes are narrower than those from the precursors; it can be explained by the removal of the smallest chains during the purification process.

Thermal stability of the diblock copolymers was evaluated using TGA under dynamic Argon atmosphere. Figure 3.7 shows the thermal degradation profile of PHOHH_{x1}-*b*-

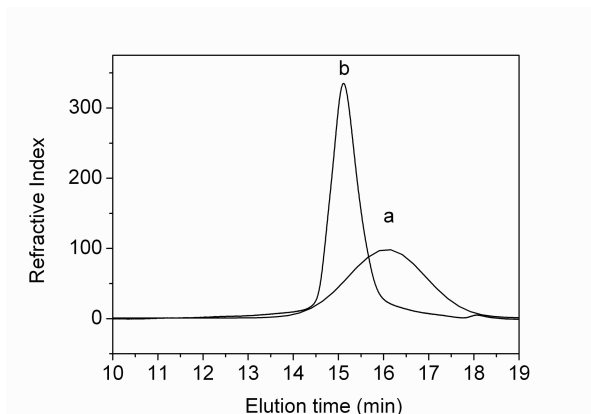


Figure 3.6: Size exclusion chromatography (SEC) traces of (a) PHBHHx oligomer and (b) PHBHHx-*b*-PEG.

PEG with its precursors.

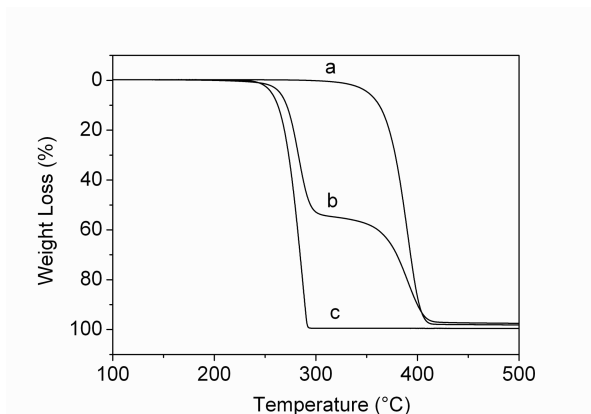


Figure 3.7: TGA curves for (a) MeO-PEG₅₀₀₀, (b) PHOHHx₁-*b*-PEG and (c) PHOHHx₁ oligomer.

The copolymer exhibited a two-step degradation behavior, with a first step occurring from 225°C to 310°C and followed by a second step from 310°C to 425°C. With thermal degradation profiles of the precursors, the first step was attributed to the degradation of the PHOHHx blocks and the second to the PEG blocks. Since degradation temperatures were sufficiently far-off, we were able to calculate the amount of PHA present in the copolymers. Results, summarized in Table 3.3, are in good agreement with those obtained by ¹H NMR.

DSC study was carried out to investigate the thermal characteristics of the diblock copolymers. Thermal transitions as well as corresponding enthalpies are reported in Table 3.4.

| Sample | T _g °C | | T _m °C | | ΔH _m ^{b)} J.g ⁻¹ | |
|-------------------------------------|----------------------|------------------|----------------------|-----|--|-----|
| | PHA | PEG | PHA | PEG | PHA | PEG |
| MeO-PEG ₅₀₀₀ | — | nd ^{a)} | — | 62 | — | 166 |
| PHBHV ₁ | 1 | — | 154 | — | 63 | — |
| PHBHV ₂ | 0 | — | 149 | — | 60 | — |
| PHBHV ₃ | -5 | — | 140 | — | 60 | — |
| PHBHH _x | 0 | — | 130 | — | 48 | — |
| PHOHH _{x1} | -36 | — | — | — | — | — |
| PHOHH _{x2} | -38 | — | — | — | — | — |
| PHBHV ₁ - <i>b</i> -PEG | nd | nd | 153 | 38 | 47 | 57 |
| PHBHV ₂ - <i>b</i> -PEG | -9 | nd | 145 | 47 | 53 | 86 |
| PHBHV ₃ - <i>b</i> -PEG | -7 | nd | 132 | 54 | 42 | 117 |
| PHBHH _x - <i>b</i> -PEG | 0 | nd | 120 | 50 | 39 | 133 |
| PHOHH _{x1} - <i>b</i> -PEG | -33 | nd | nd | 53 | — | 149 |
| PHOHH _{x2} - <i>b</i> -PEG | -32 | nd | nd | 55 | — | 149 |

^{a)} nd : not determined ; ^{b)} for the block copolymers, calculated using the formula $\Delta H = \Delta H_i/W_i$, where ΔH_i is the area of the DSC endothermic peak, and W_i is the weight fraction of PHA or PEG determined by TGA.

TABLE 3.4: Thermal characteristics of oligomers and diblock copolymers.

PHBHV and PHBHHX oligomers exhibit semi-crystalline behavior, whereas PHOHH_x oligomers are totally amorphous. In PHBHV-*b*-PEG copolymers, separate crystalline phases of both PHBHV and PEG part are present. It is noticeable that melting temperature and melting enthalpies of PEG decrease with the increase of the PHBHV content ; this may be caused by the presence of the hard PHBHV block, restricting the crystallization of the PEG blocks. For PHBHH_x-*b*-PEG copolymer, the lower crystallinity of the PHA segment is less hindering the crystallization of PEG, explaining its higher melting enthalpy compared to the PHBHV-*b*-PEG copolymers. Finally, both PHOHH_x-*b*-PEG copolymers exhibit a PEG melting enthalpy of 149 J.mol⁻¹, close to the melting enthalpy of MeO-PEG₅₀₀₀ (166 J.g⁻¹); this indicates that both of the amorphous PHOHH_x segments induces limited hindrance of the PEG crystallization.

3.5 Conclusion

An easy and efficient synthesis of PHAs-based amphiphilic diblock copolymers has been presented. A series of PHBHV, PHBHHx and PHOHHx oligomers were prepared by thermal treatment by varying the time of reaction. All oligomers were quantitatively functionalized with alkyne function, allowing the grafting of azide-modified MeOPEG₅₀₀₀ using CuAAC. The structures and molecular characteristics of all copolymers were studied by ¹H NMR, COSY, SEC, DSC and TGA, which confirmed the efficiency of the ligation whatever the nature or the length of the PHA precursor. Whereas PHBHV and PHBHHx-based copolymers did not form stable colloidal suspension in water, our preliminary studies showed that PHOHHX-*b*-PEG copolymers were able to form stable micelles in solution. Our efforts will now focus on studying the micellization behavior of those copolymers in water. They can be envisioned for biomedical applications as drug delivery systems able to transport bioactive hydrophobic molecule.

References

1. MULLER, H. M. & SEEBACH, D. Poly(hydroxyalkanoates) : a fifth class of physiologically important organic biopolymers. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **32**, 477–502 (1993).
2. STEINBÜCHEL, A. & VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* **128**, 219–228 (1995).
3. LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 1–14 (1996).
4. CHEN, Z. F., CHENG, S. T. & XU, K. T. Block poly(ester-urethane)s based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate). *Biomaterials* **30**, 2219–2230 (2009).
5. CHEN, G. Q. & WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **26**, 6565–6578 (2005).
6. GAN, D. J. & LYON, L. A. Synthesis and protein adsorption resistance of PEG-modified poly(N-isopropylacrylamide) core/shell microgels. *Macromolecules* **35**, 9634–9639 (2002).
7. PRIME, K. L. & WHITESIDES, G. M. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide) - A model system using self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 10714–10721 (1993).
8. LI, S. M. *et al.* Enzymatic degradation of block copolymers prepared from epsilon-caprolactone and poly(ethylene glycol). *Biomacromolecules* **3**, 525–530 (2002).

9. BABINOT, J, RENARD, E & LANGLOIS, V. Preparation of Clickable Poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) : Application to Poly(ethylene glycol) (PEG) Graft Copolymers Synthesis. *Macromolecular Rapid Communications* **31**, 619–624 (2010).
10. LI, J, LI, X, NI, X. P. & LEONG, K. W. Synthesis and characterization of new biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)-b-poly[(R)-3-hydroxy butyrate]-b-poly(ethylene oxide) triblock copolymers. *Macromolecules* **36**, 2661–2667 (2003).
11. RAVENELLE, F & MARCHESSAULT, R. H. One-step synthesis of amphiphilic diblock copolymers from bacterial poly([R]-3-hydroxybutyric acid). *Biomacromolecules* **3**, 1057–1064 (2002).
12. BINDER, W. H. & SACHSENHOFER, R. 'Click' chemistry in polymer and materials science. *Macromolecular Rapid Communications* **28**, 15–54 (2007).
13. BINDER, W. H. & SACHSENHOFER, R. 'Click' chemistry in polymer and material science : An update. *Macromolecular Rapid Communications* **29**, 952–981 (2008).
14. ROSTOVTSEV, V. V., GREEN, L. G., FOKIN, V. V. & SHARPLESS, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process : Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie-International Edition* **41**, 2596–2599 (2002).
15. OPSTEEN, J. A. & van HEST, J. C. M. Modular synthesis of block copolymers via cycloaddition of terminal azide and alkyne functionalized polymers. *Chemical Communications*, 57–59 (2005).
16. HARTMANN, R. *et al.* Tailored Biosynthesis of Olefinic Medium-Chain-Length Poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas putida* GPo1 with Improved Thermal Properties. *Macromolecules* **37**, 6780–6785 (2004).
17. ZHAO, X. Y., METZ, W. A., SIEBER, F & JANDA, K. D. Expanding on the purification methodology of polyethylene glycol (PEG) bound molecules : The synthesis of 3,5-pyrazolidinediones. *Tetrahedron Letters* **39**, 8433–8436 (1998).
18. NGUYEN, S, YU, G. E. & MARCHESSAULT, R. H. Thermal degradation of poly(3-hydroxyalkanoates) : Preparation of well-defined oligomers. *Biomacromolecules* **3**, 219–224 (2002).

19. SAMAIN, X, RENARD, E, LORANG, G & LANGLOIS, V. Grafting biodegradable polyesters onto cellulose. *Journal of Applied Polymer Science* **121**, 1183–1192 (2010).

Chapitre 4

Etude de la micellisation de copolymères amphiphiles diblocs à base de PHA-mcl

Présentation de l'article

Grâce à l'utilisation de la chimie « click » (CuAAC), nous avons pu synthétiser différents copolymères amphiphiles diblocs bien définis à base de PHA-scl et de PHA-mcl (Chapitre 3). Dans le but de développer des agents de vectorisation de principes actifs à base de PHA-mcl, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux propriétés d'auto-assemblage des copolymères amphiphiles diblocs à base de PHOHHx en milieu aqueux.

Une série de copolymères possédant une fraction hydrophile fixe (5000 g.mol^{-1}) et différentes fractions hydrophobes ($1500 - 7700 \text{ g.mol}^{-1}$) a été synthétisée. La méthode de dialyse a ensuite été utilisée pour induire l'auto-assemblage de ces copolymères en milieu aqueux. L'influence de la taille relative du bloc hydrophobe sur la taille des agrégats ainsi que sur leur concentration micellaire critique (CMC) a été étudiée.

Les images de cryo-microscopie électronique à transmission ont montré que la structure des agrégats était de type micellaire, avec un coeur de PHOHHx et une couronne hydrophile de PEG solvaté. Suivant la masse molaire du bloc PHOHHx, des diamètres de 44 à 90 nm ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS); des analyses par fluorescence du pyrène utilisé comme sonde ont quant à elles permis de déterminer des valeurs très basses de CMC, comprises entre 0,85 et 5,5 mg.L^{-1} . Enfin, la stabilité des micelles en milieu salin a été étudiée par DLS; il a été déterminé que la taille ainsi que la polydispersité des micelles n'évoluaient pas avec l'augmentation de la force ionique jusqu'à des valeurs dépassant celle de la force ionique du milieu physiologique.

Ce système permettant l'élaboration de micelles de taille contrôlée, stables à force ionique similaire à celle du milieu physiologique et de faibles CMC apparaît donc comme prometteur pour la mise au point d'agents de vectorisation de principes actifs.

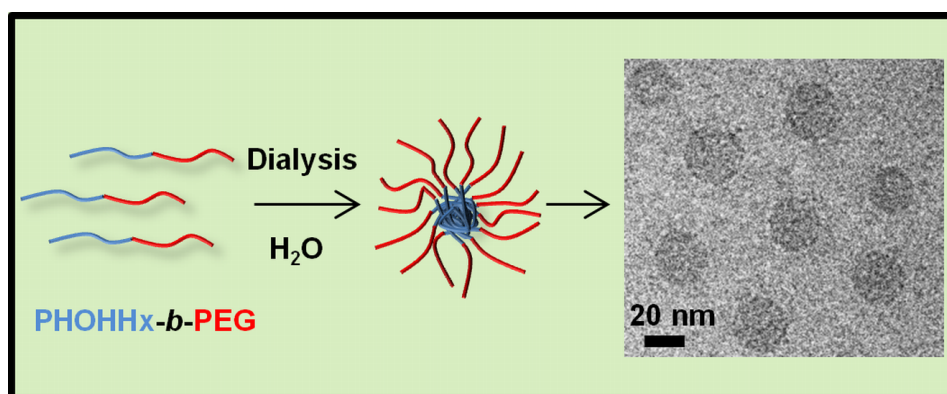
A Micellization Study of Medium Chain Length Poly(3-hydroxyalkanoate)-based Amphiphilic Diblock Copolymers

Journal of Colloid and Interface Science, 2012, 375, 88-93

JULIEN BABINOT^a, JEAN-MICHEL GUIGNER^b, ESTELLE RENARD^a, VALÉRIE LANGLOIS^a

^aInstitut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE), Systèmes Polymères Complexes, UMR CNRS 7182, 2-8 rue Henri Dunant, 94320 Thiais, France

^bInstitut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés (IMPMC), 4 place Jussieu, 75005 Paris, France



4.1 Abstract

In this paper, we report the first micellization study of amphiphilic copolymers composed of bacterial medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs). A series of diblock copolymers based on fixed poly(ethylene glycol) (PEG) block (5000 g.mol⁻¹) and a varying poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHOHHx) segment (1500-7700 g.mol⁻¹) has been synthesized using “click” chemistry. These copolymers self-assembled to form micelles in aqueous media. The influence of PHOHHx block molar mass on the hydrodynamic size and on the critical micelle concentration (CMC) has been studied using dynamic light scattering and fluorescence spectroscopy, respectively. With increasing PHOHHx length, narrowly-distributed micelles with diameters ranging from 44 to 90 nm were obtained, with extremely low CMC (up to 0.85 mg.L⁻¹). Cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM) showed that micelles took on a spherical shape and exhibited narrow polydispersity. Finally, the colloidal stability of the micelles against physiological NaCl concentration has been demonstrated, suggesting they are promising candidates for drug delivery applications.

4.2 Introduction

Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) are a class of natural biodegradable polyesters accumulated by many bacteria as carbon and energy supply when an essential nutrient is limited.[1, 2] Using various substrates, a wide variety of PHAs are synthesized, differing notably by the length of their side chains.[3] Two types are distinguished, one with short chain length, or scl-PHAs, possessing alkyl side chains having up to two carbon atoms; medium chain length PHAs, or mcl-PHAs, have at least three carbon atoms on their side chains. The length of the side chains determines the physical properties of PHAs, crystalline, rigid and brittle for scl-PHAs, semi-crystalline, soft and elastomeric for mcl-PHAs. Thanks to their biocompatibility, PHAs are good candidates for biomedical applications including biomedical devices, tissue engineering or biodegradable drug carriers.[4–6] For the latter application, different systems were reported only using scl-PHAs. Using direct transesterification in the melt, Marchessault et al. synthesized diblock copolymers consisting of poly(3-hydroxybutyrate)-*b*-poly(ethylene glycol) (PHB-*b*-PEG) able to self

assemble into stable colloidal suspensions of PHB crystalline lamellae.[7, 8] The synthesis of triblock copolymers poly(ethylene oxide)-poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene oxide) (PEO-PHB-PEO) using carbodiimide-mediated coupling has also been reported; they were able to self assemble into micelles in aqueous medium,[9] but the high crystallinity of the isotactic PHB segment limited the critical micelle concentrations (CMC) to relatively high values, thus limiting the use of natural PHAs for drug delivery applications. Even if they are less studied, mcl-PHAs are promising biomaterials for the future thanks to their biocompatibility, biodegradability but more especially thanks to their low crystallinity if drug delivery applications are targeted.[6] Using a functionalized mcl-PHA, amphiphilic grafted copolymers with poly(ethylene glycol) (PEG) as side chains were recently synthesized using click chemistry.[10] Moreover, Ritter et al. designed cyclodextrin-modified mcl-PHA in a similar strategy.[11] However, their self-assembling properties have not been explored yet. In this paper, we report the self-assembly study of amphiphilic mcl-PHA consisting of poly[(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxyhexanoate)]-*b*-poly(ethylene glycol) (PHOHHx-*b*-PEG). Diblock copolymers were synthesized using click chemistry[12] and characterized with ^1H Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR), Size Exclusion Chromatography (SEC) and Thermogravimetric Analysis (TGA). Their self-association in water was investigated by fluorescence spectroscopy, Dynamic Light Scattering (DLS) and cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM). Finally, their colloidal stability against NaCl was also examined.

4.3 Experimental section

4.3.1 Materials

N-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC hydrochloride) commercial grade, *N*-hydroxysuccinimide 98 % (NHS), propargylamine 98 %, poly(ethylene glycol) methyl ether $\overline{M}_n = 5000 \text{ g.mol}^{-1}$ (MeO-PEG₅₀₀₀), methanesulfonyl chloride $\geq 99\%$ (MsCl), sodium azide 99.5 %, copper(I) iodide 99.5 %, anhydrous *N,N*-dimethylformamide 99.8 % (DMF) and *N,N,N',N'',N''*-pentamethyldiethylenetriamine 99 % (PMDETA) were purchased from Sigma Aldrich. PHOHHx was obtained from EMPA, Swiss Fed Labs Mat Testing & Res, Lab Biomat, CH-9014 St Gallen, Switzerland, synthesized following a previously reported procedure.[13] Isopropanol (iPrOH) was obtained from

SDS. CH₂Cl₂ and CHCl₃ were obtained from SDS and were distilled over CaH₂ before use. All other materials were used without further purification.

4.3.2 Synthesis

PHOHHx-*b*-PEG copolymers were synthesized according to our previous report.[12] First, Oligomers of PHOHHx were prepared by thermal treatment. 300 mg of the polymer were placed at 190°C for 120, 180, 300 and 360 min, respectively, and used without further purification. Molar masses and PDI were determined by ¹H NMR and SEC (Table 4.1).

4.3.2.1 Fonctionnalization of PHOHHx oligomers

Typical procedure : PHOHHx ($\overline{M}_n = 6800 \text{ g.mol}^{-1}$, 250 mg, 0.037 mmol) was placed in 7 ml of CH₂Cl₂. EDC (35 mg, 0.183 mmol), NHS (21 mg, 0.183 mmol) and propargylamine (23 μL , 0.367 mmol) were added and the mixture was allowed to stir for 48h. 30 mL of CH₂Cl₂ were added and the solution was washed three times with 30 mL of saturated NH₄Cl, once with saturated NaCl solution, and then dried over MgSO₄. After removing the solvent by rotary evaporation, the product was dried under vacuum (90 % yield).

4.3.2.2 Mesylation of MeO-PEG₅₀₀₀

Procedure was accomplished according to a modified procedure.[14] MeO-PEG₅₀₀₀ (10 g, 2 mmol) and triethylamine (1.4 mL, 10 mmol) were placed in 30 mL of anhydrous CH₂Cl₂ under Argon at 0°C. MsCl (780 μL , 10 mmol) dissolved in 30 mL of CH₂Cl₂ was added dropwise and the solution was left to stir overnight (0°C to RT). After concentration under vacuum, the solution was precipitated twice in *i*PrOH; the product was recovered by filtration and dried under vacuum (92 % yield).

4.3.2.3 Azidation of MeO-PEG₅₀₀₀-OMs

MeO-PEG₅₀₀₀-OMs (9.89 g, 1.98 mmol) was dissolved in 60 mL of dry DMF under Argon. NaN₃ (643 mg, 9.89 mmol) was added and the solution was stirred at 80°C for 24h. After removing DMF under reduced pressure, 40 mL of CH₂Cl₂ were added.

The solution was then filtered to remove the excess of NaN_3 and precipitated twice in 400 mL of *i*PrOH. The product was recovered by filtration and dried under vacuum (MeO-PEG₅₀₀₀-N₃, 88 % yield).

4.3.2.4 Synthesis of PHOHHx-*b*-PEG

A typical procedure is given as follows : Alkyne-terminated PHOHHx oligomer ($\overline{M}_n = 6800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 0.220 g, 0.032 mmol) was dissolved in 8 mL of CHCl_3 . Copper (I) iodide (2.5 mg, 40 % mol relatively to triple bonds, 0.013 mmol), PMDETA (10 μL , 0.032 mmol) and MeO-PEG₅₀₀₀-N₃ (482 mg, 0.096 mmol) were added and the reaction mixture was stirred in closed vessel at 60 °C for 48 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was dissolved in 100 mL of DMSO and diluted with the same volume of water under vigorous stirring. The resulting colloidal suspension was then transferred into an ultrafiltration cell and purified against water (molecular weight cut off 30000 Da) for 5 days. The product was recovered by freeze-drying (89 % yield). All copolymers were characterized by ^1H NMR, SEC and TGA (Table 4.1) (For complete ^1H NMR attributions see ref [12]).

4.3.3 Sample Preparation

Self-assembled micelles were prepared by the dialysis method. 50 mg of the block copolymer were dissolved in 30 mL of DMSO and extensively dialyzed against water for 4 days (Spectra/Por dialysis tubing, molecular weight cut off 6-8000 Da). The volume of water was two liters, and was renewed 4 times per day.

4.3.3.1 Dynamic Light Scattering (DLS)

Samples for DLS experiments were adjusted at the concentration of $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and filtered through a 0.22 μm filter before the measurement.

4.3.3.2 Critical Micelle Concentration (CMC)

Samples for CMC determination were prepared in a two-steps procedure : first, 10 μL of a stock solution of pyrene ($1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$) in dichloromethane was deposited on the bottom of a flask and left to evaporate, and then 2 mL of a block copolymer solution with

the appropriate concentration was added to the flask and shaken for two days before measurements (the final concentration of pyrene in the samples was 7×10^{-7} M).

4.3.3.3 Cryo-Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM)

The morphology and size of the polymer nanoparticles (NPs) were determined from cryo-TEM images. A drop of NPs dispersion (0.1 wt% solid content) was deposited on « quantifoil »® (Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany) carbon membrane. The excess of liquid on the membrane was blotted out with a filter paper and, before evaporation, the membrane was quench-frozen in liquid ethane to form a thin vitreous ice film in which NPs were captive. Once mounted in a Gatan 626 cryo-holder cooled with liquid nitrogen, the samples were transferred in the microscope and observed at low temperature (-180 °C).

4.3.4 Instrumentation

^1H NMR spectra were recorded in CDCl_3 using a Bruker 400 MHz NMR spectrometer. Size exclusion chromatography (SEC) experiments were performed in THF ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) at room temperature using a Spectra Physics P100 pump, and two PLgel Polymer Laboratories columns ($5 \mu\text{m}$ Mixte-C). A Wyatt Technology Optilab Rex interferometric refractometer was used as detector. The molar masses were calibrated with polystyrene standards. TGA analyses were performed on a Setaram Setsys Evolution 16 apparatus, by heating the samples at a rate of $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ from 20°C to 600°C under argon atmosphere. DLS measurements were performed on a Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS operating with a He-Ne laser source at the wavelength of 633 nm. All measurements were performed at 25°C and at an angle of 173° . The autocorrelation functions were analyzed using the cumulant method to obtain diameters and distributions. The pyrene fluorescence was recorded at 23°C with a SLM Aminco 8100 by excitation at 335 nm with slits fixed at 16 and 0.5 nm, respectively, at the excitation and emission. Cryo-TEM images were recorded on ultrascan 2k ccd camera (Gatan, USA), using a LaB6 JEOL 2100 (JEOL, Japan) cryo microscope operating at 200kV with a JEOL low dose system (Minimum Dose System, MDS) to protect the thin ice film from any irradiation before imaging and reduce the irradiation during the image capture. The size measurements were carried out using the ImageJ software.

4.4 Results and Discussion

4.4.1 Copolymer Synthesis and Characterization

A series of amphiphilic block copolymers PHOHHx-*b*-PEG were synthesized as previously described[12] (Figure 4.1).

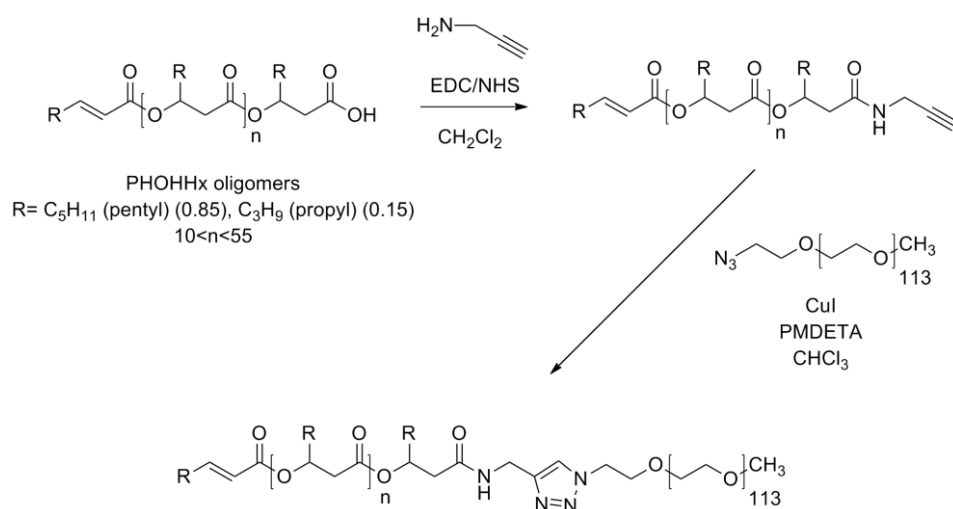


Figure 4.1: Synthesis of PHOHHx-*b*-PEG diblock copolymers.

Briefly, oligomers of PHOHHx were prepared by thermal treatment at 190°C using different reaction times to obtain a range of molar masses (from 1500 to 7700 g.mol⁻¹) (Table 4.1).

Oligomers present unsaturated and carboxylic acid chain ends, respectively. It is noteworthy that unlike scl-PHAs that degrade by concerted β -elimination reaction,[15] mcl-PHAs are undergoing chain cleavage by hydrolysis of the ester. At 190°C, this step is followed by the dehydration of terminal alcohol leading to unsaturated chain end.[16] After functionalization of the carboxylic acid end-groups with propargylamine, block copolymers were synthesized by copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC)[17] using MeO-PEG₅₀₀₀-N₃ (5000 g.mol⁻¹) as hydrophilic moiety. Well-defined structures were obtained in good yields and characterized by SEC and ¹H NMR (Table 4.1). The theoretical PHOHHx content in the copolymers was calculated using the molar masses of PHOHHx oligomers determined by ¹H NMR and 5000 g.mol⁻¹ as molar mass

| Polymer | PHOHHx precursor | | | Block copolymer | | | | |
|-------------------------------|------------------------|--|--|-------------------|--|-------------------|--------------|--|
| | Reaction time (min) | $\bar{M}_n^a)$ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) | $\bar{M}_n^b)$ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) | PDI ^{b)} | $\bar{M}_n^b)$ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) | PDI ^{b)} | Yield (%) | PHOHHx content ^{d)} (wt%) |
| PHOHHx ₁₅₀₀ -b-PEG | 360 | 1500 | 1900 | 2 | 9000 | 1.6 | 90 | 19 |
| PHOHHx ₃₈₀₀ -b-PEG | 300 | 3800 | 3600 | 2 | 9900 | 1.5 | 91 | 44 |
| PHOHHx ₆₈₀₀ -b-PEG | 180 | 6800 | 6700 | 2.2 | 12000 | 1.6 | 89 | 56 |
| PHOHHx ₇₇₀₀ -b-PEG | 120 | 7700 | 7900 | 2.2 | 11300 | 1.8 | 86 | 62 |

^{a)} Determined by ¹H NMR; ^{b)} Determined by SEC in THF, polystyrene standards; ^{c)} Determined using ¹H NMR for PHOHHx block molar mass and 5000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ as PEG molar mass; ^{d)} Determined by TGA.

TABLE 4.1: Molecular characteristics of PHOHHx-*b*-PEG copolymers with fixed PEG block (5000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and varying PHOHHx segment.

for PEG oligomers ; PHOHHx weight fraction is varying from 23 to 60 % with increasing block length (Table 4.1). To confirm the efficiency of the coupling, TGA analyses were conducted (Figure 4.2).

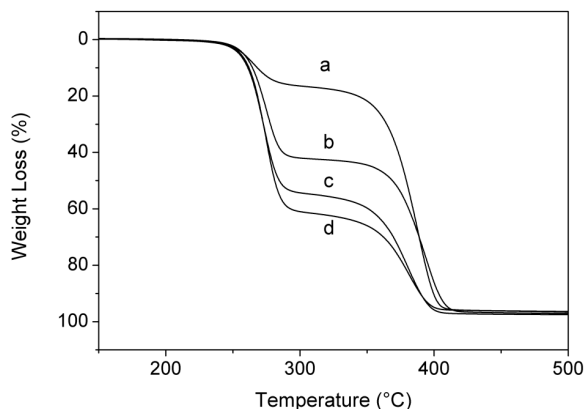


Figure 4.2: Determination of PHOHHx content in copolymers using TGA : (a) PHOHHx₁₅₀₀-*b*-PEG, (b) PHOHHx₃₈₀₀-*b*-PEG, (c) PHOHHx₆₈₀₀-*b*-PEG and (d) PHOHHx₇₇₀₀-*b*-PEG.

The curves show a two-step degradation behavior, with a first degradation at 266-283°C and a second at 378-390°C. Those steps correspond to the degradation of the precursors, PHOHHx oligomers and PEG, respectively (data not shown). Since their degradation temperatures are sufficiently far-off, it is possible to determine the mass fraction of each component in the copolymers. Results are reported in Table 4.1 : experimental PHOHHx mass fraction is ranging from 19 % to 62 %, which is in good agreement with theoretical results, thus attesting for the efficiency of the coupling.

4.4.2 Characterization and properties of PHOHHx-*b*-PEG micelles

Micelles were prepared using the dialysis method.[18] Copolymers were dissolved in DMSO, which is a good solvent for both blocks, and extensively dialyzed against water. Progressive aggregation was observed due to the loss of solubility, leading to homogeneous suspension of polymeric nanoparticles. This method has been demonstrated to be very suitable for the preparation of micellar systems, avoiding the formation of large aggregates.[19] The CMC of a copolymer gives an indication regarding the thermodynamic stability of the micellar system upon dilution. For drug delivery applications this

stability is crucial, as high dilution is reached after injection in the body. In order to detect the CMC of the micelles, pyrene was used as fluorescent probe. When pyrene changes from polar to non polar environment, its vibrational fine structure changes allowing a symmetry-forbidden (0,0) band, known as Ham effect.[20–22] This change is described in terms of the ratio I_1/I_3 , the intensities, respectively, of the first and third bands in pyrene fluorescence spectrum; monitoring this change has been widely used in the literature to detect CMC.[18, 22, 23] Figure 4.3a shows the fluorescence emission spectra of pyrene for PHOHHx₆₈₀₀-*b*-PEG at various concentrations.

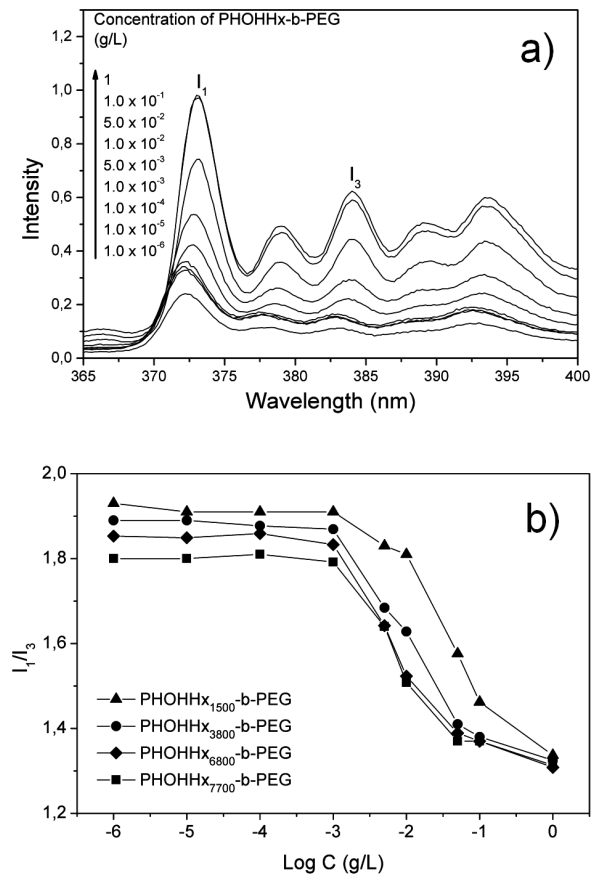


Figure 4.3: (a) Fluorescence emission spectra of the pyrene probe for PHOHHx6800-*b*-PEG copolymer at various concentrations ($[\text{pyrene}] = 7 \times 10^{-7} \text{ M}$) and (b) Plots of the intensity ratio I_1/I_3 as a function of different concentrations of PHOHHx-*b*-PEG copolymers.

By plotting the intensity ratio I_1/I_3 as a function of the copolymer concentration the

CMC was determined using the flexion point of the sigmoidal curve (Figure 4.3b). It should be pointed out that as shown by Wilhelm et al.,[21] the change in I_1/I_3 ratio at low concentration can either be due to self association of the amphiphilic molecules but also to pyrene partition between the aqueous and hydrophobic phase. However, they concluded that the apparent CMC taken at the flexion point was always larger than the real CMC. Our purpose was not to measure CMC with an extreme accuracy but to provide a good estimation, justifying the use of this method. Results for the different copolymers are shown in Table 4.2. The CMC values are very low, ranging from 0.85 to 5.5 mg/L. Compared with the CMC values of PEO-PHB-PEO micelles made with bacterial PHB (13-1100 mg/L), those of PHOHHx-*b*-PEG micelles are significantly lower. This result shows the importance of the crystallinity of the PHA segment in the stability of the micelles; indeed, while bacterial PHB is crystalline even for short segment, PHOHHx oligomers showed amorphous behavior.[12] This result is supported by Chen et al.,[24] who showed that using the ring opening polymerization of β -butyrolactone on PEG, PHB-PEG-PHB triblock copolymers were obtained with atactic and amorphous PHB. The copolymers were able to self assemble into stable micelles with CMC ranging from 3.3 to 14.4 mg/L, which are lower values than for PEO-PHB-PEO. PHOHHx-*b*-PEG micelles present also lower CMC than PHB-PEG-PHB; with the same amorphous behavior, this result can be attributed to the structure of PHOHHx. Indeed, while PHB possess methyl groups as side chains, PHOHHx possess mainly pentyl groups, generating stronger hydrophobic interactions and thus higher stability. Figure 4.4a plots the CMC values of the copolymers as a function of the length of the hydrophobic PHOHHx block.

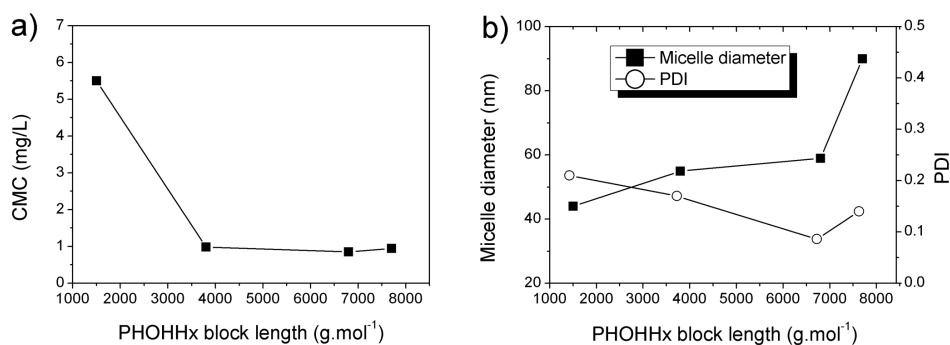


Figure 4.4: Influence of PHOHHx block length on (a) CMC of the copolymer and (b) micelles size and polydispersity.

Apparently, the dependence of the CMC on PHOHHx block length is important for the shorter PHOHHx block-containing copolymer. However, from a PHOHHx block of 3800 g.mol⁻¹ in the copolymer, CMC tends to reach a plateau at approximately 0.9 mg/L. For PHB-based[9, 24] amphiphilic copolymers, CMC is dependent on the hydrophobic block length in a more progressive manner; this result might be also attributed to the stronger interactions among the aliphatic pendent chains of PHOHHx than among PHB chains, making the CMC of PHOHHx-*b*-PEG less sensitive to the hydrophobic block length. This behavior is of great interest as the size of the micelles can be tuned without loss of stability upon dilution. The size of the micelles was investigated using DLS. They were found to have hydrodynamic diameters ranging from 44 to 91 nm (Table 4.2). As shown in Figure 4.4b, the micelle diameter increased with PHOHHx block length.

| Copolymer | PHOHHx block length ^{a)} (g.mol ⁻¹) | Micelle diameter ^{b)} (nm) | PSD ^{b)} | CMC ^{c)} (mg.L ⁻¹) |
|--|---|--|-------------------|--|
| PHOHHx ₁₅₀₀ - <i>b</i> -PEG | 1500 | 44.5 | 0.210 | 5.50 |
| PHOHHx ₃₈₀₀ - <i>b</i> -PEG | 3800 | 55.4 | 0.171 | 0.98 |
| PHOHHx ₆₈₀₀ - <i>b</i> -PEG | 6800 | 59.1 | 0.086 | 0.85 |
| PHOHHx ₇₇₀₀ - <i>b</i> -PEG | 7700 | 90.9 | 0.139 | 0.93 |

a) Determined by ¹H NMR; b) Determined by dynamic light scattering; mean diameter, SD = 2%; c) Critical micelle concentration (CMC) in water determined using the pyrene probe technique.

TABLE 4.2: Characteristics of PHOHHx-*b*-PEG micelles.

While PBH-based micelles are generated from triblock copolymers,[9, 24] it turned out to be interesting to compare PHOHHx-*b*-PEG micelles to the synthetic polyester poly(lactide)-*block*-poly(ethylene glycol) (PLA-*b*-PEG) micelles with the same PEG block and in comparable hydrophobic weight fractions.[25] Results showed that PHOHHx-*b*-PEG micelles are significantly larger than PLA-*b*-PEG : 26 to 46.7 nm for PLA-PEG and 44.5 to 90.9 nm for PHOHHx-PEG. This observation can be attributed to PHOHHx structure, sterically larger than that of PLA, thus generating larger hydrophobic cores. PHOHHx-PEG micelles present a narrow particle size distribution (PSD) (Table 4.2); as for PLA-PEG micelles,[25] PHOHHx-PEG micelles with the shorter hydrophobic block exhibit higher polydispersity. An optimum is reached for PHOHHx₆₈₀₀-*b*-PEG, with a PSD of 0.086; its particle size distribution is represented in Figure 4.5.

It has to be noticed that the relatively high molecular weight distribution of the

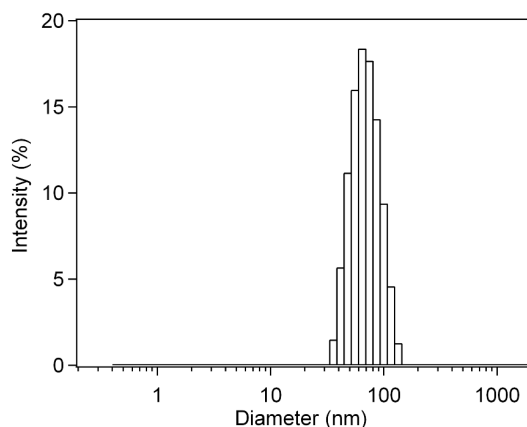


Figure 4.5: Particle size distribution of PHOHH_{x6800}-*b*-PEG.

copolymer (1.6) is not a severe limitation to monodisperse micelles formation. This result is consistent with previously reported poly(2-methyloxazoline)-*b*-poly(dimethylsiloxane)-*b*-poly(2-methyloxazoline) (PMOXA–PDMS–PMOXA) triblock copolymers,[26] that were forming monodisperse vesicles with similar molecular weight distribution (1.7). Cryo-TEM was used to confirm the micellar structures formed by PHOHH_x-*b*-PEG in aqueous medium. As a typical example, Figure 4.6 shows the micelles formed with PHOHH_{x6800}-*b*-PEG.

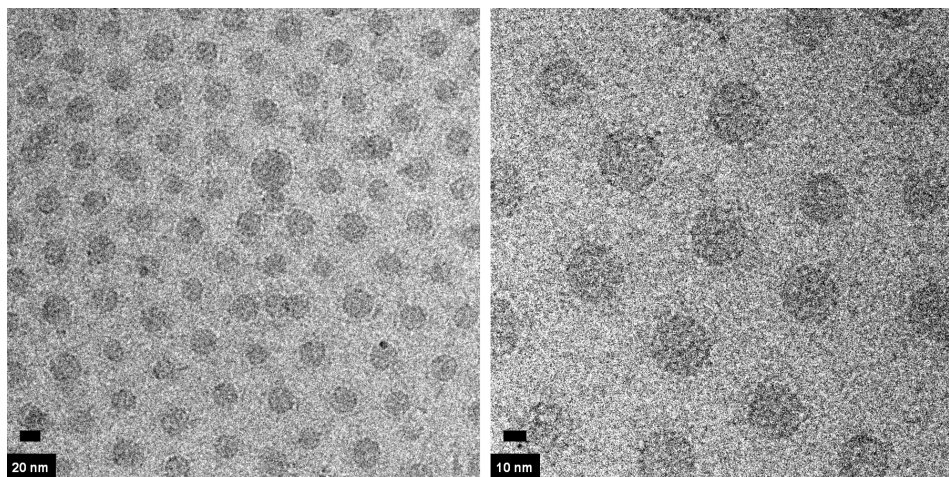


Figure 4.6: Micelles of PHOHH_{x6800}-*b*-PEG observed by cryo-TEM at 1 g.L⁻¹.

They exhibit remarkable spherical shape, with an average size of 32.1 nm. This result

is significantly lower than DLS results ; based on the intensity of scattered light, the mean hydrodynamic radius determined by DLS is heavily influenced by the largest structures in the solution, and could explain this dissimilarity.[27] Another likely explanation would be the inability to see all the micellar structure by cryo-TEM. Indeed, only the dense PHOHHx core would be visible while the diffuse PEG corona would not be contrasted enough to appear on cryo-TEM image. This hypothesis is supported by the apparent regularity of the stacking of the micelles on the cryo-TEM image, which would be in fact sterically stabilized thanks to their PEG corona.[28]

If biological applications are targeted, it is obvious that micelles should be stable in physiological medium, i.e., at an ionic strength of 0.15 M. Thus, the colloidal stability of PHOHHx-*b*-PEG micelles has been tested over storage time and at various sodium chloride concentrations. It has been found that micelles remain stable after 1 month, without noticeable change in the size or in the PDI. Moreover, concentrations ranging from 0.05M to 0.2M of NaCl were used to investigate the stability of the micelles. DLS was used to follow micelle diameter as well as PDI upon increase of NaCl concentration (Figure 4.7).

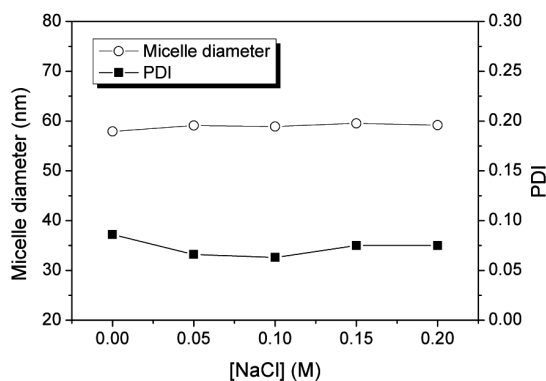


Figure 4.7: Colloidal stability of PHOHHx₆₈₀₀-*b*-PEG micelles against NaCl concentration.

It can be seen that no significant changes in size or PDI can be noticed. Moreover, the count rate, reflecting the intensity of the scattered light (in kilocounts per second) has also been controlled ; it remains stable, attesting for the absence of flocculation of the micelles and thus of the absence of effect of physiological ionic strength on colloidal

stability.

4.5 Conclusion

In this study, the self-association of amphiphilic mcl-PHAs has been investigated for the first time. A series of diblock copolymers was obtained in good yields thanks to a straightforward and efficient « click chemistry » approach. The copolymers were demonstrated to form well-defined micelles with narrow particle size distribution in the 20-120 nm range, making them suitable for drug delivery applications if one considers the enhanced permeability and retention effect (EPR effect)[29] which allows particles in this diameter range to extravasate across vascular endothelium from bloodstream near cancer tumors. Compared to previously described natural scl-PHAs-based systems,[9] PHOHHx-*b*-PEG micelles display significantly lower CMC reflecting a higher stability for intravenous applications . The amorphous behavior of PHOHHx blocks combined to the strong hydrophobic interactions between pentyl groups allows the formation of very stable micelles, for which the CMC is partially independent of the hydrophobic block length. Moreover, with pentyl groups as side chains, high loading of hydrophobic drugs can be expected as previously shown for hexyl-grafted PLA compared to PLA.[30] With tunable size and high stability, natural mcl-PHAs appear as a credible alternative to synthetic polymers for drug delivery applications. Further studies are underway to evaluate the potential of this system for controlled drug delivery.

References

1. MULLER, H. M. & SEEBACH, D. Poly(hydroxyalkanoates) : a fifth class of physiologically important organic biopolymers. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **32**, 477–502 (1993).
2. STEINBÜCHEL, A. & VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* **128**, 219–228 (1995).
3. LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 1–14 (1996).
4. CHEN, Z. F., CHENG, S. T. & XU, K. T. Block poly(ester-urethane)s based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate). *Biomaterials* **30**, 2219–2230 (2009).
5. CHEN, G. Q. & WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **26**, 6565–6578 (2005).
6. RAI, R, KESHAVARZ, T, ROETHER, J. A., BOCCACCINI, A. R. & ROY, I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science & Engineering R-Reports* **72**, 29–47 (2011).
7. RAVENELLE, F & MARCHESSAULT, R. H. One-step synthesis of amphiphilic diblock copolymers from bacterial poly([R]-3-hydroxybutyric acid). *Biomacromolecules* **3**, 1057–1064 (2002).
8. RAVENELLE, F & MARCHESSAULT, R. H. Self-assembly of poly([R]-3-hydroxybutyric acid)-block-poly(ethylene glycol) diblock copolymers. *Biomacromolecules* **4**, 856–858 (2003).

9. LI, J *et al.* Micellization phenomena of biodegradable amphiphilic triblock copolymers consisting of poly(beta-hydroxyalkanoic acid) and poly(ethylene oxide). *Langmuir* **21**, 8681–8685 (2005).
10. BABINOT, J, RENARD, E & LANGLOIS, V. Preparation of Clickable Poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) : Application to Poly(ethylene glycol) (PEG) Graft Copolymers Synthesis. *Macromolecular Rapid Communications* **31**, 619–624 (2010).
11. JAZKEWITSCH, O., MONDRZYK, A., STAFFEL, R. & RITTER, H. Cyclodextrin-Modified Polyesters from Lactones and from Bacteria : An Approach to New Drug Carrier Systems. *Macromolecules* **44**, 1365–1371 (2011).
12. BABINOT, J, RENARD, E & LANGLOIS, V. Controlled Synthesis of Well Defined Poly(3-hydroxyalkanoate)s-based Amphiphilic Diblock Copolymers Using Click Chemistry. English. *Macromolecular Chemistry and Physics* **212**, 278–285 (2011).
13. HARTMANN, R. *et al.* Tailored Biosynthesis of Olefinic Medium-Chain-Length Poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas putida* GPo1 with Improved Thermal Properties. *Macromolecules* **37**, 6780–6785 (2004).
14. ZHAO, X. Y., METZ, W. A., SIEBER, F & JANDA, K. D. Expanding on the purification methodology of polyethylene glycol (PEG) bound molecules : The synthesis of 3,5-pyrazolidinediones. *Tetrahedron Letters* **39**, 8433–8436 (1998).
15. NGUYEN, S, YU, G. E. & MARCHESSAULT, R. H. Thermal degradation of poly(3-hydroxyalkanoates) : Preparation of well-defined oligomers. *Biomacromolecules* **3**, 219–224 (2002).
16. CHAN SIN, M., GAN, S. N., MOHD ANNUAR, M. S. & PING TAN, I. K. Chain cleavage mechanism of palm kernel oil derived medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) during high temperature decomposition. *Polymer Degradation and Stability* **96**, 1705–1710 (2011).
17. NANDIVADA, H., JIANG, X. & LAHANN, J. Click chemistry : Versatility and control in the hands of materials scientists. *Advanced Materials* **19**, 2197–2208 (2007).

18. YASUGI, K., NAGASAKI, Y., KATO, M. & KATAOKA, K. Preparation and characterization of polymer micelles from poly(ethylene glycol)-poly(d,l-lactide) block copolymers as potential drug carrier. *Journal of Controlled Release* **62**, 89–100 (1999).
19. RIESS, G. Micellization of block copolymers. *Progress in Polymer Science* **28**, 1107–1170 (2003).
20. KALYANASUNDARAM, K & THOMAS, J. K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *Journal of the American Chemical Society* **99**, 2039–2044 (1977).
21. WILHELM, M. *et al.* Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water : a fluorescence probe study. *Macromolecules* **24**, 1033–1040 (1991).
22. ANTHONY, O & ZANA, R. Fluorescence Investigation of the Binding of Pyrene to Hydrophobic Microdomains in Aqueous Solutions of Polyoaps. *Macromolecules* **27**, 3885–3891 (1994).
23. WINTGENS, V., DAOUD-MAHAMMED, S., GREF, R., BOUTEILLER, L. & AMIEL, C. Aqueous Polysaccharide Associations Mediated by beta-Cyclodextrin Polymers. *Biomacromolecules* **9**, 1434–1442 (2008).
24. CHEN, C, YU, C. H., CHENG, Y. C., YU, P. H. F. & CHEUNG, M. K. Biodegradable nanoparticles of amphiphilic triblock copolymers based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as drug carriers. *Biomaterials* **27**, 4804–4814 (2006).
25. RILEY, T *et al.* Physicochemical Evaluation of Nanoparticles Assembled from Poly(lactic acid)-Poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir* **17**, 3168–3174 (2001).
26. NARDIN, C, HIRT, T, LEUKEL, J & MEIER, W. Polymerized ABA Triblock Copolymer Vesicles. *Langmuir* **16**, 1035–1041 (2000).
27. COLDREN, B, van ZANTEN, R, MACKEL, M. J., ZASADZINSKI, J. A. & JUNG, H.-T. From Vesicle Size Distributions to Bilayer Elasticity via Cryo-Transmission and Freeze-Fracture Electron Microscopy. *Langmuir* **19**, 5632–5639 (2003).

28. HANS, M., SHIMONI, K., DANINO, D., SIEGEL, S. J. & LOWMAN, A. Synthesis and Characterization of mPEG-PLA Prodrug Micelles. *Biomacromolecules* **6**, 2708–2717 (2005).
29. MAEDA, H, WU, J, SAWA, T, MATSUMURA, Y & HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics : a review. *Journal of Controlled Release* **65**, 271–284 (2000).
30. MONDON, K., GURNY, R. & MOELLER, M. Colloidal Drug Delivery Systems - Recent Advances With Polymeric Micelles. *CHIMIA* **62**, 832–840 (2008).

Chapitre 5

Synthèse de copolymères amphiphiles greffés par addition thiol-ène et élaboration de polymersomes

Présentation de l'article

Il a été précédemment montré (Chapitre 4) que des copolymères diblocs PHOHHx-*b*-PEG s'auto-associaient en structures micellaires en milieu aqueux. Afin d'établir des relations structure-propriétés entre l'architecture moléculaire et les propriétés d'auto-association, nous nous sommes intéressés à la synthèse et à l'étude de l'auto-assemblage de copolymères greffés à base de PEG et de PHA-mcl.

Afin d'obtenir un ratio hydrophobe/hydrophile similaire à celui des copolymères diblocs, des chaînes de PEG de masse molaire de 550 g.mol⁻¹ ont été greffées sur des oligomères de PHOU par addition thiol-ène. Cette réaction, également qualifiée de réaction de chimie « click », est particulièrement bien adaptée au greffage d'oligomères de masses molaires relativement faibles¹. Elle présente par ailleurs l'avantage de pouvoir exploiter les insaturations du PHOU sans autres modifications chimiques.

Tout d'abord, des oligomères de PHOU possédant 14% et 31% d'insaturations ont été synthétisés par méthanolyse ($\overline{M}_n \approx 15000$ g.mol⁻¹), puis des PEG porteurs de fonctions thiol ont ensuite été greffés sur les oligomères de PHOU par addition thiol-ène. Les analyses par RMN et SEC ont confirmé la synthèse de copolymères parfaitement définis. L'auto-assemblage en milieu aqueux de ces copolymères a ensuite été induit grâce à la technique de nanopréciipitation.

Les images de cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) ont clairement montré que le copolymère PHOU_{14%}-*g*-PEG s'auto-associait en structures vésiculaires (polymersomes) d'approximativement 60 nm de diamètre et de distribution relativement étroite. Enfin, une concentration d'agrégation critique (CAC) très faible de 0,4 mg.L⁻¹ a été mesurée, témoignant d'une très grande stabilité à la dilution.

En résumé, cette étude présente donc une voie simple et efficace pour l'élaboration de polymersomes potentiellement utilisables comme vecteurs de principes actifs; elle met par ailleurs en lumière l'influence de l'architecture moléculaire sur les propriétés d'auto-association des PHA-mcl amphiphiles.

1. voir SANDY P. S. KOO et al., Limitations of Radical Thiol-ene Reactions for Polymer-Polymer Conjugation, *Journal of Polymer Science : Part A : Polymer Chemistry*, **48**, 1699–1713 (2010)

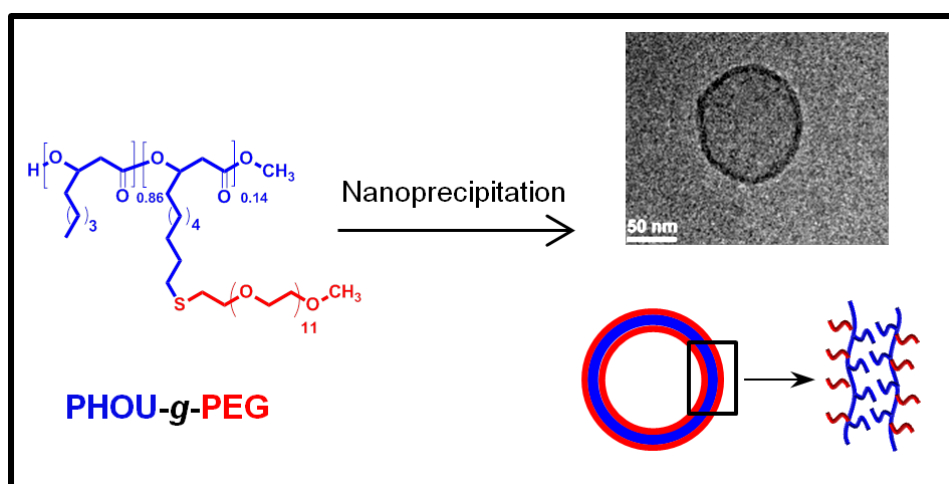
Poly(3-hydroxyalkanoate)-derived Amphiphilic Graft Copolymer for the Design of Polymersomes

Chemical Communications, 2012, 48, 5364-5366

JULIEN BABINOT^a, JEAN-MICHEL GUIGNER^b, ESTELLE RENARD^a, VALÉRIE
LANGLOIS^a

^aInstitut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE), Systèmes Polymères Complexes,
UMR CNRS 7182, 2-8 rue Henri Dunant, 94320 Thiais, France

^bInstitut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés (IMPMC), 4 place Jussieu,
75005 Paris, France



5.1 Abstract

Amphiphilic graft copolymer composed of biocompatible bacterial poly(3-hydroxyalkanoate) and poly(ethylene glycol) has been synthesized by thiol-ene addition. It was demonstrated to form well-defined nanoscale vesicles in water by cryo-transmission electron microscopy.

5.2 Communication

Polymeric vesicles, so-called polymersomes, have attracted considerable interest in the past decade regarding their potential applications in drug delivery, gene therapy or as model systems of biomembranes.[1–6] Mimicking liposomes, i.e. vesicular superstructures made of natural phospholipids, polymersomes are formed by the self-assembly of amphiphilic copolymers with higher molar mass, resulting in more stable structures with improved mechanical properties.[7] Biodegradable and biocompatible polymersomes are thus of particular interest for biomedical applications. In the literature, most of them are self-assembled from diblock copolymers based on synthetic polyesters such as polylactide[8] or polycaprolactone,[9] polycarbonates[10] or on polypeptides.[11] Only a few of them are the result of the self-assembly of graft copolymers such as poly(2-hydroxyethyl aspartamide) grafted with lactic acid oligomers,[12] amphiphilic graft polyphosphazenes[13] or more recently poly(ethylene glycol) and poly(D,L-lactide) grafted poly(β -amino ester).[14]

Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) constitute a class of natural polyesters produced and accumulated by many bacteria as carbon and energy supply when an essential nutrient is limited.[15, 16] Due to their biodegradability and biocompatibility features, PHAs look promising candidates for biomedical applications especially regarding the fields of biomedical devices, tissue engineering or biodegradable drug carriers.[17, 18] For the latter application, amphiphilic bacterial PHAs-based diblock or triblock copolymers have already been synthesized and proved to self-assemble into micelles in aqueous media.[19, 20] To the best of our knowledge, no example describing PHAs-based polymersomes has been reported yet. Herein, we propose a simple and straightforward methodology for the preparation of well-defined polymersomes starting from an amphi-

philic PHA-based graft copolymer. Poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxyundecanoate) (PHOU) is a functionalized PHA bearing alkene functions on its side chains.[21] The alkene ratio in the polymer depends on the initial bacterial feeding ratio with octanoic acid and 10-undecenoic acid, respectively. In our study, two PHOUs with respectively 14% and 31% of alkene units were used, as well as the well-known biocompatible poly(ethylene glycol)[22] as hydrophilic moiety.

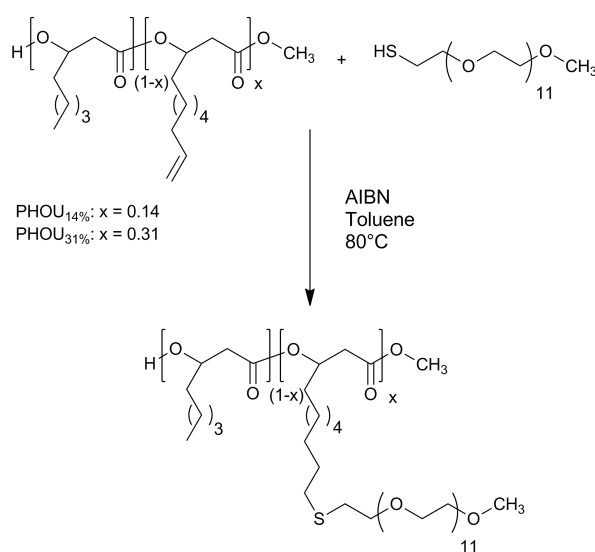


Figure 5.1: Synthesis of PHOU-*g*-PEG.

The synthetic route to poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxyundecanoate)-*g*-poly(ethylene glycol) (PHOU-*g*-PEG) is shown in Figure 5.1. Graft copolymers composed of PHOU oligomers and thiol-appended polyethylene glycol monomethyl ether were obtained via the well-known thiol-ene addition.[23, 24] First, a thiol group was introduced at the terminus of a 550 g.mol⁻¹ polyethylene glycol monomethyl ether. In a second step, PHOU oligomers were prepared by acid-catalyzed methanolysis[25] and fully characterized using ¹H NMR and SEC (Table 5.1).

This method provides well-defined oligomers with hydroxyl and methyl ester end groups, respectively, without spoiling the alkene groups. Grafting was achieved via thiol-ene addition, which has proven to be an effective reaction to functionalize unsaturated PHOU.[21] It is also noteworthy that as « click » reaction, thiol-ene addition is better suited for biomedical applications than the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition

| Samples | \overline{M}_n^a | \overline{M}_n^b | PDI ^b |
|------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| PHOU _{14%} oligomer | 15200 | 14100 | 2 |
| PHOU _{31%} oligomer | 15000 | 13600 | 2.1 |
| PHOU _{14%-g} -PEG | — | 20900 | 2.1 |
| PHOU _{31%-g} -PEG | — | 22800 | 2.1 |

a) Determined by ¹H NMR, g.mol⁻¹; b) Determined by SEC (THF, polystyrene standards).

TABLE 5.1: Molecular characteristics of modified PHOUs.

(CuAAC)[26] as no toxic catalyst that could be detrimental for further in vitro or in vivo studies is employed. The efficiency of the coupling was confirmed by ¹H NMR that showed the complete disappearance of the ethylenic signals ($\delta = 4.83$ - 5.08 and 5.61 - 5.91 ppm) along with the simultaneous appearance of the methylene in alpha of the sulphur atom ($\delta = 2.66$ ppm) (Figure 5.4, ESI). Size exclusion chromatography was also conducted and the results showed a monomodal size distribution (Figure 5.5, ESI) together with an expected increase of the molar mass associated to the PEG grafting on the alkene pendant chains of the PHOU backbone (Table 5.1).

Polymersomes were prepared by the nanoprecipitation technique.[27] PHOU_{14%-g}-PEG copolymer was dissolved in acetone, a good solvent for both PHOU and PEG blocks, and added dropwise to deionized (DI) water under moderate stirring, inducing the self-assembly process. The organic solvent was removed by extensive dialysis against DI water and the polymeric vesicles were observed by cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) (Figure 5.2).

The vesicular structure was clearly identified by the contrast difference of the membrane at the periphery of the nanoparticles. For all polymersomes, the membrane thickness was approximately 8-9 nm. In the diblock copolymer system, from which majority of polymersomes are resulting from, the capacity to form vesicle is mainly related to the hydrophilic/hydrophobic ratio.[7] For graft copolymers, the molecular shape has also to be considered. In our system, PEG chains are grafted along PHOU backbone approximately every 7 monomer units. The structuring of the bilayer membrane would be the consequence of the stacking of pendant pentyl chains; indeed, the ratio of hydrophobic chains in the copolymer would be suitable to allow a stable stacking of the pentyl chains through hydrophobic interactions. A proposed schematic representation is given

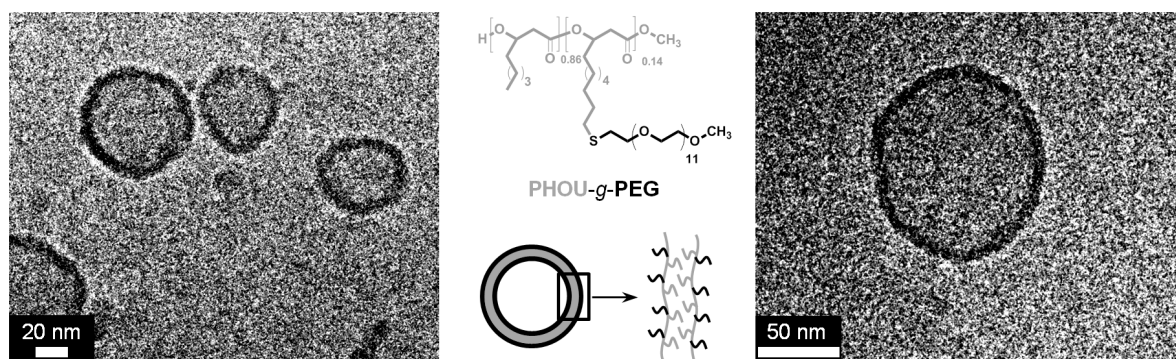


Figure 5.2: Vesicles of PHOU_{14%}-g-PEG prepared by nanoprecipitation observed by cryo-TEM at 1 g/L. Center : schematic representation of a vesicle with focus on the bilayer wall (PHOU in grey, PEG in black). The mean wall thickness is 8-9 nm.

in Figure 5.2. This interpretation is supported by the analysis of PHOU_{31%}-g-PEG nanoparticles prepared in the same conditions. Indeed, the cryo-TEM picture revealed the presence of micellar-like nanoparticles, with an approximate diameter of 5-6 nm (Figure 5.6, ESI). In this case, PEG chains are grafted approximately every 3 monomer units; the limited amount of pentyl chains would not allow sufficiently strong hydrophobic interactions and thus would prevent the formation of a stable bilayer. Hence, the amphiphilic copolymer would preferentially take micellar structure composed most certainly of a few unimers.

Size measurements using the cryo-TEM pictures were conducted on 60 vesicles. The mean diameter was found to be 63 nm, with a standard deviation of 16 nm and minimum and maximum at 32 and 107 nm, respectively. Dynamic light scattering (DLS) was used to assess whether cryo-TEM measurements are representative of the whole sample. Using the cumulant analysis method, the polymersomes exhibited a mean diameter of 65 nm and a narrow particle size distribution (PSD) of 0.08 (Figure 5.3a), which confirmed the above-mentioned results obtained by analysis of cryo-TEM images. Regarding drug delivery applications, this narrow submicron PSD in the 30-110 nm range appears promising especially if one considers the opportunity of these nanoparticles to benefit from the enhanced permeability and retention effect (EPR effect)[28] which allows particles in this diameter range to extravasate across vascular endothelium from bloodstream near cancer tumors.

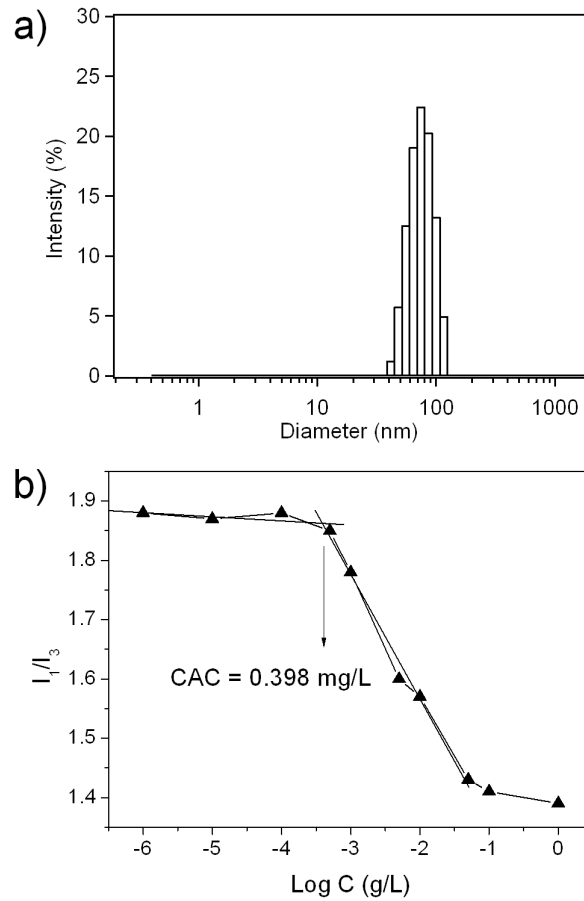


Figure 5.3: a) Vesicle size distribution of nanoprecipitated polymersomes determined by DLS and b) Determination of the CAC of PHOU_{14%}-*g*-PEG vesicles by plotting the intensity ratio I_1/I_3 of pyrene probe at different concentrations.

Dialysis was used to investigate the influence of an alternative solvent displacement method for the preparation of polymersomes. Copolymers were dissolved in acetone and extensively dialyzed against DI water. Progressive aggregation was observed and the colloidal suspension was analyzed by DLS. A high PSD of 0.61 was noted with an average hydrodynamic radius in the micrometer scale. The vesicular morphology was confirmed by cryo-TEM with the observation of well-defined vesicular structures (Figure 5.7, ESI). Considering the lower PSD previously observed, i.e. when nanoprecipitation was used, this result suggests that polymersome formation is dictated more by kinetic aspects than thermodynamics. Furthermore, with an appropriate separation method such as extrusion through controlled size membranes, the dialysis technique could allow the development of polymersomes in the micrometer range.

Finally, the stability of the nanometer-sized vesicles upon dilution, i.e. their critical aggregation concentration (CAC), has been investigated by means of fluorescence spectroscopy using pyrene as fluorescent probe.[29] Monitoring the band ratio I_1/I_3 at different concentrations (Figure 5.8, ESI), the CAC was determined as the flexion point of the sigmoidal curve (Figure 5.3b). A very low CAC of 0.398 mg/L was determined, demonstrating the potential of PHOU-*g*-PEG polymersomes as drug delivery carriers where high dilution is reached. In summary, a simple and efficient strategy for the preparation of PHOU-*g*-PEG amphiphilic graft copolymer was presented. Novel biocompatible bacterial polyester-based polymeric nanoscale vesicles were prepared, with narrow particle size and high stability. Work is in progress to fully investigate their encapsulation properties and their biodegradability so as to assess the entire potential of such nanoparticulate system in the biomedical area.

5.3 Electronic Supplementary Information

5.3.1 Experimental Part

5.3.1.1 Materials

Acetone $\geq 99.5\%$, Anhydrous MeOH 99.8%, poly(ethylene glycol) methyl ether average $\overline{M}_n \sim 550 \text{ g.mol}^{-1}$ (MeO-PEG₅₅₀) potassium thioacetate 98%, and α, α' -Azoisobutyronitrile $\geq 98\%$ (AIBN) were purchased from Sigma Aldrich. p-toluenesulfonyl chloride 99+%

(TsCl) and 4-dimethylaminopyridine 99% (DMAP) were purchased from Acros Organics. Hydrochloric acid 37% and pyridine synthesis grade were obtained from Carlo Erba. CH₂Cl₂ was obtained from Carlo Erba and was distilled over CaH₂ before use. THF and toluene were obtained from Carlo Erba and were distilled over sodium/benzophenone before use. All other materials were used without further purification. PHOU was obtained from EMPA, Swiss Fed Labs Mat Testing & Res, Lab Biomat, CH-9014 St Gallen, Switzerland, synthesized following a previously reported procedure.[21] Its molar composition was determined by ¹H NMR in CDCl₃ by comparing the integration of the ethylenic proton **g** to the main chain protons **b**, **b'** (Figure 5.4a). PHOU_{14%} : 14% of unsaturated undecenoate units and 86% of 3-hydroxyoctanoate. PHOU_{31%} : 31% of undecenoate units and 69% of 3-hydroxyoctanoate. It has to be noted that PHOUs are mainly composed of 3-hydroxyoctanoate and 3-hydroxy-10-undecenoate units; however, they possess a wider chain length distribution (3-hydroxyhexanoate; 3-hydroxy-6-heptenoate; 3-hydroxy-8-nonenoate), as a consequence of biosynthesis. Their molar masses were determined by SEC (THF, polystyrene standards) : PHOU_{14%} : $\overline{M}_n = 98600 \text{ g.mol}^{-1}$, PDI = 1.8, and PHOU_{31%} : $\overline{M}_n = 95600 \text{ g.mol}^{-1}$, PDI = 1.8.

5.3.1.2 Synthesis of PEG-SH

Thiolated PEG was synthesized using a modified procedure.[30]

Tosylation of PEG₅₅₀

MeO-PEG₅₅₀ (30 g, 54.5 mmol) and DMAP (333 mg, 2.7 mmol) were dissolved in 160 mL of CH₂Cl₂/ Pyridine (1 :1) solution at 0°C under argon atmosphere. p-toluenesulfonyl chloride (18.7 g, 98.1 mmol) dissolved in 50 mL of CH₂Cl₂ was added dropwise and the solution was stirred overnight (from 0°C to RT). 200 mL of cold water were added and the aqueous phase was extracted three times with 150 mL of CH₂Cl₂. The combined organic phases were successively washed with 3x 250 mL HCl 1M solution and 3x 250 mL of saturated NaCl solution. After drying over MgSO₄, the organic phase was concentrated under reduced pressure and the resulting product (PEG₅₅₀-OTs) dried under vacuum (m = 36.4 g, yield 95%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 4.12 (m, 2H), 3.49-3.66 (m, 41H), 3.34 (s, 3H), 2.41 (s, 3H).

Synthesis of PEG₅₅₀-thioacetate

PEG₅₅₀-OTs (36 g, 51 mmol) was dissolved in 200 mL of THF under Ar. Potassium thioacetate (11.66 g, 102 mmol) was added and the solution was refluxed for 20h. A white fluffy precipitate formed. The solution was cooled to room temperature and 400 mL of water were added. The flask contents were extracted with 3x 150 mL CH₂Cl₂ and the brown colored organic extract was washed with 3x 200 mL of water, treated with activated charcoal, filtered and rotary evaporated to afford 23.3 g (38.3 mmol) of light yellow oil (yield 75%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.49-3.62 (m, 43H), 3.34 (s, 3H), 3.05 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H).

Synthesis of PEG₅₅₀-SH

PEG₅₅₀-thioacetate (23 g, 37.7 mmol) was dissolved in 200 mL of anhydrous MeOH under argon. 15 mL of HCl 37% were added and the solution was refluxed for 2h. 200 mL of water were added and the solution was extracted with 3x 150 mL CH₂Cl₂. The combined organic phases were washed with 3x 200 mL of water, 3x 250 mL of saturated NaCl solution, dried over MgSO₄ and filtered. The resulting solution was rotary evaporated to give 17.52 g (30.9 mmol) of colorless oil, thiolated PEG (yield 82%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.50-3.63 (m, 43H), 3.34 (s, 3H), 2.66 (dt, *J* = 8.2, 6.4 Hz, 2H), 1.56 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H).

5.3.1.3 Synthesis of PHOU oligomers[31]

PHOU (300 mg) was dissolved in 12 mL of CH₂Cl₂. 12 mL of anhydrous MeOH were introduced to the solution and 0.9 mL of H₂SO₄ was added. The solution was then stirred at 100°C (the vessel was hermetically closed) for 7 minutes to obtain the desired molar mass. After cooling in an ice bath, 8 mL of distilled water were added ; after decantation, the organic layer was washed again with distilled water, dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated and the resulting product was dried under vacuum at 40°C to afford 279 mg of PHOU oligomers (yield 93%). See Figure 5.4a for complete ¹H NMR attribution and Table 5.1 for molar mass determination.

5.3.1.4 Typical synthesis of PHOU-g-PEG

PHOU_{14%} oligomers (278 mg, 1.88 mmol, 0.263 mmol of double bonds), PEG₅₅₀-SH (747 mg, 1.31 mmol) and AIBN (21 mg, 0.131 mmol) were dissolved in 10 mL of anhydrous toluene under argon, and the solution was heated at 80°C for 20h. Toluene was rotary evaporated and the crude was dissolved in 30 mL of acetone. The solution was poured in 30 mL of water, and the resulting colloidal suspension was then transferred into a dialysis tube (SpectraPor, molecular weight cut off, 6-8000 Da) and dialyzed against water for 3 days. In order to remove all unreacted PEG, acetone was added to break the vesicles till complete clearance of the solution, and put again to dialyze for 3 days. Water was removed under reduced pressure and the resulting product dried under vacuum (394 mg, yield 92%). See Figure 5.4b for complete ¹H NMR attribution and Table 5.1 for molar mass determination.

5.3.1.5 Sample Preparation

Self-assembled vesicles were prepared using two different methods. In a first manner, nanoprecipitation was used. 20 mg of the copolymer were dissolved in 2 mL of acetone and precipitated in 4 mL of water. Acetone was removed from the dispersion by extensive dialysis against water for 48h. Dialysis was also used to elaborate polymeric vesicles. 50 mg of the copolymer were dissolved in 10 mL of acetone and extensively dialyzed against water for 4 days (Spectra/Por dialysis tubing, molecular weight cut off 6-8000 Da). The volume of water was two liters, and was renewed 4 times per day.

Dynamic Light Scattering (DLS)

Samples for DLS experiments were adjusted at the concentration of 1 g.L⁻¹ and filtered through a 0.45 µm filter prior to measurement in the case of nanoprecipitated polymersomes (measurement without filtration has been made to check the possible presence of aggregates or large vesicles; none of them has been observed). Polymersomes made by dialysis were analyzed without filtration.

Critical Aggregation Concentration (CAC)

Samples for CAC determination were prepared in a two-steps procedure : first, 10 μ L of a stock solution of pyrene (1.4×10^{-4} M) in dichloromethane was deposited on the bottom of a flask and left to evaporate, and then 2 mL of a copolymer solution with the appropriate concentration was added to the flask and shaken for two days before measurements (the final concentration of pyrene in the samples was 7×10^{-7} M).

Cryo-Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM)

The morphology and size of the polymer nanoparticles (NPs) were determined from cryo-TEM images. A drop of NPs dispersion (0.1 wt% solid content) was deposited on "quantifoil"[®] (Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany) carbon membrane. The excess of liquid on the membrane was blotted out with a filter paper and, before evaporation, the membrane was quench-frozen in liquid ethane to form a thin vitreous ice film in which NPs were captive. Once mounted in a Gatan 626 cryo-holder cooled with liquid nitrogen, the samples were transferred in the microscope and observed at low temperature (-180 °C).

5.3.1.6 Instrumentation

¹H NMR spectra were recorded in CDCl₃ using a Bruker 400 MHz NMR spectrometer. Size exclusion chromatography (SEC) experiments were performed in THF (1 mL.min⁻¹) at room temperature using a Shimadzu LC10 AD pump, and two PLgel Polymer Laboratories columns (5 μ m Mixte-C). A Wyatt Technology Optilab Rex interferometric refractometer was used as detector. The molar masses were calibrated with polystyrene standards. DLS experiments were made using a Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS operating with a He-Ne laser source at the wavelength of 633 nm. All measurements were performed at 25°C and at an angle of 173°. The autocorrelation functions were analyzed using the cumulant method to obtain mean diameter and distribution. The pyrene fluorescence was recorded at 23°C with a SLM Aminco 8100 by excitation at 335 nm with slits fixed at 16 and 0.5 nm, respectively, at the excitation and emission. Cryo-TEM images were recorded on ultrascan 2k ccd camera (Gatan, USA), using a LaB₆ JEOL 2100 (JEOL, Japan) cryo microscope operating at 200kV with a JEOL low dose system (Minimum Dose System, MDS) to protect the thin ice film from any irradiation before

imaging and reduce the irradiation during the image capture . The size measurements were carried out using ImageJ software.

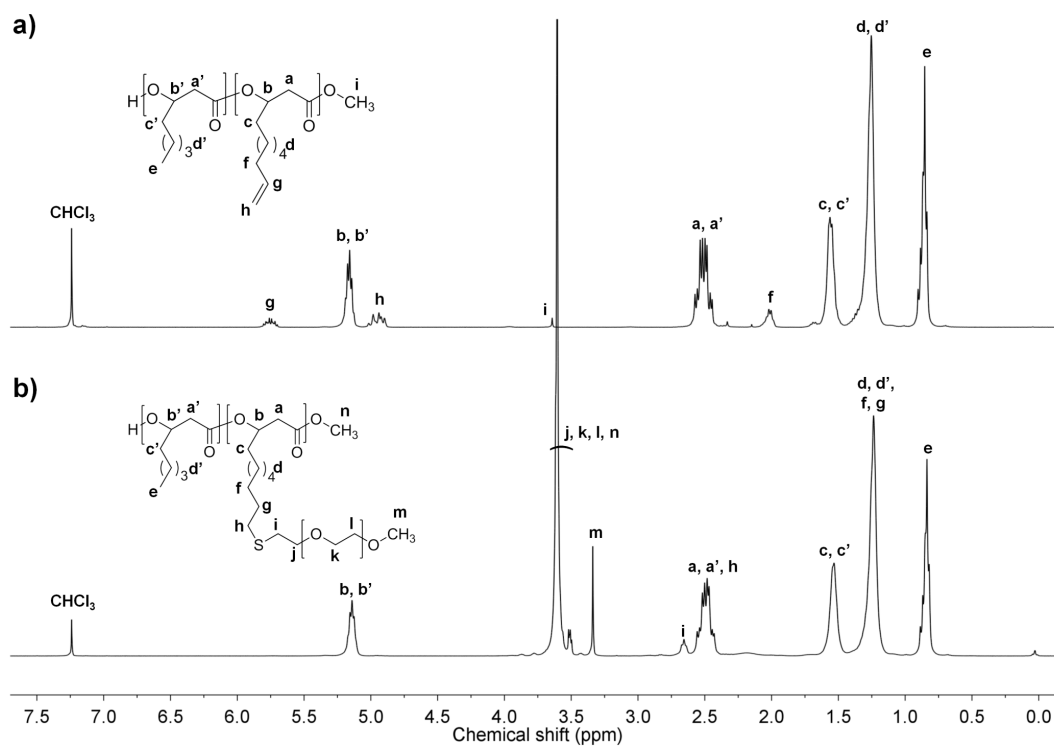


Figure 5.4: ^1H NMR of a) PHOU_{14%} oligomers and b) PHOU_{14%}-g-PEG.

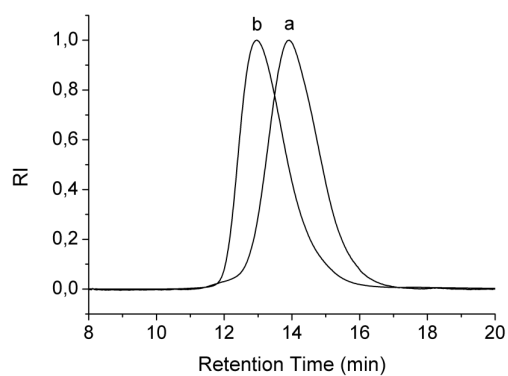


Figure 5.5: SEC chromatograms of a) PHOU_{14%} oligomer and b) PHOU_{14%-g}-PEG.

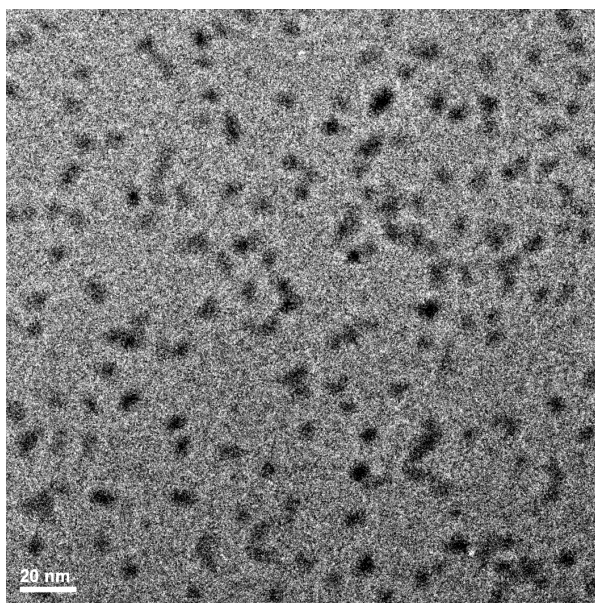


Figure 5.6: Cryo-TEM picture of PHOU_{31%-g}-PEG in water at 1 g.L⁻¹.

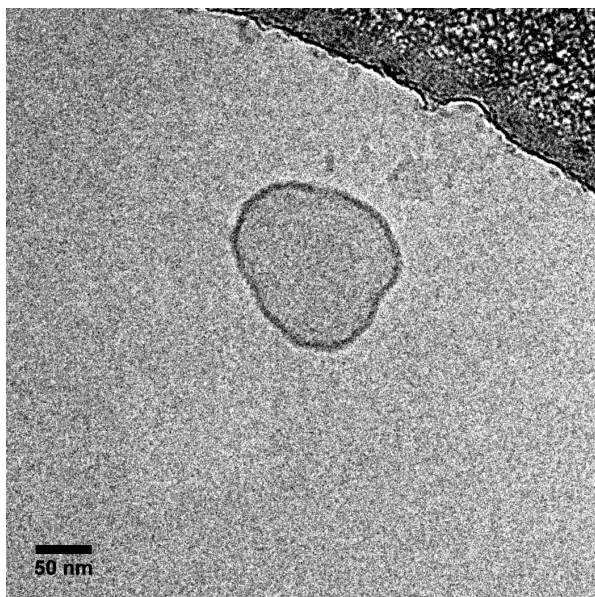


Figure 5.7: Cryo-TEM picture of PHOU_{14%}-*g*-PEG prepared by dialysis. The darker area corresponds to the carbon membrane of the grid.

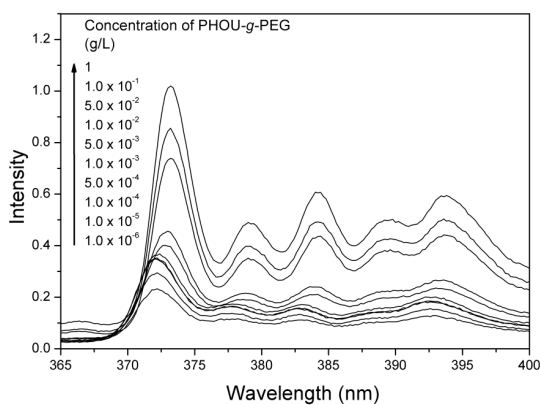


Figure 5.8: Fluorescence emission spectra of the pyrene probe for PHOU_{14%}-*g*-PEG copolymer at various concentrations ($[\text{pyrene}] = 7 \times 10^{-7} \text{ M}$).

References

1. DISCHER, D. E. & EISENBERG, A. Polymer Vesicles. *Science* **297**, 967–973 (2002).
2. DU, J. Z. & O'REILLY, R. K. Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles. *Soft Matter* **5**, 3544–3561 (2009).
3. LOPRESTI, C, LOMAS, H, MASSIGNANI, M, SMART, T & BATTAGLIA, G. Polymersomes : nature inspired nanometer sized compartments. *Journal of Materials Chemistry* **19**, 3576–3590 (2009).
4. KIM, K. T., MEEUWISSEN, S. A., NOLTE, R. J. M. & van HEST, J. C. M. Smart nanocontainers and nanoreactors. *Nanoscale* **2**, 844–858 (2010).
5. BRINKHUIS, R. P., RUTJES, F. & van HEST, J. C. M. Polymeric vesicles in biomedical applications. *Polymer Chemistry* **2**, 1449–1462 (2011).
6. JAIN, J. P., AYEN, W. Y. & KUMAR, N. Self Assembling Polymers as Polymersomes for Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design* **17**, 65–79 (2011).
7. DISCHER, B. M. *et al.* Polymersomes : Tough vesicles made from diblock copolymers. *Science* **284**, 1143–1146 (1999).
8. MENG, F. H., HIEMSTRA, C, ENGBERS, G. H. M. & FEIJEN, J. Biodegradable polymersomes. *Macromolecules* **36**, 3004–3006 (2003).
9. GHOROGHCHIAN, P. P. *et al.* Bioresorbable vesicles formed through spontaneous self-assembly of amphiphilic poly(ethylene oxide)-block-polycaprolactone. *Macromolecules* **39**, 1673–1675 (2006).
10. SANSON, C *et al.* Biocompatible and Biodegradable Poly(trimethylene carbonate)-b-Poly (L-glutamic acid) Polymersomes : Size Control and Stability. *Langmuir* **26**, 2751–2760 (2010).

11. BERTIN, A, HERMES, F & SCHLAAD, H. dans *Polymer Membranes/Biomembranes* (éds. MEIER, W. P. & KNOLL, W) 167–195 (Springer-Verlag, Berlin, 2010).
12. LEE, H. J., YANG, S. R., AN, E. J. & KIM, J.-D. Biodegradable Polymersomes from Poly(2-hydroxyethyl aspartamide) Grafted with Lactic Acid Oligomers in Aqueous Solution. *Macromolecules* **39**, 4938–4940 (2006).
13. ZHENG, C., QIU, L. & ZHU, K. Novel polymersomes based on amphiphilic graft polyphosphazenes and their encapsulation of water-soluble anti-cancer drug. *Polymer* **50**, 1173–1177 (2009).
14. KIM, M. S. & LEE, D. S. Biodegradable and pH-sensitive polymersome with tuning permeable membrane for drug delivery carrier. *Chemical Communications* **46**, 4481–4483 (2010).
15. MULLER, H. M. & SEEBACH, D. Poly(hydroxyalkanoates) : a fifth class of physiologically important organic biopolymers. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **32**, 477–502 (1993).
16. STEINBÜCHEL, A. & VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* **128**, 219–228 (1995).
17. CHEN, Z. F., CHENG, S. T. & XU, K. T. Block poly(ester-urethane)s based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate). *Biomaterials* **30**, 2219–2230 (2009).
18. CHEN, G. Q. & WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **26**, 6565–6578 (2005).
19. BABINOT, J., GUIGNER, J.-M., RENARD, E. & LANGLOIS, V. A micellization study of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoate)-based amphiphilic diblock copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science* **375**, 88–93 (2012).
20. LI, J *et al.* Micellization phenomena of biodegradable amphiphilic triblock copolymers consisting of poly(beta-hydroxyalkanoic acid) and poly(ethylene oxide). *Langmuir* **21**, 8681–8685 (2005).
21. HANY, R *et al.* Chemical synthesis of crystalline comb polymers from olefinic medium-chain-length poly [3-hydroxyalkanoates]. *Macromolecules* **37**, 385–389 (2004).

-
22. LEE, M. Y., LEE, T. S. & PARK, W. H. Effect of side chains on the thermal degradation of poly(3-hydroxyalkanoates). *Macromolecular Chemistry and Physics* **202**, 1257–1261 (2001).
 23. LOWE, A. B. Thiol-ene "click" reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry* **1**, 17–36 (2010).
 24. HOYLE, C. E. & BOWMAN, C. N. Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie, International Edition* **49**, 1540–1573 (2010).
 25. TIMBART, L, RENARD, E, TESSIER, M & LANGLOIS, V. Monohydroxylated poly(3-hydroxyoctanoate) oligomers and its functionalized derivatives used as macroinitiators in the synthesis of degradable diblock copolyesters. *Biomacromolecules* **8**, 1255–1265 (2007).
 26. MELDAL, M. Polymer Clicking by CuAAC Reactions. *Macromolecular Rapid Communications* **29**, 1016–1051 (2008).
 27. FESSI, H, PUISIEUX, F, DEVISSAGUET, J. P., AMMOURY, N & BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* **55**, R1–R4 (1989).
 28. MAEDA, H, WU, J, SAWA, T, MATSUMURA, Y & HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics : a review. *Journal of Controlled Release* **65**, 271–284 (2000).
 29. ANTHONY, O & ZANA, R. Fluorescence Investigation of the Binding of Pyrene to Hydrophobic Microdomains in Aqueous Solutions of Polysoaps. *Macromolecules* **27**, 3885–3891 (1994).
 30. LEE, D., DONKERS, R. L., DESIMONE, J. M. & MURRAY, R. W. Voltammetry and Electron-Transfer Dynamics in a Molecular Melt of a 1.2 nm Metal Quantum Dot. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 1182–1183 (2003).
 31. BABINOT, J, RENARD, E & LANGLOIS, V. Preparation of Clickable Poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) : Application to Poly(ethylene glycol) (PEG) Graft Copolymers Synthesis. *Macromolecular Rapid Communications* **31**, 619–624 (2010).

Chapitre 6

Copolymères amphiphiles fluorés PHA-*g*-(F ;PEG) pour l'élaboration de micelles multicompartimentées

Présentation de l'article

Nous avons précédemment démontré l'influence de l'architecture moléculaire sur les propriétés d'auto-association en milieu aqueux de PHA-mcl amphiphiles. Des micelles (Chapitre 4) et des polymersomes (Chapitre 5) ont ainsi respectivement été préparés à partir de copolymères diblocs et de copolymères greffés. Dans ce dernier chapitre, nous nous sommes intéressés à rendre plus complexe la structure issue de l'auto-association de copolymères amphiphiles greffés en introduisant un troisième partenaire, hydrophobe mais aussi lipophile. Ainsi, des copolymères amphiphiles greffés à base de PHOU, PEG et de chaînes carbonées perfluorées (2-perfluorooctyl-1-éthyle) ont été synthétisés.

De la même manière que dans le chapitre précédent, des oligomères de PHOU ($\overline{M}_n \approx 7500-8000 \text{ g.mol}^{-1}$) ont été greffés par addition thiol-ène, mais de façon séquentielle; une partie des insaturations a tout d'abord été fonctionnalisée par du 2-perfluorooctyl-1-éthanethiol puis les doubles liaisons restantes ont été fonctionnalisées par un PEG ($\overline{M}_n \approx 550 \text{ g.mol}^{-1}$) porteur d'une fonction thiol. Les analyses RMN et SEC ont confirmé la synthèse de copolymères parfaitement définis. Finalement, la technique de nanoprecipitation a permis l'auto-assemblage de ces copolymères en milieu aqueux.

L'analyse de ces objets par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) a clairement mis en évidence la formation de micelles multicompartimentées, c'est-à-dire possédant des nanodomains structurés de groupes fluorés dans le coeur hydrophobe de PHOU; suivant la proportion relative de chaînes perfluorées et de PEG, des micelles relativement monodisperses de 79 et 18 nm ont été obtenues.

Finalement, la faible cytotoxicité de ces micelles a été démontrée grâce à des tests de viabilité cellulaire; de par sa facilité de mise en oeuvre, ce système apparaît très prometteur pour l'élaboration de vecteurs de médicaments permettant la délivrance de molécules incompatibles entre elles.

Facile synthesis of multicompartment micelles based on biocompatible poly(3-hydroxyalkanoate)

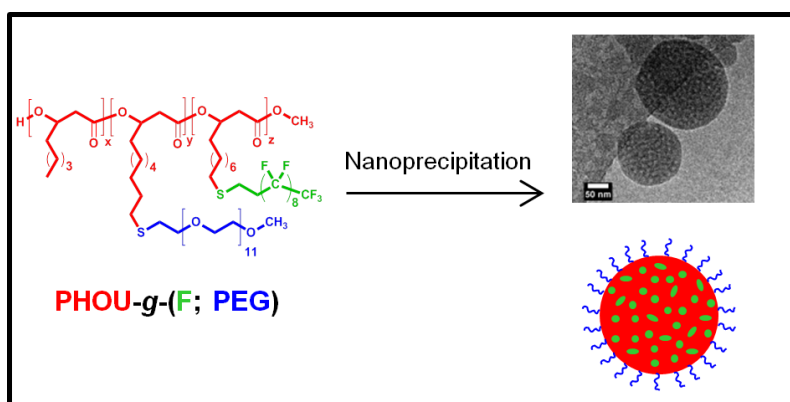
Macromolecular Rapid Communications, accepté, DOI : 10.1002/marc.201200692

JULIEN BABINOT^a, ESTELLE RENARD^a, BENJAMIN LE DROUMAGUET^a,
JEAN-MICHEL GUIGNER^b, SIMONA MURA^c, JULIEN NICOLAS^c, PATRICK COUVREUR^c
and VALÉRIE LANGLOIS^a

^aInstitut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE), Systèmes Polymères Complexes, UMR CNRS 7182, 2-8 rue Henri Dunant, 94320 Thiais, France

^bInstitut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés (IMPMC), 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

^cLaboratoire de Physico-Chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie, Univ Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France



6.1 Abstract

In this paper, a straightforward method to produce poly(3-hydroxyalkanoate)-based multicompartment micelles (MCMs) is presented. Thiol-ene addition is used to graft sequentially perfluorooctyl chains and poly(ethylene glycol) oligomers onto poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-hydroxyundecenoate) (PHOU) oligomers backbone. Well-defined copolymers are obtained as shown by ^1H NMR and size exclusion chromatography. After nanoprecipitation in water, novel PHA-based MCMs are evidenced by cryo-transmission electron microscopy. Moreover, the cytocompatibility of MCMs is demonstrated *in vitro* via cell viability assay.

6.2 Introduction

In the growing area of nanotechnology, multicompartment micelles (MCMs) have attracted increasing attention over the last decade.[1–5] The concept of multicompartment micelle, proposed by Ringsdorf in the late 1990's, stated that such system could mimic the complex organization of eukaryotic cells.[6, 7] From this consideration, the key aspect of MCMs is the ability to form discrete and structured nanodomains within the hydrophobic core of the micelles. To this end, the most straightforward pathway to design MCMs is unquestionably the direct aqueous self-assembly of amphiphilic copolymers, possessing one hydrophilic segment and two mutually incompatible hydrophobic segments. More precisely, most approaches have focused on the combination of hydrocarbon and fluorocarbon hydrophobic segments into polysoaps,[8–10] miktoarm,[11–16] linear ABC,[17–19] or dendritic[20] amphiphilic copolymers. The morphology of the as-obtained micelles is governed by many factors, including the chemical nature of the building blocks, their segment lengths and the molecular architecture of the copolymers. Beyond the fundamental interest in the understanding of how such structures self-assemble, MCMs could find applications in drug delivery, as distinct incompatible molecules could be loaded in a same carrier.[21, 22]

Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) are natural polyesters produced and accumulated by many bacteria as carbon and energy supply when an essential nutrient is limited.[23, 24] Depending on the length of their side chains, two types of PHAs are distinguished;

one with short chain length, or scl-PHAs, possessing alkyl side chains having up to two carbon atoms, and medium chain length PHAs, or mcl-PHAs, having at least three carbon atoms on their side chains. Thanks to their biocompatibility and their biodegradability, they appear as promising candidates for biomedical applications.[25–27] Particularly, chemically modified medium-chain-length PHAs (mcl-PHAs), have recently shown their abilities to form well-defined micelles,[28] polymersomes,[29] or plasmid DNA delivery system.[30]

Herein, we report on the design of PHA-based MCMs. We propose a simple and straightforward methodology starting from a functionalized mcl-PHA, poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-hydroxyundecenoate) (PHOU).[31] This PHA is a statistical copolymer bearing pendant hydrophobic pentyl chains and pendant oct-1-ene chains in a 69/31 molar ratio. Our strategy relies on a stepwise use of the well-known thiol-ene addition[32–36] in order to graft perfluorinated chains and hydrophilic poly(ethylene glycol) (PEG) chains on PHOU unsaturated side chains. All the synthesized copolymers were fully characterized using proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and size exclusion chromatography (SEC). Their self-assembly in water was studied using cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM), dynamic light scattering (DLS) and fluorescence spectroscopy. Finally, their cytocompatibility has been investigated.

6.3 Experimental Section

6.3.1 Materials

Acetone $\geq 99.5\%$, Anhydrous MeOH 99.8%, poly(ethylene glycol) methyl ether average $M_n \sim 550 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (MeO-PEG₅₅₀) potassium thioacetate 98%, and α,α' -Azoisobutyronitrile $\geq 98\%$ (AIBN) were purchased from Sigma Aldrich. *p*-toluenesulfonyl chloride 99+% (TsCl) and 4-dimethylaminopyridine 99% (DMAP) were purchased from Acros Organics. 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol (Foralkyl® EM8) was supplied from Elf-Atochem. Hydrochloric acid 37% and pyridine synthesis grade were obtained from Carlo Erba. CH_2Cl_2 was obtained from Carlo Erba and was distilled over CaH_2 before use. THF and toluene were obtained from Carlo Erba and were distilled over sodium/benzophenone before use. All other materials were used without further purification. PHOU was obtained from EMPA, Swiss Fed Labs Mat Testing & Res, Lab Biomat, CH-9014 St Gallen,

Switzerland, synthesized following a previously reported procedure.[31] Its molar composition was determined by ^1H NMR in CDCl_3 by comparing the integration of the ethylenic proton *g* to the main chain protons **b**, **b'** (Figure 6.1). PHOU_{31%} : 31% of 3-hydroxyundecenoate units and 69% of 3-hydroxyoctanoate units. It has to be noted that PHOU is mainly composed of 3-hydroxyoctanoate and 3-hydroxy-10-undecenoate units; however, it possess a wider chain length distribution (3-hydroxyhexanoate; 3-hydroxy-6-heptenoate; 3-hydroxy-8-nonenoate), as a consequence of biosynthesis. Its apparent molar mass was determined by SEC (THF, polystyrene standards) : \overline{M}_n (app) = 96000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, PDI = 1.8.

The experimental procedure for the synthesis of thiolated PEG is given in the Supporting information.

6.3.2 Synthesis of PHOU oligomers

PHOU_{31%} (300 mg) was dissolved in 12 mL of CH_2Cl_2 . 12 mL of anhydrous MeOH were introduced to the solution and 0.9 mL of H_2SO_4 was added. The solution was then stirred at 100°C (the vessel was hermetically closed) for 10 minutes to obtain the desired molar mass. After cooling in an ice bath, 8 mL of distilled water were added; after decantation, the organic layer was washed again with distilled water, dried over MgSO_4 and filtered. The solvent was evaporated and the resulting product was dried under vacuum at 40°C to afford 281 mg of PHOU oligomers (yield 93%). See Figure 6.1 for complete ^1H NMR attribution and Table 6.1 for molar mass determination.

6.3.3 Typical synthesis of PHOU-*g*-F

PHOU_{31%} oligomers (281 mg, 1.82 mmol, 0.565 mmol of double bonds), 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol (217 mg, 0.452 mmol) and AIBN (46 mg, 0.282 mmol) were dissolved in 6 mL of anhydrous toluene under argon, and the solution was heated at 80°C for 20h. Toluene was rotary evaporated and the polymer was dried under high vacuum for 24h. $m = 480$ mg (yield 98%). ^1H NMR was conducted to determine the amount of grafted 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol. On the 31% of available double bonds, 20% have been grafted with 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol, meaning that 11% are free for subsequent PEG grafting. The effect of 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol molar ratio on the grafting

conversion is shown in Table 6.2 (ESI). See Table 6.1 for molar mass determination.

6.3.4 Typical synthesis of PHOU-*g*-(F ; PEG)

PHOU-*g*-F (485 mg, 0.196 mmol of double bonds), PEG₅₅₀-SH (556 mg, 0.98 mmol) and AIBN (16 mg, 0.1 mmol) were dissolved in 10 mL of anhydrous toluene under argon, and the solution was heated at 80°C for 20h. Toluene was rotary evaporated and the crude was dissolved in 30 mL of acetone. The solution was poured in 30 mL of water, and the resulting colloidal suspension was then transferred into a dialysis tube (SpectraPor, molecular weight cut off, 6-8000 Da) and dialyzed against water for 3 days. Water was removed under reduced pressure and the resulting product dried under vacuum (434 mg, yield 78%). See Figure 6.1 for complete ¹H NMR attribution and Table 6.1 for molar mass determination.

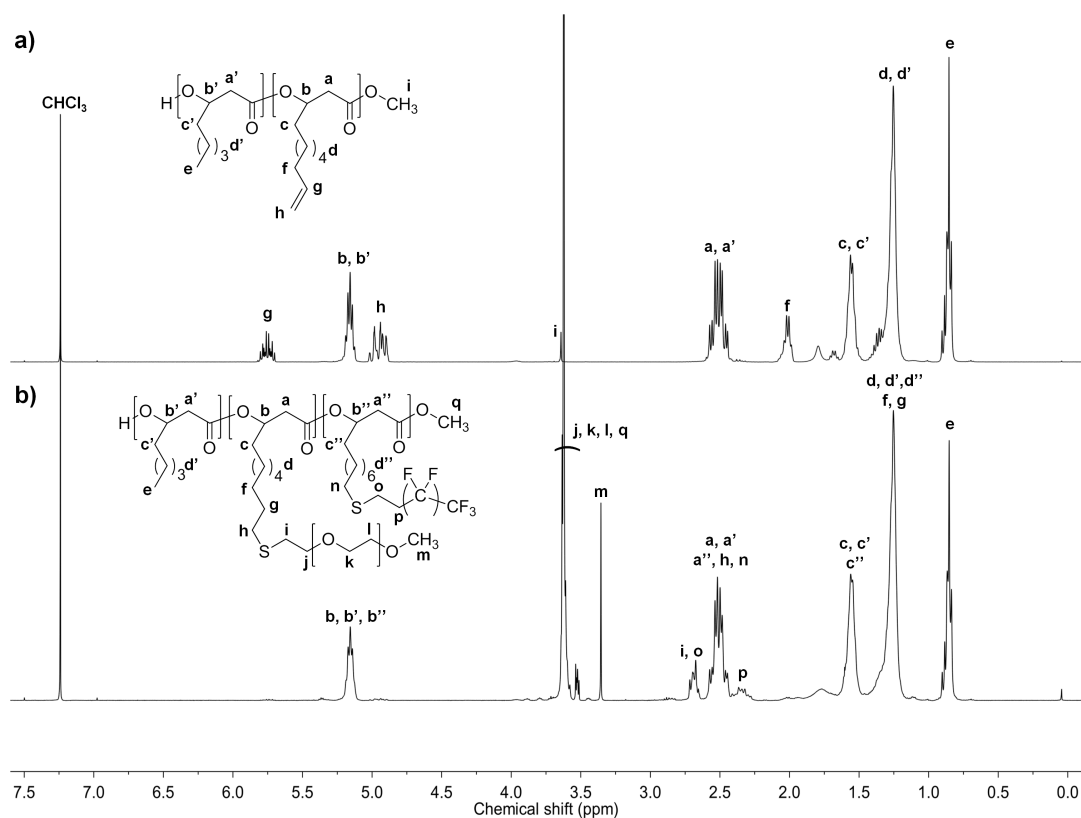


Figure 6.1: ¹H NMR spectra of PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.20} ; PEG_{0.11}) copolymer.

6.3.5 Sample Preparation

Self-assembled micelles were prepared using the nanoprecipitation method. 20 mg of the copolymer were dissolved in 2 mL of acetone and precipitated dropwise in 4 mL of water. Acetone was removed from the dispersion by extensive dialysis against water for 48h.

6.3.5.1 Dynamic Light Scattering (DLS)

Samples for DLS experiments were adjusted at the concentration of 1 g.L⁻¹ and passed through a 0.45 µm filter prior to measurement.

6.3.5.2 Critical Micelle Concentration (CMC)

Samples for CMC determination were prepared in a two-steps procedure : first, 10 µL of a stock solution of pyrene (1.4 ×10⁻⁴ M) in dichloromethane was deposited on the bottom of a flask and left to evaporate, and then 2 mL of the micellar solution with the appropriate concentration was added to the flask and shaken for two days before the measurements (the final concentration of pyrene in the sample was 7 ×10⁻⁷ M).

6.3.5.3 Cryo-Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM)

The morphology and size of the polymer MCMs were determined from cryo-TEM images. A drop of MCMs dispersion (0.1 wt% solid content) was deposited on "quantifoil"® (Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany) carbon membrane. The excess of liquid on the membrane was blotted out with a filter paper and, before evaporation, the membrane was quench-frozen in liquid ethane to form a thin vitreous ice film in which NPs were captive. Once mounted in a Gatan 626 cryo-holder cooled with liquid nitrogen, the samples were transferred in the microscope and observed at low temperature (-180 °C).

6.3.6 Cell culture

Embryonic murine fibroblast (NIH/3T3) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza, Belgium) supplemented with 50 U.mL⁻¹ penicillin, 50 U.mL⁻¹ streptomycin and 10 % fetal bovin serum (FBS, Lonza, Belgium). The J774.A1 murine

macrophage–monocyte cell line was cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Belgium) supplemented with 50 U.mL⁻¹ penicillin, 50 U.mL⁻¹ streptomycin and 10 % heat inactivated FBS. All cell lines were obtained from ATCC and were maintained at 37 °C and 5 % CO₂ in humidified atmosphere.

6.3.7 Cell viability assay

The *in vitro* cytotoxicity of micelles was evaluated on the three cells line by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] viability test. This assay depends on the cellular reductive capacity to metabolize the MTT to a highly colored formazan product. Cells were seeded in 100 µL of growth medium (4×10^4 cells.mL⁻¹) in 96-well microtiter plates (TPP, Switzerland) and pre-incubated for 24 h to recover. The cells were then exposed to a series of MCMs solutions of different concentrations (5–60 µg.mL⁻¹) for 48h (NIH/3T3) or 72 h (J774.A1). Initial cell density and incubation time have been chosen to allow cells to remain in exponential growth and to undergo two cell-doubling times throughout the assay. After the incubation period, 20 µL of a 5 mg.mL⁻¹ MTT (Sigma Aldrich, Germany) solution in phosphate buffered saline was added to each well. 2 h incubation later, the culture medium was gently aspirated and replaced by 200 µL dymethylsulfoxide (ACS grade, BioBasic Inc, France) in order to dissolve the formazan crystals. The absorbance of the solubilized dye, which correlates with the number of living cells, was measured spectrophotometrically with a microplate reader (LAB Systems Original Multiscan MS, Finland) at 570 nm. The percentage of viable cells in each well was calculated as the absorbance ratio between treated and untreated control cells. Each experiment was repeated 8 times from 3 independent incubation preparations.

6.3.8 Instrumentation

¹H NMR spectra were recorded in CDCl₃ using a Bruker 400 MHz NMR spectrometer. Size exclusion chromatography (SEC) experiments were performed in THF (1 mL.min⁻¹) at room temperature using a Shimadzu LC10 AD pump, and two PLgel Polymer Laboratories columns (5 µm Mixte-C). A Wyatt Technology Optilab Rex interferometric refractometer was used as detector. The molar masses were calibrated with polystyrene

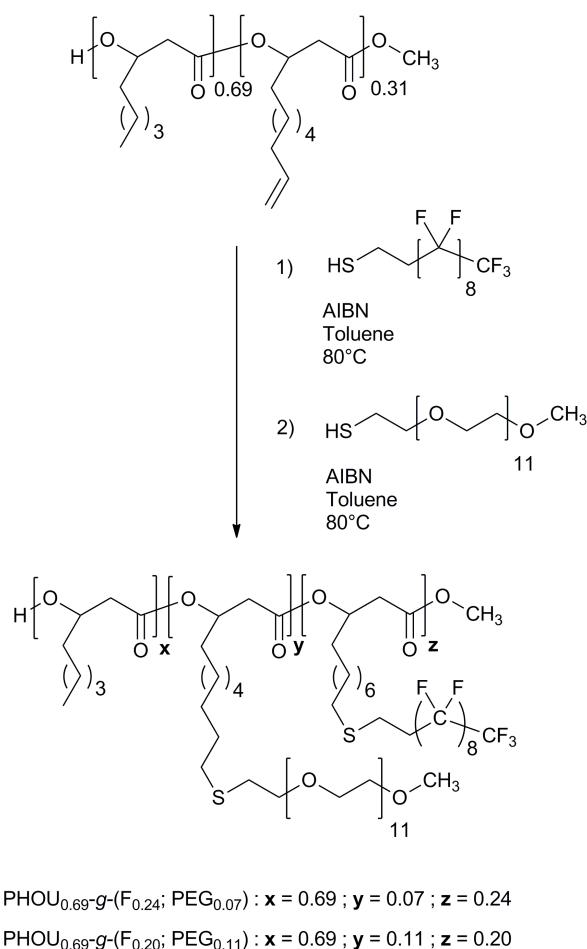
standards. DLS experiments were made using a Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS operating with a He-Ne laser source at the wavelength of 633 nm. All measurements were performed at 25°C and at an angle of 173°. The autocorrelation functions were analyzed using the cumulant method to obtain mean diameter and distribution. The pyrene fluorescence was recorded at 23 °C with a SLM Aminco 8100 by excitation at 335 nm with slits fixed at 16 and 0.5 nm, respectively, at the excitation and emission. Cryo-TEM images were recorded on ultrascan 2k ccd camera (Gatan, USA), using a LaB₆ JEOL 2100 (JEOL, Japan) cryo microscope operating at 200kV with a JEOL low dose system (Minimum Dose System, MDS) to protect the thin ice film from any irradiation before imaging and reduce the irradiation during the image capture .

6.4 Results and Discussion

The synthetic route to PHOU-*g*-(F ; PEG) is given in Figure 6.2. After the preparation of PHOU oligomers by acid-catalyzed methanolysis,[37] 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol was first grafted on PHOU. The molar ratio of 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol was adjusted so as to functionalize only a part of the available double bonds (Table 6.2, ESI). In a second step, thiol-appended poly(ethylene glycol) monomethyl ether oligomers were grafted on the remaining double bonds to afford PHOU-*g*-(F ; PEG). Two copolymers were synthesized, PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.24} ; PEG_{0.07}) and PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.20} ; PEG_{0.11}), where the numbers in subscript represent the copolymer composition. The success of the reaction was demonstrated by ¹H NMR that showed the disappearance of the ethylenic signals ($\delta = 4.92\text{-}5.01$ and $5.74\text{-}5.81$ ppm) along with the appearance of methylene protons in the α -position to the sulfur atoms ($\delta = 2.67\text{-}2.74$ ppm), methylene protons in the α -position to the CF₂ group ($\delta = 2.34\text{-}2.39$ ppm) and methylene protons of the oxyethylene repeating units ($\delta = 3.53\text{-}3.65$ ppm) (Figure 6.1).

Size exclusion chromatography (SEC) was also used to monitor the variation of the copolymer apparent molar mass after each step (Figure 6.5, ESI). It increased each time after the addition of 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol and thiolated PEG onto the PHOU backbone, attesting for the success of the grafting (Table 6.1).

MCMs were prepared by the nanoprecipitation technique.[38] Copolymers were dissolved in acetone, a common solvent for each block, and added dropwise to deionized (DI)


Figure 6.2: Synthesis of PHOU-*g*-(F;PEG) copolymers.

| | PHOU | | | PHOU- <i>g</i> -F | | PHOU- <i>g</i> -(F; PEG) | |
|---|--------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| | \overline{M}_n^a | \overline{M}_n^b | PDI ^b | \overline{M}_n^b | PDI ^b | \overline{M}_n^b | PDI ^b |
| PHOU _{0.69-g-F_{0.24}; PEG_{0.07}}) | 7500 | n.d. ^c | n.d. | 12000 | 1.8 | 15200 | 2.1 |
| PHOU _{0.69-g-F_{0.20}; PEG_{0.11}}) | 8100 | 7300 | 2 | 10800 | 1.9 | 12000 | 2.0 |

^a Determined by ¹H NMR. ^b Determined by SEC in THF (polystyrene standards). ^c Not determined.

TABLE 6.1: Molecular characteristics of modified poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-hydroxyundecenoates)s (PHOUs).

water under moderate stirring, inducing the self-assembly process. The organic solvent was removed by extensive dialysis against DI water and the as-prepared micelles were observed by cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) (Figure 6.3).

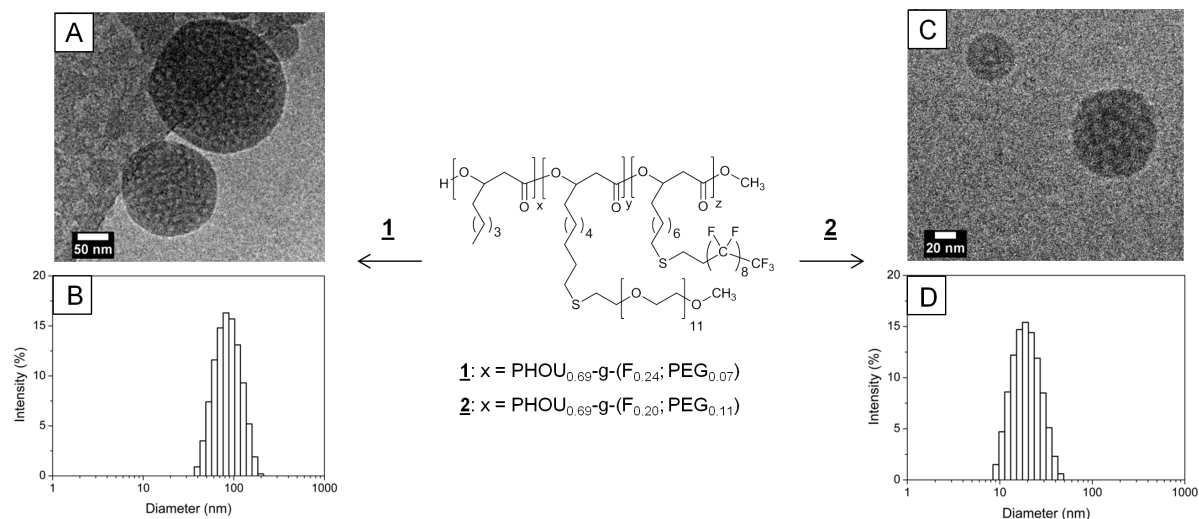


Figure 6.3: Cryo-TEM picture along with DLS particle size distribution for $PHOU_{0.69}\text{-}g\text{-}(F_{0.24}; PEG_{0.07})$ (A,B) and for $PHOU_{0.69}\text{-}g\text{-}(F_{0.20}; PEG_{0.11})$ (C,D).

It can be seen that both copolymers, $PHOU_{0.69}\text{-}g\text{-}(F_{0.24}; PEG_{0.07})$ (A) and $PHOU_{0.69}\text{-}g\text{-}(F_{0.20}; PEG_{0.11})$ (C), clearly self-assembled into spherical polymeric micelles, with a core displaying light gray regions as well as darker domains. These can be attributed to fluorinated domains, as electron-rich fluorine atoms are known to give strong signal in cryo-TEM[12] (larger pictures are given in Figures 6.6 and 6.7, ESI). The self-assembly of the micelles might be driven by the hydrophobic interactions between pentyl chains of PHOU, while fluorinated chains would form discrete subdomains due to the strong incompatibility between hydrocarbon and fluorocarbon chains. These appear both as small patches of 4.5 ± 1.4 nm as well as more continuous regions in an orange peel-like micellar core. The distribution of fluorinated domains in the micellar core appears rather homogeneous and might be explained by the statistical nature of PHOU copolymer. Indeed, fluorinated chains are randomly distributed along the PHOU backbone, approximately every 4-5 monomer unit, thus providing uniform distribution of fluorinated domains. Changing the relative fraction of PEG and fluorine from 7% and 24% to 11% and 20%, respectively, results in an apparent decrease of the size of the micelles, without changing

the overall morphology. In the literature, triphasic polysoaps with similar architecture have given some indications for local micro-phase separation into hydro- and fluorocarbon nano-domains but no definite proofs.[4, 9, 10] In these examples, the alkyl and fluoroalkyl chains are directly grafted to the backbone, while in PHOU copolymers the fluorocarbon chains are added to the end of the hydrocarbon side chains. Consequently, the local segregation of the hydro- and fluorocarbon chains could be facilitated. While cryo-TEM allows the direct visualization of individual micelles, dynamic light scattering (DLS) was used to enable the measurement of average hydrodynamic radius as well as particle size distribution (PSD) of obtained MCMs. The results show that uniform structures are obtained for both copolymers. PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.24}; PEG_{0.07}) MCMs exhibit an average diameter of 79 nm with a PSD of 0.10, whereas PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.20}; PEG_{0.11}) MCMs yield an average diameter of 18 nm and a PSD of 0.11. The stability of the MCMs upon dilution, *i.e.* their critical micelle concentration (CMC), has been investigated by means of fluorescence spectroscopy using pyrene as fluorescent probe.[39] Monitoring the band ratio I₁/I₃ at different concentrations, the CMC was determined as the flexion point of the sigmoidal curve (Figure 6.8). Very low CMCs of 0.49 and 0.85 mg.L⁻¹ were determined for PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.20}; PEG_{0.11}) and PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.24}; PEG_{0.07}), respectively. This result demonstrates the potential of PHA-based MCMs as drug delivery carriers where high dilution is reached.

Finally, in order to assess the biocompatibility of PHOU-*g*-(F; PEG) MCMs, any cytotoxicity was investigated on the basis of viability assays on two different cell lines : mouse fibroblast cells (NIH/3T3) and murine macrophage cells (J774.A1) (Figure 6.4).

No significant toxicity was obtained in NIH/3T3 cells and viability values of 84.5 ± 3.5 % and 77.5 ± 4.8% were measured after exposure at the highest concentration of PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.24}; PEG_{0.07}) and PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.20}; PEG_{0.11}) micelles, respectively. Similar results were obtained when J774.A1 cells were incubated with PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.20}; PEG_{0.11}) micelles. Exposure to PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.24}; PEG_{0.07}) micelles led to significant cytotoxicity and the IC₅₀ value was reached at 60 µg.mL⁻¹. This result might be ascribed to the strong ability of macrophages to uptake extracellular materials,[40] whose intracellular accumulation might cause alteration of cell metabolism and cell death. The lowest cytotoxicity was observed with smaller micelles. Although they are internalised with a greater extent compared to larger ones,[41] their uptake led to a lowest intracellular content of copolymer, which is dependent on particle radius.[42] Moreover, small

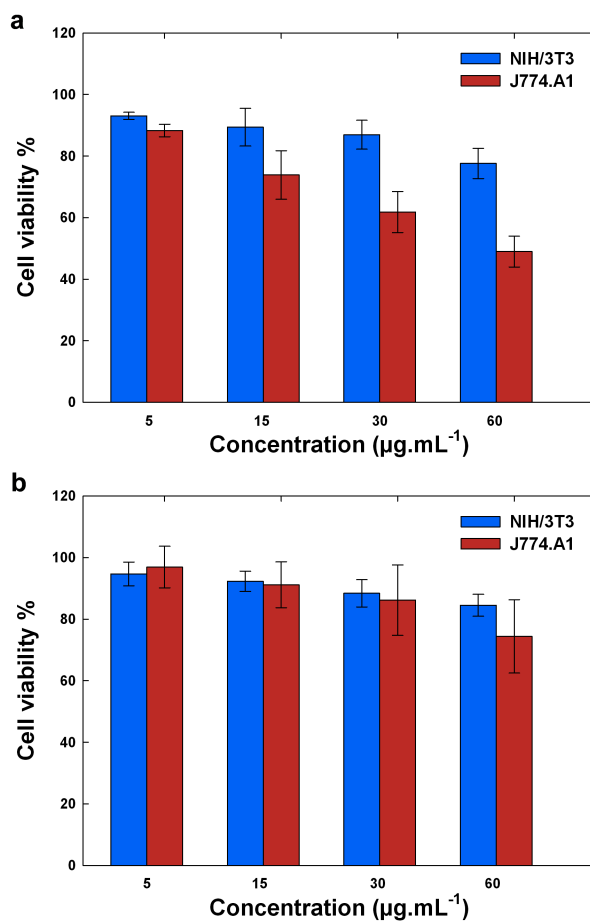


Figure 6.4: Cell viability (MTT assay) after incubation of NIH/3T3 and J774.A1 cells with PHOU_{0.69-g-(F_{0.24}; PEG_{0.07}) (a) and for PHOU_{0.69-g-(F_{0.20}; PEG_{0.11}) (b) as a function of the MCMs concentration.}}

micelles are probably internalized via a different pathway and thus might have a different intracellular fate. Noteworthy, cell viabilities are comparable to those obtained with poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles that have demonstrated great potential in the field of drug delivery.[43]

6.4.1 Conclusion

In summary, a versatile and straightforward method using thiol-ene addition for the preparation of well-defined PHOU-*g*-(F ; PEG) copolymers has been presented. This methodology, based on a « click » type reaction, allowed to precisely tune the number of PEG or fluorinated chains grafted onto the backbone of PHA oligomers. The as-obtained copolymers were proved to self-assemble into MCMs upon nanoprecipitation in aqueous media. Moreover, their *in vitro* cytocompatibility has been demonstrated, making them potential promising systems for advanced drug delivery applications.

6.5 Electronic supplementary information

6.5.1 Synthesis of PEG-SH

Thiolated PEG was synthesized using a modified procedure.[44]

6.5.1.1 Tosylation of PEG₅₅₀

MeO-PEG₅₅₀ (30 g, 54.5 mmol) and DMAP (333 mg, 2.7 mmol) were dissolved in 160 mL of CH₂Cl₂/ Pyridine (1 :1) solution at 0°C under argon atmosphere. p-toluenesulfonyl chloride (18.7 g, 98.1 mmol) dissolved in 50 mL of CH₂Cl₂ was added dropwise and the solution was stirred overnight (from 0°C to RT). 200 mL of cold water were added and the aqueous phase was extracted three times with 150 mL of CH₂Cl₂. The combined organic phases were successively washed with 3x 250 mL HCl 1M solution and 3x 250 mL of saturated NaCl solution. After drying over MgSO₄, the organic phase was concentrated under reduced pressure and the resulting product (PEG₅₅₀-OTs) dried under vacuum (m = 36.4 g, yield 95%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 4.12 (m, 2H), 3.49-3.66 (m, 41H), 3.34 (s, 3H), 2.41 (s, 3H).

6.5.1.2 Synthesis of PEG₅₅₀-thioacetate

PEG₅₅₀-OTs (36 g, 51 mmol) was dissolved in 200 mL of THF under Ar. Potassium thioacetate (11.66 g, 102 mmol) was added and the solution was refluxed for 20h. A white fluffy precipitate formed. The solution was cooled to room temperature and 400 mL of water were added. The flask contents were extracted with 3x 150 mL CH₂Cl₂ and the brown colored organic extract was washed with 3x 200 mL of water, treated with activated charcoal, filtered and rotary evaporated to afford 23.3 g (38.3 mmol) of light yellow oil (yield 75%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.49-3.62 (m, 43H), 3.34 (s, 3H), 3.05 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H).

6.5.1.3 Synthesis of PEG₅₅₀-SH

PEG₅₅₀-thioacetate (23 g, 37.7 mmol) was dissolved in 200 mL of anhydrous MeOH under argon. 15 mL of HCl 37% were added and the solution was refluxed for 2h. 200 mL of water were added and the solution was extracted with 3x 150 mL CH₂Cl₂. The combined organic phases were washed with 3x 200 mL of water, 3x 250 mL of saturated NaCl solution, dried over MgSO₄ and filtered. The resulting solution was rotary evaporated to give 17.52 g (30.9 mmol) of colorless oil, thiolated PEG (yield 82%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.50-3.63 (m, 43H), 3.34 (s, 3H), 2.66 (dt, *J* = 8.2, 6.4 Hz, 2H), 1.56 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H).

| PHOU functionalization ^a | 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol ^b | |
|-------------------------------------|---|-------------|
| | 0.8 eq. 20% | 1eq. 24% |

^a Amount of reacted double bonds (initial amount : 31%) determined by ¹H NMR; ^b Molar ratio of 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol relative to double bonds of PHOU.

TABLE 6.2: Effect of 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol molar ratio on PHOU functionalization.

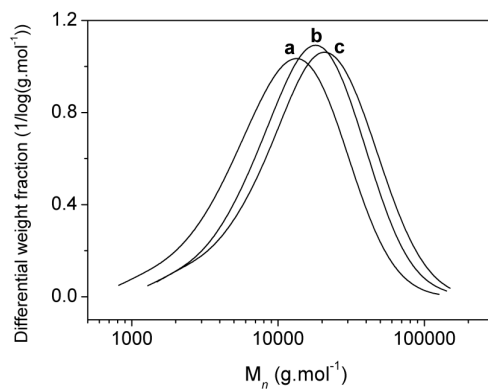


Figure 6.5: Evolution of the molar mass of PHOU oligomer (a) after the grafting of 2-perfluorooctyl-1-ethanethiol (b) and thiolated poly(ethylene glycol) (c) for $\text{PHOU}_{0.69-g-(\text{F}_{0.20}; \text{PEG}_{0.11})}$ copolymer.

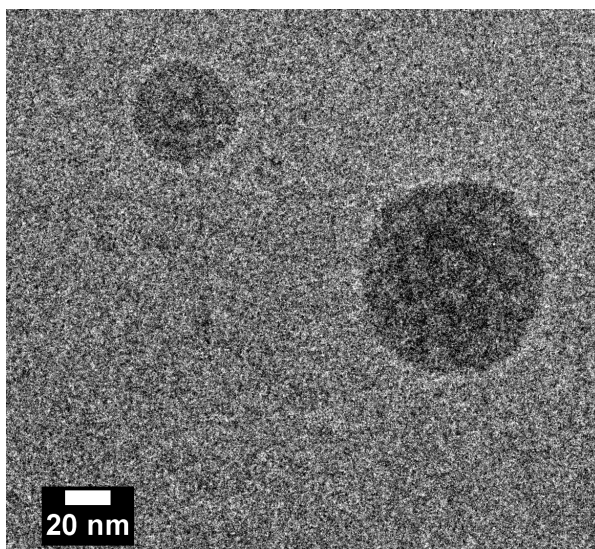


Figure 6.6: Cryo-TEM picture of $\text{PHOU}_{0.69-g-(\text{F}_{0.20}; \text{PEG}_{0.11})}$.

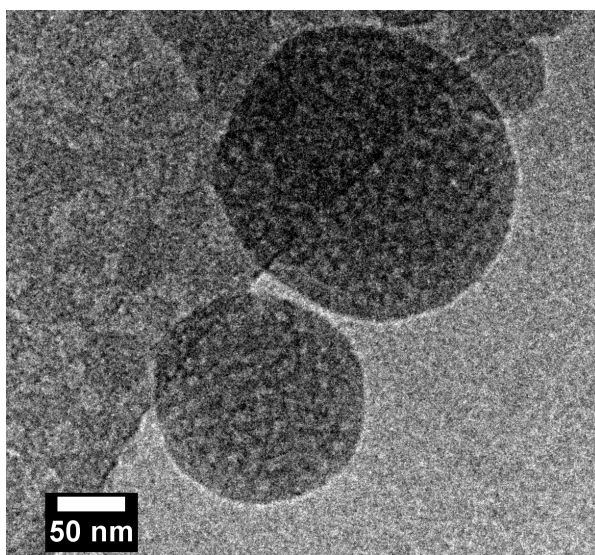


Figure 6.7: Cryo-TEM picture of PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.24}; PEG_{0.07}).

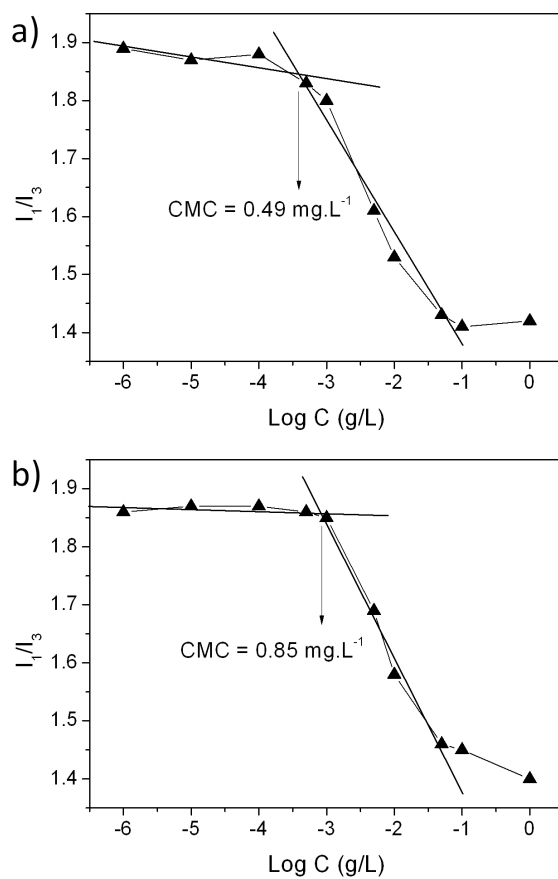


Figure 6.8: Determination of the CMC of PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.20}; 0.11) (a) and PHOU_{0.69}-*g*-(F_{0.24}; 0.07) (b) by plotting the intensity ratio I_1/I_3 of pyrene probe at different concentrations.

References

1. LASCHEWSKY, A. Polymerized micelles with compartments. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **8**, 274–281 (2003).
2. LUTZ, J.-F. & LASCHEWSKY, A. Multicompartment Micelles : Has the Long-Standing Dream Become a Reality ? *Macromolecular Chemistry and Physics* **206**, 813–817 (2005).
3. MOUGHTON, A. O., HILLMYER, M. A. & LODGE, T. P. Multicompartment Block Polymer Micelles. *Macromolecules* **45**, 2–19 (2012).
4. LASCHEWSKY, A., MARSAT, J.-N., SKRABANIA, K., von BERLEPSCH, H. & BÖTTCHER, C. Bioinspired Block Copolymers : Translating Structural Features from Proteins to Synthetic Polymers. *Macromolecular Chemistry and Physics* **211**, 215–221 (2010).
5. AMADO, E. & KRESSLER, J. Triphilic block copolymers with perfluorocarbon moieties in aqueous systems and their biochemical perspectives. *Soft Matter* **7**, 7144–7149 (2011).
6. RINGSDORF, H, LEHMANN, P & WEBERSKIRCH, R. Multicompartmentation - A concept for the molecular architecture of life. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **217**, U657–U657 (1999).
7. De GENNES, P.-G. Géométrie de micelles à deux compartiments hydrophobes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIB - Mechanics-Physics-Astronomy* **327**, 535–538 (1999).
8. HASHIDZUME, A., MATSUDA, K., SATO, T. & MORISHIMA, Y. NMR and fluorescence studies of the self-association behavior of an amphiphilic polyanion bearing hydrocarbon and fluorocarbon hydrophobes. *Polymer* **52**, 1546–1553 (2011).

9. KOTZEV, A., LASCHEWSKY, A. & RAKOTOALY, R. H. Polymerizable Surfactants and Micellar Polymers Bearing Fluorocarbon Hydrophobic Chains Based on Styrene. *Macromolecular Chemistry and Physics* **202**, 3257–3267 (2001).
10. KOTZEV, A, LASCHEWSKY, A, ADRIAENSENS, P & GELAN, J. Micellar Polymers with Hydrocarbon and Fluorocarbon Hydrophobic Chains. A Strategy to Multicompartment Micelles. *Macromolecules* **35**, 1091–1101 (2002).
11. SAITO, N., LIU, C., LODGE, T. P. & HILLMYER, M. A. Multicompartment Micelle Morphology Evolution in Degradable Miktoarm Star Terpolymers. *ACS Nano* **4**, 1907–1912 (2010).
12. LI, Z. B., KESSELMAN, E, TALMON, Y, HILLMYER, M. A. & LODGE, T. P. Multicompartment micelles from ABC miktoarm stars in water. *Science* **306**, 98–101 (2004).
13. LI, Z., HILLMYER, M. A. & LODGE, T. P. Laterally Nanostructured Vesicles, Polygonal Bilayer Sheets, and Segmented Wormlike Micelles. *Nano Letters* **6**, 1245–1249 (2006).
14. LI, Z., HILLMYER, M. A. & LODGE, T. P. Morphologies of Multicompartment Micelles Formed by ABC Miktoarm Star Terpolymers. *Langmuir* **22**, 9409–9417 (2006).
15. LIU, C., HILLMYER, M. A. & LODGE, T. P. Evolution of Multicompartment Micelles to Mixed Corona Micelles Using Solvent Mixtures. *Langmuir* **24**, 12001–12009 (2008).
16. LIU, C., HILLMYER, M. A. & LODGE, T. P. Multicompartment Micelles from pH-Responsive Miktoarm Star Block Terpolymers. *Langmuir* **25**, 13718–13725 (2009).
17. KUBOWICZ, S. *et al.* Multicompartment Micelles Formed by Self-Assembly of Linear ABC Triblock Copolymers in Aqueous Medium. *Angewandte Chemie, International Edition* **44**, 5262–5265 (2005).

18. BERLEPSCH, H. v., BÖTTCHER, C., SKRABANIA, K. & LASCHEWSKY, A. Complex domain architecture of multicompartment micelles from a linear ABC triblock copolymer revealed by cryogenic electron tomography. *Chemical Communications*, 2290–2292 (2009).
19. SKRABANIA, K., von BERLEPSCH, H., BÖTTCHER, C. & LASCHEWSKY, A. Synthesis of Ternary, Hydrophilic-Lipophilic-Fluorophilic Block Copolymers by Consecutive RAFT Polymerizations and Their Self-Assembly into Multicompartment Micelles. *Macromolecules* **43**, 271–281 (2010).
20. MAO, J., NI, P., MAI, Y. & YAN, D. Multicompartment Micelles from Hyperbranched Star-Block Copolymers Containing Polycations and Fluoropolymer Segment. *Langmuir* **23**, 5127–5134 (2007).
21. LODGE, T. P., RASDAL, A., LI, Z. & HILLMYER, M. A. Simultaneous, Segregated Storage of Two Agents in a Multicompartment Micelle. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 17608–17609 (2005).
22. MARSAT, J.-N. *et al.* Self-Assembly into Multicompartment Micelles and Selective Solubilization by Hydrophilic-Lipophilic-Fluorophilic Block Copolymers. *Macromolecules* **44**, 2092–2105 (2011).
23. MULLER, H. M. & SEEBACH, D. Poly(hydroxyalkanoates) : a fifth class of physiologically important organic biopolymers. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **32**, 477–502 (1993).
24. STEINBÜCHEL, A. & VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* **128**, 219–228 (1995).
25. CHEN, Z. F., CHENG, S. T. & XU, K. T. Block poly(ester-urethane)s based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate). *Biomaterials* **30**, 2219–2230 (2009).
26. CHEN, G. Q. & WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **26**, 6565–6578 (2005).
27. RAI, R., KESHAVARZ, T., ROETHER, J. A., BOCCACCINI, A. R. & ROY, I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science & Engineering R-Reports* **72**, 29–47 (2011).

28. BABINOT, J., GUIGNER, J.-M., RENARD, E. & LANGLOIS, V. A micellization study of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoate)-based amphiphilic diblock copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science* **375**, 88–93 (2012).
29. BABINOT, J., GUIGNER, J.-M., RENARD, E. & LANGLOIS, V. Poly(3-hydroxyalkanoate)-derived amphiphilic graft copolymers for the design of polymersomes. *Chemical Communications* **48**, 5364–5366 (2012).
30. SPARKS, J & SCHOLZ, C. Evaluation of a Cationic Poly(beta-hydroxyalkanoate) as a Plasmid DNA Delivery System. *Biomacromolecules* **10**, 1715–1719 (2009).
31. HANY, R *et al.* Chemical synthesis of crystalline comb polymers from olefinic medium-chain-length poly [3-hydroxyalkanoates]. *Macromolecules* **37**, 385–389 (2004).
32. HOYLE, C. E. & BOWMAN, C. N. Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie, International Edition* **49**, 1540–1573 (2010).
33. LOWE, A. B. Thiol-ene "click" reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry* **1**, 17–36 (2010).
34. SUN, J. & SCHLAAD, H. Thiol-Ene Clickable Polypeptides. *Macromolecules* **43**, 4445–4448 (2010).
35. SCHLAAD, H. *et al.* Poly(2-oxazoline)s as Smart Bioinspired Polymers. *Macromolecular Rapid Communications* **31**, 511–525 (2010).
36. YUE, J. *et al.* Modular Functionalization of Amphiphilic Block Copolymers via Radical-Mediated Thiol-Ene Reaction. *Macromolecules* **43**, 9645–9654 (2010).
37. TIMBART, L, RENARD, E, TESSIER, M & LANGLOIS, V. Monohydroxylated poly(3-hydroxyoctanoate) oligomers and its functionalized derivatives used as macroinitiators in the synthesis of degradable diblock copolyesters. *Biomacromolecules* **8**, 1255–1265 (2007).
38. FESSI, H, PUISIEUX, F, DEVISSAGUET, J. P., AMMOURY, N & BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* **55**, R1–R4 (1989).

-
39. ANTHONY, O & ZANA, R. Fluorescence Investigation of the Binding of Pyrene to Hydrophobic Microdomains in Aqueous Solutions of Polysoaps. *Macromolecules* **27**, 3885–3891 (1994).
 40. SWANSON, J, YIRINEC, B, BURKE, E, BUSHNELL, A & SILVERSTEIN, S. C. Effect of alterations in the size of the vacuolar compartment on pinocytosis in J774.2 macrophages. *Journal of Cellular Physiology* **128**, 195–201 (1986).
 41. HILLAIREAU, H & COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell : relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 2873–2896 (2009).
 42. FUJIKAWA, S. M., CHEN, I. A. & SZOSTAK, J. W. Shrink-wrap vesicles. *Langmuir* **21**, 12124–12129 (2005).
 43. VAUTHIER, C, DUBERNET, C, FATTAL, E, PINTO-ALPHANDARY, H & COUVREUR, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 519–548 (2003).
 44. LEE, D., DONKERS, R. L., DESIMONE, J. M. & MURRAY, R. W. Voltammetry and Electron-Transfer Dynamics in a Molecular Melt of a 1.2 nm Metal Quantum Dot. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 1182–1183 (2003).

Conclusion générale

ALORS que l'industrialisation des PHAs ne connaissait pas l'essor espéré depuis les premières productions dans les années 70, l'expansion des biotechnologies dans les années 2000 a permis un second départ. Un nombre croissant d'industries se sont lancées dans leur fabrication, à l'image des sociétés Metabolix, Biomer ou Danimer scientific llc, cette dernière assurant une production de plus de 13000 tonnes de PHA-scl en 2012, et visant une production de 100000 tonnes à l'horizon 2016¹. L'utilisation de nouvelles bactéries sauvages ou de bactéries recombinantes annonce une amélioration des rendements et des coûts de production, rendant donc l'exploitation de ces polymères économiquement viable. En outre, l'emploi de substrats tels que la mélasse de betterave² ou l'utilisation des eaux usées³ pour la croissance des bactéries offre de formidables perspectives ; en effet, outre la préparation de ces bioplastiques entièrement biodégradables, cela permettrait également d'apporter une solution au retraitement de certains déchets inutiles ou polluants issus de l'activité humaine. Cependant, les coûts de production actuels restent toujours plus élevés que ceux des plastiques issus de la pétrochimie, et leur utilisation concerne en priorité des applications à haute valeur ajoutée telles que les applications biomédicales. Leurs propriétés de biodégradabilité et de biocompatibilité leur confère un réel potentiel dans ce domaine, spécialement pour l'élaboration de vecteurs de principes actifs. Les PHA-scl ont à ce titre été largement étudiés, mais certaines de leurs propriétés physiques telle que leur grande cristallinité limitent leur utilisation.

L'essentiel de notre travail est fondé sur l'étude de PHA-mcl, qui offrent des particularités intéressantes comparativement aux PHA-scl telles qu'une faible cristallinité, une

1. <http://www.plasticsnews.com/headlines2.html?id=25654>

2. <http://www.dw.de/dw/article/0,,15438369,00.html>

3. <http://bioplastic-innovation.com/2011/07/29/micromidas-is-using-carefully-constructed-populations-of-bacteria-to-convert-organic-waste-into-bio-degradable-plastics/#more-3767>

température de fusion plus faible et surtout par le fait qu'il est possible de façonner des polymères sur mesure, en jouant sur le couple bactérie-substrat. En effet, les PHA-mcl insaturés (PHOU) possèdent des doubles liaisons sur leurs chaînes latérales, ce qui permet ensuite aux chimistes de réaliser de nombreuses réactions chimiques permettant l'élaboration de copolymères greffés originaux. Tirant parti de cette diversité chimique, nous nous sommes intéressés à la synthèse de copolymères amphiphiles de différentes architectures (copolymères à blocs, copolymères greffés) et à l'étude de leurs propriétés d'auto-association en milieu aqueux.

Dans un premier temps, la chimie « click », et plus particulièrement la cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre I (CuAAC), a été utilisée pour synthétiser des copolymères amphiphiles greffés à base de PHA-mcl et de PEG. En effet, les méthodes existantes telles que l'estérification directe entre les oligomères n'offraient que de faibles taux de conversion ou limitaient le greffage à des oligomères de faibles masses molaires ($< 2000 \text{ g.mol}^{-1}$). Dans notre étude, des chaînes de PEG de 5000 g.mol^{-1} ont été greffées avec succès sur des oligomères de PHA-mcl « clickables », c'est-à-dire porteurs de triples liaisons, permettant ainsi d'établir une méthodologie simple et efficace pour la synthèse de copolymères amphiphiles à partir d'oligomères préformés de masses molaires relativement élevées. Il est cependant à noter que l'étape d'estérification par l'alcool propargylique ne dépasse pas 71% de conversion, et constitue donc l'étape limitante de cette stratégie.

La CuAAC a par la suite été utilisée pour synthétiser une gamme de copolymères diblocs amphiphiles possédant un segment hydrophobe de PHA de 3800 à 15000 g.mol^{-1} et un PEG de 5000 g.mol^{-1} comme partenaire hydrophile. Des copolymères amphiphiles diblocs bien définis comportant une fraction massique de PHA comprise entre 19 et 62% ont ainsi été synthétisés. Comparativement aux méthodes précédemment utilisées telles que l'estérification ou la transestérification, cette étude a montré l'efficacité de la CuAAC pour la synthèse de copolymères diblocs quels que soient la nature et/ou la masse des oligomères de PHAs utilisés, garantissant l'obtention de rendements relativement élevés et de produits bien définis. Enfin, des oligomères de PEG de 550 g.mol^{-1} ont été greffés sur du PHOU afin d'obtenir des PHAs greffés possédant un ratio hydrophobe/hydrophile permettant la formation de nano-objets. Pour simplifier et optimiser la préparation de ces PHAs greffés, nous avons utilisé l'addition thiol-ène, particulièrement bien adaptée au greffage d'oligomères de masses molaires relativement faibles, et permettant d'utiliser le

PHOU sans autre modification chimique. Les résultats ont en effet démontré un greffage quantitatif, permettant l'obtention de copolymères parfaitement définis.

L'auto-association en milieu aqueux d'une série de copolymères diblocs possédant une fraction massique de 19 à 62% de PHA-mcl a été étudiée. Des structures micellaires monodisperses de 44 à 90 nm ont été mises en évidence par cryo-TEM, la taille des micelles augmentant avec la fraction massique de PHA. Des concentrations micellaires critiques extrêmement basses (0,85 à 5,5 mg.L⁻¹) ont été mesurées, reflétant une grande stabilité à la dilution ; il est à noter que ces valeurs sont significativement plus faibles que celles de copolymères amphiphiles à base de PHA-scl (13 à 1100 mg.L⁻¹). L'auto-association en milieu aqueux des copolymères greffés a également été examinée. Contrairement aux copolymères diblocs, nous avons mis en évidence que les copolymères greffés possédant une fraction massique de PHA de 66 % s'auto-associaient en structures vésiculaires, ou polymersomes, d'environ 65 nm de diamètre ; ils possèdent par ailleurs une concentration d'agrégation critique extrêmement basse de 0,4 mg.L⁻¹. Grâce à leur membrane hydrophobe et leur cavité aqueuse, ces structures sont très prometteuses pour l'élaboration de nouveaux vecteurs permettant d'encapsuler des principes actifs hydrophobes et hydrophiles.

Finalement, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de micelles multicompartimentées, c'est-à-dire possédant un coeur présentant une séparation de phase entre deux domaines hydrophobes incompatibles. Nous avons pour cela synthétisé un copolymère de PHOU greffé par addition thiol-ène séquentielle de 2-perfluorooctyl-1-éthanethiol, hydrophobe et lipophile, puis de PEG. Après auto-assemblage en milieu aqueux, les analyses physico-chimiques ont révélé la formation de micelles multicompartimentées de 18 à 79 nm de diamètre. De plus, des tests de viabilité cellulaire sur des fibroblastes de souris ont démontré leur faible cytotoxicité, les rendant particulièrement intéressantes pour des applications biomédicales avancées. En effet, ces micelles multicompartimentées pourraient permettre l'encapsulation de principes actifs incompatibles ; mais elles pourraient également être utilisées comme agents « théranostic » (association d'un test diagnostique et d'une thérapie) grâce à la visibilité du fluor en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Ce travail de thèse a permis d'élaborer de nouvelles structures à base de PHAs mais soulève également quelques interrogations. Il est tout d'abord nécessaire de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'auto-association de ces copolymères en milieu

aqueux. Pour cela, il serait intéressant de synthétiser des structures intermédiaires, par exemple en faisant varier le taux de greffage et la longueur des greffons PEG dans le cas des copolymères greffés, afin d'observer les morphologies obtenues après auto-association. Par ailleurs, des études physico-chimiques plus poussées par diffusion de neutrons aux petits angles ou par diffusion de rayons X aux petits angles permettraient de caractériser plus finement la structure des nano-objets. Enfin, des études d'encapsulation et la libération de principes actifs sont à réaliser pour évaluer le réel potentiel de ces systèmes comme agents de vectorisation.

Résumé

Les poly(3-hydroxyalcanoate)s (PHAs) sont des polyesters aliphatiques produits et accumulés par des bactéries en tant que réserve de carbone et d'énergie. Ils sont constitués d'unités β -hydroxyesters et possèdent des chaînes latérales de longueur variable, pouvant être fonctionnalisées. Ils possèdent des propriétés de biodégradabilité et de biocompatibilité; ceci leur confère de vastes possibilités d'utilisation dans le domaine biomédical, notamment pour la mise au point de systèmes de libération contrôlée de principes actifs. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la synthèse de copolymères amphiphiles de différentes architectures à base de PHAs, ainsi qu'à l'étude de leur propriétés d'auto-association en milieu aqueux. Une méthode simple et efficace permettant le greffage d'oligomères de poly(éthylène glycol) (PEG) a tout d'abord été mise au point grâce à l'utilisation de la chimie « click ». Une série de copolymères diblocs bien définis PHA-*b*-PEG a ainsi pu être synthétisée par cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre (CuAAC). Les copolymères diblocs à base de PHAs à moyennes chaînes latérales (PHA-*mcl*) ont montré leur capacité à s'auto-associer en milieu aqueux et à former des micelles monodisperses présentant une concentration micellaire critique très faible. Par la suite, des copolymères greffés PHOU-*g*-PEG ont été synthétisés par addition thiol-ène. Les analyses par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-MET) ont montré que les copolymères s'auto-associaient dans ce cas en structures vésiculaires, ou polymersomes. Enfin, la synthèse de copolymères amphiphiles greffés porteurs de chaînes perfluorées PHOU-*g*-(F;PEG) a permis l'obtention de structures auto-associées plus complexes. La cryo-MET a en effet révélé la formation de micelles multicompartimentées, c'est à dire possédant un coeur présentant une séparation de phase entre les domaines hydrophobes et les domaines fluorés. Des tests biologiques préliminaires ont montré la cytocompatibilité de ces micelles.

Mots clés : Poly(3-hydroxyalcanoate)s, copolymères amphiphiles, copolymères à blocs, copolymères greffés, chimie « click », micelles, polymersomes, micelles multicompartimentées.

Abstract

Poly(3-hydroxyalkanoate)s are natural aliphatic polyesters produced and accumulated by many bacteria as carbon and energy supply. They consist of β -hydroxy ester units, with pendant side chains of different lengths that can be functionalized. Thanks to their biodegradability and biocompatibility, they are promising candidates for biomedical applications, especially for controlled drug delivery systems. In this context, we aimed to synthesize PHA-based amphiphilic copolymers with different molecular architectures, and to study their self-assembly in aqueous medium. First, a simple and straightforward method using click chemistry has been used to graft poly(ethylene glycol) (PEG) oligomers onto PHA backbone. A series of well-defined diblock copolymers PHA-*b*-PEG has thus been synthesized using copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC). Medium chain length PHA-based diblock copolymers have shown their ability to self-assemble into stable micelles having very low critical micelle concentrations. Afterwards, amphiphilic graft copolymers PHOU-*g*-PEG have been synthesized using thiol-ene addition. In this case, cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) analysis revealed that graft copolymers self-assembled into vesicular morphologies, i.e. polymersomes. Finally, the synthesis of amphiphilic graft copolymers bearing perfluorinated chains PHOU-*g*-(F;PEG) was achieved. After aqueous self-assembly, cryo-TEM showed the formation of multicompartment micelles, i.e. with a core displaying segregated hydrophobic and fluorophilic domains. Moreover, these multicompartment micelles have shown their cytocompatibility.

Keywords: Poly(3-hydroxyalkanoate)s, amphiphilic copolymers, block copolymers, graft copolymers, click chemistry, micelles, polymersomes, multicompartment micelles.