

Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

**Discipline ou spécialité :**

CHIMIE MACROMOLECULAIRE ET SUPRAMOLECULAIRE

---

**Présentée et soutenue par :**

Renée MAYAP TALOM

**le :** vendredi 7 octobre 2011

**Titre :**

Copolymères à base d'ADN: Synthèse - Auto-assemblage - Applications

---

**Ecole doctorale :**

Sciences de la Matière (SDM)

**Unité de recherche :**

Laboratoire des IMRCP

**Directeur(s) de Thèse :**

Dr Fabienne GAUFFRE

**Rapporteurs :**

Pr Sébastien LECOMMANDOUX, LCPO, Bordeaux

Dr Nadia BENKIRANE-JESSEL, Inserm, Strasbourg

**Membre(s) du jury :**

Pr Sébastien LECOMMANDOUX, LCPO, Bordeaux

Dr Nadia BENKIRANE-JESSEL, Inserm, Strasbourg

Pr Christophe CHASSENIEUX, PCI, Lemans

Pr Peter FALLER, LCC, Toulouse

Dr Fabienne GAUFFRE, IMRCP, Toulouse



# Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement de trois années de recherche menées au Laboratoire des Interactions Moléculaires et de Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP). Je tiens tout d'abord à remercier Madame Monique Mauzac, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Je remercie également les membres du Jury : les Pr. Sébastien Lecommandoux, Christophe Chassenieux et Peter Fallner ainsi que les Dr. Nadia Benkirane-Jessel et Fabienne Gauffre d'avoir accepté de juger ce travail.

Si je n'avais le temps de remercier qu'une unique personne, ce serait elle, ma directrice de thèse, Fabienne Gauffre. C'est sans abus que je peux dire qu'elle est mon Mentor. Il n'est jamais trop tard ni impossible de travailler sur soi, surtout quand il est des maîtres exceptionnels. Je la remercie pour m'avoir confié ces travaux, pour sa disponibilité, pour ses précieux conseils, pour son soutien, pour ses encouragements, pour m'avoir complètement immergée et embarquée dans cette belle aventure que fût le projet «DNATool», pour cette formidable rencontre tant professionnelle que personnelle. Ce qui selon moi la caractérise et m'a beaucoup aidée : sa disponibilité, son tact, son humanité, sa gentillesse et sa sincérité. Alors que j'étais issue d'un milieu plutôt de biologiste, elle m'a aidée à m'immerger dans le monde de la physico-chimie et plus encore de la physico-chimie des polymères tout en gardant un côté « bio » tourné vers les applications. Ce qui m'a permis d'évoluer en partenariat fort et en collaborations enrichissantes. Fabienne, c'est ici que ma gratitude infinie prend son sens, j'ai eu un immense plaisir à œuvrer à tes côtés, ce fut pour moi un enrichissement exceptionnel tant d'un point de vue humain que scientifique. Fabienne, tu m'as toujours impressionnée par tes connaissances scientifiques et le fait de vouloir toujours donner le maximum de toi dans tout ce que tu faisais. Tu m'as montré que l'on pouvait totalement assumer le rôle de « Chercheur passionné » et de « Super maman ». Tu es pour moi un exemple et je t'adresse ma profonde et sincère reconnaissance.

Je voudrais également dire un grand merci à Christophe, Nancy, Jean Daniel, les autres permanents de l'équipe. Christophe, je te remercie pour tes remarques scientifiques. Tu as été pour beaucoup dans ce projet de thèse : les différentes réunions d'équipe m'ont beaucoup aidée à m'approprier le sujet et à mieux le comprendre bien que quelques fois il était difficile d'expliquer certains phénomènes. Je te remercie également d'avoir bien voulu partager ton bureau avec moi, je sais que je n'étais pas l'étudiante la plus « extravertie », mais j'ai eu du plaisir à partager le bureau avec toi. Et aussi, merci de m'avoir appris tant bien que mal les échecs avec E2E4...Merci. Nancy, je te remercie pour ton aide au niveau du laboratoire (avec les différentes purifications du SDS et bien d'autres...), merci pour ta disponibilité. Jean Daniel, merci pour ton humour et aussi pour ta bonne humeur. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés.

Je tiens également à remercier Gad Fuks. Oh Gad, si tu n'avais pas été là, je ne sais pas si je serai devenue une « as » de la liaison phosphoramidite et de la liaison

peptidique. Je tiens à te remercier, pour ta patience, pour ta disponibilité et pour tous les échanges scientifiques que nous avons eu à partager.

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont contribué à ce travail, notamment Julian Oberdisse du LCVN, pour les manips de Neutrons, merci pour ton acharnement, Cédric Gaillard de l'INRA de Nantes pour les clichés de microscopie, Christelle Cerclier de l'ITAV pour les manips de Qsense et d'AFM, merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité, Patricia Vicendo, pour les idées «cotés bio» et manips de radiomarquage que nous avons débuté, ce fut un plaisir de travailler à tes cotés, Jacques Leng du LOF, Léo Kaps, étudiant en master qui a contribué à la synthèse de nombreux diblocs, je te remercie pour tout et j'espère que tu trouveras enfin cette thèse en Australie et pour finir à Stéphane Gineste, merci pour les purifications, pour nos rigolades dans le laboratoire et nos discussions, j'espère que je ne t'ai pas complètement dégoutée de la biologie avec les quantités de l'ordre du nanomolaire à l'issue de 5-6 synthèses., cela a été un plaisir de travailler avec toi ; on dira «à demain, de bonne heure et de bonne humeur».

Je tiens également à remercier les autres membres du laboratoire qui m'ont aidé dans mes recherches, pour leur disponibilité ainsi que pour leur grande gentillesse. J'ai une grande pensée pour Valérie Sartor, merci pour nos discussions sur les PAGES, j'associe également Joris à ces remerciements. Joris, je me remémore le temps que nous passions devant mes pages à les contempler et à comprendre ce qui n'allait pas, pourquoi les migrations étaient «bizarres». Je tiens à vous remercier Valérie et toi, de m'avoir soutenue dans ces moments de grandes incompréhensions, merci pour vos suggestions afin d'améliorer certains procédés et aussi merci pour les produits que je vous «piquais». J'espère que Joris, ta rédaction se déroule bien. Y'a pas de raison, tu es quelqu'un de formidable, t'inquiètes pas, ça se passera très bien, je n'ai aucun doute. Je tiens également à remercier Anne-Françoise pour les échanges que nous avons eus sur les caractérisations des polymères (SEC), les procédés de micellisation. Je ne peux oublier Charles-Louis, merci pour ta disponibilité. Je sais que les appareils et moi faisaient «deux», je tiens à te remercier pour ta patience et rassure toi, ce sont les appareils qui ne m'aimaient pas, faut croire que je ne savais pas leur parler.

Je voudrais également dire un grand merci à tout le personnel du labo, pour leur aide quotidienne dans l'avancement de ces travaux, merci à Yann, Nadia, Arielle, Sandrine, Fabienne, Florence, merci pour tout. Merci à tous les permanents...

Ces trois années de thèse m'ont également permis de tisser de forts liens : Sheilita, je te remercie pour tous les moments que nous avons partagés (de stress, de remise en question, de discussions tant professionnelles que personnelles, de soirée chez toi m'efforçant de sortir de mon cocoon), j'ai été très contente de te rencontrer et saches que je t'apprécie beaucoup et j'espère de tout cœur que l'on continuera de rester en contact. Saliba, que dire, j'ai appris les plus gros mots maltais en ta présence (aléba ma donna, osdia, ...), ce fut un réel plaisir de te côtoyer. Je vous remercie (sheilita et toi) d'avoir organisé mon pot de thèse, merci pour tout (préparation de la soutenance, présentation, soirées...), thanks a lot. Et j'espère de tout cœur que sheilita et toi, trouverez le boulot de vos rêves dans la même ville et je vous souhaite pleins de bonnes

choses sur le plan personnel, I miss you guys...Sandra, j'ai également beaucoup partagé avec toi, je tiens à te dire merci pour toutes les remarques sur les powerpoint, les mises en forme, nos discussions sur l'avenir et autres, les soirées et aussi mon petit passage à Lugano. J'espère que le boulot se passe bien de ton côté. Merci également à Marie-anne (allez, c'est la dernière ligne droite, c'est presque fini !!!), à Stéphane Lemonier (courage pour toutes les manip que tu as à réaliser et merci pour ta bonne humeur), Virginie (j'espère que ça va déjà mieux avec ta main, du courage pour la suite et merci de m'avoir incitée à m'initier au piano), Anass (merci pour nos discussions non scientifiques et pour les petits gâteaux ramenés du Maroc, courage dans la rédaction), la liste est longue (julie, waël, pauline, lacra, jérôme, alexandra...), merci à tous !!

Je souhaite également remercier toute ma famille, merci de m'avoir toujours soutenue dans tout ce que je faisais et merci de toujours répondre présent pour moi. Je tiens également à dire merci à mes ami(e)s inconditionnel(le)s (cédric, christine, sophie) et les autres (jean marc, tierry, carole, didier...) pour leur soutien durant ces trois années. Enfin, je voudrai remercier, Marius, celui qui me soutient et continue de me soutenir, qui est resté présent malgré les tempêtes traversées. WAML...



"Ce n'est pas la force, mais la persévérance, qui fait les grandes œuvres"

[Samuel Johnson]



## Liste des abréviations

**A** : Adénine

**a<sub>0</sub>** : interface

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ADN<sub>S</sub>** : Acide DésoxyriboNucléique sens

**ADN<sub>As</sub>** : Acide DésoxyriboNucléique antisens

**ADN<sub>AsSb</sub>** : Acide DésoxyriboNucléique antisens simple brin

**AFM** : Microscopie à force atomique

**AML** : affinity Macro Ligand

**AMS**: Acide méthane sulfonique

**ANS**: 1-Anilino-8-naphtalène sulfonate

**ATRP**: Atom transfert radical polymerization

**AuNps**: Nanoparticules d'or

**BPS**: Bande plasmonique de surface

**C** : Cytosine

**CAC** : Concentration d'agrégation critique

**CES** : Chromatographie d'exclusion stérique

**CMC** : Concentration micellaire critique

**CPG** : Controlled porosity glass

**CRP** : Controlled radical polymerization

**Cryo-MET** : Microscopie électronique à transmission cryogénique

**DCC** : Dicyclohexylcarbodiimide

**DCCU** : Dicyclohexylurée

**DCM** : Dichlorométhane

**DDL** : Diffusion dynamique de la lumière

**DGBE** : Diéthylèneglycolbis[3-aminopropyl]ether

**DIPEA** : N,N-Diisopropyéthylamine

**DMF** : Diméthylformamide

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DMT-MM** : 4-(4,6-diméthoxy-1,3,3-triazine-2-yl)-4-méthylemorpholinium

**DNPA** : Diffusion des neutrons aux petits angles

**E<sub>a</sub>** : Energie d'activation

**EDC** : Ethyl-3[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride

**f**: fraction volumique relative de bloc

**G** : Guanine

**HPA**: Acide 3-hydroxypicolinique

**I<sub>p</sub>**: Indice de polydispersité

**I(q)** : Intensité diffusée

**K<sub>B</sub>**: Constante de Boltzman

**l<sub>B</sub>**: Longueur de Bjerrum

**l<sub>c</sub>**: Longueur maximale de chaîne

**l<sub>p</sub>** : Longueur de persistance

**LCST**: Lower Critical Solution Temperature

**MET** : Microscopie électronique à transmission

**M<sub>n</sub>** : Masse molaire moyenne en nombre

**N** : degré de polymérisation

**N<sub>ag</sub>** : Nombre d'agrégation

**N<sub>B</sub>** : Nombre d'unités constitutives du bloc hydrophobe (B)

**NHS** : N-hydroxysuccinimide

**ODN** : Oligonucléotide

**ODN<sub>sb</sub>** : Oligonucléotide simple brin

**P** : paramètre d'empilement

**PAA** : Poly(acide acrylique)

**PAGE** : Gel électrophorèse de polyacrylamide

**PALG** : Poly(acide L-glutamique)

- PANa** : Poly(acrylate) de sodium
- PBu** : Poly(butadiène)
- PBLG** : poly ( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)
- PCI** : Poly( $\epsilon$ -caprolactone)
- PDMS** : Poly(diméthyle de siloxane)
- PEO** : Poly(oxyde d'éthylène)
- PEO-*b*-PCI** : Poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(caprolactone)
- PIC**: Complexe de polyions
- PIP**: Poly(isoprène)
- PLGA** : Poly(D,L-acide lactique-co-glycolique)
- PLL** : Poly(L-lysine)
- PMMA** : Poly(méthacrylate de méthyle)
- PMaNa** : Poly(méthacrylate de sodium)
- PPA** : Poly(phénylalanine)
- PPO** : Poly(oxyde de propylène)
- P(q)** : Facteur de forme
- PS** : Poly(styrène)
- PTHF** : Poly(tétrahydrofurane)
- PZLL** : Poly( $\epsilon$ -benzyloxycarbonyl L-lysine)
- q**: Vecteur de diffusion
- QCM** : Microbalance à cristal de quartz
- RAFT** : Reversible addition-fragmentation chain transfert
- R<sub>g</sub>** : Rayon de giration
- R<sub>c</sub>** : Rayon du cœur
- R<sub>h</sub>** : Rayon hydrodynamique
- RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire
- SDS** : Dodécylsulfate de sodium
- S(q)** : Facteur de structure

**T** : Thymine

**TBTA**: Tris[1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4yl)methyl]amine

**T<sub>g</sub>** : Température de transition vitreuse

**T<sub>m</sub>** : Température de fusion

**THF** : Tétrahydrofurane

**μ**: Potentiel chimique

**χ**: paramètre de Flory-Huggins

**Φ**: Fraction volumique des objets

**Δρ** : Contraste

**γ<sub>B/solvant</sub>** : Tension de surface entre le bloc hydrophobe (B) et le solvant

# SOMMAIRE

---



<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>I. Généralités sur les copolymères à blocs .....</b>	<b>9</b>
<b>I.1. Auto-assemblage de copolymères à blocs.....</b>	<b>10</b>
<b>I.1.1. Auto-assemblage de copolymères à blocs en masse.....</b>	<b>10</b>
<b>I.1.2. Auto-assemblage de copolymères à blocs en solution .....</b>	<b>12</b>
<b>I.1.2.1. Les copolymères à blocs amphiphiles .....</b>	<b>12</b>
<b>I.1.2.2. Facteurs influençant la morphologie des agrégats micellaires.....</b>	<b>16</b>
<b>II. La molécule d'ADN : une biomolécule particulière .....</b>	<b>20</b>
<b>II.1. Généralités sur la molécule d'ADN.....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.1. Structures de l'ADN .....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.2. Dénaturation de l'ADN .....</b>	<b>24</b>
<b>II.2. La molécule d'ADN en solution.....</b>	<b>25</b>
<b>II.3. Applications de l'ADN en thérapeutique : la thérapie génique.....</b>	<b>26</b>
<b>II.3.1. Principales barrières au transfert du gène.....</b>	<b>26</b>
<b>II.3.2. Les vecteurs .....</b>	<b>26</b>
<b>II.4. L'ADN comme matériau .....</b>	<b>27</b>
<b>III. Les copolymères hybrides à base de biomolécules .....</b>	<b>29</b>
<b>III.1. les peptides .....</b>	<b>30</b>
<b>III.1.1. Copolymères hybrides avec des peptides .....</b>	<b>31</b>
<b>III.1.1.1. Cas des peptides hydrophiles.....</b>	<b>31</b>
<b>III.1.1.2. Cas des peptides hydrophobes.....</b>	<b>31</b>

III.1.1.3. Cas des copolypeptides à blocs .....	32
III.1.1.4. Copolymères à blocs contenant des peptides ou protéines naturelles.....	33
III.1.1.5. Copolymères à blocs à base de polysaccharides et de polypeptides.....	33
III.1.2. Vers la formation d'agrégats intelligents .....	34
III.2. l'ADN.....	35
III.3. APPLICATIONS DE COPOLYMERES A BLOCS BIOHYBRIDES .....	37
III.3.1. Vecteurs de principes actifs ou d'ADN.....	37
III.3.1.1. Cas des copolymères à base de peptides .....	37
III.3.1.2. Cas des copolymères à base d'ADN .....	39
III.3.2. Purification de biomatériaux.....	40
III.3.3 "Chimie dirigée" .....	41
CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA THESE.....	43
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	44
CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES COPOLYMERES .....	49
INTRODUCTION.....	53
I. Rappels bibliographiques .....	53
I.1. La synthèse divergente .....	53
I.2. La synthèse convergente .....	53
I.3. Avantages et inconvénients des deux voies de synthèse .....	55
II. Notre stratégie .....	56

II.1. Choix de la voie de synthèse.....	56
II.2. Les polymères utilisés .....	57
II.3. Choix des couplages .....	59
III. Méthodologie générale .....	61
III.1. Couplages .....	61
III.1.1. Liaison peptidique .....	61
III.1.2. Synthèse par formation d'un intermédiaire phosphoramidite : liaison phosphoramidite .....	61
III.2. Purification .....	61
IV. Les synthèses effectuées .....	62
IV.1. Couplage peptidique.....	62
IV.1.1. Synthèse des conjugués PCI-ODN.....	62
IV.1.2. Synthèse des conjugués PMMA-ODN .....	64
IV.2. Couplage phosphoramidite.....	66
IV.3. Chimie «Click ».....	68
CONCLUSION.....	69
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	70
CHAPITRE III : CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE L'AUTO-ASSEMBLAGE .....	73
INTRODUCTION.....	77
I. Mise en solution et formation d'agrégats .....	77
II. Caractérisation des morphologies obtenues .....	77

<b>II.1. Techniques expérimentales .....</b>	<b>78</b>
<b>II.1.1. Microscopie Electronique à Transmission (MET).....</b>	<b>78</b>
<b>II.1.2. Cryo-Microscopie Electronique à Transmission (Cryo-MET).....</b>	<b>78</b>
<b>II.1.3. Microscopie à Force Atomique (AFM) .....</b>	<b>79</b>
<b>II.1.4. Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL) .....</b>	<b>81</b>
<b>II.1.5. Diffusion des Neutrons aux Petits Angles (DNPA) .....</b>	<b>82</b>
<b>II.2. Résultats.....</b>	<b>85</b>
<b>II.2.1. Les diblocs .....</b>	<b>85</b>
<b>II.2.1.1. PMMA-ODN.....</b>	<b>85</b>
<b>II.2.1.2. PDMS-ODN .....</b>	<b>89</b>
<b>II.2.1.3. PIP-ODN .....</b>	<b>90</b>
<b>II.2.1.4. PCI-ODN .....</b>	<b>91</b>
<b>II.2.2. Le tribloc.....</b>	<b>92</b>
<b>II.2.2.1. PEO-<i>b</i>-PCI-ODN .....</b>	<b>92</b>
<b>III. Etude de la transition unimères ↔ agrégats.....</b>	<b>100</b>
<b>III.1. Cas des copolymères à base d'oligonucléotides : PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> et PCI3700-ODN<sub>22</sub> .....</b>	<b>101</b>
<b>III.1.1. Mesures de tension de surface : méthode de la lame de Wilhelmy et méthode de la goutte sessile .....</b>	<b>101</b>
<b>III.1.1.1. Lame de Wilhelmy.....</b>	<b>101</b>
<b>III.1.1.2. Goutte sessile .....</b>	<b>102</b>
<b>III.1.1.3. Les autres copolymères à base d'oligonucléotides à blocs.....</b>	<b>104</b>
<b>III.2. Influence de la longueur du bloc hydrophile .....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>106</b>

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>107</b>
<b>CHAPITRE IV : APPLICATIONS</b> .....	<b>109</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>112</b>
<b>I. Encapsulation d'une sonde fluorescente dans les nanoparticules de PEO2000-<i>b</i>-PCI-ODN<sub>22</sub></b> .....	<b>112</b>
<b>II. Contrôle de l'immobilisation sur surface des nanoparticules de PEO2000-<i>b</i>-PCI-ODN<sub>22</sub>S</b> .....	<b>114</b>
<b>II.1. Principe de la QCM</b> .....	<b>115</b>
<b>II.2. Stratégie de l'immobilisation de la nanoparticule de polymères sur une surface d'or</b> .....	<b>116</b>
<b>III. Décoration des nanoparticules de PMMA-ODN<sub>22</sub> par des nanoparticules d'or ...</b> .....	<b>119</b>
<b>III.1. Choix des particules</b> .....	<b>119</b>
<b>III.2. Stochiométrie</b> .....	<b>119</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>122</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>123</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>125</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>131</b>
<b>I. Caractéristiques chimiques des réactifs et solvants</b> .....	<b>133</b>
<b>II. Instrumentation</b> .....	<b>136</b>
<b>III. Synthèse des bioconjugués d'ADN</b> .....	<b>138</b>

<b>III.1. Synthèse par voie phosphoramidite.....</b>	<b>138</b>
<b>III.2. Synthèse par voie peptidique.....</b>	<b>141</b>
<b>IV. Purification des bioconjugués d'ADN .....</b>	<b>144</b>
<b>V. Caractérisation des objets .....</b>	<b>147</b>
<b>V.1. Préparation des objets .....</b>	<b>147</b>
<b>V.2. Mesures de tension de surface.....</b>	<b>147</b>
<b>V.3. Fluorescence .....</b>	<b>147</b>
<b>VI. Adsorption de nanoparticules de polymères sur une surface.....</b>	<b>148</b>
<b>VII. Synthèse des particules AuNps et caractérisation des systèmes AuNps/PMMA-ODN.....</b>	<b>148</b>
<b>VII.1. Synthèse des nanoparticules d'or .....</b>	<b>148</b>
<b>VII.2. Caractérisation des systèmes AuNps/PMMA-ODN .....</b>	<b>149</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>151</b>

INTRODUCTION GENERALE

# INTRODUCTION GENERALE

---



Les polymères synthétiques ont révolutionné notre vie de tous les jours depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle. Ils peuvent être rendus solubles dans l'eau ou dans les solvants organiques et certains sont capables de répondre à un stimuli externe (pH, température ou concentration saline). Les polymères les plus avancés tels que les polymères conducteurs sont impliqués dans des dispositifs de haute technologie pour des applications en électronique ou en sciences biomédicales.

Les copolymères à blocs ont été utilisés pour l'étude du processus d'auto-assemblage de certaines protéines naturelles. Dans une autre tentative pour imiter la biologie, les copolymères à blocs ont également été utilisés pour former des micelles et des vésicules («polymersomes») qui, comme les cellules et les organelles peuvent compartimenter les unités fonctionnelles, tout en réunissant les deux parties antagonistes de la vie (composés hydrophiles et hydrophobes).

Les copolymères à blocs biohybrides sont une nouvelle classe de polymères résultant de l'association de polymères synthétiques et de biomacromolécules telles que les polypeptides, les polynucléotides ou les polysaccharides. La combinaison de polymères synthétiques aux biomolécules naturelles fournit des matériaux fonctionnels avancés avec un haut niveau de contrôle des structures et une activité biologique spécifique. Les copolymères à blocs hybrides avec des oligonucléotides ont été très peu étudiés. Les applications de ces derniers semblent très prometteuses compte tenu de la propriété de reconnaissance unique de la molécule d'ADN, les rendant ainsi hautement modulables et permettant un contrôle facile de fonctionnalisation à la surface.

Le premier chapitre de ce manuscrit, consacré à une mise au point bibliographique sur l'auto-assemblage des copolymères à blocs en solution, décrira plus particulièrement celui des copolymères à blocs à base de peptides et d'ADN en solution aqueuse et les différentes applications.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit portera sur les différentes stratégies de synthèse mise en œuvre pour coupler soit des blocs polymères hydrophobes ou des diblocs aux oligonucléotides.

Le troisième chapitre portera sur l'étude et la caractérisation des structures auto-assemblées en solution aqueuse des copolymères à blocs à base d'oligonucléotides synthétisés.

Enfin, dans le dernier chapitre, les systèmes biohybrides seront utilisés pour des potentielles applications comme nanovecteur et la propriété de reconnaissance des oligonucléotides sera mise à profit notamment pour modifier une surface ou encore décorer ces systèmes biohybrides de nanoparticules d'or.



# CHAPITRE I: BIBLIOGRAPHIE

---



# Sommaire

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>I. Généralités sur les copolymères à blocs .....</b>	<b>9</b>
<b>I.1. Auto-assemblage de copolymères à blocs .....</b>	<b>10</b>
<b>I.1.1. Auto-assemblage de copolymères à blocs en masse.....</b>	<b>10</b>
<b>I.1.2. Auto-assemblage de copolymères à blocs en solution .....</b>	<b>12</b>
<b>I.1.2.1. Les copolymères à blocs amphiphiles .....</b>	<b>12</b>
<b>I.1.2.2. Facteurs influençant la morphologie des agrégats micellaires .....</b>	<b>16</b>
<b>II. LA MOLECULE D'ADN: UNE BIOMOLECULE PARTICULIERE .....</b>	<b>20</b>
<b>II.1. Généralités sur la molécule d'ADN .....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.1. Structures de l'ADN .....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.2. Dénaturation de l'ADN .....</b>	<b>24</b>
<b>II.2. La molécule d'ADN en solution.....</b>	<b>25</b>
<b>II.3. Applications de l'ADN en thérapeutique : la thérapie génique.....</b>	<b>26</b>
<b>II.3.1. Principales barrières au transfert du gène .....</b>	<b>26</b>
<b>II.3.2. Les vecteurs .....</b>	<b>26</b>
<b>II.4. L'ADN comme matériau .....</b>	<b>27</b>
<b>III. LES COPOLYMERES HYBRIDES A BASE DE BIOMOLECULES .....</b>	<b>29</b>
<b>III.1. les peptides .....</b>	<b>30</b>
<b>III.1.1. Copolymères hybrides avec des peptides .....</b>	<b>31</b>
<b>III.1.1.1. Cas des peptides hydrophiles.....</b>	<b>31</b>
<b>III.1.1.2. Cas des peptides hydrophobes.....</b>	<b>31</b>

---

<b>III.1.1.3. Cas des copolypeptides à blocs .....</b>	<b>32</b>
<b>III.1.1.4. Copolymères à blocs contenant des peptides ou protéines naturelles.....</b>	<b>33</b>
<b>III.1.1.5. Copolymères à blocs à base de polysaccharides et de polypeptides.....</b>	<b>33</b>
<b>III.1.2. Vers la formation d'agrégats intelligents .....</b>	<b>34</b>
<b>III.2. l'ADN.....</b>	<b>35</b>
<b>III.3. APPLICATIONS DE COPOLYMERES A BLOCS BIOHYBRIDES .....</b>	<b>37</b>
<b>III.3.1. Vecteurs de principes actifs ou d'ADN.....</b>	<b>37</b>
<b>III.3.1.1. Cas des copolymères à base de peptides .....</b>	<b>37</b>
<b>III.3.1.2. Cas des copolymères à base d'ADN .....</b>	<b>39</b>
<b>III.3.2. Purification de biomatériaux.....</b>	<b>40</b>
<b>III.3.3 "Chimie dirigée" .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>43</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>44</b>

## **Introduction**

Ce premier chapitre donne les prérequis nécessaires à la compréhension de cette thèse. Notre objectif est d'étudier le comportement en solution aqueuse de copolymères à blocs amphiphiles contenant un brin d'ADN. Au cours de cette partie bibliographique, nous allons introduire les notions fondamentales concernant l'auto-assemblage des copolymères à blocs en masse et en solution. Nous avons mis l'accent sur l'auto-assemblage en solution car il a un lien fort avec le sujet. Ensuite, nous nous intéresserons à la molécule d'ADN, son utilisation comme outil thérapeutique mais aussi comme matériau. Puis nous terminerons par un sous-chapitre consacré à l'étude bibliographique de l'auto-assemblage des copolymères à blocs hybrides possédant au moins une biomolécule (ADN, peptide et polysaccharide) comme bloc.

## **I. Généralités sur les copolymères à blocs**

Les copolymères à blocs sont une classe particulière de polymères, composés au minimum de deux chaînes à base d'unités monomères de natures chimiques différentes, reliées entre elles par une liaison covalente. En fonction du nombre de blocs, on peut distinguer des diblocs, triblocs, tétrablocs... (Figure I.1a). Selon le mode d'arrangement entre les différents blocs, on peut également avoir une variété architecturale de copolymères à blocs parmi lesquelles nous pouvons citer l'architecture linéaire, alternée greffée ou bien en étoile (figure I.1b). Ces architectures sont généralement bien définies grâce aux procédés de synthèse mis en œuvre. Depuis les années 1960, année de la toute première synthèse de copolymère à blocs par voie anionique,<sup>1,2</sup> ce type de matériau suscite un grand intérêt dans la communauté scientifique et continue à se développer du point de vue commercial car leur marché ne cesse d'augmenter. Les raisons de cet engouement proviennent des propriétés d'auto-assemblage des copolymères à blocs.<sup>3</sup>

D'une manière générale, lorsque les blocs constituant le copolymère sont immiscibles, ces copolymères sont capables de se micro-ségréguer et s'auto-structurer du fait des interactions répulsives entre les différents blocs du copolymère. La présence de la liaison covalente entre les deux blocs, empêche que ceux-ci se séparent sur une échelle macroscopique, ils sont donc contraints de s'organiser en taille de domaines plus réduits en minimisant la surface de contact entre les différents blocs. Ce phénomène est appelé microséparation de phase et s'explique par le fait que le gain enthalpique dû à la minimisation de la surface de ces interfaces est en compétition avec le coût entropique de la localisation et de l'étirement de ces blocs à cette interface. L'équilibre entre ces deux contributions conduit à une variété de morphologies selon l'architecture des copolymères à blocs, la nature des blocs, la taille des blocs et aussi du degré d'incompatibilité entre les deux blocs.

L'auto-assemblage de copolymères à blocs est utilisé dans divers applications: délivrance de médicaments,<sup>4</sup> lithographie,<sup>5</sup> nanofabrication<sup>6</sup> et bien d'autres.

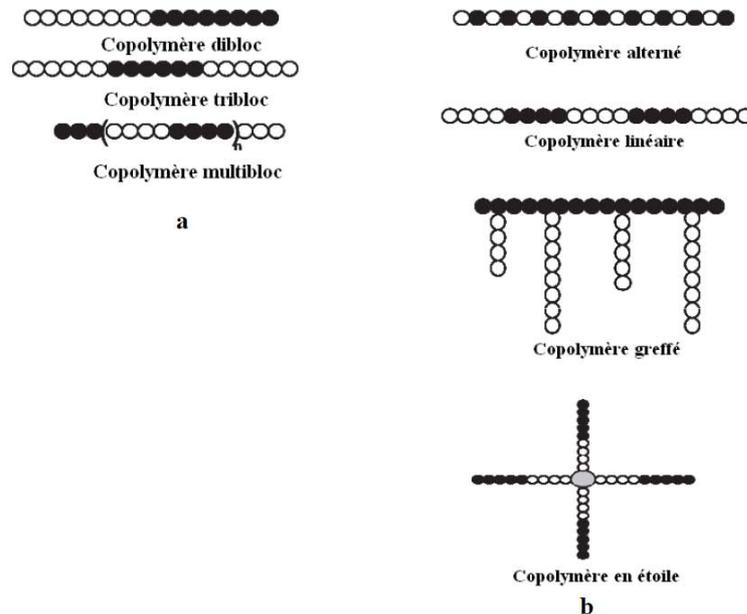


Figure I.1. Exemples d'architectures de polymères

## I.1. Auto-assemblage de copolymères à blocs

### I.1.1. Auto-assemblage de copolymères à blocs en masse

Pour le cas le plus étudié, celui des diblocs AB constitués de deux blocs incompatibles, la microséparation de phase dépend de trois paramètres: le paramètre de Flory-Huggins  $\chi_{AB}$  représentant l'incompatibilité entre les deux blocs, les degrés de polymérisation  $N_A$  et  $N_B$  et les fractions volumiques des deux blocs  $f_A$  et  $f_B$ . Le paramètre d'interaction de Flory-Huggins  $\chi$  dépend principalement de la nature chimique des monomères et sa valeur augmente avec l'incompatibilité entre les blocs. Autrement dit, une valeur positive de ce terme traduit une forte répulsion entre les chaînes, tandis qu'une valeur négative indique une compatibilité entre les blocs. Ainsi la séparation de phases apparaît quand le terme  $\chi N$ , aussi appelé paramètre réduit, caractérisant l'équilibre enthalpique-entropique possède une valeur critique pour laquelle la force de ségrégation est assez forte pour créer une micro séparation de phases: on parle également de transition ordre-désordre. On peut ainsi avoir trois régimes de phases selon la valeur  $\chi N$ : un domaine de faible ségrégation ( $\chi N \leq 10$ ) où l'état du système est désordonné (noté Disordered sur la Figure I.2), un domaine intermédiaire ( $10 < \chi N \leq 50$ ) et un domaine de forte ségrégation ( $\chi N \rightarrow \infty$ ). Dans ce dernier cas, différentes microstructures ordonnées sont possibles.

Dans le cas des diblocs AB, où A et B représentent les blocs incompatibles: pour une valeur  $\chi N$  fixe, trois régimes de phase ont été décrits en fonction de la fraction volumique du bloc A (Figure I.2a). Lorsque la fraction volumique  $f_A$  augmente, on passe d'une phase sphérique cubique centrée (S), à une phase hexagonale cylindrique (C), suivie d'une phase complexe gyroïde cubique continue (G), pour finir sur une phase lamellaire (L). Khandapur et ses collaborateurs<sup>7</sup> ont construit expérimentalement, le diagramme de phase du dibloc poly(isoprène)-*b*-poly(styrène) (Figure I.2b). Ce diagramme concorde avec le diagramme théorique précédemment décrit.

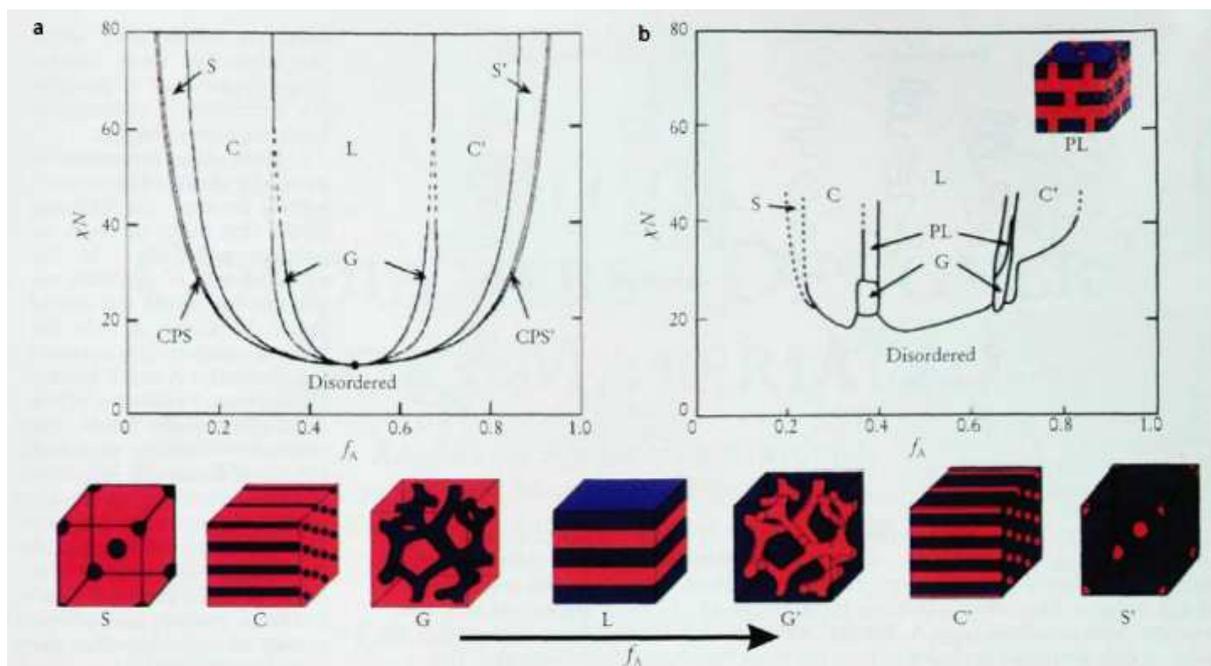


Figure I.2. Diagramme de phase d'un copolymère dibloc AB.<sup>7</sup> (a) Courbe théorique de la transition ordre-désordre: sphérique (S), Cubique face centrée (CPS), cylindrique (C), gyroïde cubique continue (G), lamellaire (L); (b) Morphologies expérimentales obtenues avec le dibloc poly(isoprène)-*b*-poly(styrène).

Les copolymères triblocs ABA montrent un comportement de phase similaire aux diblocs AB. La seule différence réside dans la disposition des blocs à l'intérieur des microdomaines.<sup>8</sup> L'introduction d'un troisième bloc de composition différente conduit à la diversification des microstructures, car le nombre de morphologies possibles augmente considérablement à cause du nombre de paramètres indépendants plus grand que pour un tribloc ABA. La microstructure des triblocs ABC est gouvernée par les paramètres suivants:  $\chi_{AB}$ ,  $\chi_{AC}$ ,  $\chi_{BC}$ ,  $N$ ,  $f_A$ ,  $f_B$ ,  $f_C$  mais aussi par la séquence des blocs dans la chaîne (ABC, ACB ou BAC). C'est ainsi que Bates<sup>9</sup> a proposé diverses morphologies en fonction des paramètres précédents (Figure I.3).

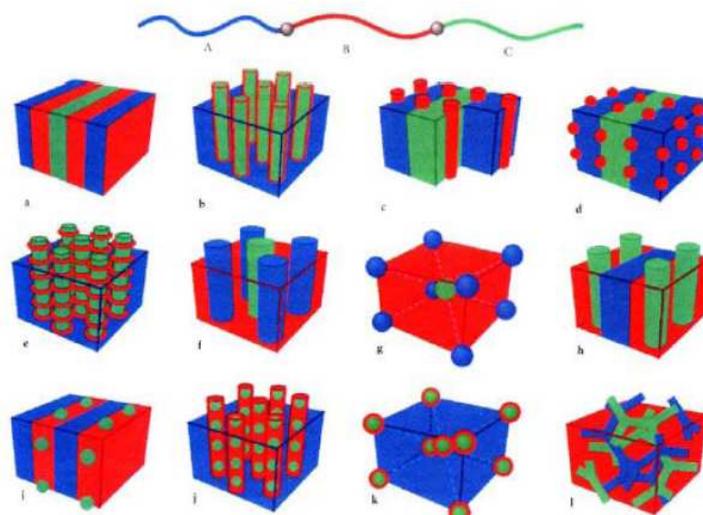


Figure I.3. Morphologies prédites pour un triblocs linéaire ABC.<sup>9</sup>

## I.1.2. Auto-assemblage de copolymères à blocs en solution

En solution, dans un solvant sélectif d'un des blocs, les copolymères à blocs tout comme les tensioactifs, vont s'auto-organiser pour former des nano-domaines limitant ainsi la surface de contact du bloc incompatible avec le solvant. Ce phénomène d'auto-assemblage a été largement décrit aussi bien dans des solvants organiques<sup>10,11</sup> qu'en milieu aqueux.<sup>12-14</sup> Nous allons dans cette partie, nous limiter à l'auto-assemblage des copolymères à blocs amphiphiles en solution aqueuse.

### I.1.2.1. Les copolymères à blocs amphiphiles

En solution aqueuse, les copolymères amphiphiles se comportent comme des tensioactifs macromoléculaires, ils s'auto-associent sous la forme d'agrégats colloïdaux pour former une variété de structures. Leur auto-association a lieu lorsque l'entropie qui favorise le désordre et donc la solubilité des blocs ne parvient pas à contrebalancer le coût énergétique des contacts répulsifs entre les blocs hydrophobes et l'eau. Afin de minimiser ces contacts répulsifs avec les molécules d'eau, les blocs hydrophobes s'agrègent et expulsent le solvant. On parle de processus de micellisation. La Figure I.4 schématise les différentes structures que l'on peut rencontrer. Les blocs hydrophobes constituent le cœur de l'agrégat tandis que les blocs hydrophiles gonflés d'eau forment la couronne.

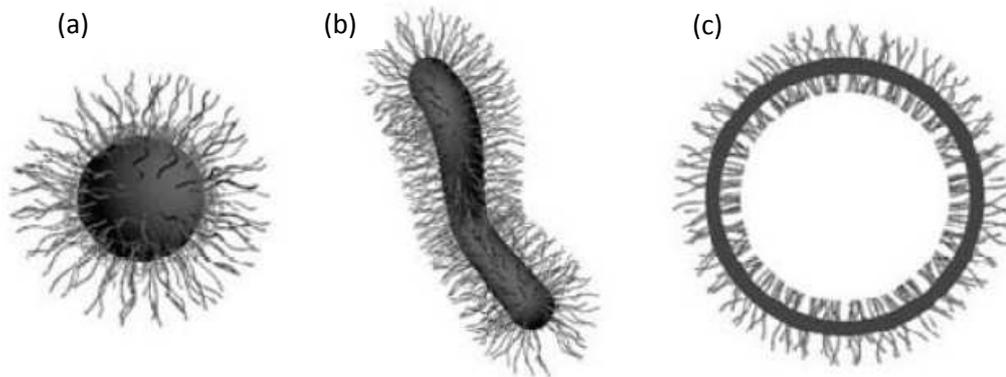


Figure I.4. Morphologies des agrégats de copolymères en micelles. (a) Sphérique, (b) Cylindrique, (c) Vésicule.<sup>15</sup>

#### a) Caractérisation expérimentale des micelles

La morphologie et la taille des micelles peuvent être caractérisées par plusieurs paramètres structuraux :

- Le rayon  $R_c$  considéré comme rayon du cœur micellaire constitué des blocs hydrophobes.
- Le rayon de giration de la micelle  $R_g$ , correspondant à la moyenne quadratique des distances des unimères au centre de gravité de chaque micelle.
- Le rayon hydrodynamique  $R_h$ , qui correspond au rayon d'une sphère dure possédant le même coefficient de diffusion que celui de la micelle donnée par la relation de Stokes-Einstein. La taille effective de la micelle détectée suite à son mouvement brownien. Le rapport  $\frac{R_g}{R_h}$  donne une information sur la morphologie de la micelle. Par exemple, dans le cas d'une structure creuse de type vésiculaire, ce rapport vaut 1.
- Le nombre d'agrégation  $N_{ag}$ , correspondant au nombre d'unimères par micelle.

Différentes techniques expérimentales récapitulées dans le Tableau I.1 permettent de déterminer ces paramètres structuraux.

Techniques expérimentales	Paramètres structuraux
Microscopie électronique à transmission cryogénique (Cryo-MET)	Morphologie, taille à l'état hydraté
Diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA)	$R_c, R_g, N_{ag}$ , dynamique des systèmes
Diffusion des rayons X aux petits angles	$R_g, R_c, N_{ag}$ , dynamique des systèmes
Diffusion dynamique de la lumière (DDL)	$R_h$ , dynamique des systèmes, polydispersité en taille
Tensiométrie, Fluorimétrie	CAC
Microscopie électronique à transmission (MET)	Morphologie, polydispersité en taille, taille à l'état sec
Chromatographie d'exclusion stérique	$R_h$ , dynamique des systèmes

Tableau I.1. Paramètres structuraux obtenus par différentes techniques expérimentales<sup>16</sup>.

### b) Thermodynamique des micelles de copolymères à l'équilibre

Deux modèles décrivent l'association des copolymères à blocs en solution: un modèle dit «fermé» opposé au modèle dit «ouvert». Dans le premier modèle, on considère qu'il existe un équilibre dynamique entre les unimères et les agrégats micellaires. En effet, lorsque la concentration en unimères augmente et atteint une certaine concentration critique dite «**concentration d'agrégation critique**» (CAC), les unimères s'associent pour former des objets. Dans le cas le plus simple, les objets formés seront appelés micelles et dans ce cas, on parlera de «concentration micellaire critique ou CMC». En dessous de cette CAC, on considère que seuls sont présents les unimères (chaîne de copolymère isolé) non associés et au-delà de cette concentration des agrégats commencent à apparaître. Le modèle fermé considère que la solution est constituée de plusieurs composés comprenant des micelles, des unimères et des molécules de solvant. La formation de micelles dans cette solution est assimilée à une séparation de phase, où les agrégats ayant un nombre  $N_{ag}$  élevé sont favorisés par rapport à ceux possédant un faible  $N_{ag}$ . Ceci implique un processus coopératif puisque dès que l'agrégation a débuté, l'addition d'un nouvel unimère devient de plus en plus favorable jusqu'à ce qu'un nombre d'agrégation  $N_{ag}$  maximum soit atteint. Dans ce cas, les unimères libres en solution sont donc en équilibre avec les micelles. Si on considère  $\mu_s$ , le potentiel chimique d'un unimère dans un agrégat contenant S unimères. A l'équilibre on aura donc, pour  $s=1,2,\dots,n$ , :

$$\mu_s = \mu_s^0 + RT \ln [\text{micelles}] \quad \text{Equation 1.1}$$

Où  $\mu_s^0$  désigne le potentiel chimique d'un unimère dans un agrégat de S unimères et le second membre de l'équation représente la contribution entropique au potentiel chimique.

En général, la CMC ( $10^{-5} - 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ ) des copolymères à blocs amphiphiles est nettement inférieure à celle des tensioactifs de faibles masses molaires.<sup>17</sup>

Dans le modèle d'association ouvert, on considère qu'il existe une distribution continue de micelles contenant 1, 2, 3, ..., n unimères associés à des constantes d'équilibre diverses. L'agrégation dans ce modèle est décrite comme un procédé continu, par conséquent, il est impossible de définir une CMC.

### c) **Equilibre thermodynamique/Hors équilibre thermodynamique**

Les micelles formées par les copolymères à blocs ne sont pas toujours à l'équilibre thermodynamique. Elles peuvent être «gelées» si aucun échange ne s'opère entre les micelles et les unimères. Johnson et Prud'homme<sup>18</sup> utilisent le terme «micelles» pour des systèmes à l'équilibre thermodynamique et «nanosphères» pour des systèmes hors équilibre.

Dans la plupart des cas, les études concernant l'échange dynamique des copolymères à blocs ne sont pas effectuées. Par conséquent dans la littérature, la majorité des auteurs qualifient de «micelles» tous types d'agrégats constitués d'un cœur hydrophobe entouré d'une couronne hydrophile alors qu'ils ne sont pas à l'équilibre thermodynamique. En outre, la vitesse d'échange peut être lente, par conséquent la notion d'agrégats «dynamiques» ou «gelés» dépend fortement de l'échelle de temps durant laquelle les expériences vont être réalisées.<sup>19</sup> Les agrégats formés par les copolymères à blocs sont généralement utilisés pour l'encapsulation et la délivrance de principes actifs.<sup>20-27</sup> Le contrôle des échanges dynamiques reste très important pour ce type d'application bien que l'efficacité du relargage des médicaments a été démontrée.<sup>28</sup>

Généralement, le mécanisme de micellisation des tensioactifs de faibles masses moléculaires fait intervenir deux processus: un processus rapide et un processus lent. Le premier processus est un phénomène de nucléation durant lequel les unimères vont s'associer de manière rapide et croîtront jusqu'à ce que les micelles atteignent une taille critique. Ce processus rapide correspond au réajustement de la concentration en unimères pour atteindre la concentration micellaire critique et se fait sans changement du nombre total des micelles. Le deuxième processus lent, conduit à un équilibre thermodynamique impliquant un changement du nombre de micelles soit par échange d'unimère, soit par fusion/fission. Ce processus lent permet d'ajuster le nombre d'agrégation des micelles sans modification significative de la concentration en unimères.<sup>29-33</sup>

Halperin et Alexander<sup>34</sup> ont développé une théorie sur la cinétique de relaxation des micelles de copolymères diblocs. Dans cette théorie, deux mécanismes de micellisation ont été considérés: le mécanisme d'Aniasson et Wall<sup>29,32</sup> dans lequel les agrégats sont capables de se réorganiser par échange d'unimères et le mécanisme de fusion/fission faisant intervenir les interactions entre les agrégats. D'après leur théorie, le mécanisme d'Aniasson et Wall serait favorisé compte tenu de la

faible barrière énergétique à franchir. Dormidontova<sup>35</sup> et Haliloglu<sup>36</sup> suggèrent par la suite que le mécanisme de fusion/fission pourrait jouer un rôle déterminant. Ces arguments furent par la suite réfutés par l'équipe de Nyrkova.<sup>37-39</sup> Après plusieurs théories développées sur le processus de micellisation des diblocs, c'est l'équipe de Nose<sup>40</sup> qui donnera une explication claire sur cette théorie. Elle explique, que dans le cas des diblocs, le mécanisme de fusion/fission entre agrégats a un rôle minoritaire à cause des interactions répulsives des couronnes. Selon leurs études, la formation de micelles de copolymères diblocs nécessite la présence de deux forces: une force attractive entre les blocs insolubles conduisant à l'agrégation et une force répulsive entre les blocs solubles (couronnes) empêchant une croissance illimitée de la micelle. La balance entre ces deux forces est atteinte via trois paramètres: (a) l'étirement des chaînes de polymères formant le cœur micellaire, (b) la tension de surface à l'interface entre le cœur micellaire et le solvant, (c) les interactions entre les blocs hydrophiles formant la couronne.

Contrairement aux tensioactifs de faibles masses moléculaires, l'équilibre d'échange entre les micelles et les unimères des copolymères à blocs est relativement lent. Cela est dû à une forte barrière d'énergie d'activation à franchir pour expulser ou pour ajouter une chaîne de polymères de l'agrégat. Cette barrière d'énergie d'activation sera d'autant plus importante que le cœur de la micelle sera très hydrophobe. C'est aussi le cas des agrégats ayant un cœur à l'état vitreux comme par exemple les micelles de poly(méthacrylate de méthyle) ou de polystyrène en solution aqueuse. Wang<sup>41</sup> et Van Stam<sup>42</sup> ont observé qu'il n'existait pas de cinétique d'échange pour les copolymères à blocs poly(styrène)-*b*-poly (oxide d'éthylène) (PS-*b*-PEO) et poly(styrène)-*b*-poly(méthacrylate de sodium) (PS-*b*-PMaNa) à température ambiante. Toutefois à 60°C, température proche de la température de transition vitreuse des blocs poly(styrène), une cinétique d'échange lente a été observée. De manière claire, une grande tension interfaciale entre les blocs hydrophobes et le solvant conduit à des agrégats «gelés». De façon phénoménologique, si différentes méthodes de préparation conduisent à différents types d'agrégats, on peut conclure sans aucun doute que les micelles obtenues ne sont pas à l'équilibre thermodynamique et que celles-ci sont «gelées».

### **I.1.2.2. Facteurs influençant la morphologie des agrégats micellaires**

Plusieurs facteurs peuvent avoir un effet sur la morphologie des copolymères en solution: la fraction volumique des blocs, la méthode de préparation, l'ajout des sels.

#### **a) Effet de la fraction volumique des blocs**

Plusieurs théories ont été développées dans le but de comprendre et de prédire le phénomène d'auto-assemblage dans des systèmes de copolymères à blocs en solvant sélectif.<sup>43,44</sup> En 1976, Israelachvili<sup>45</sup>

et ses collaborateurs ont relié l'approche énergétique de l'agrégation des tensioactifs aux contraintes géométriques imposées par la structure des agrégats. Dans ces études, les auteurs, ont défini un paramètre d'empilement  $p$ , permettant de prédire la morphologie des agrégats suivant la structure géométrique des tensioactifs (Figure I.5). Ce paramètre d'empilement est le rapport entre le volume  $v$  occupé par les chaînes hydrophobes du tensioactif et l'interface  $a_0$  multipliée par la longueur maximale  $l_c$  des chaînes hydrophobes exprimé par la relation  $p = v/a_0 l_c$ . Cette théorie géométrique décrit assez bien les successions de phase observées pour des systèmes à l'équilibre, en particulier les tensioactifs de faibles masses moléculaires.

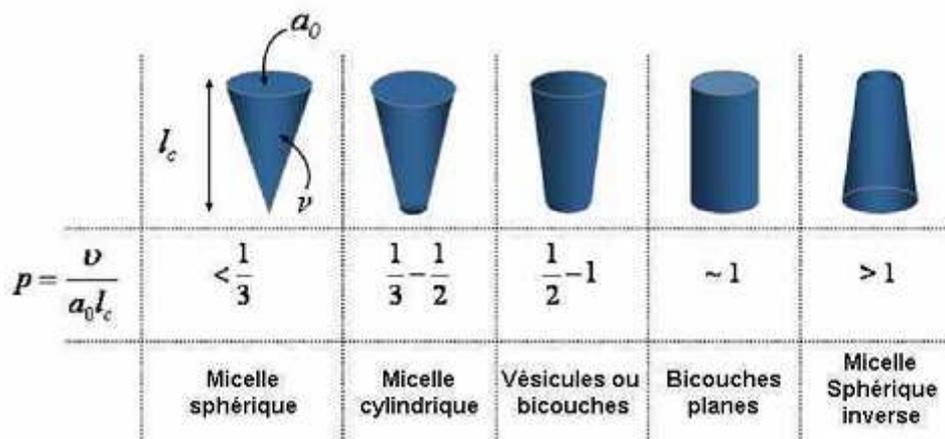


Figure I.5. Influence du paramètre d'empilement sur la morphologie des agrégats.<sup>45</sup>

Par analogie avec l'approche d'Israelachvili, Discher et Eisenberg<sup>46</sup> ont prédit la morphologie des objets formés au cours de l'auto-assemblage des copolymères amphiphiles. D'après leurs études la fraction volumique relative ( $f$ ) du bloc hydrophile influence le type d'agrégats. Pour une valeur de  $f \leq 0,35$  la formation des vésicules est favorisée. Pour une valeur de  $f > 0,5$  des micelles sphériques sont obtenues, et pour des valeurs  $0,4 < f < 0,5$ , des morphologies cylindriques apparaissent (Figure I.6).

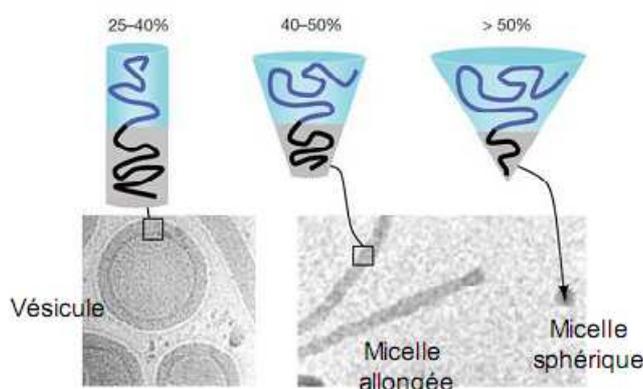


Figure I.6. Morphologies prédites pour des agrégats de copolymères à bloc en solution aqueuse en fonction de la fraction volumique  $f$  du bloc hydrophile.<sup>47</sup>

### b) Effet de la méthode de préparation

Nous avons déjà mentionné que les agrégats de copolymères à blocs sont souvent hors équilibre. La méthode de préparation des agrégats en solution est alors un facteur important pour le type d'agrégats que l'on peut obtenir *in fine*. Les méthodes les plus utilisées sont décrites ci-après.

- La solubilisation directe

Cette technique consiste à solubiliser le copolymère à bloc amphiphile directement dans la solution aqueuse. L'obtention d'agrégats isolés en solution apparaît pour des systèmes asymétriques dont le bloc hydrophile est majoritaire.<sup>28</sup> Il est parfois nécessaire de solubiliser les copolymères dans de l'eau à une température supérieure à la  $T_g$  des blocs hydrophobes afin de leur conférer une plus grande mobilité et de faciliter la cinétique d'équilibre d'échange unimères/micelles. La cinétique d'équilibre va dépendre de paramètres expérimentaux tels que la température, la vitesse d'agitation mais aussi des propriétés intrinsèques des copolymères à blocs comme la fraction volumique des blocs hydrophobes et hydrophiles, la masse molaire et aussi la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) du bloc hydrophobe.

- La solubilisation «indirecte» ou méthode de cosolvant

Pour des copolymères à blocs possédant un bloc hydrophobe avec une  $T_g$  élevée ou des copolymères ayant une faible solubilité dans l'eau, l'emploi d'un solvant organique est requis. Tout d'abord le copolymère à blocs est solubilisé dans un solvant organique non sélectif (thermodynamiquement bon pour les deux blocs) miscible avec l'eau (DMF, DMSO, THF, acétone...). L'étape suivante consistera à ajouter l'eau progressivement. Une autre façon de procéder pour cette étape consiste à ajouter de façon progressive une solution de copolymères à blocs dans le solvant organique dans un volume d'eau. La taille et la forme des agrégats peuvent évoluer en fonction du temps mais également en

fonction de la quantité d'eau ajoutée.<sup>48</sup> La dernière étape consistera à éliminer le solvant organique par dialyse ou par évaporation.

- La réhydratation de film

Cette méthode consiste à solubiliser le copolymère dans un solvant organique volatil pas nécessairement miscible avec l'eau, puis à évaporer ce dernier. Les chaînes de polymère vont s'auto-assembler en masse dû à l'incompatibilité des deux blocs. La réhydratation du film par l'ajout d'eau induira la formation de structures auto-organisées dans l'eau. Cette méthode est utilisée pour l'obtention de vésicules de copolymères à blocs.<sup>49,50</sup>

- La méthode de l'émulsification

Ce procédé permet l'obtention d'agrégats micellaires. La dissolution des copolymères dans un mélange eau/solvant non miscible à l'eau est nécessaire. L'auto-assemblage va se faire dans une émulsion «huile dans l'eau» où les blocs hydrophiles présentent une affinité pour la phase aqueuse et les blocs hydrophobes sont dissous dans les nano-gouttes formées par la phase organique. Une agitation vigoureuse de la solution est requise dans le but d'obtenir une bonne dispersion de la phase organique dans une phase continue. Les ultrasons sont parfois utilisés afin d'optimiser cette dispersion. Les agrégats micellaires sont obtenus après élimination du solvant organique par évaporation ou par dialyse.

### c) Effet de l'ajout de sel

L'ajout de sel peut avoir une influence sur la morphologie des agrégats. C'est ainsi que Zhang<sup>51</sup> et ses collaborateurs ont observé une évolution du type de morphologies en ajoutant du  $\text{NaCl}$  dans une solution aqueuse de copolymères  $\text{PAA}_{25}\text{-b-PS}_{410}$ . On est passé d'une morphologie de type micelles «crew-cut» (cheveux courts) vers la formation de vésicules en passant par une forme de bâtonnets (Figure I.7).

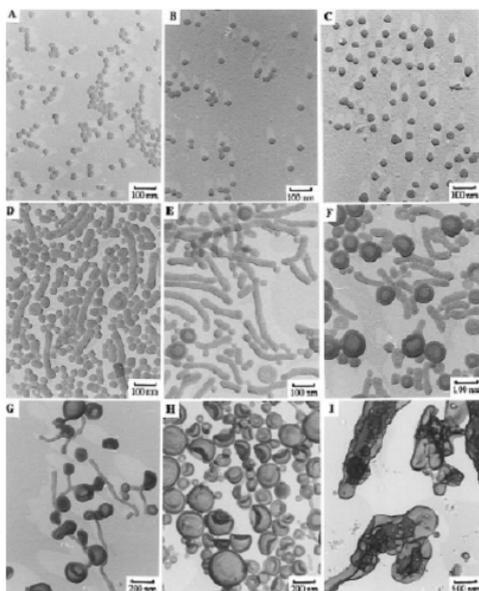


Figure I.7. Systèmes micellaires de  $\text{PAA}_{25}\text{-b-PS}_{410}$  obtenus sans sel (A) et en présence de concentrations variables en sel (en mM) : (B) 1,1; (C) 2,1; (D) 3,2; (E) 4,3; (F) 5,3; (G) 10,6; (H) 16,0; (I) 21,0.<sup>51</sup>

*Pour conclure sur cette section, la micellisation des copolymères à blocs amphiphiles présente certaines analogies mais aussi des différences avec celle des tensioactifs. En effet, contrairement aux tensioactifs, les agrégats obtenus avec les copolymères à blocs amphiphiles ne sont pas nécessairement à l'équilibre thermodynamique. Le processus de microséparation de phase peut être affecté par des facteurs tels que le paramètre de Flory-Huggins, les fractions volumiques des différents blocs ou encore les degrés de polymérisation. En solution aqueuse, les chaînes de polymères dispersées peuvent se ségréger et former une large variété de structures telles que des vésicules, des micelles tubulaires, des micelles sphériques...etc.*

*Lorsque le système est à l'équilibre thermodynamique, deux types de processus interviennent, un lent et l'autre rapide permettant ainsi l'association ou la dissociation des micelles par insertion ou expulsion un à un d'unimères. Toutefois, dans le cas des copolymères à blocs, la cinétique d'échange est beaucoup plus lente voire quasi-inexistante que dans le cas des tensioactifs.*

*Par ailleurs, l'agrégation d'unimères de copolymères à blocs amphiphiles peut conduire à la formation d'agrégats gelés. Ces derniers bien qu'obtenus au dessus d'une concentration critique ne sont pas à l'équilibre même si ils présentent des analogies structurales avec les micelles.*

*Différents paramètres peuvent influencer la morphologie des agrégats. C'est le cas de la méthode de préparation, la présence de sel, la fraction volumique hydrophobe ou hydrophile, ...etc.*

## **II. La molécule d'ADN: une biomolécule particulière**

L'ADN ou Acide DésoxyriboNucléique est une molécule présente dans toutes les cellules vivantes. Elle renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. Dans les cellules eucaryotes, la molécule d'ADN se trouve dans le noyau, sa fonction principale est de stocker l'information génétique dont le corps humain a besoin. Elle est non seulement le siège de la synthèse protéique mais également le support de l'information génétique car elle est transmise lors de la reproduction. La découverte de sa structure en double hélice date de 1953, suite aux travaux de Rosalind Franklin, James Watson et Francis Crick.<sup>52</sup> Cette découverte a ouvert une nouvelle ère dans la biologie. Beaucoup de scientifiques ont dirigé leur attention sur la génétique. Aujourd'hui, après des années de recherche, les scientifiques ont non seulement orienté leurs études vers l'utilisation de l'ADN pour soigner des maladies mais également vers l'utilisation de la structure de l'ADN afin de faire de nouveaux matériaux.

## II.1. Généralités sur la molécule d'ADN

### II.1.1. Structures de l'ADN

La structure de l'ADN a été élucidée pour la première fois en 1953 par James Watson et Francis Crick.<sup>52</sup> Ils ont montré que la macromolécule biologique, ADN, est formée par deux chaînes de polymères complémentaires qui s'emboîtent tout en s'enroulant l'une autour de l'autre pour former une double hélice.

- Structure primaire

La structure primaire de la molécule d'ADN est une séquence linéaire de nucléotides. Chaque nucléotide est formé d'une base azotée liée à un sucre à cinq carbones (désoxyribose) qui possède un groupement phosphate fixé à son carbone 5' (voir figure I.9). L'ADN contient quatre types de bases azotées liées au carbone 1' du sucre: deux bases puriques, l'adénine (A) et la guanine (G), et deux pyrimidiques à savoir la cytosine (C) et la thymine (T) (Figure I.8).

Le brin d'ADN possède une orientation chimique due à la position des phosphates sur les sucres en 3' ou en 5'. L'extrémité 5' présente un groupement hydroxyle ou phosphate sur le carbone 5' de son dernier sucre. L'extrémité 3' quant à elle possède habituellement un groupement hydroxyle au niveau du carbone 3' de son dernier sucre (figure I.9). Cette orientation, ajoutée au déroulement de la synthèse dans le sens 5' vers 3', fait que par convention les séquences polynucléotidiques sont écrites et sont lues dans le sens 5' → 3'. Les liaisons phosphodiester relient le phosphate à deux carbones inéquivalents, C<sub>3'</sub> et C<sub>5'</sub>, et des désoxyriboses voisins (Figure I.9). Les groupements phosphates sont chargés négativement dans les conditions physiologiques.

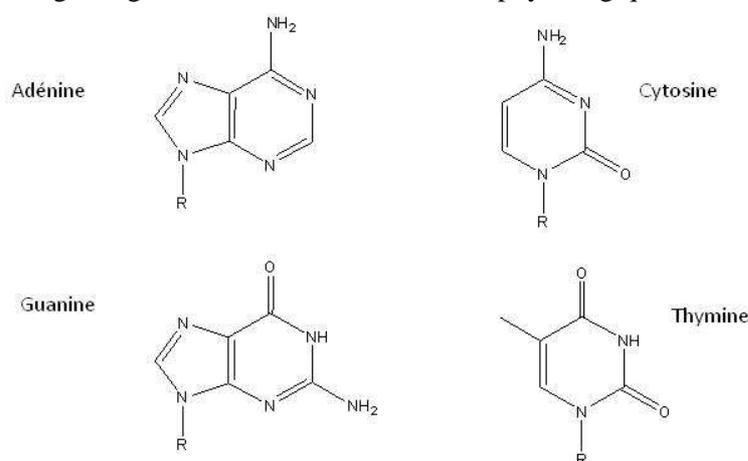


Figure I.8. Les quatre bases A, G, C et T de l'ADN. Dans les nucléotides, elles sont attachées à un sucre (désoxyribose) indiqué par R.

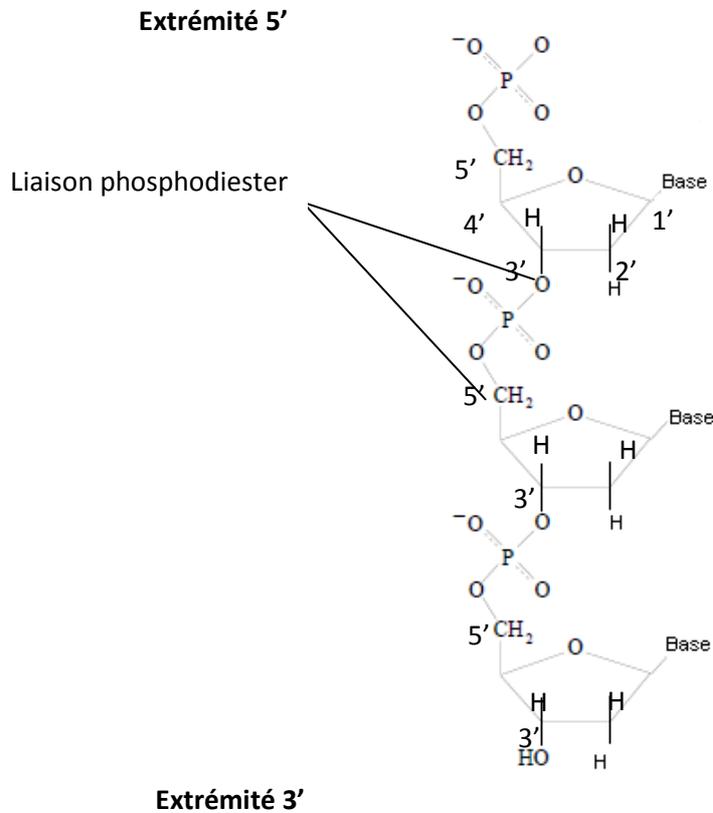


Figure I.9. Structure du squelette d'un simple brin d'ADN. La structure chimique montre un groupement hydroxyle au niveau de l'extrémité 3' et un groupement phosphate au niveau de l'extrémité 5'. Deux liaisons phosphodiester relient les deux nucléotides adjacents. Par convention, une séquence d'ADN est toujours écrite dans le sens 5' → 3'.

- Structure secondaire

La molécule d'ADN est constituée de deux brins polynucléotidiques associés, qui s'enroulent l'un autour de l'autre pour former une double hélice. La double hélice est maintenue grâce aux liaisons hydrogènes qui se forment entre les bases de chaque brin. L'orientation des deux brins est dite *antiparallèle*, c'est-à-dire que les directions 5' → 3' sont opposées dans le double brin (Figure I.10a). L'appariement spécifique des bases deux à deux entraîne la complémentarité des deux brins. A s'apparie avec T par deux liaisons hydrogène et G avec C par trois liaisons hydrogène (figure I.10b). Ces associations entre une purine et une pyrimidine sont appelées paires de bases de Watson-Crick.<sup>52</sup> La présence de ces liaisons hydrogènes dans une double hélice d'ADN contribue fortement à sa stabilité.

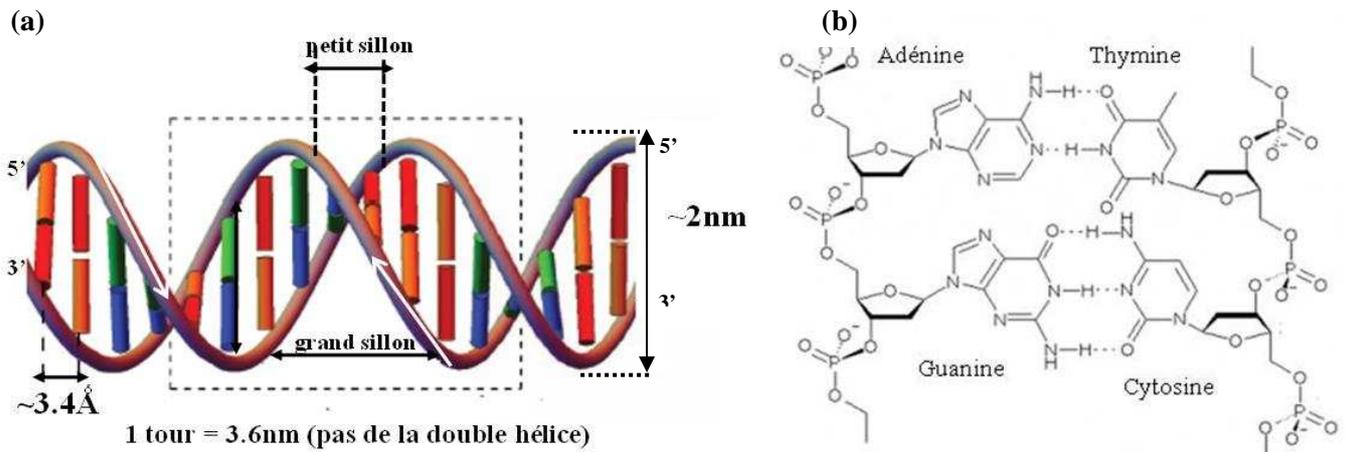


Figure I.10. La double hélice d'ADN. (a) un modèle compact de l'ADN B, forme la plus courante d'ADN dans les cellules. Les flèches en blanc indiquent le sens 5' → 3' de chaque brin. Les liaisons hydrogènes entre les bases sont au centre de la structure; (b) Structure chimique de la double hélice d'ADN montrant les liaisons hydrogènes entre les paires de bases de type Watson-Crick A=T et G≡C.<sup>53</sup>

Le simple brin d'ADN peut être noté  $ADN_S$  ou  $ADN_{AS}$ . L' $ADN_S$  correspond au brin sens et celui noté  $ADN_{AS}$  correspond au brin antisens. En effet le brin sens est celui qui a la même séquence nucléotidique que l'ARN messager. Le brin antisens, quant à lui sert de matrice à la polymérase. L'ARN étant polymérisé du 5' → 3', la matrice (brin antisens) peut donc être représentée du 3' → 5'. Le brin complémentaire (brin sens) est donc représenté du 5' → 3'. Ce qui revient à représenter dans le cas d'un oligonucléotide ADN double brin de 22 bases de séquence quelconque de la façon suivante:



La double hélice de la molécule d'ADN a un pas (correspondant à un tour d'hélice) de 3.6 nm et un diamètre de 2 nm.<sup>54</sup> La distance entre deux paires de bases est de 3.4 Å, ce qui donne 10 paires de bases par pas d'hélice. L'une des particularités de la double hélice d'ADN est qu'elle présente un petit et un grand sillon: le petit sillon correspond au plus petit écart formé entre les deux brins, et le grand sillon au plus grand écart (figure I.10 a). Il s'agit d'une hélice droite et correspond à la forme B de l'ADN, qui est la forme normalement présente dans la plupart des segments d'ADN cellulaires. En

plus de la forme B prédominante, deux autres structures d'ADN sont décrites. Il s'agit de l'ADN A et l'ADN Z.

- Structures tertiaire et quaternaire

L'ADN peut former un autre type d'appariement que celui de Watson et Crick entre les bases AT et GC. Une troisième base peut se rajouter, on parle alors d'appariement de Hoogsteen.<sup>55</sup> La double hélice peut accueillir ainsi une troisième chaîne polynucléotidique. La structure formée est un triplex d'ADN.

La molécule d'ADN peut également former des quadruplex. Elle peut également se replier sur elle-même en formant des structures en épingle à cheveux. La formation de cette structure est très dépendante des paires de bases.

### II.1.2. Dénaturation de l'ADN

La séparation des deux brins d'ADN, que l'on appelle dénaturation ou «fusion», peut être provoquée expérimentalement en élevant la température dans une solution d'ADN. L'accroissement de l'agitation moléculaire finit par rompre les liaisons hydrogène et les autres forces stabilisant la double hélice. Les brins se séparent alors et s'éloignent l'un de l'autre en raison de la répulsion électrostatique entre groupements phosphates. Cette réaction de fusion de l'ADN peut être suivie en mesurant l'absorbance d'une solution d'ADN. La longueur d'onde utilisée est en général de 260 nm. En effet l'ADN simple brin et la double hélice n'ont pas la même absorption, la dénaturation s'accompagne d'un effet hyperchromique, se matérialisant par une augmentation de l'absorbance (Figure I.11). La température de fusion,  $T_m$  à laquelle les brins d'ADN se séparent, dépend de plusieurs facteurs, dont en premier lieu la proportion de paires de bases GC. En effet, une forte proportion de paires GC entraîne une  $T_m$  élevée car les trois liaisons hydrogène dans les paires GC rendent ces paires de bases plus stables que les paires AT. La concentration ionique influence également la  $T_m$  car les groupements phosphates chargés négativement dans les deux brins sont écrantés par les ions positifs. Par conséquent une haute force ionique augmente la  $T_m$  de par la stabilisation de la double hélice d'ADN par les cations positifs.

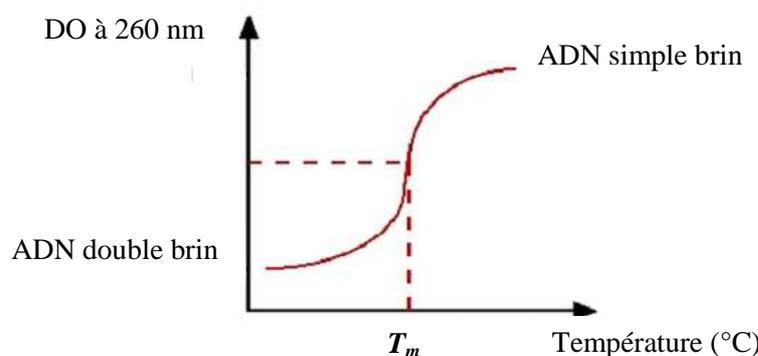


Figure I.11. Courbe d'hybridation de l'ADN.  $T_m$  correspond à la température à laquelle 50% de brins sont sous la forme simple brin.

## II.2. La molécule d'ADN en solution

L'ADN est un polyélectrolyte anionique. Par conséquent, en solution lui est associé un contre ion positif permettant de remplir la condition d'électroneutralité du système. Les solutions de polyélectrolytes se comportent différemment des solutions de polymères non chargés. L'origine de cette particularité résulte de la combinaison des propriétés dues aux chaînes de polymère proprement dites et de celles dues aux interactions entre charges. La molécule d'ADN est notamment l'un des polymères les plus fortement chargés présentant une charge négative tous les 3Å environ. Sa charge effective dépend de l'écrantage par les ions en solution. Autrement dit lorsque la densité de charge dépasse un certain seuil, les contre-ions se condensent sur la surface du polyanion et réduisent alors la charge totale de celui-ci.

Le concept de condensation des contre-ions a été introduit par Manning.<sup>56-58</sup> La théorie de Manning dite aussi d'Oosawa-Manning décrit le paramètre  $\zeta = \frac{l_B}{b}$  où  $b$  représente la distance moyenne entre les charges du polyion et  $l_B$  est la longueur de Bjerrum, dépendante de la constante diélectrique du milieu:

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r\kappa_B T} \quad \text{Equation 1.2}$$

avec  $e$  : charge électrique élémentaire,  $\epsilon_0$  : permittivité du vide,  $\epsilon_r$  : permittivité du solvant et  $\kappa_B T$  : le facteur d'énergie de Boltzman. Ce paramètre  $\zeta$  représente une densité linéaire de charge, il ne fait pas intervenir la concentration en ions de la solution. Il ne dépend que de l'ADN et du solvant. Pour l'ADN en solution aqueuse  $\zeta = 4.2$ . Cette valeur est bien au dessus de  $\zeta = 1$ , valeur au dessus de laquelle le phénomène de condensation des ions est prédominant.<sup>59</sup> Suivant la nature et la concentration des contre-ions, deux brins d'ADN peuvent interagir plus ou moins fortement via les forces électrostatiques. L'interaction est médiée par l'écrantage des charges se trouvant sur le squelette de chaque brin.

En raison des propriétés mécaniques de l'ADN simple brin et de la double hélice d'ADN, l'auto-assemblage de l'ADN peut former un réseau d'éléments relativement rigides reliés par des joints flexibles: la rigidité d'un polymère peut être caractérisée par sa longueur de persistance  $l_p$ . Cette longueur mesure la distance sur laquelle une chaîne de polymère suit la même direction.<sup>60</sup> Il a été démontré que sous la forme B et en condition physiologique, l'ADN est un polymère semi-flexible. Sa

longueur de persistance  $l_p$  est de 50 nm. Au contraire, l'ADN simple brin, est beaucoup plus flexible, il a un  $l_p \sim 0.7\text{nm}$ .<sup>61,62</sup>

### II.3. Applications de l'ADN en thérapeutique : la thérapie génique

La thérapie génique correspond au premier changement du statut de l'ADN, qui de responsable de maladies, devient médicament. Né au milieu des années 1980, le concept de thérapie génique est fondé sur l'administration thérapeutique d'acides nucléiques.<sup>63</sup> La thérapie génique peut être définie comme le remplacement du gène défectueux ou absent, responsable de la maladie par le gène équivalent sans rompre l'équilibre cellulaire.<sup>64</sup> Cette thérapie utilisant l'ADN comme médicament pourrait être utilisée pour traiter certaines maladies héréditaires.<sup>65</sup> Elle offre des perspectives prometteuses pour le traitement des troubles du métabolisme, d'infections virales et de certains types de cancers. Des essais cliniques sont en cours présentement, soit pour le traitement de certains types de cancers,<sup>66,67</sup> soit pour certaines maladies provoquant une immunodéficience.<sup>68</sup>

Le principe de la thérapie génique est simple. Une fois que le gène responsable de la maladie est connu, on est capable de le reproduire en grande quantité, il suffira de le transférer à l'endroit approprié. Toutefois, malgré toutes les recherches effectuées sur la thérapie génique, l'efficacité du transfert de gènes est limitée par les barrières physiologiques qui entravent le cheminement de l'ADN jusqu'au noyau des cellules.

#### II.3.1. Principales barrières au transfert du gène

L'ADN qui porte l'information nécessaire à l'expression d'un gène thérapeutique est un polymère anionique de haut poids moléculaire. Il doit franchir de nombreuses barrières biologiques (extracellulaires et intracellulaires)<sup>69-71</sup> pour atteindre le noyau des cellules cibles. Sa taille conséquente est un facteur limitant pour son entrée dans la cellule. De plus, l'ADN étant une molécule polyanionique, il va se voir repoussé par les membranes cellulaires chargées négativement. Les répulsions électrostatiques limitent donc les contacts de l'ADN avec les membranes plasmiques. De même, l'ADN thérapeutique injecté dans le corps humain est susceptible d'être dégradé par les nucléases ou par le système de défense du patient. Pour protéger l'ADN de l'action des nucléases et promouvoir son interaction avec les membranes des cellules, il est indispensable de vectoriser l'ADN, c'est-à-dire contrôler son administration, afin qu'il puisse franchir plus facilement l'ensemble de ces obstacles.

#### II.3.2. Les vecteurs

Deux types de vecteurs sont actuellement utilisés en thérapie génique. Ce sont soit des vecteurs viraux utilisant la capacité des virus à pénétrer dans les cellules hôtes et y injecter leur génome, soit des vecteurs non viraux. Dans ce dernier cas, le vecteur est conçu de manière à reproduire les fonctions

d'un virus en permettant la pénétration cellulaire, la diffusion jusqu'au noyau, le passage de l'enveloppe nucléaire et l'expression de l'ADN vectorisé.

Les vecteurs viraux ont l'avantage de posséder la capacité d'infecter naturellement les cellules. Leurs inconvénients majeurs sont leur potentielle intégration dans le génome des cellules hôtes et leur immunogénicité.<sup>72</sup>

Les vecteurs non viraux, développés plus récemment, permettent de s'affranchir des limites de taille de gènes thérapeutiques et des problèmes de toxicité. Bien qu'ils soient légèrement immunogènes, la réponse immunitaire qu'ils déclenchent a pour conséquence de les éliminer ou d'éliminer les cellules les ayant intégrés, mais n'est pas toxique pour l'organisme. Ce sont des molécules naturelles ou synthétiques: polymères cationiques<sup>73</sup> ou protéines<sup>74</sup> formant avec l'ADN des particules appelées polyplexes ou encore des lipides cationiques<sup>75</sup> formant avec de l'ADN des particules appelées lipoplexes.

Les vecteurs non viraux sont plus faciles à produire que les vecteurs viraux, leur qualité de production est plus constante. En revanche, l'inconvénient majeur de l'utilisation de ce type de vecteurs reste leur faible efficacité.

#### II.4. L'ADN comme «matériau»

L'ADN présente deux avantages en tant que "matériau" de construction à l'échelle du nanomètre. C'est un matériau non seulement robuste et flexible mais aussi programmable. Nadrian Seeman,<sup>76</sup> fut le premier à utiliser les propriétés de la double hélice d'ADN dans le but d'assembler des nanostructures. D'après lui, la clé est de pouvoir créer des ramifications sur les brins d'ADN. L'ADN adopte la structure Holliday (jonctions formées lors de la recombinaison de l'ADN donnant des structures cruciformes). Seeman et ses collaborateurs ont ainsi créé des variations de ces structures ramifiées auxquelles ils ont ajouté des points d'accroche permettant à l'ADN de s'associer aux autres molécules, de façon à former un réseau cristallin de jonction. Seeman<sup>77</sup> a ainsi créé des structures organisées en deux ou trois dimensions par auto-assemblage (Figure I.12).

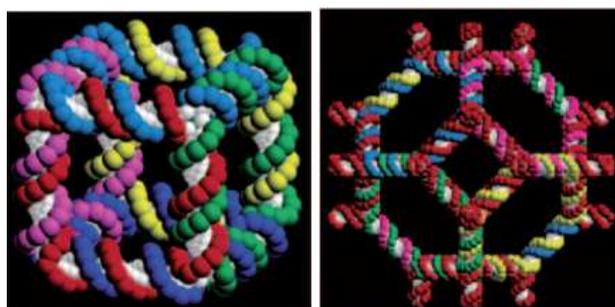


Figure I.12. Nanostructures à base d'ADN: Structures cubique et octaédrique.<sup>77</sup>

Des études approfondies sur l'organisation des nanoparticules à partir des complexes nanoparticules-ADN ont été effectuées. En effet, en fonctionnalisant des nanoparticules d'or avec des brins d'ADN, Mirkin<sup>78,79</sup> et ses collaborateurs ont utilisé la molécule d'ADN comme «un pont liant». Ils ont assemblé les nanoparticules en utilisant la complémentarité entre les brins d'ADN. Ils ont ainsi obtenus des clusters de nanoparticules en hybridant les brins (Figure I.13a). Les clichés de microscopie électronique à transmission ont montré une structure en satellite de nanoparticules de 8nm assemblées autour de nanoparticules de 31 nm (Figure I.13b).<sup>80</sup>

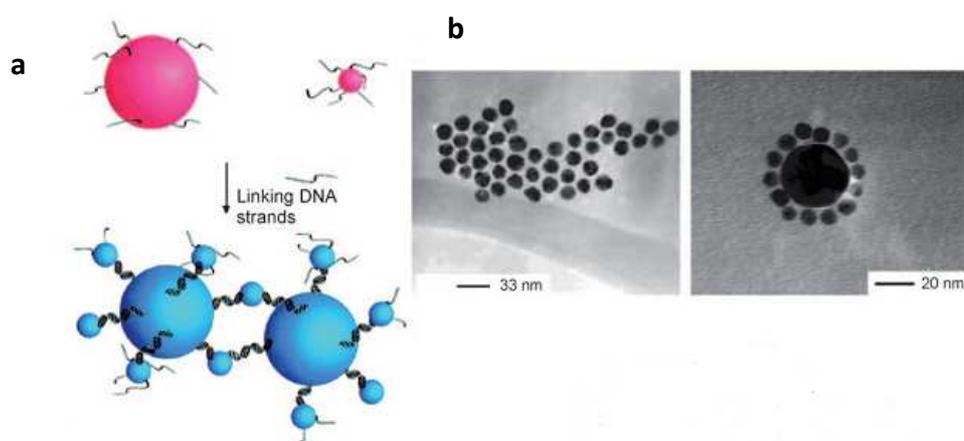


Figure I.13. Complexe de nanoparticule-ADN. (a) Clusters de nanoparticules obtenus par hybridation des nanoparticules de différentes tailles fonctionnalisées avec des brins complémentaires, (b) Clichés de MET de nanoparticules de 8 nm fonctionnalisées avec de l'ADN et clichés de nanoparticules de 8 nm assemblées autour de nanoparticules de 31 nm.<sup>80</sup>

Une nouvelle stratégie de construction des nanostructures à base d'ADN a été abordée par Paul Rothmund. Rothmund et ses collaborateurs<sup>81</sup> ont réalisé d'étonnantes collections d'œuvre d'art: des «smileys», des étoiles... En utilisant l'ADN du bactériophage M13 de 7.2 kb et en l'hybridant avec plusieurs petits brins d'ADN, des structures de dimension nanométrique ont été réalisées (figure I.14). La méthode consiste à plier un brin pour former une sorte de trame d'où le nom «d'origami».

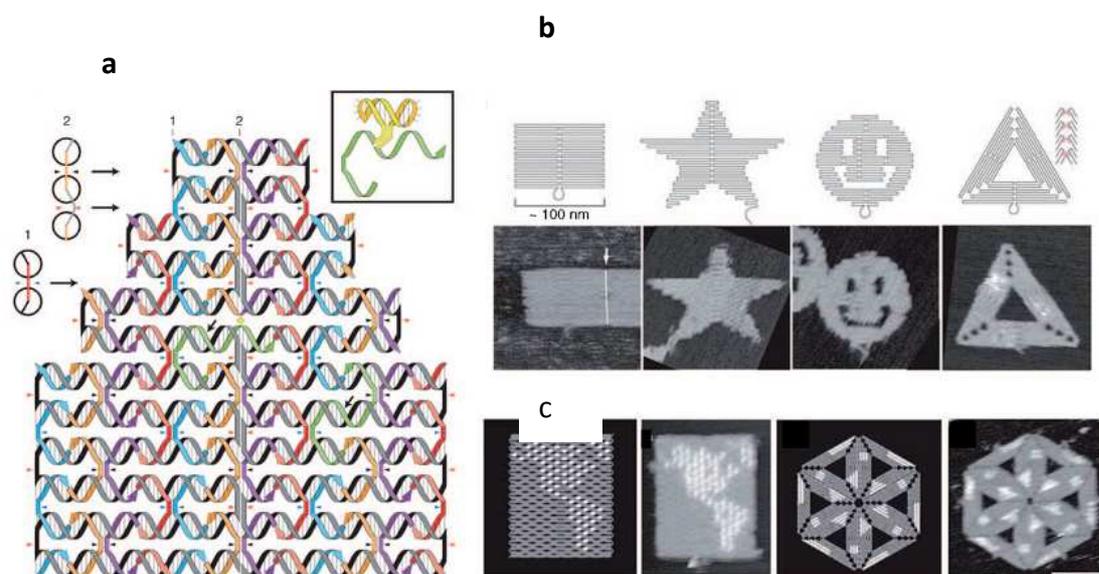


Figure 1.14. Méthode de l'origami d'ADN. (a) géométrie de l'origami d'ADN. Le bactériophage M13 a été arrangé en une structure en deux dimensions en utilisant des brins complémentaires spécifiques, (b) Design et images AFM de rectangle, de smiley, d'étoile, (c) Dessin obtenu par le pliage d'ADN par l'introduction de structure en épingle à cheveux.<sup>81</sup>

### III. Les copolymères hybrides à base de biomolécules

Les copolymères à blocs biohybrides sont une nouvelle classe de polymères résultant de l'association de polymères synthétiques et de biomacromolécules telles que les polypeptides, les polynucléotides ou les polysaccharides. De nombreux noms tels que «chimères macromoléculaires» ou «polymères-bioconjugués» ont été utilisés pour se référer à ceux-ci dans une littérature sans cesse croissante.<sup>82,83</sup> La combinaison de polymères synthétiques aux biomolécules naturelles fournit des matériaux fonctionnels avancés avec un haut niveau de contrôle des structures et une activité biologique spécifique.

La nature offre de nombreux biopolymères capables non seulement de s'auto-structurer mais aussi avec une activité biologique telle que la reconnaissance ou la biocatalyse. Beaucoup de polypeptides et polysaccharides possèdent d'excellentes propriétés mécaniques. Ces biopolymères jouent un grand rôle dans la construction des biomatériaux tels que la soie, les colles, la chitine,...etc. Les caractéristiques les plus remarquables des peptides et oligonucléotides naturels reposent sur leur structure primaire (séquence d'acides aminés ou de nucléotides). Cette structure peut être convertie en des formes et fonctions spécifiques.

### III.1. Les peptides

Les peptides sont des polymères constitués d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Les polypeptides possèdent une organisation tridimensionnelle qui leur est propre. De la séquence au repliement, 4 niveaux de structuration sont distingués. La Figure I.15 regroupe les différents niveaux de structuration. On parle de structure primaire à quaternaire selon l'échelle à laquelle est regardée l'organisation. Il existe trois principales catégories de structures secondaires selon l'échafaudage de liaisons hydrogènes, et donc selon le repliement des liaisons peptidiques: les hélices  $\alpha$ , les feuillets  $\beta$  et les pelotes statistiques (Figure I.16).

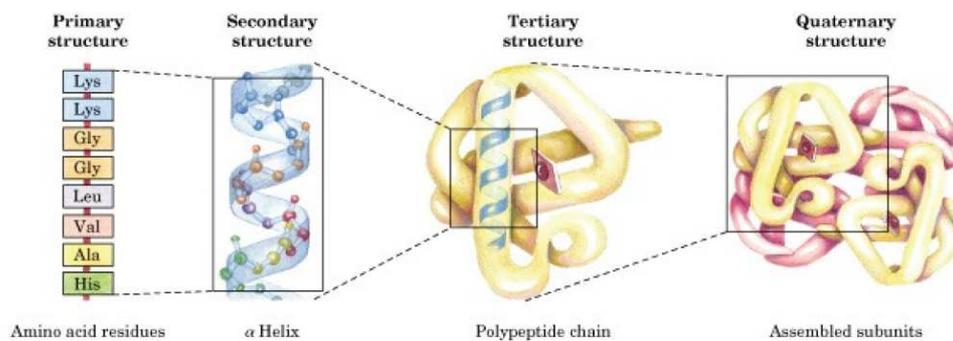


Figure I.15. Schéma récapitulant les différents niveaux de structuration des polypeptides.<sup>84</sup>

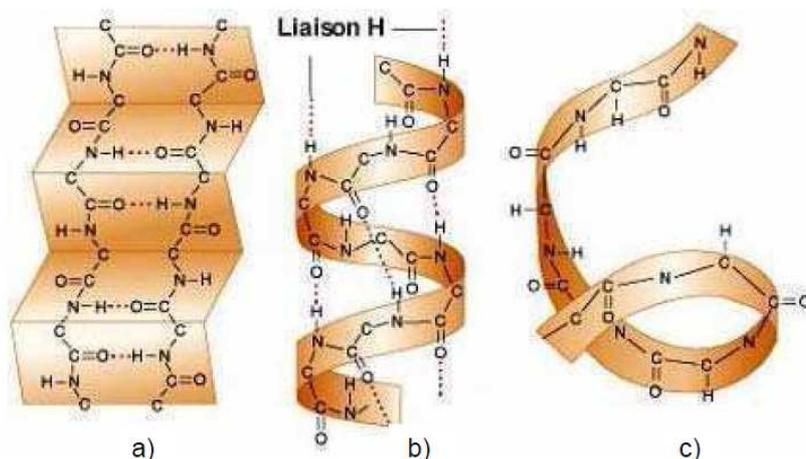


Figure I.16. Structures secondaires des polypeptides. (a) Feuillet  $\beta$ , (b) Hélice  $\alpha$ . (c) pelote statistique

Certains homopolypeptides c'est-à-dire constitués d'un seul type d'acide  $\alpha$  aminé sont capables de transiter d'une structure secondaire à une autre suivant la nature du solvant ou des conditions expérimentales (pH, température, force ionique...). La présence d'un bloc peptidique possédant des propriétés de structuration au sein des copolymères à blocs hybrides constitue une composante intéres-

sante. A cet effet, les hélices alpha se comportent comme des segments rigides capables de s'agréger, ce qui aura pour conséquence de favoriser la formation de structures supramoléculaires originales. De plus, contrairement à l'ADN, les segments peptidiques peuvent être hydrophiles ou hydrophobes. De ce fait, ils peuvent constituer soit le cœur de l'agrégat ou alors la couronne dans les copolymères à blocs hybrides.

### III.1.1. Copolymères hybrides avec des peptides

#### III.1.1.1. Cas des peptides hydrophiles

L'auto-structuration en solution aqueuse de différents diblocs contenant un peptide hydrophile a été étudiée.<sup>85-87</sup> Des structures vésiculaires et micellaires sont obtenues avec le peptide en contact avec l'eau.

Des structures triblocs ont été également étudiées dans la littérature. C'est ainsi que des vésicules de triblocs poly(L-lysine)-b-poly(tetrahydrofurane)-b-poly(L-lysine) ont été obtenues par l'équipe de Tian (Figure I.17).<sup>88</sup> L'équipe de Nolte a obtenu des morphologies de type bâtonnets à partir du poly(styrène) et des «peptosomes» poly(isocyno-L-alanine-L-alanine) et poly(isocyno-L-alanine-L-histidine). Des vésicules présentant des super-hélices ont également été obtenues lorsque la longueur du bloc poly(isocyanide) a été augmentée.<sup>89</sup>

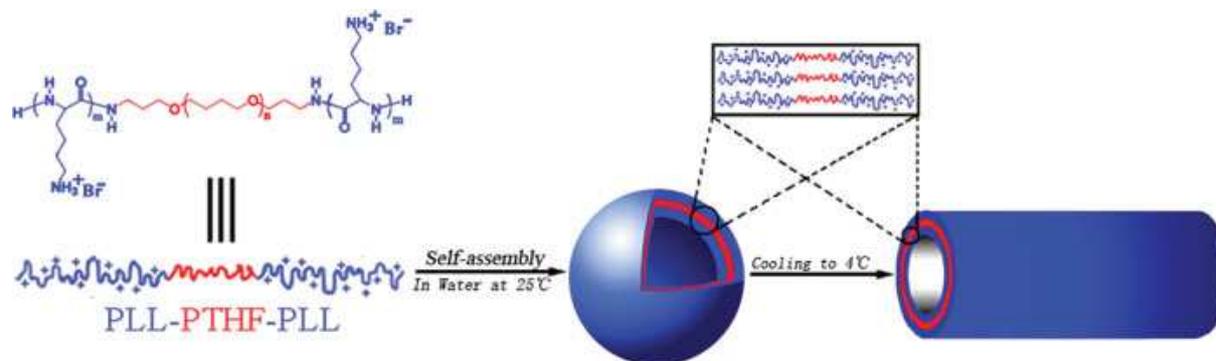


Figure I.17. Description schématique de l'auto-assemblage du triblocs poly(L-lysine)-b-poly(tetrahydrofurane)-b-poly(L-lysine): passage d'une structure vésiculaire à une structure tubulaire sous l'effet de la température du milieu.<sup>88</sup>

#### III.1.1.2. Cas des peptides hydrophobes

Des études d'auto-assemblage de copolymères à blocs présentant un bloc peptidique hydrophobe ont été rapportées dans la littérature.<sup>90-93</sup>

Les copolymères à blocs constitués de deux blocs peptidiques hydrophobes poly( $\epsilon$ -benzyloxycarbonyl L-lysine) (PZLL) liés de façon covalente à une petite molécule hydrophile la diéthylèneglycolbis[3-

aminopropyl]ether (DGBE) forment en solution aqueuse des vésicules. Les blocs hydrophobes PZLL forment la bicouche hydrophobe créant ainsi une morphologie se rapprochant des phospholipides dans les membranes liposomales. Lorsque la longueur du bloc peptidique augmente, de grosses micelles sont plutôt observées (Figure I.18).<sup>94</sup> Le tribloc PZLL-PEO-PZLL forme également des vésicules et d'autres morphologies suivant les conditions de préparation.<sup>95</sup>

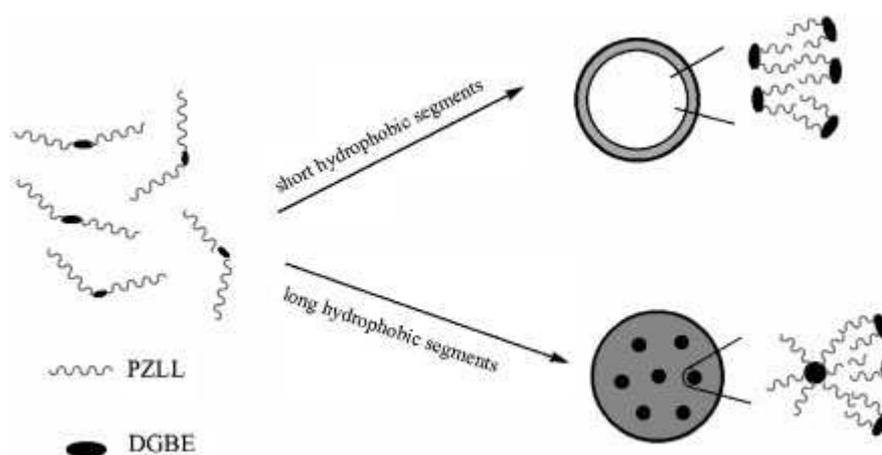


Figure I.18. Formation de vésicules et de grosses micelles à partir du PZLL-DGBE-PZLL (PZLL = poly( $\epsilon$ -benzyloxycarbonyl L-lysine); DGBE = diéthylénegcolbis[3-aminopropyl]ether).<sup>94</sup>

### III.1.1.3. Cas des copolypeptides à blocs

L'équipe de Deming a décrit l'auto-assemblage de copolypeptides à blocs obtenus à partir d'une variété de combinaisons entre différents peptides hydrophobes et hydrophiles. Les segments peptidiques chargés tels que la poly(lysine), poly(arginine) ou poly(glutamate) constituent le bloc hydrophile. Contrairement aux copolymères hybrides avec des polymères synthétiques hydrophiles, les vésicules sont obtenues pour des blocs hydrophiles relativement grands. Une série de copolypeptides à blocs constitués d'un bloc leucine et d'un autre à base de lysine noté poly(L-lysine)<sub>x</sub>-b-poly(L-leucine)<sub>y</sub> où x varie de 20 à 80 et y = 20 a été étudiée. Pour une valeur de x = 60 et y = 20, des vésicules «géantes» ont été observées (Figure I.19). Les blocs poly(leucine) hydrophobes adoptent une conformation en hélice  $\alpha$  et vont former la partie centrale de la membrane des vésicules.<sup>96</sup> La diminution de la longueur du bloc hydrophobe poly(L-leucine) c'est-à-dire pour y = 10 conduit à des micelles. Des vésicules de l'ordre du micromètre ont été également obtenues à partir de copolypeptides à blocs poly(L-lysine)-b-poly(phénylalanine) (PLL-b-PPA).<sup>97</sup>

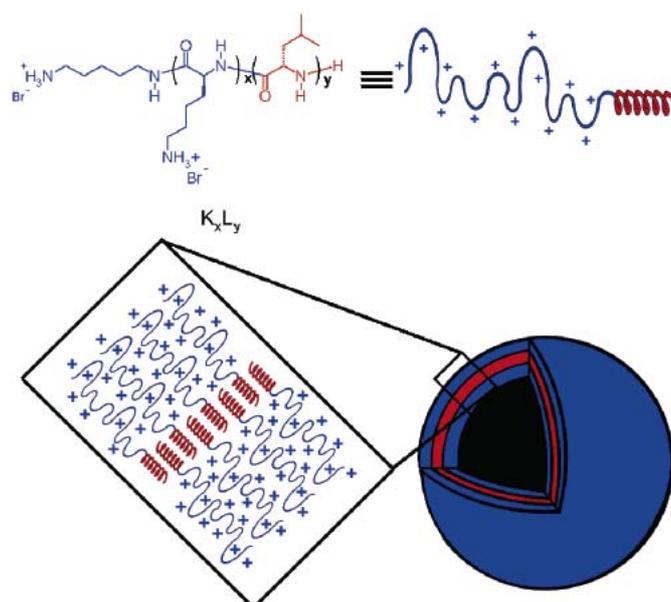


Figure 1.19. Représentation schématique de la structure vésiculaire obtenue à partir du copolypeptide à blocs poly(L-lysine)<sub>60</sub>-b-poly(L-leucine)<sub>20</sub>.<sup>96</sup>

#### III.1.1.4. Copolymères à blocs contenant des peptides ou protéines naturelles

Les peptides naturels ont été tout d'abord conjugués au poly(oxyde d'éthylène) dans le but d'améliorer leur stabilité ou de réduire leur immunogénicité. Ils ont été par la suite utilisés pour former des assemblages supramoléculaires, le but étant de garder la conformation active du peptide dans un agrégat stable. Différentes équipes se sont intéressées à l'auto-assemblage de copolymères à blocs possédant un peptide naturel<sup>98-101</sup> ou une protéine naturelle.<sup>102</sup>

#### III.1.1.5. Copolymères à blocs à base de polysaccharides et de polypeptides

Les polysaccharides sont impliqués dans de nombreux processus biologiques à savoir réserve énergétique, maintien mécanique,... En solution dans l'eau, les polysaccharides tendent à adopter des structures plus ou moins pelotonnées. Ils sont capables de prendre une énorme variété de formes tridimensionnelles, du fait d'un haut degré de liberté conformationnelle autour de chaque liaison.<sup>103,104</sup> Toutefois, la chimie des polysaccharides est très complexe et les polysaccharides ont rarement été conjugués aux polymères.

Très récemment, l'équipe de Lecommandoux a effectué le couplage par chimie «click» du dextran<sup>105</sup> et de l'acide hyaluronique<sup>106</sup> au poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate). Ils ont montré qu'en solution aqueuse, ces copolymères s'auto-structurent pour donner des vésicules de diamètre entre 100-200 nm. De tels hybrides présentent une structure proche des glycoprotéines et leurs structures vésiculaires pourraient être utilisées comme modèles afin de mimer les capsides virales.

### III.1.2. Vers la formation d'agrégats intelligents

Les liaisons hydrogène dans les polypeptides peuvent être rompues par une variation de la température ou encore du pH conduisant ainsi à un changement de conformation du polypeptide. De manière intéressante, cette sensibilité au pH des polypeptides reste maintenue même à des forces ioniques élevées contrairement aux polyélectrolytes.<sup>21,107</sup> De plus, les polymères synthétiques ne présentent aucune structure secondaire et la seule transition existante est la transition "rod-coil" (bâtonnet-globule).<sup>108</sup>

De nombreuses études ont été effectuées par différents groupes sur l'auto-structuration en solution aqueuse des copolymères à blocs à base de polypeptides sensibles au pH. Le plus souvent, le bloc hydrophile utilisé est un segment polypeptidique chargé.<sup>21,85,109-111</sup> Dans certaines études, c'est le polymère synthétique tel que le poly(acide acrylique) qui est sensible au pH.<sup>112</sup>

Des polymères synthétiques possédant une LCST (Lower Critical Solution Temperature) tels que la jeffamine, le poly(propylène oxyde) ou le pNIPAM ont été couplés à des biopolymères hydrophiles donnant ainsi lieu à des copolymères à blocs «double hydrophile». Ces copolymères sont solubles dans l'eau à  $T < LCST$ . A  $T > LCST$ , ils s'auto-assemblent de manière réversible pour former des micelles ou des vésicules.<sup>90,113</sup> L'un des avantages de cette double hydrophilie repose sur la facilité de la synthèse du fait de la compatibilité des deux blocs pour le même solvant.

La combinaison de polymères synthétiques pH-sensibles aux polypeptides sensibles également au pH donne lieu à des micelles «schizophrènes», où chaque bloc peut former soit le cœur ou la couronne de la micelle en fonction des conditions de pH et de température. A cet effet, l'équipe de Lecommandoux<sup>16</sup> a rapporté la nature schizophrène du PALG-*b*-PLL (Figure I.20). Ce copolypeptide s'auto-assemble de manière réversible en vésicules aussi bien à pH faible ( $pH < 4$ ) qu'à pH élevé ( $pH > 10$ ). Ce caractère schizophrène de copolymères à blocs a été rapporté par d'autres équipes.<sup>114-116</sup>

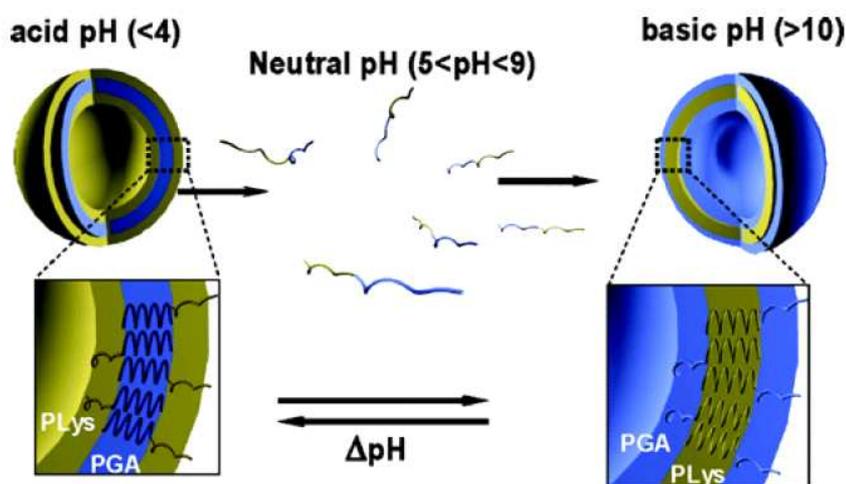


Figure I.20. Représentation schématique de l'auto-assemblage en vésicules «schizophrènes» du dibloc poly(acide L-glutamique)<sub>15</sub>-b-poly(L-lysine)<sub>15</sub>. Les noms PGA et PLys correspondent respectivement aux noms PALG et PLL abrégés dans le texte.<sup>16</sup>

Börner<sup>117</sup> a démontré que les conjugués PEO-peptide peuvent répondre à des stimuli biologiques. Par exemple, en phosphorylant des sites spécifiques situés sur le segment peptidique, le domaine d'agrégation présent dans le peptide conjugué au PEO peut être évité. Sous l'action de la phosphatase, la déphosphorylation apparaît, déclenchant ainsi une agrégation en structure fibrillaires. Par conséquent, l'utilisation de séquences bien définies en peptides dans l'auto-assemblage est d'un grand intérêt pour le développement de systèmes capables d'interactions avec l'environnement biologique.

### III.2. L'ADN

Contrairement aux cas des peptides, les copolymères à blocs hybrides avec des oligonucléotides (abrégé «ODN») ont été très peu étudiés. Ceci est dû au fait que l'échelle de synthèse des oligonucléotides est encore limitée. Les premières études rapportées dans la littérature sur les conjugués ADN-polymères datent des années 1980. Des oligonucléotides ont été greffés sur le squelette de la poly(L-lysine) et utilisés comme agents antiviraux pour inhiber la synthèse de protéines du virus de la stomatite vésiculaire.<sup>118,119</sup> Depuis ce temps, différentes applications de ces matériaux ont vu le jour. Elles vont de la purification de biomatériaux à la détection de la molécule d'ADN en passant par la délivrance des oligonucléotides. Ces applications seront développées plus loin dans les paragraphes.

Les copolymères à blocs amphiphiles ADN-polymères, tout comme les polyélectrolytes conventionnels, peuvent s'auto-assembler en solution aqueuse pour donner des micelles sphériques. Les micelles de poly(D,L-acide lactique-co-glycolique)-Oligonucléotide (PLGA-ODN),<sup>120</sup> de

PS-ODN,<sup>121</sup> PPO-ODN,<sup>122</sup> et PBU-ODN<sup>123</sup> ont été rapportées dans la littérature. La taille des oligonucléotides peut être étendue à partir des micelles de manière contrôlée par l'action d'une ADN polymérase (voir Figure I.21)<sup>124</sup>. La croissance de l'oligonucléotide et par conséquent de la taille des micelles peut être suivie par microscopie à force atomique.

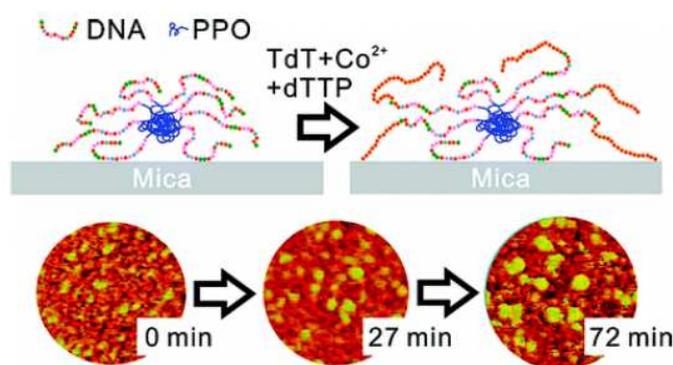


Figure I.21. Représentation schématique de la croissance des micelles de PPO-b-ODN sous l'action d'une polymérase et images AFM correspondantes.<sup>124</sup>

Les formes des agrégats issus des copolymères à blocs à base d'ADN peuvent être modifiées par hybridation. Ainsi, l'hybridation de micelles avec un ODN complémentaire long induit la formation d'agrégats en forme de bâtonnets (figure I.22b).<sup>125</sup>

Le dibloc formé de poly(butadiène)-b-cytidine<sub>12</sub> forme des vésicules de diamètre ~ 80 nm. De larges structures résultant d'une organisation complexe de petites vésicules entre elles ont été également observées.<sup>123</sup> Un agent chélateur d'ADN fluorescent a été utilisé pour visualiser le bloc cytidine dans le copolymère. La combinaison d'une sonde fluorescente hydrophobe et du chélateur d'ADN a permis d'observer les domaines hydrophile et hydrophobe des vésicules par microscopie confocale à balayage laser.

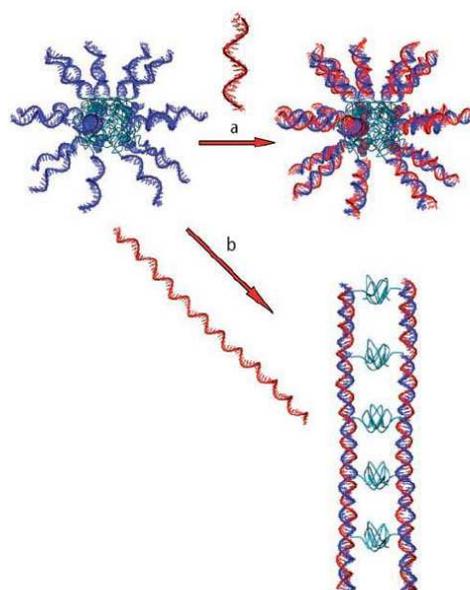


Figure I.22. Représentation schématique de l'hybridation de micelles de PPO-*b*-ODN avec différentes longueurs d'ODN. (a) Paires de bases de Watson-Crick formées avec un ODN complémentaire court conduisant à des micelles possédant une couronne en double hélice. (b) Hybridation avec un ODN beaucoup plus long conduit à la formation d'agrégats en forme de bâtonnets caractérisés par deux doubles hélices parallèles.<sup>125</sup>

Le dibloc formé de poly(butadiène)-*b*-cytidine<sub>12</sub> forme des structures vésiculaires de diamètre d'environ 80 nm. De larges structures résultant d'une organisation complexe de petites vésicules entre elles ont été également observées.<sup>123</sup> Un agent chélateur d'ADN fluorescent a été utilisé pour visualiser le bloc cytidine dans le copolymère. La combinaison d'une sonde fluorescente hydrophobe et du chélateur d'ADN a permis d'observer les domaines hydrophile et hydrophobe des vésicules par microscopie confocale à balayage laser.

### III.3. Applications de copolymères à blocs biohybrides

#### III.3.1 Vecteurs de principes actifs ou d'ADN

##### III.3.1.1. Cas des copolymères à base de peptides

De nombreux systèmes micellaires basés sur l'utilisation des poly(acides aminés) pour former le cœur de la micelle ont été étudiés. Le plus souvent ces poly(acides aminés) ont été couplés au PEO ou à la poly(vinylpyrrolidone).<sup>126</sup> Ces chaînes PEO sont biocompatibles et permettent d'augmenter la furtivité des micelles vis-à-vis des systèmes de défense biologique. A cet effet, Kataoka et son équipe ont utilisé les micelles de PLGA-*b*-PEO et des diblocs et triblocs de PEO et poly ( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)

(PBLG) pour encapsuler de nombreux principes actifs tels que l'indométhacine, la doxorubicine, le clonazepam ou la norfloraxin.<sup>127-129</sup>

L'équipe de Lecommandoux a introduit le dibloc PBLG<sub>23</sub>-*b*-hyaluronan<sub>10</sub>. Ce dibloc forme de petites vésicules utilisées pour des applications de délivrance de médicaments.<sup>106</sup> L'une des caractéristiques remarquable de ces systèmes est que le bloc hydrophile polysaccharide agit comme biorécepteur mais aussi comme agent stabilisant. Ces polymersomes peuvent encapsuler de grandes quantités de doxorubicine (12% de leur propre masse molaire) sans changements significatifs de morphologies (Figure I.23).

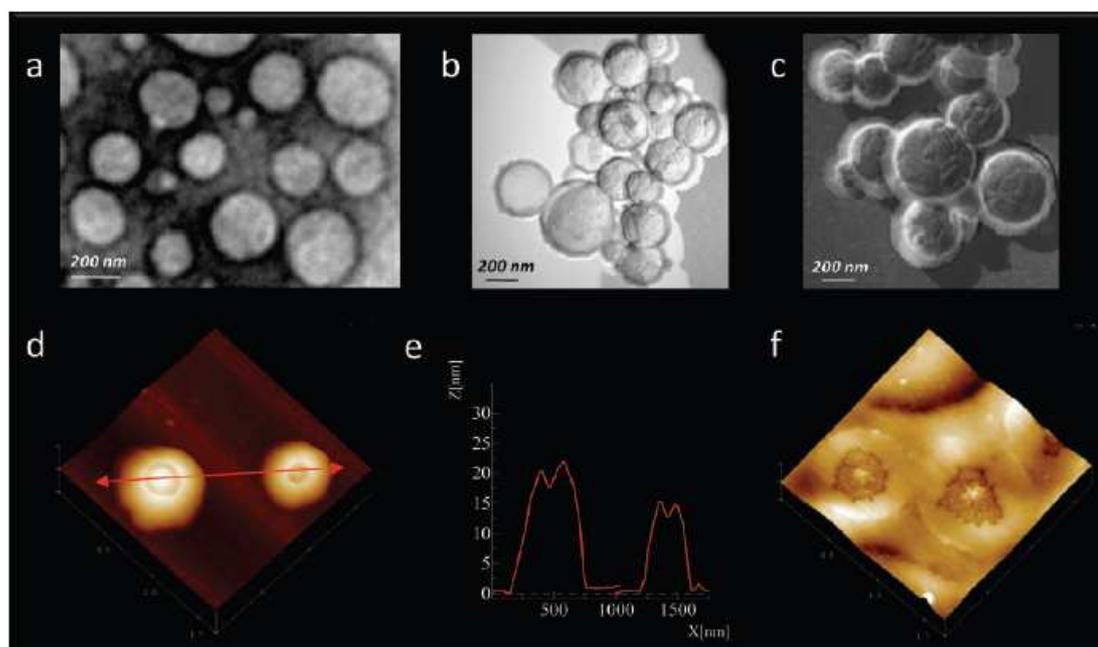


Figure I.23. Polymersomes PBLG<sub>23</sub>-*b*-hyaluronan<sub>10</sub> obtenues par (a) MET, (b) Cryo-MET, et (d) AFM. (e) Section obtenue avec les images AFM, (d) Doxorubicine encapsulée dans les polymersomes observée par (c) Cryo-MET et (f) AFM.<sup>106</sup>

Une autre façon de vectoriser les principes actifs c'est de former les complexes de polyions. Ces derniers peuvent être utilisés comme vecteurs pour la thérapie génique. Par exemple, les copolymères à blocs composés d'un peptide chargé positivement et d'un bloc PEO sont capables de complexer des biomolécules chargées négativement telles que l'ADN pour former des complexes de polyions (PIC). C'est ainsi qu'un nano-vecteur prometteur résultant de la complexation d'ADN avec le copolymère PEO-*b*-PLL a été rapporté dans la littérature.<sup>130,131</sup>

Les études entreprises sur la cytotoxicité des micelles biohybrides à base de poly(acides aminés) révèlent que celle-ci est généralement faible.<sup>126</sup> L'utilisation d'espèces cationiques pour la délivrance de médicaments est généralement proscrite en raison de leur toxicité élevée. Toutefois, il a été observé

que l'auto-assemblage de segments polycationiques diminue leur toxicité en particulier pour les polymères lysine. En effet les peptides cationiques ont tendance à s'agréger déclenchant ainsi des réponses immunogènes dans l'organisme.

De nombreux systèmes micellaires de polymères ont été élaborés dans le but d'encapsuler et d'administrer de façon contrôlée les principes actifs. Toutefois dans la «vraie vie», une seule application a vu le jour et le chemin reste encore long. De nos jours, les systèmes de délivrance de médicaments anticancéreux utilisant les polypeptides se trouvant aux stades cliniques les plus avancées sont ceux conjugués au PEO.<sup>132</sup> Par exemple, NK-012, un système constitué de poly(L-glutamate)-b-PEO est actuellement en phase clinique 2. Dans ce système, le médicament anticancéreux, SN-38, est encapsulé dans le cœur PALG de la micelle. Un autre système, NK-105, aussi en phase clinique 2, est constitué de copolymères à blocs PEO-b-poly(Asp).

### III.3.1.2. Cas des copolymères à base d'ADN

L'utilisation des copolymères à blocs à base d'ADN peut être très avantageuse pour des applications de vectorisation de médicaments. En effet, la couronne constituée d'oligonucléotides simples brin, noté «ODN» peut être facilement hybridée par des brins complémentaires portant des groupements de ciblage ou des «rapporteurs fonctionnels». Aujourd'hui, à notre connaissance, un seul exemple de micelles de copolymères à base d'ADN a été développé en vue de son utilisation comme nanovecteur.<sup>125</sup> Les brins d'oligonucléotides complémentaires fonctionnalisés avec de l'acide folique à leur extrémité 5' ou 3' ont été hybridés sur les brins des micelles ODN-b-PPO, permettant ainsi une localisation précise des groupements folates à la périphérie ou à proximité du cœur de la micelle (Figure I.24).<sup>133</sup>

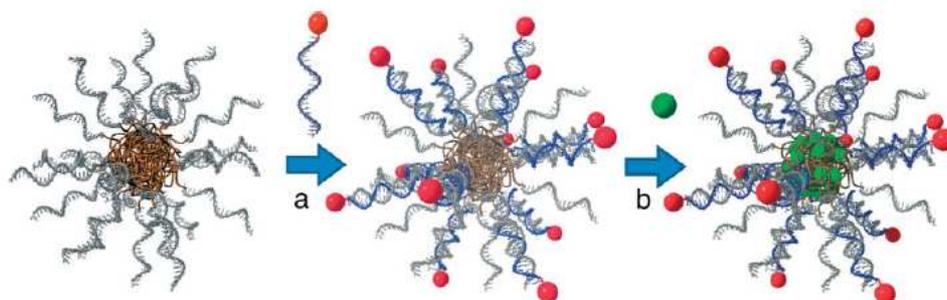


Figure I.24. Représentation schématique du système de délivrance de médicaments à base de copolymères à blocs d'ADN. (a) Hybridation des brins complémentaires fonctionnalisés avec de l'acide folique (ronds rouges sur les brins des micelles ODN-b-PPO). (b) Encapsulation de la doxorubicine (ronds verts) dans le cœur hydrophobe de la micelle.<sup>133</sup>

La mortalité cellulaire suite à l'exposition des micelles chargées de doxorubicine avec ou sans conjugaison à l'acide folique a été étudiée. L'étude a montré une augmentation significative de l'efficacité de la délivrance de la DOX lorsque les micelles étaient conjuguées à des acides foliques. Les études de cytotoxicité des micelles de ODN-b-PPO ont montré qu'elles étaient non toxiques.<sup>125</sup>

Jeong et Park<sup>120</sup> se sont intéressés à la stratégie antisens. Ils ont couplé un ADN antisens simple brin ( $ADN_{AS}Sb$ ) au PLGA. Les études *in vitro* de l'adsorption cellulaire dans les fibroblastes des souris NIH3T3 ont montré que les micelles étaient transportées dans les cellules plus efficacement que l'ODN libre. La délivrance de l' $ADN_{AS}Sb$  résulte de la dégradation enzymatique du bloc polyester PLGA.

### III.3.2. Purification de biomatériaux

Freitag et son équipe ont synthétisé le dibloc thermosensible ADN-b-pNIPAM pour la purification de biomacromolécules.<sup>134</sup> L'hybridation d'un ADN double brin plasmidique à l'ADN du dibloc conduit à la formation d'une triple hélice. A température élevée ( $T > LCST$  du pNIPAM), le complexe formé précipite. Le plasmide cible est libéré en faisant varier le pH de la solution (Figure I.25). Ce système est un système prometteur qui pourrait être utilisé pour fournir en grandes quantités des ADN plasmidiques dans le domaine pharmaceutique. Une autre équipe s'est intéressée à un système similaire en greffant de part et d'autre de l'ADN double brin, des chaînes de polymères de pNIPAM. Ce système a été utilisé pour la séparation de protéines liées aux molécules d'ADN en utilisant le principe de précipitation par affinité.<sup>135</sup>

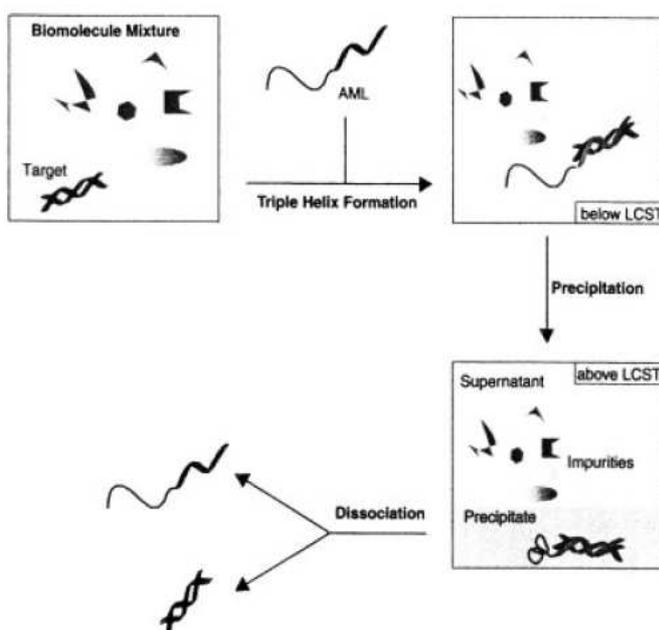


Figure I.25. Principe de purification par formation d'une triple hélice. LCST : «Lower Critical Solution Temperature», AML : «Affinity Macro Ligand» = dibloc pNIPAM-ADN.<sup>134</sup>

### III.3.3 “Chimie dirigée”

Les structures mésoscopiques organisées de copolymères à blocs sont couramment utilisées comme nanoréacteurs pour la synthèse de matériaux organiques ou inorganiques ou encore comme échafaudages dans la structure de composites. Les propriétés spécifiques des biomolécules (ADN, peptides) telles que la chiralité, haut degré d’organisation spatiale ou encore leur reconnaissance pour des séquences spécifiques, peuvent certainement apporter d’autres valeurs aux copolymères à blocs biohybrides pour ce type d’applications. Pourtant, les exemples discutés plus bas, montrent que cette vaste potentialité a été très peu explorée.

L’équipe de Lecommandoux s’est intéressée à la synthèse de nanoparticules magnétiques *via* l’auto-organisation en milieu aqueux de dibloc poly(butadiène)-*b*-Poly(acide L-glutamate) et de ferrofluides. De larges micelles (diamètre de l’ordre de 200 nm) contenant des nanoparticules ont été obtenues avec les diblocs PBU<sub>114</sub>-*b*-PALG<sub>56</sub> et PBU<sub>48</sub>-*b*-PALG<sub>145</sub>. Les diblocs PBU<sub>48</sub>-*b*-PALG<sub>56</sub> ont donné des vésicules avec une bicouche membranaire magnétique déformable.<sup>136</sup>

Deming et ses collaborateurs ont conçu des copolymères à blocs amphiphiles de poly(cystéine)-*b*-poly(lysine) capables de diriger la synthèse de silice.<sup>137</sup> Ils ont montré à travers cette étude que l’émulsion de la molécule tétraéthoxysilane dans une solution aqueuse de micelles de copolypeptides mime la biosynthèse de la silice (Figure I.26) comme la silicatéine, protéine naturelle catalysant la formation de silice dans les éponges.

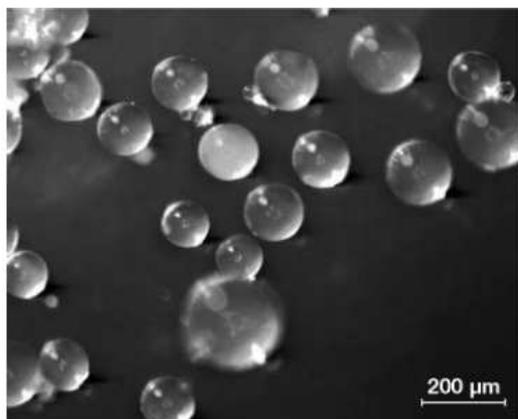


Figure I.26. Images TEM des différentes formes de silice obtenues par émulsion de la tétraéthoxysilane dans des micelles de copolypeptides.<sup>137</sup>

Shantz et ses collaborateurs ont obtenu une série de nanosphères creuses inorganiques en présence de copolymères à blocs poly(lysine)-*b*-poly(phenylalanine).<sup>138</sup> Ils ont montré que la morphologie des nanosphères (taille de la cavité, épaisseur de la couronne) peut être contrôlée par l’utilisation de copolymère à blocs.

Les copolymères à blocs à base d'oligonucléotides ont été également utilisés comme nanoréacteurs. C'est ainsi que, les diblocs PPO-ODN développés par le groupe d'Hermann ont été initialement utilisés comme système «catalytique» pour promouvoir le couplage chimique entre deux réactifs.<sup>122</sup> Les oligonucléotides formant la couronne ont été hybridés à des brins complémentaires fonctionnalisés avec l'un ou l'autre réactif. Le groupe a montré que le couplage des réactifs avait lieu.

Par ailleurs, la formation d'assemblages obtenus à partir de micelles de copolymères à base d'ADN et de brins d'ADN fonctionnalisés de nanoparticules a été décrite dans la littérature.<sup>121</sup> Les agrégats de micelles décorées de nanoparticules d'or peuvent être désassemblés de manière réversible en chauffant les agrégats au dessus de la température de melting des oligonucléotides (Figure I.27).

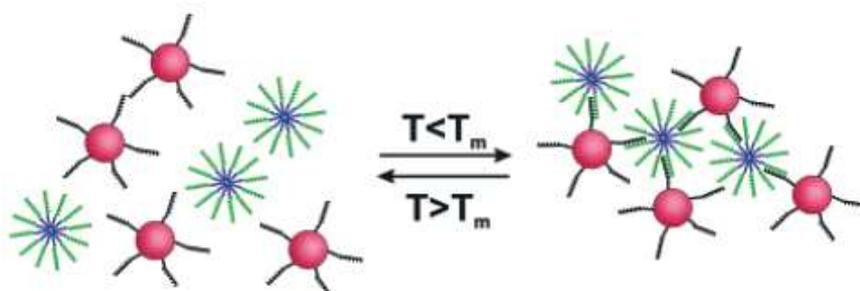


Figure I.27. Formation d'assemblages de micelles décorées de nanoparticules d'or par hybridation de brins complémentaires fonctionnalisés de nanoparticules d'or aux micelles de copolymères à blocs.<sup>121</sup>

## Conclusion et objectifs de la thèse

Nous avons vu dans ce chapitre bibliographie que les copolymères à blocs biohybrides ont trouvé des applications dans de nombreux domaines notamment dans la vectorisation des médicaments. Les copolymères à blocs à base de peptides ont été largement explorés à ces fins. En effet, la transition d'une structure secondaire à une autre des peptides, suite à une modification de l'environnement (température, pH, ...) permet non seulement de contrôler la structure de l'assemblage des agrégats mais aussi de déstabiliser ceux-ci dans des conditions précises en vue de délivrer de manière contrôlée le principe actif encapsulé dans l'agrégat.

Contrairement aux cas des peptides, les copolymères à blocs possédant un oligonucléotide comme biomolécule ont été très peu étudiés. Toutefois, les applications de ces derniers semblent très prometteuses compte tenu de la propriété de reconnaissance unique de la molécule d'ADN, les rendant ainsi hautement modulables et permettant un contrôle facile de fonctionnalisation à la surface. En effet, les micelles et vésicules formées à partir de ces copolymères présentent une couronne constituée d'ADN simple brin disponible, capable de s'hybrider avec les brins complémentaires fonctionnalisés avec différents types d'unités fonctionnelles tels que: l'acide folique pour des ciblage cellulaires spécifiques, des réactifs pour des conjugaisons chimiques, etc. Les applications potentielles de ce type de matériau sont sans aucun doute nombreuses. On peut les utiliser pour vectoriser des médicaments, dans la stratégie antisens, la détection d'ADN ou encore comme nanoréacteurs.

Toutefois, les agrégats obtenus à partir de ces copolymères nécessitent une attention particulière notamment dans leur caractérisation physico-chimique en vue de leurs applications plus particulièrement dans la vectorisation. L'objectif de cette thèse est d'étudier l'auto-assemblage de copolymères à base d'oligonucléotides.

Dans un premier temps, nous avons cherché à obtenir une librairie de copolymères-ADN. Pour cela, nous avons utilisé différentes stratégies de synthèse en couplant soit des blocs polymères hydrophobes ou des diblocs aux oligonucléotides. Cette partie sera développée dans le **Chapitre II**.

Dans le **Chapitre III**, nous avons caractérisé les agrégats obtenus en solution aqueuse. Pour cela, diverses techniques de diffusion et de microscopies ont été utilisées.

Pour finir, nous nous sommes penchés sur les applications potentielles des objets obtenus dans le **Chapitre IV**. Pour ce faire, nous avons utilisé la propriété d'hybridation de l'ADN pour adsorber non seulement les agrégats obtenus sur une surface mais aussi décorer ces agrégats de nanoparticules. Nous avons également regardé si il était possible d'encapsuler une molécule hydrophobe dans ces agrégats.

## Références Bibliographiques

- (1) Schlick, S.; Levy, M. *The Journal of Physical Chemistry* **1960**, *64*, 883.
- (2) Szwarc, M.; Levy, M.; Milkovich, R. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78*, 2656.
- (3) Lodge, T. P. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2003**, *204*, 265.
- (4) Vriezema, D. M.; Comellas Aragonès, M.; Elemans, J. A. A. W.; Cornelissen, J. J. L. M.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1445.
- (5) Li, Z.; Zhao, W.; Liu, Y.; Rafailovich, M. H.; Sokolov, J.; Khougaz, K.; Eisenberg, A.; Lennox, R. B.; Krausch, G. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 10892.
- (6) Massey, J. A.; Winnik, M. A.; Manners, I.; Chan, V. Z. H.; Ostermann, J. M.; Enchelmaier, R.; Spatz, J. P.; Möller, M. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 3147.
- (7) Khandpur, A. K.; Foerster, S.; Bates, F. S.; Hamley, I. W.; Ryan, A. J.; Bras, W.; Almdal, K.; Mortensen, K. *Macromolecules* **1995**, *28*, 8796.
- (8) Lescanec, R. L.; Hajduk, D. A.; Kim, G. Y.; Gan, Y.; Yin, R.; Gruner, S. M.; Hogen-Esch, T. E.; Thomas, E. L. *Macromolecules* **1995**, *28*, 3485.
- (9) Bates, F. S.; Fredrickson, G. H. *Physics Today* **1999**, *52*, 32.
- (10) Tuzar, Z. K., P. Surface and Colloid Science; Plenum Press: New York, 1993; Chap. 1, Ed., 1993.
- (11) Liu, T. L., L. I.; Chu, B. Amphiphilic block copolymers: self-assembly and applications, 2000, Elsevier,; Amsterdam. *elsevier* **2000**.
- (12) Alexandridis, P. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1996**, *1*, 490.
- (13) Chu, B. *Langmuir* **1995**, *11*, 414.
- (14) Riess, G. *Progress in Polymer Science* **2003**, *28*, 1107.
- (15) Schlaad H, K. H.-A., Schlaad H., *Adv. Polym. Sci.* **2006**, 202.
- (16) J. Rodriguez-Hernandez, F. C., Y. Gnanou, S. Lecommandoux, *Prog. Polym. Sci.*,; 2005, 691.
- (17) Majhi, P. R.; Moulik, S. P. *Langmuir* **1998**, *14*, 3986.
- (18) Johnson, B. K.; Prud'homme, R. K. *Physical Review Letters* **2003**, *91*, 118302.
- (19) Nicolai, T.; Colombani, O.; Chassenieux, C. *Soft Matter* **2010**, *6*, 3111.
- (20) Babin, J.; Rodriguez-Hernandez, J.; Lecommandoux, S.; Klok, H.-A.; Achard, M.-F. *Faraday Discussions* **2005**, *128*, 179.
- (21) Chécot, F.; Lecommandoux, S.; Gnanou, Y.; Klok, H.-A. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1339.
- (22) Gnanou, S. *BIOForum Eur.* **2004**, *5*, 2-4.
- (23) Kakizawa, Y.; Kataoka, K. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 203.
- (24) Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G. S. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 169.
- (25) Liggins, R. T.; Burt, H. M. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 191.
- (26) Bertin, P. A.; Watson, K. J.; Nguyen, S. T. *Macromolecules* **2004**, *37*, 8364.
- (27) Park, E. K.; Lee, S. B.; Lee, Y. M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 1053.
- (28) Allen, C.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *16*, 3.

- (29) Aniansson, E. A. G. W., S. N. *J. Phys. Chem* **1974**, 78, 1024.
- (30) Lang, J. T., C., Zana, R.; Bauer, R.; Hoffmann, H.; Ulbricht, W. *J. Phys. Chem* **1975**, 79, 276.
- (31) Muller, N. *J. Phys. Chem* **1972**, 76, 3017.
- (32) Aniansson, E. A. G. W., S. N. *J. Phys. Chem* **1975**, 79, 857.
- (33) Colen, A. H. *J. Phys. Chem* **1974**, 78, 1676.
- (34) Halperin, A.; Alexander, S. *Macromolecules* **1989**, 22, 2403.
- (35) Dormidontova, E. E. *Macromolecules* **1999**, 32, 7630.
- (36) HaliloÇşlu, T. r.; Bahar, I.; Erman, B.; Mattice, W. L. *Macromolecules* **1996**, 29, 4764.
- (37) Nyrkova, I. A.; Semenov, A. N. *Faraday Discussions* **2005**, 128, 113.
- (38) Nyrkova, I. A.; Semenov, A. N. *Macromolecular Theory and Simulations* **2005**, 14, 569.
- (39) Nyrkova, I. A.; Semenov, A. N. *Eur. Phys. J. E* **2005**, 17, 327.
- (40) T. Nose and K. Iyama, C. T. P. S., 2000, 10, 249–257.
- (41) Y. Wang, R. B., R. P. Quirk and; W. L. Mattice, P. B., 1992, 28,; 333–338.
- (42) van Stam, J.; Creutz, S.; De Schryver, F. C.; JÃ©rÃ©me, R. *Macromolecules* **2000**, 33, 6388.
- (43) Leibler, L.; Orland, H.; Wheeler, J. C. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, 79, 3550.
- (44) Nagarajan, R.; Ganesh, K. *Macromolecules* **1989**, 22, 4312.
- (45) Israelachvili, J. N., Intermolecular and surfaces forces. Hartcourt Brace & Company: London, 1992.
- (46) Discher, D. E.; Eisenberg, A. *Science* **2002**, 297, 967.
- (47) Discher, D. E.; Ahmed, F. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2006**, 8, 323.
- (48) Shen, H.; Eisenberg, A. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, 9473.
- (49) Berry, G. C. *The Journal of Chemical Physics* **1966**, 44, 4550.
- (50) Zupancich, J. A.; Bates, F. S.; Hillmyer, M. A. *Macromolecules* **2006**, 39, 4286.
- (51) Zhang, L.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1996**, 29, 8805.
- (52) J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids : A structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953.
- (53) Biologie moléculaire de la cellule Par Harvey Lodish, A. B., Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, James Darnell.
- (54) Wolfram Saenger. Principles of nucleic acid structure. Springer-Verlag, N. Y., 1984.
- (55) Wilson, K. M. V. a. J. H. *Techniques* **1998**, 23, 4.
- (56) Manning, G. S. *The Journal of Chemical Physics* **1969**, 51, 924.
- (57) Manning, G. S. *The Journal of Chemical Physics* **1969**, 51, 934.
- (58) Manning, G. S. *The Journal of Chemical Physics* **1969**, 51, 3249.
- (59) Gelbart, W. M.; Bruinsma, R. F.; Pincus, P. A.; Parsegian, V. A. *Physics Today* **2000**, 53, 38.
- (60) Ott, A.; Magnasco, M.; Simon, A.; Libchaber, A. *Physical Review E* **1993**, 48, R1642.
- (61) Steven B. Smith, Y. C., Carlos Bustamant *Science* **1996**, 271, 795.
- (62) Baumann, C. G.; Smith, S. B.; Bloomfield, V. A.; Bustamante, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, 94, 6185.

- (63) Kreiss, P.; Bettan, M.; Crouzet, J.; Scherman, D. *The Journal of Gene Medicine* **1999**, *1*, 245.
- (64) Delattre, J., Couvreur P., Puisieux, F.; Philippot, J.-R. et Schuber. F. (1993). Les liposomes, aspects technologiques, biologiques et phannacoloyiques. Les éditions; Paris, N.
- (65) Sorscher, *Human gene therapy* **1994**, *5*, 1259.
- (66) Nakao, A.; Kasuya, H.; Sahin, T. T.; Nomura, N.; Kanzaki, A.; Misawa, M.; Shirota, T.; Yamada, S.; Fujii, T.; Sugimoto, H.; Shikano, T.; Nomoto, S.; Takeda, S.; Kodera, Y.; Nishiyama, Y. *Cancer Gene Ther*, *18*, 167.
- (67) Tan Seok Shin, Z. N. A. a. M. A. M. L. *Pertanika J.Sci & Technol* **2011**, *19*, 129.
- (68) Grez, M.; Reichenbach, J.; Schwable, J.; Seger, R.; Dinauer, M. C.; Thrasher, A. J. *Mol Ther*, *19*, 28.
- (69) Lukacs, G. L.; Haggie, P.; Seksek, O.; Lechardeur, D.; Freedman, N.; Verkman, A. S. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 1625.
- (70) Neves, C.; Escriou, V.; Byk, G.; Scherman, D.; Wils, P. *Cell Biology and Toxicology* **1999**, *15*, 193.
- (71) LECHARDEUR, D., SOHN, K. J., HAARDT, M. et al. *Gene Therapy* **1999**, *6*, 482.
- (72) Clare E. Thomas, A. E. a. M. A. K. *Nature* **2003**, *4*, 346.
- (73) De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Hennink, W. E. *Pharmaceutical Research* **2000**, *17*, 113.
- (74) Uherek, C.; Wels, W. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *44*, 153.
- (75) Pedroso de Lima, M. C.; Simões, S.; Pires, P.; Faneca, H.; Düzgünes, N. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *47*, 277.
- (76) Seeman, N. C. *Journal of Theoretical Biology* **1982**, *99*, 237.
- (77) Seeman, N. C. *Nature* **2003**, *421*, 427.
- (78) Jin, R.; Wu, G.; Li, Z.; Mirkin, C. A.; Schatz, G. C. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 1643.
- (79) Storhoff, J. J.; Lazarides, A. A.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Schatz, G. C. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 4640.
- (80) Huo, F.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. *Advanced Materials* **2006**, *18*, 2304.
- (81) Rothmund, P. W. K. *Nature* **2006**, *440*, 297.
- (82) Schlaad, H.; Antonietti, M. *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics* **2003**, *10*, 17.
- (83) Barner, H. G.; Schlaad, H. *Soft Matter* **2007**, *3*, 394.
- (84) Lehninger A. L., N. D. L., Cox M. M., *Worth Publishers* **1993**.
- (85) Chécot, F.; Rodríguez-Hernández, J.; Gnanou, Y.; Lecommandoux, S. *Biomolecular Engineering* **2007**, *24*, 81.
- (86) Knoop, R. J. I.; de Geus, M.; Habraken, G. J. M.; Koning, C. E.; Menzel, H.; Heise, A. *Macromolecules* **2010**, *43*, 4126.
- (87) Lübbert, A.; Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Nuhn, H.; Scholl, M.; Bourdillon, L.; Wandrey, C.; Klok, H.-A. *Langmuir* **2005**, *21*, 6582.
- (88) Tian, Z.; Li, H.; Wang, M.; Zhang, A.; Feng, Z.-G. *Journal of Polymer Science Part emistry* **2008**, *46*, 1042.
- (89) jeroen J. L. M. Cornelissen, M. F., Nico A. J. M Sommerdijk, Roelandm J. M. Nolte *Science* **1998**, *280*, 1427.
- (90) Cheon, J.-B.; Jeong, Y.-I.; Cho, C.-S. *Polymer* **1999**, *40*, 2041.

- (91) Cho, C. S.; Nah, J. W.; Jeong, Y. I.; Cheon, J. B.; Asayama, S.; Ise, H.; Akaike, T. *Polymer* **1999**, *40*, 6769.
- (92) Cai, C.; Zhu, W.; Chen, T.; Lin, J.; Tian, X. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2009**, *47*, 5967.
- (93) Sinaga, A.; Hatton, T. A.; Tam, K. C. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2801.
- (94) Sun, J.; Shi, Q.; Chen, X.; Guo, J.; Jing, X. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2008**, *209*, 1129.
- (95) Yang, Z.; Yuan, J.; Cheng, S. *European Polymer Journal* **2005**, *41*, 267.
- (96) Holowka, E. P.; Pochan, D. J.; Deming, T. J. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12423.
- (97) Sun, J.; Chen, X.; Deng, C.; Yu, H.; Xie, Z.; Jing, X. *Langmuir* **2007**, *23*, 8308.
- (98) Dirks, A. J.; van Berkel, S. S.; Hatzakis, N. S.; Opsteen, J. A.; van Delft, F. L.; Cornelissen, J. J. L. M.; Rowan, A. E.; van Hest, J. C. M.; Rutjes, F. P. J. T.; Nolte, R. J. M. *Chemical Communications* **2005**, 4172.
- (99) Vandermeulen, G. W. M.; Tziatzios, C.; Duncan, R.; Klok, H.-A. *Macromolecules* **2005**, *38*, 761.
- (100) Pechar, M.; Kopečková, P.; Joss, L.; Kopeček, J. *Macromolecular Bioscience* **2002**, *2*, 199.
- (101) Marsden, H. R.; Handgraaf, J.-W.; Nudelman, F.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Kros, A. *Journal of the American Chemical Society*, *132*, 2370.
- (102) Reynhout, I. C.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 2327.
- (103) *Polysaccharide shapes*; John and Wiley sons, New York ed.; Rees, D. A., Ed., 1977.
- (104) In *Academic Press*; G.O. Aspinall: London, 1985.
- (105) Schatz, C.; Louguet, S.; Le Meins, J.-F.; Lecommandoux, S. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 2572.
- (106) Upadhyay, K. K.; Meins, J. F. L.; Misra, A.; Voisin, P.; Bouchaud, V.; Ibarboure, E.; Schatz, C.; Lecommandoux, S. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2802.
- (107) Babin, J.; Leroy, C.; Lecommandoux, S.; Borsali, R.; Gnanou, Y.; Taton, D. *Chemical Communications* **2005**, 1993.
- (108) Dai, S.; Ravi, P.; Tam, K. C. *Soft Matter* **2008**, *4*, 435.
- (109) Kukula, H.; Schlaad, H.; Antonietti, M.; Förster, S. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 1658.
- (110) Carlsen, A.; Lecommandoux, S. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2009**, *14*, 329.
- (111) Gebhardt, K. E.; Ahn, S.; Venkatachalam, G.; Savin, D. A. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *317*, 70.
- (112) Sinaga, A.; Hatton, T. A.; Tam, K. C. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2801.
- (113) Agut, W.; Brélet, A.; Taton, D.; Lecommandoux, S. *Langmuir* **2007**, *23*, 11526.
- (114) Rao, J.; Luo, Z.; Ge, Z.; Liu, H.; Liu, S. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3871.
- (115) Deng, L.; Shi, K.; Zhang, Y.; Wang, H.; Zeng, J.; Guo, X.; Du, Z.; Zhang, B. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *323*, 169.
- (116) Qiu, S.; Huang, H.; Dai, X.-H.; Zhou, W.; Dong, C.-M. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2009**, *47*, 2009.
- (117) Kühnle, H.; Börner, H. G. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6431.
- (118) Lemaitre, M.; Bayard, B.; Lebleu, B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84*, 648.

- (119) Leonetti, J. P.; Rayner, B.; Lemaitre, M.; Gagnor, C.; Milhaud, P. G.; Irbach, J. L.; Lebleua, B. *Gene* **1988**, *72*, 323.
- (120) Jeong, J. H.; Park, T. G. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 917.
- (121) Li, Z.; Zhang, Y.; Fullhart, P.; Mirkin, C. A. *Nano Letters* **2004**, *4*, 1055.
- (122) Alemdaroglu, F. E.; Ding, K.; Berger, R.; Herrmann, A. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 4206.
- (123) Teixeira Jr, F.; Rigler, P.; Vebert-Nardin, C. *Chemical Communications* **2007**, 1130.
- (124) Wang, J.; Alemdaroglu, F. E.; Prusty, D. K.; Herrmann, A.; Berger, R. d. *Macromolecules* **2008**, *41*, 2914.
- (125) Alemdaroglu, F. E.; Alemdaroglu, N. C.; Langguth, P.; Herrmann, A. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29*, 326.
- (126) Wang, L.; Zeng, R.; Li, C.; Qiao, R. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, *74*, 284.
- (127) Kwon, G.; Naito, M.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. *Journal of Controlled Release* **1997**, *48*, 195.
- (128) Nah, J.-W.; Jeong, Y.-I.; Cho, C.-S. *Journal of Applied Polymer Science* **2000**, *75*, 1115.
- (129) Yokoyama, M.; Fukushima, S.; Uehara, R.; Okamoto, K.; Kataoka\*, K.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Journal of Controlled Release* **1998**, *50*, 79.
- (130) Katayose, S.; Kataoka, K. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, *8*, 702.
- (131) Itaka, K.; Yamauchi, K.; Harada, A.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Kataoka, K. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4495.
- (132) Matsumura, Y.; Kataoka, K. *Cancer Science* **2009**, *100*, 572.
- (133) Alemdaroglu, F. E.; Alemdaroglu, N. C.; Langguth, P.; Herrmann, A. *Advanced Materials* **2008**, *20*, 899.
- (134) Costioli, M. D.; Fisch, I.; Garret-Flaudy, F.; Hilbrig, F.; Freitag, R. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, *81*, 535.
- (135) Nobuaki Soh, D. U., Zhonglan Tang, Masaharu Murata and Mizuo Maeda *Analytical Sciences* **2002**, *18*, 1295.
- (136) Lecommandoux, S.; Sandre, O.; Chécot, F.; Rodriguez-Hernandez, J.; Perzynski, R. *Advanced Materials* **2005**, *17*, 712.
- (137) Cha, J. N.; Stucky, G. D.; Morse, D. E.; Deming, T. J. *Nature* **2000**, *403*, 289.
- (138) Jan, J.-S.; Lee, S.; Carr, C. S.; Shantz, D. F. *Chemistry of Materials* **2005**, *17*, 4310.
- (139) Nardin, C.; Meier, W. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, *90*, 17.
- (140) Taubert, A.; Napoli, A.; Meier, W. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*, 598.
- (141) Kita-Tokarczyk, K.; Grumelard, J.; Haefele, T.; Meier, W. *Polymer* **2005**, *46*, 3540.

# CHAPITRE II: SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES COPOLYMERES

---



# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>53</b>
<b>I. Rappels bibliographiques</b> .....	<b>53</b>
<b>I.1. La synthèse divergente</b> .....	<b>53</b>
<b>I.2. La synthèse convergente</b> .....	<b>53</b>
<b>I.3. Avantages et inconvénients des deux voies de synthèse</b> .....	<b>55</b>
<b>II. Notre stratégie</b> .....	<b>56</b>
<b>II.1. Choix de la voie de synthèse</b> .....	<b>56</b>
<b>II.2. Les polymères utilisés</b> .....	<b>57</b>
<b>II.3. Choix des couplages</b> .....	<b>59</b>
<b>III. Méthodologie générale</b> .....	<b>61</b>
<b>III.1. Couplages</b> .....	<b>61</b>
<b>III.1.1. Liaison peptidique</b> .....	<b>61</b>
<b>III.1.2. Synthèse par formation d'un intermédiaire phosphoramidite : liaison phosphoramidite</b> .....	<b>61</b>
<b>III.2. Purification</b> .....	<b>61</b>
<b>IV. Les synthèses effectuées</b> .....	<b>62</b>
<b>IV.1. Couplage peptidique</b> .....	<b>62</b>
<b>IV.1.1. Synthèse des conjugués PCI-ODN</b> .....	<b>62</b>
<b>IV.1.2. Synthèse des conjugués PMMA-ODN</b> .....	<b>64</b>
<b>IV.2. Couplage phosphoramidite</b> .....	<b>66</b>
<b>IV.3. Chimie «Click »</b> .....	<b>68</b>

**CONCLUSION..... 69**

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 70**

## Introduction

Ce chapitre décrit les différentes stratégies de synthèse que nous avons mises en œuvre afin d'accéder à de nouveaux copolymères à blocs à base d'oligonucléotides. Ces copolymères à blocs originaux sont constitués d'un oligonucléotide simple brin noté «ODN<sub>sb</sub>» (hydrophile) couplé à un polymère hydrophobe ou à un copolymère. Après un rappel bibliographique sur les méthodes existantes, nous présenterons nos travaux sur le couplage des polymères aux oligonucléotides ainsi que les différents problèmes rencontrés.

## I. Rappels bibliographiques

Les chimistes disposent de méthodes efficaces qui leur permettent de fabriquer, chaque année, des millions de tonnes de polymères. Cependant la synthèse de bioconjugués à partir de polymères synthétiques et de biomolécules constitue une tâche plutôt difficile. Deux stratégies de synthèse de bioconjugués sont rapportées dans la littérature. Il s'agit de : la synthèse divergente et la synthèse convergente. Les deux voies de synthèse peuvent être effectuées aussi bien sur support solide qu'en solution. Le choix de la stratégie de synthèse se fait non seulement en fonction de la disponibilité des réactifs (polymères, biomolécules) avec la fonctionnalité appropriée mais aussi suivant la facilité de fonctionnalisation de ces réactifs.

### I.1. La synthèse divergente

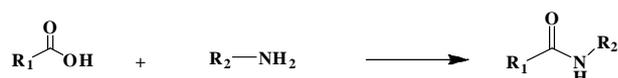
La synthèse divergente peut s'effectuer suivant deux approches: (i) la croissance du polymère sur la biomolécule ou (ii) la croissance de la biomolécule à partir du polymère. La première approche nécessite la fonctionnalisation de la biomolécule en vue de l'utiliser comme un «macro-initiateur» qui engendrera par la suite le procédé de polymérisation. La seconde approche encore appelée approche de «bioconjugaison inverse» consiste à la fonctionnalisation du polymère souhaité, suivie de la croissance de la biomolécule d'intérêt sur le polymère.

### I.2. La synthèse convergente

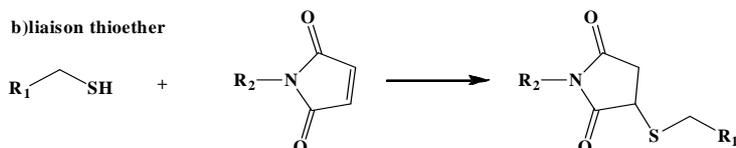
La deuxième stratégie de synthèse de bioconjugués est la synthèse convergente. Elle consiste à coupler des polymères téléchéliques possédant à leurs extrémités des fonctions susceptibles de réagir avec des groupements complémentaires se trouvant aux extrémités des biomolécules (de séquences bien définies). A cet effet, différentes approches de couplage peuvent être employées (Figure II.1). Pour la première approche, (a) les biomolécules fonctionnalisées par une amine réagissent avec les polymères fonctionnalisés par un groupement acide carboxylique pour former une liaison peptidique.<sup>1-4</sup> Cette approche a été utilisée dans notre étude et sera plus détaillée dans la suite du chapitre. (b) La seconde approche va consister à former une liaison thioether. Cette approche nécessite la présence d'un groupement thiol libre sur la biomolécule.<sup>5,6</sup> (c) La troisième approche consiste à former des ponts

disulfures en partant de polymères et biomolécules fonctionnalisés par un groupement thiol.<sup>7</sup> Une autre méthode de couplage intéressante est l'amination réductrice (d). Elle implique l'utilisation d'un polymère fonctionnalisé par un groupement aldéhyde et d'une biomolécule possédant une fonction amine et fait intervenir la formation d'un intermédiaire, une base de Schiff.<sup>6</sup> L'approche de couplage suivante (e) consiste en la formation d'une liaison oxime.<sup>8-11</sup> (f) La chimie "click" est une autre méthode de couplage de polymères aux biomolécules. Elle est basée sur une réaction de cycloaddition catalysée par des métaux de transition comme le cuivre(I) entre des alcynes terminaux et des azotures organiques.<sup>12</sup> Nous l'avons utilisée dans notre étude et nous la détaillerons dans la suite du chapitre. (g) La liaison phosphoramidite est aussi une autre méthode de couplage. Toutefois, elle est spécifique au couplage des oligonucléotides aux polymères car elle est inspirée de la procédure automatisée de synthèse des oligonucléotides.<sup>13,14</sup> Elle sera détaillée dans la suite du chapitre.

## a) liaison peptidique



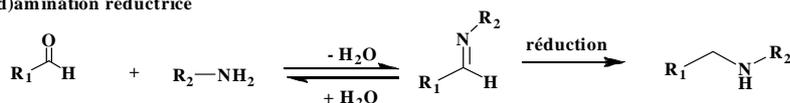
## b) liaison thioether



## c) formation des ponts disulfures



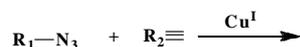
## d) amination réductrice



## e) liaison oxime



## f) chimie "click"



## g) liaison phosphoramidite

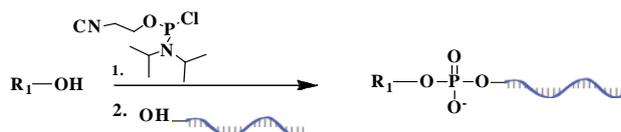


Figure II.1. Les stratégies convergentes. Les groupes  $R_1$ ,  $R_2$  représentent soit le polymère synthétique, soit le biopolymère.

### I.3. Avantages et inconvénients des deux voies de synthèses

La synthèse de bioconjugués à partir de polymères et de biomolécules en empruntant la voie divergente fait appel à des procédés de polymérisation. Toutefois ces procédés ne doivent pas interagir avec les divers groupes fonctionnels se trouvant sur la biomolécule. Les procédés de polymérisation tels que la polymérisation anionique ou cationique sont proscrite car l'espèce active peut interagir avec les fonctions polaires présentes sur la biomolécule. La polymérisation radicalaire contrôlée semble être le seul processus applicable en la présence de biomolécules bien que certaines terminaisons de chaînes ou de transferts pourraient dans certains cas être induites. A ce titre, la polymérisation radicalaire contrôlée (Controlled Radical Polymerization)<sup>15</sup> (CRP) semble être un bon candidat car les conditions de synthèse douces n'affectent pas les segments biologiques. C'est ainsi que certaines équipes ont utilisé deux approches de la CRP pour coupler les polymères aux biomolécules. Il s'agit de: la polymérisation par transfert d'atome (Atom Transfert Radical Polymerization, ATRP)<sup>16,17</sup> et la polymérisation par transfert de chaîne par addition-fragmentation réversible (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfert, RAFT).<sup>18-21</sup> Par ailleurs, la stratégie divergente, on se limite le plus souvent à un homopeptide<sup>22</sup> ou un homonucléotide<sup>23</sup>, car tous les monomères sont ajoutés en même temps dans la solution de polymérisation.

La synthèse convergente est la voie la plus décrite dans la littérature pour la préparation de polymères biohybrides. Contrairement à la stratégie divergente, elle ne nécessite pas l'utilisation de groupements protecteurs. De plus, comme nous partons des blocs pré-synthétisés, il y a un meilleur contrôle sur la taille de chacun des blocs. Toutefois, la principale difficulté réside dans le choix des conditions idéales de réaction. En effet lorsque les polymères biohybrides amphiphiles sont ciblés, la principale difficulté rencontrée est la manipulation de deux macromolécules qui ont des propriétés de solubilité très différentes. En solution, ces réactions de conjugaison sont effectuées dans des mélanges eau/solvant organique. Le Tableau II.1 ci-dessous rassemble les principaux avantages et inconvénients des deux voies de couplage des polymères aux biomolécules.

Voies de synthèse		
<b>Divergente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-deux approches de polymérisations efficaces (ATRP, RAFT)</li> <li>-Conditions de synthèse douces de la CRP n'affectant pas les biomolécules</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Interaction d'espèces actives avec les groupements polaires présents sur la biomolécule d'intérêt (polymérisation anionique et cationique)</li> <li>-Nécessité d'utiliser des groupements protecteurs sur la biomolécule dans certains cas</li> <li>-Possibilité de réactions en chaînes</li> <li>-Pas de contrôle sur taille des blocs</li> <li>-Limitation aux biomolécules de petites tailles (par exemple peptides <math>\leq 50</math> acides aminés)</li> <li>-Limité aux homopeptides et homonucléotides</li> </ul>
<b>Convergente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Plus décrite dans la littérature</li> <li>-Efficace</li> <li>-Meilleur contrôle de la taille des blocs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Problème de solubilisation (cas de polymères bioconjugués amphiphiles)</li> </ul>

Tableau II.1. Principaux avantages et inconvénients intrinsèques à la synthèse de polymères bioconjugués.

## II. Notre stratégie

### II.1. Choix de la voie de synthèse

La synthèse convergente permet de conjuguer des oligonucléotides de séquence définie et donc d'utiliser toutes potentialités de l'hybridation par la suite. Bien que se pose le problème de solubilité, elle permet d'avoir un meilleur contrôle sur la taille des blocs. De plus, elle est mieux décrite dans la littérature et de nombreuses méthodes de couplages de polymères aux oligonucléotides ont été rapportées. C'est pour ces raisons que nous nous sommes tournés vers cette voie.

## II.2. Les polymères utilisés

Différents polymères de structures et de propriétés différentes ont été utilisés. La majorité a été achetée et utilisée telle quelle. Le Tableau II.2 regroupe les différents types de polymères utilisés, leur structure et les fonctionnalités retrouvées à l'extrémité de chaque.

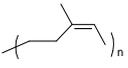
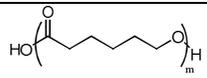
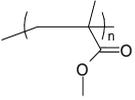
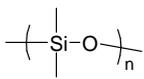
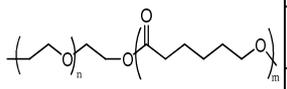
Polymères	Notations	Structures	Masses molaires ( $M_n$ ) (g/moles)		Fonctionnalisation
			$m_n$	$m_m$	
Poly(isoprène)	<b>PIP</b>		6500		-OH
polyε-caprolactone	<b>PCI</b>		voir Tableau II.3		-COOH
Poly(méthacrylate de méthyle)	<b>PMMA</b>		6300		-OH
	<b>PMMA</b>		5500		-COOH
	<b>PMMA</b>		12000		
Poly(diméthyle de siloxane)	<b>PDMS</b>		1000		-OH
Poly(oxyde d'éthylène)-b-polycaprolactone	<b>PEO-b-PCI</b>		$m_n$	$m_m$	-OH
			2000	2600	
			2000	2800	

Tableau II.2. Structure des polymères utilisés dans notre étude.

La poly(ε-caprolactone), PCI est le seul homopolymère synthétisé dans notre étude. La PCI a été obtenue par polymérisation par ouverture de cycle de la ε-caprolactone dans du toluène à 50°C, amorcée par de l'eau et catalysée par l'acide méthane sulfonique (AMS).<sup>24</sup> Ce procédé de polymérisation comprend deux étapes, à savoir l'amorçage et la propagation.

La première étape se fait en utilisant de l'eau. La caprolactone activée par l'AMS subit une attaque nucléophile sur l'atome de carbone du carbonyle par H<sub>2</sub>O. L'ouverture de cycle (clivage O-acyl) conduit alors à l'addition du groupement hydroxyle OH dans la caprolactone (voir Figure II.2). La croissance du polymère se produit par la répétition du même processus d'activation, les alcools issus de l'ouverture de cycle de la caprolactone agissant à la place de l'eau. Toutefois, il convient de noter

que d'autres mécanismes peuvent avoir lieu comme l'a démontré Damien Delcroix dans sa thèse.<sup>25</sup> Après confirmation de la conversion du monomère caprolactone par RMN  $^1\text{H}$ , la réaction est stoppée au bout de 3h par l'ajout d'une base, la DIPEA (N,N-Diisopropyléthylamine), qui aura pour effet de neutraliser l'AMS.

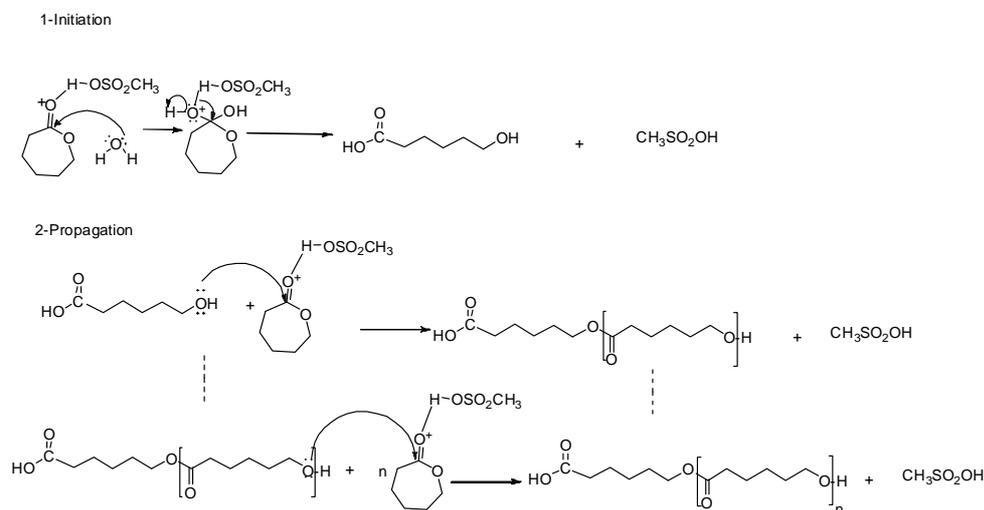


Figure II.2. Polymérisation par ouverture de cycle de la  $\epsilon$ -caprolactone amorcée par l'eau et catalysée par l'AMS dans du toluène,  $50^\circ\text{C}$ , 3h.

Dans notre étude, les conditions de synthèse ont été choisies de telle sorte que le rapport  $\epsilon$ -caprolactone/ $\text{H}_2\text{O}$  définisse la taille finale du polymère. Les taux de conversion obtenus sont mesurés par RMN  $^1\text{H}$  et sont supérieurs à 98%. C'est ainsi que des blocs polycaprolactone de différentes masses molaires ont été obtenus: PCI 3000g/mol, PCI 3700g/mol et PCI 13600g/mol. Ces différents blocs de polycaprolactone synthétisés ont été caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique (CES). La CES nous a permis de déterminer la masse molaire moyenne en nombre  $\overline{M}_n$ , ainsi que l'indice de polydispersité  $I_p$ . Le Tableau II.3 rassemble les valeurs de  $\overline{M}_n$  obtenues, les  $I_p$  et les masses théoriques visées des polymères polycaprolactone synthétisés.

	Masses attendues (g.mol $^{-1}$ )	$M_n$ (g.mol $^{-1}$ )	$I_p$
<b>P<math>\epsilon</math>-Cl</b>	5100	3000	1.3
<b>P<math>\epsilon</math>-Cl</b>	5100	3700	1.2
<b>P<math>\epsilon</math>-Cl</b>	5100	13600	1.6

Tableau II.3. Caractéristique des polymères synthétisés:  $M_n$  et  $I_p$  déterminés par CES (calibration PS).

Nous constatons que les valeurs expérimentales de masses molaires (3000, 3700, 13600 g/mol) correspondant à 3 synthèses réalisées dans des conditions similaires ne concordent pas avec la valeur théorique visée (5100 g/mol). En fait la polymérisation par ouverture de cycle de la caprolactone catalysée par l'AMS permet d'obtenir des architectures macromoléculaires contrôlées pour des  $\overline{M}_n \leq 11000$  g/mol, lorsque celle-ci se fait en utilisant un alcool (le plus souvent le pentanol) comme amorceur.<sup>26</sup> Cependant dans notre cas, nous avons utilisé l'eau comme amorceur, ce qui ne permet pas d'obtenir une polymérisation contrôlée. Nous souhaitons dans cette étude, obtenir des polymères polycaprolactone portant en bout de chaîne une fonction carboxylique (nécessaire pour le couplage peptidique que nous verrons par la suite). L'utilisation du pentanol comme amorceur dans notre étude ne nous aurait pas permis d'avoir cette fonctionnalité. Toutefois ce non-contrôle de la polymérisation sur les architectures macromoléculaires nous a permis d'obtenir des polymères polycaprolactone de trois longueurs de blocs différentes, ce qui n'était pas pour nous déplaire. Les indices de polymolécularité obtenus sont respectivement 1,3 ; 1,2 et 1,6. A l'exception de la dernière valeur, les deux premières restent raisonnables.

### II.3. Choix des couplages

La fonctionnalité aux extrémités des polymères et la disponibilité commerciale de ces derniers ont dicté le choix de nos couplages. Nous avons effectué un couplage par liaison peptidique pour les polymères de fonctionnalité -COOH et via un intermédiaire phosphoramidite pour les polymères de fonctionnalité -OH.

Par ailleurs, la disponibilité commerciale des oligonucléotides fonctionnalisés par une amine ou un hydroxyle, nous ont confortés dans ce choix. Le Tableau II.4 récapitule les différentes séquences des oligonucléotides utilisées et les fonctionnalités retrouvées en bout de chaînes. L'oligonucléotide nommé «ODN<sub>x</sub>» est de séquence inconnue. Ceci est dû à une erreur de lot provenant du fournisseur. Nous avons été informés de cela bien après que les synthèses ont été effectuées et les bioconjugués caractérisés.

Les séquences sont représentées dans le sens de lecture 5' → 3'.

Noms	Séquences et modifications
ODN <sub>22S</sub>	5' CCT CGC TCT GCT AAT CCT GTT A <sup>3'</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -OH
	5' CCT CGC TCT GCT AAT CCT GTT A <sup>3'</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -NH <sub>2</sub>
ODN <sub>22As</sub>	5' TAA CAG GAT TAG CAG AGC GAG G <sup>3'</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -OH
	5' TAA CAG GAT TAG CAG AGC GAGG <sup>3'</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -NH <sub>2</sub>
ODN <sub>12S</sub>	5' CCT CGC TCT GCT <sup>3'</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -OH
ODN <sub>12As</sub>	5' TAA CAG GAT TAG <sup>3'</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -OH
ODN <sub>22A</sub>	5' AAA AAA AAA AAA AAA AAA A <sup>3'</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -OH
ODN <sub>x</sub>	Séquence inconnue mais fonctionnalisée par un OH

Tableau II.4. Noms et séquences des oligonucléotides utilisés dans le couplage aux polymères.

*En résumé, la grande disponibilité commerciale des polymères fonctionnalisés par un -OH et -COOH ainsi que des oligonucléotides fonctionnalisés par une amine et un hydroxyle a orienté nos choix de synthèse. Nous avons donc opté pour la liaison peptidique et la liaison phosphoramidite. Par ailleurs, nous avons été amenés à synthétiser la polycaprolactone compte tenu du savoir-faire que l'on dispose à proximité (savoir faire du Laboratoire LHFA). La polymérisation par ouverture du cycle de la ε-caprolactone amorcée par l'eau et catalysée par l'AMS a conduit à des polymères poly(caprolactone) de différentes masses molaires.*

## III. Méthodologie générale

### III.1. Couplages

Les couplages effectués peuvent aussi bien être réalisés en solution que sur support. Nous avons réalisé la liaison peptidique en solution et la liaison phosphoramidite sur support solide.

#### III.1.1. Liaison peptidique

Nous avons réalisé la liaison peptidique en solution dans un mélange eau/solvant organique afin de solubiliser les deux blocs. La liaison peptidique présente des caractéristiques très intéressantes, telles que les rendements de réaction très élevés, des conditions de synthèse douces et aussi la facilité de manipulation. Ces caractéristiques rendent ce couplage attractif. Toutefois, la formation de la liaison peptidique entre les acides carboxyliques et amines requiert une barrière d'activation très élevée. Afin d'atteindre cette barrière, les groupements carboxyliques sont activés. Une variété d'activateurs a été reportée dans la littérature pour la synthèse des copolymères à bloc à base d'ADN: DCC (Dicyclohexylcarbodiimide), NHS (N-HydroxySuccinimide) ou EDC (Ethyl-3-[3-Diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride) et sulfo-NHS.<sup>3,4</sup>

#### III.1.2. Synthèse par formation d'un intermédiaire phosphoramidite : liaison phosphoramidite

La liaison phosphoramidite, quant à elle est inspirée de la synthèse automatisée sur support des oligonucléotides. Elle va consister à incorporer le bloc polymère au bloc oligonucléotide via un synthon phosphoramidite. L'oligonucléotide utilisé est accroché en position 5' au support via une chaîne alkyle. Le support utilisé est à base de verre à porosité contrôlée noté CPG (Controlled Porosity Glass). En fin de réaction, le produit de couplage immobilisé sur le support est aisément séparé du reste du milieu réactionnel par un traitement à l'ammoniaque.

### III.2. Purification

Les produits de couplage réalisés sont par la suite tous purifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) dans des conditions dénaturantes en présence d'urée. L'urée aura pour fonction de détruire les structures secondaires que pourraient former les oligonucléotides simples brins *via* des appariements internes de bases.

La PAGE est une technique d'analyse et de purification des oligonucléotides. Elle nous permet de séparer les oligonucléotides liés aux polymères de ceux libres. Les produits migrent au travers d'une matrice gélifiée d'acrylamide soumise à un potentiel électrique. Il en résulte une séparation de haute

résolution suivant la taille des espèces. Cette technique est d'autant plus intéressante dans notre cas, que les polymères utilisés sont neutres et de haut poids moléculaire et l'oligonucléotide anionique. Les conjugués migrent moins vite que l'oligonucléotide libre. La Figure II.3 nous donne un aperçu de ce que l'on obtient lors de la migration sur gel du bioconjugué PEO2000-*b*-PCI2600-*b*-ODN<sub>22S</sub>. Les conjugués purifiés sont ensuite récupérés et dessalés afin d'éliminer les sels et l'urée présents en abondance.

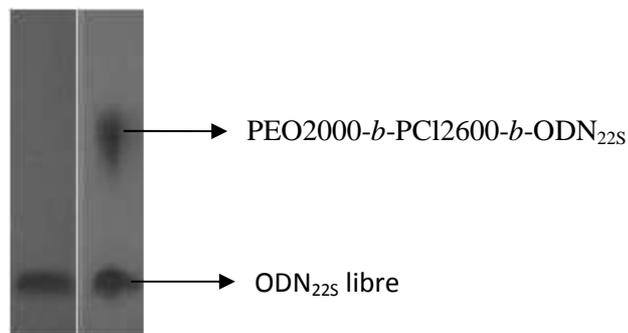


Figure II.3. PAGE analytique du tribloc PEO2000-*b*-PCI2600-*b*-ODN<sub>22S</sub>. La bande au dessus du gel représente le triblocs et les bandes en dessous l'oligonucléotide libre.

## IV. Les synthèses effectuées

### IV.1. Couplage peptidique

#### IV.1.1. Synthèse des conjugués PCI-ODN

La synthèse de copolymères à blocs PCI-ODN s'est effectuée par couplage peptidique entre des oligonucléotides simples brins (ODN<sub>22S</sub>) modifiés par une fonction amine en position 5' et les polycaprolactones fonctionnalisées par une fonction acide. Afin de mettre au point les conditions réactionnelles optimales pour ce type d'assemblage par le lien amide, nous avons effectué l'activation des fonctions carboxyliques des polymères par le DCC et le NHS. Nous avons utilisé deux voies réactionnelles:

- une première voie au cours de laquelle la formation de la liaison peptidique s'effectue en deux étapes. Une première étape d'activation, suivie d'une seconde étape de couplage entre l'oligonucléotide amine et l'ester activé du polymère.
- Une deuxième voie au cours de laquelle, la formation peptidique entre l'oligonucléotide amine et le polymère possédant une fonction carboxylique s'effectue en "one pot" en présence des activateurs DCC et NHS.

### a) Première voie : synthèse en 2 temps

- Activation de la fonction carboxylique

L'activation des fonctions carboxyliques des polymères s'effectue en présence de DCC et de NHS dans du dichlorométhane (voir Figure II.4a). Les esters activés sont des espèces stables et isolables mais qui constituent de bons groupes partants permettant ainsi de réaliser par la suite le couplage peptidique sur les oligonucléotides aminés (voir Figure II.4b). L'activation des fonctions carboxyliques a été confirmée par RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Les déplacements chimiques sont les suivants :  $\delta = 3.99$  (t,  $J=6.7$  Hz,  $2\text{H} \times 32$ ,  $n\text{OCH}_2$ ),  $2.77$  (br,  $4\text{H}$ ,  $\text{CH}_2(\text{NHS})$ ),  $2.23$  (t,  $J=7.5$  Hz,  $2\text{H} \times 32$ ,  $n\text{COCH}_2$ ),  $1.58$  (m,  $4\text{H} \times 32$ ,  $n\text{CH}_2$ ),  $1.32$  (m,  $2\text{H} \times 32$ ,  $n\text{CH}_2$ ). On obtient 100% de fonctionnalisation.

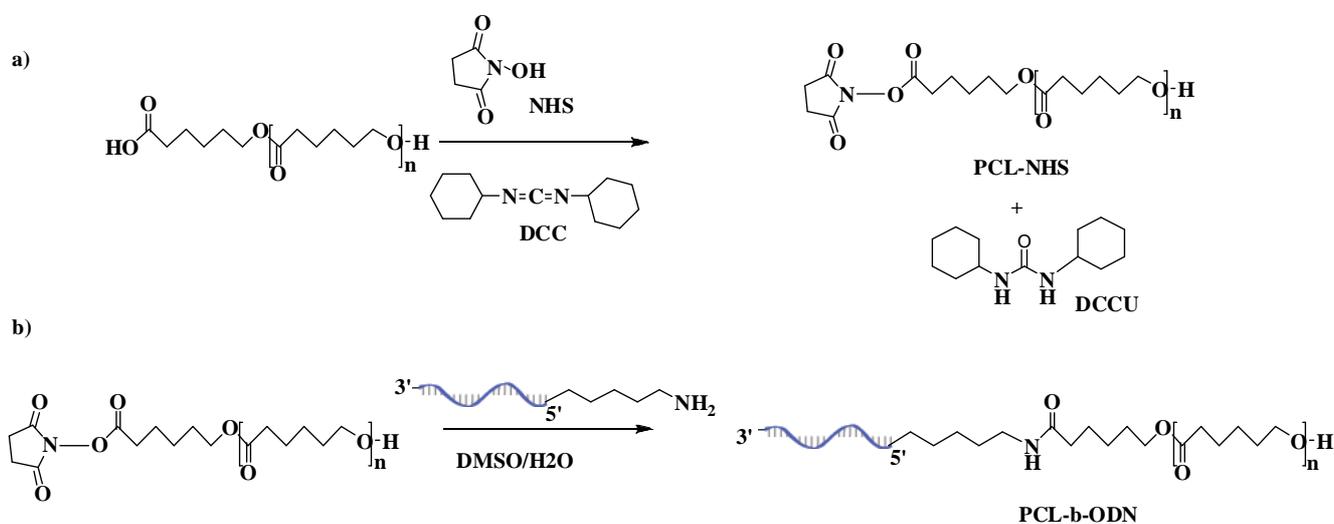


Figure II.4. Synthèse du dibloc PCI-ODN par liaison peptidique. a) activation de la fonction carboxylique du PCL par le NHS et DCC. b) couplage de l'ester activé PCI-NHS à l'oligonucléotide amine.

- Couplage du polymère activé à de l'oligonucléotide amine

Ce couplage s'effectue à  $50^\circ\text{C}$  pendant 20h dans un système biphasique composé d'une solution aqueuse tamponnée ( $\text{pH} = 9$ ) et d'un solvant organique tel que le diméthylsulfoxyde (DMSO). Le DMSO aide à la solubilisation du polymère, tandis que l'oligonucléotide se solubilise dans la solution aqueuse. L'un des challenges dans ce couplage est de pouvoir solubiliser les deux blocs présentant une solvation différente dans un seul mélange. C'est ainsi qu'après solubilisation des esters activés de PCL dans du DMSO, l'ajout d'une solution aqueuse d'oligonucléotide faisait précipiter le polymère. Après avoir essayé différents ratio DMSO/H<sub>2</sub>O, nous sommes arrivés à la conclusion qu'il fallait mettre un volume 2 à 3 fois plus important en DMSO afin d'obtenir un mélange homogène.

Les conjugués PCI-ODN<sub>225</sub> ont été purifiés par PAGE après avoir éliminé la dicyclohexylurée (DCCU) (produit de conversion du DCC par l'eau). Cette technique nous a permis d'isoler aisément le

conjugué PCI3700-ODN<sub>22S</sub> avec un rendement de couplage de 50%. Cependant, aucun produit de couplage n'a été obtenu avec les polymères PCI300 et PCI13600.

Toutefois, nous n'avons pas pu reproduire le couplage du polymère PCI à l'oligonucléotide. Toutes les tentatives se sont soldées par des échecs, quelles que fussent les longueurs de polymères PCI utilisées.

La détermination de la masse du dibloc PCI3700-ODN<sub>22S</sub> par Maldi-Tof n'a pas été concluante.

#### **b) Deuxième voie : synthèse «one pot »**

Compte tenu du fait que nous avons dû mal à reproduire le couplage par la première voie, nous nous sommes tournés vers une deuxième voie qui consiste à mélanger tous les réactifs ensemble. Pour cette voie, les trois polymères PCI (PCI3000, PCI3700 et PCI13600) synthétisés plus haut ont été utilisés. Les solutions de polymères dans du DMSO ont été rajoutées à des solutions aqueuses (tamponnées) d'oligonucléotides simples brins de 22 bases de séquence 5'-CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTA-3' portant une fonction amine en position 5'. Ceci s'est fait comme précédemment en utilisant un mélange DMSO/tampon aqueux. A ces différents mélanges, ont été ajoutés les réactifs DCC et NHS. Les solutions issues des mélanges ne formaient qu'une seule phase sans aucune formation de précipités. Les mélanges réactionnels ont été chauffés à 50°C pendant plus de 20h afin de permettre un meilleur couplage. Après élimination des précipités (probablement la DCCU) et du DMSO (pas totale), les mélanges ont été purifiés sur PAGE en conditions dénaturantes.

Aucun produit de couplage n'a été observé. Nous nous sommes posés la question de savoir si nos conjugués étaient solubles dans le formamide, ce qui pourrait être la raison pour laquelle on n'observe rien en PAGE. En fait, lors de la purification sur PAGE, le produit de synthèse est dissout dans une solution de formamide (98%). De plus, la solution contient également un colorant (le rôle est de nous permettre de suivre la migration et donc de l'arrêter au moment opportun) ce qui empêche de voir si le produit est bien dissout. Afin de répondre à cette question, nous avons regardé la solubilité de l'un des blocs PCI dans du formamide chauffé. La PCI n'était pas soluble dans ces conditions. Nous avons par la suite regardé la solubilité dans un mélange DMSO/formamide (en rapport 50/50) toujours en conditions de chauffe. Dans ce cas, le polymère était soluble. Par la suite, nous avons refait des couplages dans les mêmes conditions que précédemment. Malgré cela, nous n'avons toujours rien observé comme produit de couplage sur le gel.

#### **IV.1.2. Synthèse des conjugués PMMA-ODN**

De même, nous avons essayé en utilisant les deux voies de coupler deux différentes longueurs de blocs de polymères poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA5500 et PMMA12000 de masse moléculaires respectives  $M_n = 5500$  g/moles et  $M_n = 12000$  g/moles) fonctionnalisés par des acides carboxyliques

aux oligonucléotides de 22 bases (5'-CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTA-3') portant une fonction amine en position 5'. La PAGE ne révèle aucun produit de couplage. Par ailleurs, il était difficile lorsque nous empruntons la première voie de mettre en évidence l'activation des fonctions carboxyliques des PMMA par RMN  $^1\text{H}$ . De plus, quelle que fut la voie de couplage utilisée, l'utilisation du mélange DMSO/tampon aqueux (2 : 3 vol) ne nous conduisit pas à un mélange homogène comme ce fut le cas avec les polymères poly(caprolactone). Pour palier ce problème, nous avons procédé à la sonication des mélanges à chaud pendant une longue période (temps > 2h). A travers ce processus, nous avons obtenu un mélange homogène avec le PMMA5500, ce qui n'a pas été le cas avec le PMMA12000. Malgré cela, pour les deux mélanges, nous avons laissé la réaction de couplage s'effectuer à 70°C sur une période de temps plus longue que celle utilisée avec les polycaprolactone (3 jours). Malgré toutes ces tentatives, aucun produit de couplage n'a été mis en évidence par PAGE.

Toutefois durant la dernière année des travaux de thèse, nous avons trouvé un nouvel activateur le DMT-MM (4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine-2-yl)-4-méthylemorpholinium) dont la réactivité est supérieure à celle des activateurs mentionnés plus haut. Cet agent de couplage est stable et facile à manipuler. C'est ainsi que nous avons utilisé cet agent de couplage pour coupler les polymères fonctionnalisés par un acide carboxylique tels que le PMMA5500, PMMA12000 et le PEO5000 (poly (oxyde d'éthylène) de masse moléculaire  $M_n = 5000$  g/mole) aux oligonucléotides simples brins fonctionnalisés en 5' par une amine et attachés en 3' sur support solide CPG. Les amines sont protégées par un groupement monomethoxytrityl, introduit au cours de la synthèse des oligonucléotides afin d'éviter que cette fonction réagisse durant la synthèse. La première étape a consisté à éliminer ce groupement par une solution d'acide trifluoroacétique 3% dans du dichlorométhane (DCM). Une fois cette élimination effectuée, les oligonucléotides amines sur support CPG ont été introduits dans des solutions de polymères dans du DMSO. A ces solutions homogènes, a été ajoutée une solution tamponnée de DMT-MM. Le but d'utiliser les oligonucléotides sur support CPG était de prévenir la formation des précipités observés lors des mélanges précédents. Malgré cela, à l'exception du mélange contenant le polymère PEO5000, les mélanges contenant les polymères PMMA5500 et PMMA12000 précipitent. Le procédé de sonication à chaud pendant 2h, a permis d'homogénéiser le mélange avec le PMMA5500 mais pas celui avec le PMMA12000. Ceci s'explique par le fait que le polymère PMMA est un polymère difficile à solubiliser et cette solubilisation est d'autant plus difficile que la longueur de bloc est grande. Les mélanges ont été laissés sous agitation à 70°C pendant 5 jours afin de permettre une conjugaison maximale. Par la suite, les mélanges ont été centrifugés et concentrés sous pression réduite. Les mélanges ont été ensuite purifiés par PAGE. L'efficacité du couplage du bloc PEO5000 a été remarquablement élevée avec un rendement

atteignant 80%. Pour le bloc PMMA5500, un rendement de 30% a été obtenu. Avec un poids moléculaire plus élevé, PMMA12000 un rendement de 7% a été obtenu.

Nous n'avons pas réalisé de spectres de masse avec les diblocs de copolymères obtenus.

*En résumé, la synthèse de bioconjugués par activation de la fonction carboxylique du polymère par le NHS et le DCC n'a pas été rentable. En effet, nous n'avons pas clairement mis en évidence le couplage des polymères PCL, PMMA fonctionnalisés par un acide carboxylique aux oligonucléotides amines. Toutefois l'utilisation d'un activateur DMT-MM nous a permis d'améliorer le rendement des couplages. Cependant, la découverte tardive de ce dernier ne nous a pas permis de l'utiliser par la suite.*

## IV.2. Couplage phosphoramidite

Le couplage phosphoramidite est basé sur la synthèse sur support des oligonucléotides. Inspirés des travaux de Hermann<sup>14</sup>, les oligonucléotides simple brins de 22 et 12 bases (voir Tableau II.4) accrochés sur des billes CPG en position 3' et portant en position 5' une fonction hydroxyle sont couplés à des polymères fonctionnalisés par des groupements hydroxyles (Figure II.5).

Cette technique présente l'avantage d'éviter des étapes de purification longues et fastidieuses. Une fois que le polymère est lié à l'oligonucléotide sur support, toutes les autres espèces présentes dans le mélange réactionnel vont être facilement éliminées, laissant seulement le composé désiré. Cette réaction a été effectuée en utilisant les polymères possédant une fonction hydroxyle et les oligonucléotides de séquences définies (voir Tableaux II.2 et II.3). Les différents polymères ont été mis à réagir avec du chlorure de phosphoramidite en présence d'une base, la DIPEA, pour donner un dérivé polymère-phosphoramidite. Ceci a été confirmé par RMN <sup>31</sup>P où on note la disparition du signal du phosphore du chlorure de phosphoramidite ( $\delta = 180$  ppm) et l'apparition d'un nouveau signal 140-160 ppm selon le polymère couplé. Selon la procédure standard de la synthèse des oligonucléotides, les polymères-phosphoramidites sont par la suite couplés en présence du tétrazole à l'extrémité 5' des oligonucléotides. Après oxydation du phosphore dans une solution d'iode et déprotection des groupements protecteurs se trouvant sur les bases des oligonucléotides, les bioconjugués sont clivés du support solide à l'aide d'une solution d'ammoniaque. Les mélanges obtenus sont purifiés sur PAGE. A l'issue de cette purification, nous avons obtenus des rendements allant de 3 à 10%.

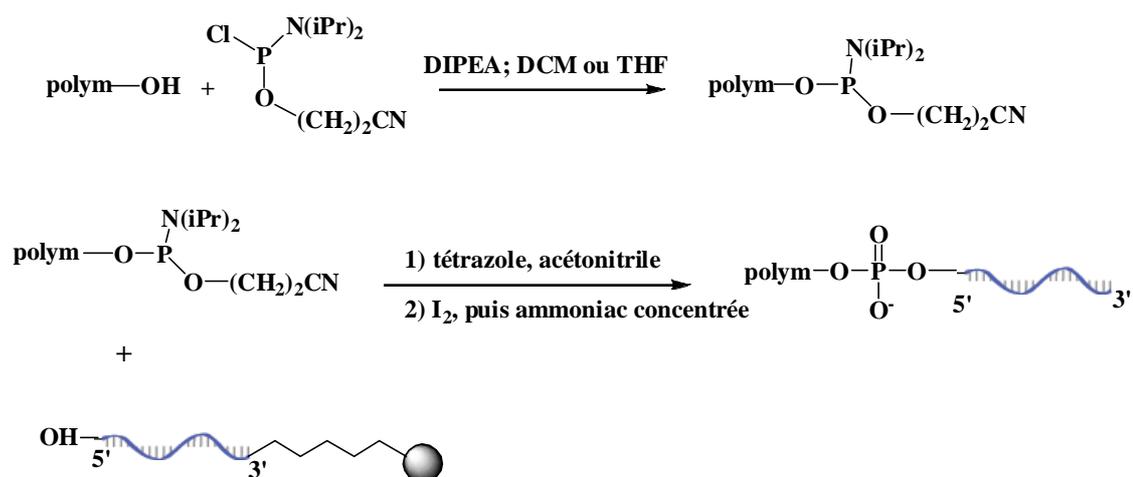


Figure II.5. Synthèse sur support solide des copolymères à blocs à base d'oligonucléotides.

Ce faible rendement s'explique par le caractère sensible du couplage. En effet, la réaction de couplage a besoin d'être réalisée sous atmosphère inerte. Le chlorure de phosphoramidite est susceptible de s'hydrolyser en présence d'eau. C'est ainsi que les spectres RMN  $^{31}\text{P}$  nous donnent quel que soit le polymère utilisé un déplacement chimique  $\delta$  entre 2 et 15 ppm. Nous supposons que ce signal est le produit d'hydrolyse du chlorure de phosphoramidite. Par ailleurs, le groupe de Mirkin a obtenu un rendement du même ordre de grandeur lors du couplage du polystyrène à un oligonucléotide.<sup>13</sup> Malgré les précautions de synthèse prises pour travailler en conditions inertes, il nous a été impossible d'éviter la formation de ces produits d'hydrolyse.

Cette méthode de synthèse nous a permis d'obtenir un certain nombre de copolymères à blocs à base d'oligonucléotides: PMMA6300-ODN<sub>22S</sub>, PMMA6300-ODN<sub>22AS</sub>, PMMA6300-ODN<sub>12x</sub>, PDMS1000-ODN<sub>12x</sub>, PIP6500-ODN<sub>12x</sub>, PEO2000-*b*-PC12600-ODN<sub>22S</sub>, PEO2000-*b*-PC12600-*b*-ODN<sub>22AS</sub>, PEO2000-*b*-PC12800-ODN<sub>22S</sub>, PEO2000-*b*-PC12800-*b*-ODN<sub>22S</sub> et PEO2000-*b*-PC12600-*b*-ODN<sub>22A</sub>.

Pour certains bioconjugués, la détermination de la masse par Maldi-Tof nous a donné la masse attendue. Cela a été le cas du PMMA6300-ODN<sub>22AS</sub> donc le spectre Maldi-Tof est représenté en Figure II.6. Pour les autres bioconjugués, les spectres maldi-Tof n'ont pas été concluants. On suppose que cela peut être dû au fait que la matrice utilisée HPA (acide 3-hydroxypicolinique) est spécifique des oligonucléotides et ne convient pas aux copolymères.

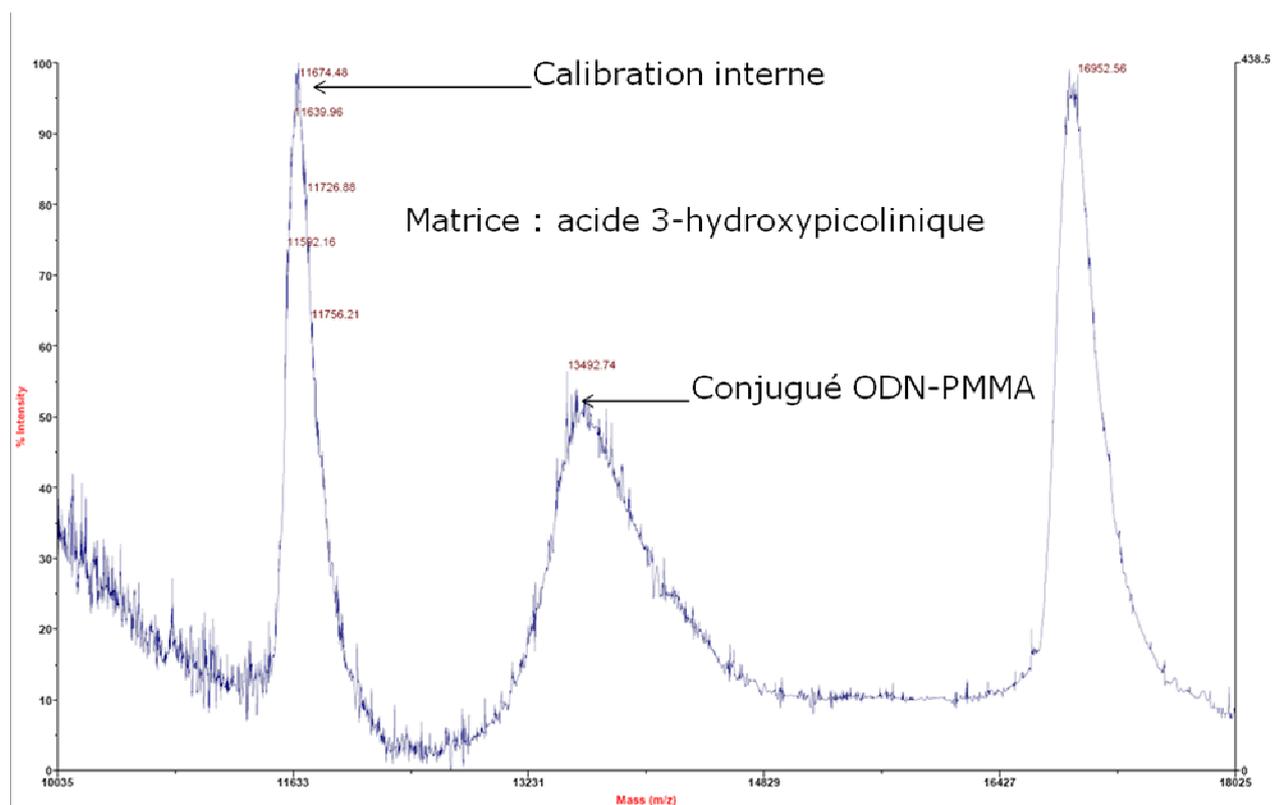


Figure II.6. Spectre Maldi-ToF du PMMA6300-ODN<sub>22As</sub>. Matrice utilisée : acide 3-hydroxypicolinique.

### IV.3. La chimie «Click»

Nous avons également utilisé la chimie «click» afin d'obtenir les copolymères à blocs à base d'oligonucléotides selon le procédé résumé sur la Figure II.6. Cette méthode de couplage est catalysée par le cuivre I et fait intervenir des oligonucléotides fonctionnalisés par un groupement alcyne et des polymères fonctionnalisés par un groupement azoture. Pour ce faire, nous avons été amenés à synthétiser des oligonucléotides fonctionnalisés par des groupements alcynes. A cet effet, des oligonucléotides alcynes ont été synthétisés selon la chimie de synthèse des oligonucléotides en utilisant des synthons phosphorés alcynes.<sup>27</sup> Par ailleurs, le couplage click se fait en utilisant le cuivre I comme catalyseur. Ce dernier peut s'attaquer aux oligonucléotides et dégrader ces derniers. Pour empêcher cela, le ligand TBTA (tris[1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4yl)methyl]amine a été synthétisé. Il a pour rôle d'accélérer de manière très active la réaction de cycloaddition catalysée par le cuivre et stabilise l'état d'oxydation +1 du cuivre.<sup>28</sup> En effet, il chélate le cation Cu<sup>+</sup>, empêchant de ce fait d'endommager l'oligonucléotide.

Nous avons donc couplé un polystyrène azide à un oligonucléotide de 22 mers alcyne. Le mélange réactionnel a été passé en PAGE, aucun produit de couplage n'a été observé. Nous n'avons pas poursuivi avec cette méthode compte tenu du fait qu'elle demande différentes étapes de synthèse (synthèse de l'oligonucléotide, synthèse du TBTA dont la purification requiert différentes colonnes). De plus très peu de polymères fonctionnalisés par un groupement azide existent dans le commerce. Par

ailleurs, nous n'avons pas pu mettre en évidence la fonctionnalisation de l'oligonucléotide par le groupement alcyne par Maldi-Tof.

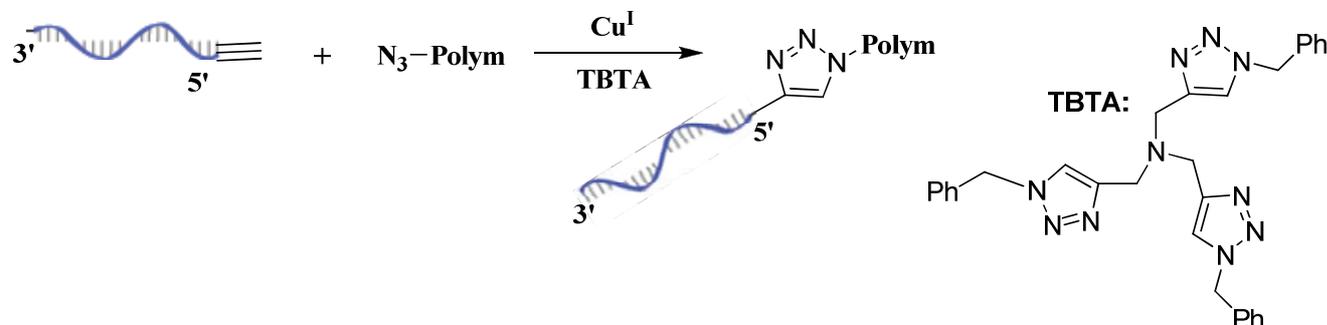


Figure II.6. Chimie «Click»: schéma d'obtention des copolymères à blocs à base d'oligonucléotides en présence de cuivre et de TBTA.

## Conclusion

Les rendements de couplage de copolymères à blocs à base d'oligonucléotides suggèrent que la synthèse peptidique utilisant le DMT-MM comme activateur est plus efficace que celle au phosphoramidite. Toutefois, très peu de polymères fonctionnalisés par les groupements carboxyliques existent dans le commerce. De plus, de nombreux problèmes tels que la reproductibilité des couplages ont été rencontrés. Malgré le faible rendement obtenu (inférieur à 10%), la synthèse phosphoramidite nous a permis de synthétiser un certain nombre de copolymères à blocs à base d'oligonucléotides. Par ailleurs, de nombreux polymères fonctionnalisés par un groupement hydroxyle sont disponibles dans le commerce. C'est ainsi qu'avec les deux types de couplages, nous avons synthétisé les copolymères à base d'oligonucléotides suivants : PMMA6300-ODN<sub>22s</sub>, PMMA6300-ODN<sub>22As</sub>, PMMA6300-ODN<sub>12x</sub>, PDMS1000-ODN<sub>12x</sub>, PIP6500-ODN<sub>22s</sub>, PEO2000-*b*-PC12600-ODN<sub>22s</sub>, PEO2000-*b*-PC12600-*b*-ODN<sub>22As</sub>, PEO2000-*b*-PC12800-ODN<sub>22s</sub>, PEO2000-*b*-PC12800-*b*-ODN<sub>22s</sub>, PEO2000-*b*-PC12800-*b*-ODN<sub>22A</sub>, PC13700-ODN<sub>22s</sub>, PMMA5500-ODN<sub>22s</sub>, PMMA12000-ODN<sub>22s</sub> et PEO5000-ODN<sub>22s</sub>.

La mise en évidence des couplages n'a été possible que par analyse sur PAGE. Les spectres maldi-Tof obtenus n'ont pas été très concluants dans un cas général.

## Références Bibliographiques

- (1) Jeong, J. H.; Park, T. G. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 917.
- (2) Felix, Y. A. L. a. A. M. *Peptide Research* **1993**, *6*, 140.
- (3) Fong, R. B.; Ding, Z.; Long, C. J.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 720.
- (4) Takei, Y. G.; Aoki, T.; Sanui, K.; Ogata, N.; Okano, T.; Sakurai, Y. *Bioconjugate Chemistry* **1993**, *4*, 42.
- (5) Velonia, K.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 4224.
- (6) Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 459.
- (7) Oishi, M.; Hayama, T.; Akiyama, Y.; Takae, S.; Harada, A.; Yamasaki, Y.; Nagatsugi, F.; Sasaki, S.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2449.
- (8) Heredia, K. L.; Tolstyka, Z. P.; Maynard, H. D. *Macromolecules* **2007**, *40*, 4772.
- (9) Tumelty, D.; Carnevali, M.; Miranda, L. P. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 14238.
- (10) Kochendoerfer, G. G.; Chen, S.-Y.; Mao, F.; Cressman, S.; Traviglia, S.; Shao, H.; Hunter, C. L.; Low, D. W.; Cagle, E. N.; Carnevali, M.; Gueriguian, V.; Keogh, P. J.; Porter, H.; Stratton, S. M.; Wiedeke, M. C.; Wilken, J.; Tang, J.; Levy, J. J.; Miranda, L. P.; Crnogorac, M. M.; Kalbag, S.; Botti, P.; Schindler-Horvat, J.; Savatski, L.; Adamson, J. W.; Kung, A.; Kent, S. B. H.; Bradburne, J. A. *Science* **2003**, *299*, 884.
- (11) Shao, H.; Crnogorac, M. M.; Kong, T.; Chen, S.-Y.; Williams, J. M.; Tack, J. M.; Gueriguian, V.; Cagle, E. N.; Carnevali, M.; Tumelty, D.; Paliard, X.; Miranda, L. P.; Bradburne, J. A.; Kochendoerfer, G. G. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 1350.
- (12) Agut, W.; Taton, D.; Lecommandoux, S. b. *Macromolecules* **2007**, *40*, 5653.
- (13) Li, Z.; Zhang, Y.; Fullhart, P.; Mirkin, C. A. *Nano Letters* **2004**, *4*, 1055.
- (14) Alemdaroglu, F. E.; Alemdaroglu, N. C.; Langguth, P.; Herrmann, A. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29*, 326.
- (15) T.P. Davis, K. Matyjaszewski; *Handbook of radical polymerization* **2002**.
- (16) Heredia, K. L.; Bontempo, D.; Ly, T.; Byers, J. T.; Halstenberg, S.; Maynard, H. D. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 16955.
- (17) Matyjaszewski, K. *Progress in Polymer Science*, *30*, 858.
- (18) Barner, L.; Davis, T. P.; Stenzel, M. H.; Barner-Kowollik, C. *Macromolecular Rapid Communications* **2007**, *28*, 539.
- (19) Hentschel, J.; Bleek, K.; Ernst, O.; Lutz, J.-F.; Borner, H. G. *Macromolecules* **2008**, *41*, 1073.
- (20) Scales, C. W.; Convertine, A. J.; McCormick, C. L. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1389.
- (21) Schilli Christine, M.; Müller Axel, H. E.; Rizzardo, E.; Thang San, H.; Chong, Y. K. In *Advances in Controlled/Living Radical Polymerization*; American Chemical Society: 2003; Vol. 854, p 603.
- (22) Chécot, F.; Lecommandoux, S.; Gnanou, Y.; Klok, H.-A. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1339.
- (23) Alemdaroglu, F. E.; Wang, J.; Börsch, M.; Berger, R.; Herrmann, A. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 974.

- (24) Delcroix, D.; Martin-Vaca, B.; Bourissou, D.; Navarro, C. *Macromolecules* **2008**, *43*, 8828.
- (25) Delcroix, D., Université de Toulouse, 2011.
- (26) Gazeau-Bureau, S. p.; Delcroix, D.; Martin-n-Vaca, B.; Bourissou, D.; Navarro, C.; Magnet, S. p. *Macromolecules* **2008**, *41*, 3782.
- (27) Morvan, F.; Meyer, A.; Pourceau, G.; Vidal, S.; Chevolut, Y.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J. *Nucleic Acids Symposium Series* **2008**, *52*, 47.
- (28) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Organic Letters* **2004**, *6*, 2853.



**CHAPITRE III:  
CARACTERISATION PHYSICO-  
CHIMIQUE DE L'AUTO-  
ASSEMBLAGE**

---



# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>77</b>
<b>I. Mise en solution et formation d'agrégats</b> .....	<b>77</b>
<b>II. Caractérisation des morphologies obtenues</b> .....	<b>78</b>
<b>II.1. Techniques expérimentales</b> .....	<b>78</b>
<b>II.1.1. Microscopie Electronique à Transmission (MET)</b> .....	<b>78</b>
<b>II.1.2. Cryo-Microscopie Electronique à Transmission (Cryo-MET)</b> .....	<b>78</b>
<b>II.1.3. Microscopie à Force Atomique (AFM)</b> .....	<b>79</b>
<b>II.1.4. Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL)</b> .....	<b>81</b>
<b>II.1.5. Diffusion des Neutrons aux Petits Angles (DNPA)</b> .....	<b>82</b>
<b>II.2. Résultats</b> .....	<b>85</b>
<b>II.2.1. Les diblocs</b> .....	<b>85</b>
<b>II.2.1.1. PMMA-ODN</b> .....	<b>85</b>
<b>II.2.1.2. PDMS-ODN</b> .....	<b>89</b>
<b>II.2.1.3. PIP-ODN</b> .....	<b>90</b>
<b>II.2.1.4. PCI-ODN</b> .....	<b>91</b>
<b>II.2.2. Le tribloc</b> .....	<b>92</b>
<b>II.2.2.1. PEO-<i>b</i>-PCI-ODN</b> .....	<b>92</b>
<b>III. Etude de la transition unimères ↔ agrégats</b> .....	<b>100</b>
<b>III.1. Cas des copolymères à base d'oligonucléotides : PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> et PCI3700-ODN<sub>22</sub></b> .....	<b>101</b>

<b>III.1.1. Mesures de tension de surface : méthode de la lame de Wilhelmy et méthode de la goutte sessile .....</b>	<b>101</b>
<b>III.1.1.1. lame de Wilhelmy .....</b>	<b>101</b>
<b>III.1.1.2. Goutte sessile .....</b>	<b>102</b>
<b>III.1.1.3. Les autres copolymères à base d'oligonucléotides à blocs.....</b>	<b>104</b>
<b>III.2. Influence de la longueur du bloc hydrophile .....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>106</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>107</b>

## Introduction

Après avoir synthétisé une série de copolymères à blocs «hybrides» à base de polymères et d'oligonucléotides, nous allons maintenant nous concentrer sur l'étude et la caractérisation des structures auto-assemblées se formant en solution aqueuse. Ainsi, après avoir vérifié la formation d'agrégats dans l'eau, l'étude et la caractérisation des organisations auto-assemblées ont été menées en utilisant différentes techniques complémentaires : la microscopie électronique à transmission (MET), la cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-MET), la diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA), la diffusion dynamique de la lumière (DDL) et la microscopie à force atomique (AFM). Nous allons ainsi présenter dans ce chapitre, les différentes morphologies d'auto-assemblage observées.

### I. Mise en solution et formation d'agrégats

Il existe deux grandes méthodes pour la préparation d'agrégats de copolymères à blocs : la dissolution directe et la méthode de co-solvant. Le choix de la méthode à utiliser dépend de la solubilité du copolymère dans le solvant sélectif. Nous avons choisi de solubiliser directement les copolymères dans l'eau compte tenu de la grande solubilité des brins oligonucléotides dans l'eau. Toutefois, dans certains cas, des précipités étaient visibles dans la solution. Ceci fut notamment le cas du copolymère PMMA6300-0DN pour des concentrations  $\geq 200 \mu\text{M}$ . Cette insolubilité pourrait s'expliquer par le fait que le bloc PMMA présente une température de transition vitreuse assez élevée ( $T_g = 120^\circ\text{C}$ ). Dans ces cas, une filtration sur filtre de  $0,2 \mu\text{M}$  a été effectuée. La détermination des concentrations en copolymères à blocs à base d'oligonucléotides s'effectuait par la suite par mesure de l'absorbance de l'oligonucléotide à  $260 \text{ nm}$ .

Nous avons dans un premier temps vérifié que nous formions bien des agrégats en solution aqueuse. Pour cela, nous avons utilisé diverses techniques de microscopie et de diffusion.

### II. Caractérisation des morphologies obtenues

Dans notre étude, nous avons déterminé le type de morphologies obtenues à l'aide de différentes techniques de microscopies telles que la MET, l'AFM, la Cryo-MET et de diffusion (DNPA, DDL). Nous avons ainsi pu extraire les paramètres structuraux suivants : le rayon du cœur ( $R_c$ ), le nombre d'agrégation ( $N_{ag}$ ). Au préalable, nous avons souhaité décrire succinctement les différentes techniques expérimentales utilisées.

## II.1. Techniques expérimentales

Différentes techniques de diffusion ou de microscopie ont été décrites dans la littérature pour la caractérisation morphologique des systèmes micellaires de copolymères à blocs.<sup>1,2</sup>

### II.1.1. Microscopie Electronique à Transmission (MET)

La technique consiste à diriger un faisceau d'électrons de haute énergie (soumis à des tensions d'accélération de 60 à 400 kV) sur un échantillon. Selon la densité électronique d'un objet, ce dernier diffusera plus ou moins les électrons du faisceau et seuls les électrons transmis seront détectés donnant ainsi naissance à une image de l'objet. L'image apparaîtra d'autant plus sombre que la densité électronique de l'objet est élevée.

La préparation des échantillons de MET est simple et consiste à faire évaporer une goutte de la solution de l'échantillon sur une grille de microscopie, ou, dans le cas d'échantillons concentrés, à poser la grille sur une goutte pour que le matériau s'adsorbe. Toutefois, dans le cas de molécules organiques ou de polymères, la visualisation de l'échantillon nécessite un traitement appelé «coloration». Cela consiste après avoir déposé l'échantillon à observer, à déposer une solution contenant des sels d'atomes lourds tels que l'acétate d'uranyle, le molybdate d'ammonium ou l'acide phosphotungstique. Lors du passage du faisceau, du fait de son numéro atomique élevé, le contrastant diffuse fortement les électrons. Les sels se déposeront préférentiellement tout autour des objets. Les objets apparaîtront dans ce cas de façon claire, tandis que le fond sera sombre. On parlera de coloration négative. Dans le cas où les sels peuvent avoir une interaction (chimisorption ou adsorption) avec les objets, ils se fixeront dessus et les objets apparaîtront plus contrastés : on parlera de coloration positive. La MET permet une visualisation des objets formés par les solutions de copolymères à blocs. Cependant, elle n'est pas toujours le reflet du comportement en solution. En effet, la phase de séchage de la grille peut conduire à un changement dans l'organisation de l'échantillon.

### II.1.2. Cryo Microscopie Electronique à Transmission (Cryo-MET)

L'essor de la Cryo-MET<sup>3-6</sup> est à la base d'un développement majeur de la microscopie électronique appliquée à la biologie. On est passé d'une observation d'échantillons fixés et déshydratés à l'observation des objets biologiques dans leur état natif et hydraté. Cette technique résout non seulement le problème que cause l'évaporation du solvant mais aussi l'utilisation de la glace dans cette technique protège jusqu'à un certain point la matière biologique de l'effet destructeur du faisceau électronique.

La clé de l'obtention d'un échantillon propre à l'observation en Cryo-MET est la rapidité de la congélation de l'échantillon, permettant d'obtenir de la glace vitreuse, c'est-à-dire amorphe, non

cristalline. En effet, le processus doit être assez rapide pour empêcher la formation de cristaux. La préparation de l'échantillon pour la Cryo-MET s'effectue en plusieurs étapes:

- le dépôt d'une goutte de solution contenant l'échantillon sur une grille à trous
- l'absorption de l'excès de solution avec du papier absorbant pour ne laisser qu'un fin film aqueux dans les trous du carbone
- le déclenchement de la plongée: la grille pénètre rapidement dans l'éthane liquide, entraînant une vitrification instantanée de l'échantillon
- le transfert de la grille dans le réceptacle à grilles et l'insertion dans le microscope à l'aide d'un système de cryotransfert permettant d'éviter les contaminations, par l'humidité de l'air.

### II.1.3. Microscopie à Force Atomique (AFM)

Développée en 1986 par l'équipe de Binnig,<sup>7</sup> la microscopie à force atomique est basée sur les forces d'attraction ou de répulsion entre les atomes d'un échantillon et d'une pointe analysant la surface de cet échantillon. L'AFM utilise ainsi une sonde à pointe ultrafine montée à l'extrémité d'un levier flexible et sensible à des forces aussi faibles que les forces interatomiques (de l'ordre du pN). Les forces présentes entre la sonde et les atomes de la surface sont mesurées de façon indirecte par la détection de la déflexion du levier. Cette détection est le plus souvent optique : un faisceau laser est focalisé sur le levier, puis réfléchi sur une photodiode (détecteur) à quatre quadrants (Figure III.1). Le signal différentiel généré par la photodiode comporte des informations sur la déformation du levier et donc, sur la force d'interaction pointe – échantillon. L'analyse du signal généré permet ainsi de caractériser l'échantillon.

L'AFM comprend différents modes de fonctionnement :

- le mode *contact* : dans ce mode, la pointe se rapproche de la surface de l'échantillon jusqu'à ce que la force entre les atomes de la pointe et les atomes situés à la surface de l'échantillon devienne répulsive (Figure III.2.). La variation des forces de répulsion imposée par les reliefs est enregistrée pour constituer l'image.
- le mode *non-contact* : dans ce mode, la pointe vibre verticalement à la distance de 5 à 15 nm au dessus de l'échantillon à une fréquence proche de sa fréquence propre. Le principal avantage de ce mode est l'absence de contact entre la pointe et la surface ce qui préserve la qualité de la pointe. En revanche, la qualité de l'image n'est pas aussi bonne que celle obtenue en mode contact car la sensibilité de force attractive est beaucoup plus faible que celle de la force de déflexion utilisée dans le mode contact.

- le mode *contact intermittent* encore appelé mode *tapping* : la pointe vibre ici à une très faible distance de la surface au point qu'elle «touche» celle-ci dans sa position la plus basse. Elle est, donc, en *contact intermittent*. La nature de la force pointe – échantillon varie de l'attraction à la répulsion (Figure III.2). L'amplitude de la vibration fournit à la fois la consigne de la hauteur moyenne de la pointe et est asservie pour maintenir cette même hauteur constante. Le mode *tapping* donne une qualité d'image aussi bonne que le mode *contact* tout en s'affranchissant des problèmes d'endommagement, ou d'adhésion ou de faible sensibilité propres aux modes *contact* ou *non-contact*.

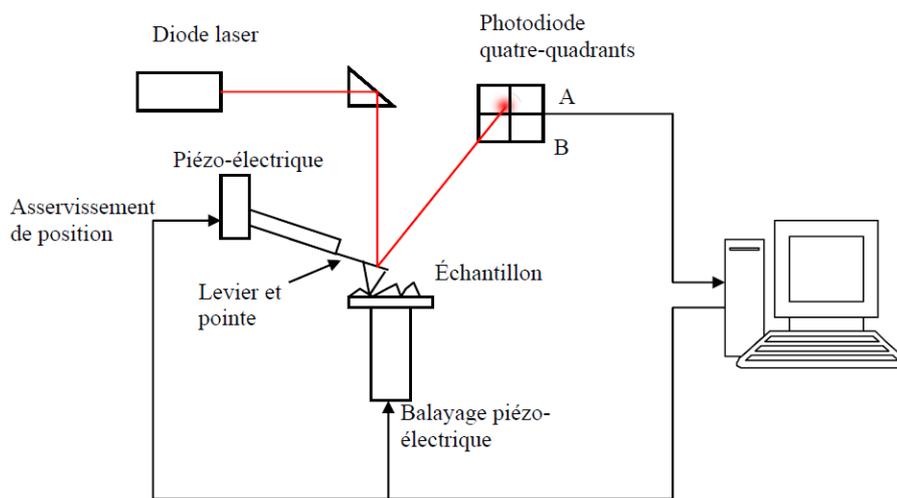


Figure III.1. Schéma de principe de l'AFM montrant la détection de la déflexion du levier par faisceau laser réfléchi vers un détecteur quatre-quadrants.

L'AFM permet donc d'observer un échantillon séché (air ambiant) ou même en solution (milieu liquide) adsorbé sur une surface, avec une résolution nanométrique. La surface sur laquelle les molécules sont déposées est en général le mica, car il est facile d'obtenir avec ce matériau une surface plane et propre à l'échelle atomique. Pour l'observation en milieu liquide, l'échantillon doit être suffisamment adsorbé sur la surface pour ne pas être emmené par la pointe de l'AFM lors du balayage

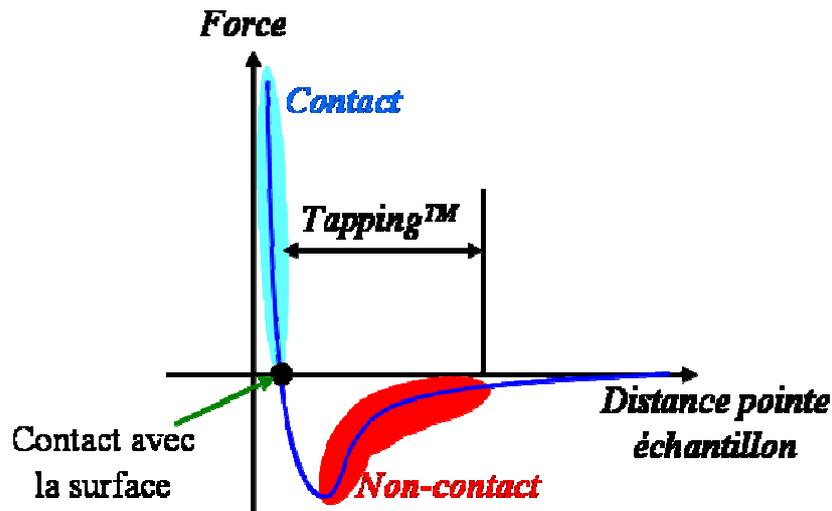


Figure III.2. Force interatomique en fonction de la distance pointe – surface.

#### II.1.4. Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL)

Le principe de la DDL consiste à mesurer au cours du temps  $t$ , l'intensité de la lumière diffusée par une solution colloïdale pour un angle fixe  $\theta$ . En effet, elle s'intéresse aux fluctuations diffusantes engendrées par le mouvement des particules. Toutefois, en DDL, les informations dynamiques ne sont pas mesurées directement : c'est la fonction d'auto-corrélation temporelle normée de l'intensité diffusée  $g(\tau)$ , pour un angle d'observation donné, qui est accessible.

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad \text{Equation 3.1}$$

La notation  $\langle \rangle$  désigne une moyenne temporelle,  $\tau$  représente le temps d'échantillonnage. Cette fonction d'auto-corrélation indique la manière dont sont dépendantes les valeurs de l'intensité diffusée à deux instants différents.

Pour des particules monodisperses en mouvement brownien, cette fonction  $g(\tau)$ , présente une décroissance monoexponentielle caractérisée par un  $\tau_1$  constant.  $\tau_1$  est directement relié au coefficient de diffusion  $D$  par la relation de Fick :

$$\tau_1 = 1 / Dq^2 \quad \text{Equation 3.2}$$

Avec :

D = coefficient de diffusion apparent des particules,

q = norme du vecteur de diffusion ( $q = 4\pi / \lambda * \sin \frac{\theta}{2}$  avec  $\lambda$  = longueur d'onde de la lumière utilisée)

Ce coefficient de diffusion permet de remonter au rayon hydrodynamique de la particule considérée comme sphérique, grâce à l'équation de Stokes-Einstein :

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad \text{Equation 3.3}$$

Avec :

D = coefficient de diffusion

k = constante de Boltzmann

T = température

$\eta$  = viscosité du solvant

Pour une solution polydisperse, la fonction d'auto-corrélation s'écrira sous la forme :

$$g(\tau) = \sum_i (f_i \exp(-\tau / \tau_{ri})) \quad \text{Equation 3.4}$$

La détermination des  $f_i$  et des  $\tau_{ri}$  permet d'évaluer les distributions en taille, et donc de déterminer la polydispersité de la solution.

La DDL nécessite l'élimination des poussières dont la présence pourrait fausser les mesures (l'intensité augmente avec la taille de l'objet). Comme toutes les techniques nécessitant l'utilisation d'un modèle pour exploiter les données expérimentales, la prudence est requise lors de l'analyse des résultats.

### II.1.5. Diffusion des Neutrons aux Petits Angles (DNPA)

La technique de DNPA est utilisée pour déterminer la forme, la distribution en tailles et la structure interne des «objets». Le principe de cette technique repose sur l'interaction entre un faisceau de neutrons et les noyaux d'atomes constituant l'échantillon solide ou liquide.

La mesure de la variation de cette intensité diffusée  $I(q)$  en fonction de l'angle de diffusion ( $2\theta$ ) et donc en fonction du vecteur de diffusion  $q$ , sera enregistrée sur un détecteur. Ce vecteur de diffusion  $q$  varie en fonction de  $\lambda$ , longueur d'onde incidente, de l'angle de diffusion, selon l'équation Equation 3.5 :

$$q = (4\pi / \lambda) \sin \theta \quad \text{Equation 3.5}$$

L'intensité  $I(q)$  diffusée se définit par l'équation 3.6 suivante :

$$I(q) = P(q) \cdot S(q) \cdot \Phi \cdot (\Delta\rho)^2 \quad \text{Equation 3.6}$$

Où  $P(q)$  est le facteur de forme de la particule (informations sur la taille de l'objet),  $\Delta\rho$  est le contraste (différence entre les densités de longueurs de diffusion de la particule et de son environnement, par exemple, différence entre le solvant et l'objet),  $S(q)$  le facteur de structure (informations sur l'organisation de l'objet) et  $\Phi$ , la fraction volumique en objets diffusants. Dans le cas de systèmes dilués, le facteur de structure est égal à 1 pour tous les vecteurs d'onde  $q$ . L'intensité diffusée est donc directement proportionnelle au contraste au carré. Il faut donc que la valeur du contraste soit la plus élevée possible pour avoir un signal avec une forte intensité. Dans le cas de molécules organiques, deux possibilités existent pour augmenter le contraste entre le soluté et le solvant : soit deutérer les molécules, soit le solvant. La première solution étant plus difficile à mettre en œuvre, la deuxième option est donc la plus largement employée.

Trois grands domaines de diffusion sont généralement distingués (Figure III.3) :

a) Le domaine de Guinier ou encore  $q < \frac{1}{R_g}$

Pour un système dilué (c'est-à-dire sans interaction), l'extrapolation de l'intensité à  $q = 0$ , permet de déterminer la masse des objets diffusants  $M$  et la décroissance de l'intensité avec le vecteur d'onde permet de déterminer le rayon de giration  $R_g$ . L'intensité est donnée par l'équation 3.7 :

$$I = I_0 e^{\frac{-q^2 R_g^2}{3}} \quad \text{Equation 3.7}$$

b) Le domaine intermédiaire

Encore appelé domaine de Debye, pour  $\frac{1}{R_g} < q < 1$ . Dans ce domaine,  $I(q)$  varie comme  $q^{-\alpha}$ , la valeur de  $\alpha$  permet d'identifier la forme du diffuseur. Par exemple pour  $\alpha = 1$ , on a des bâtons et des disques plats ou des chaînes gaussiennes pour  $\alpha = 2$ .

Dans le cas des particules sphériques, ce régime intermédiaire n'existe pas. Seuls existent les domaines de Guinier et de Porod.

c) Le domaine de Porod ou  $q > 1$

Dans ce domaine, l'intensité diffusée à grands  $q$  est extrêmement sensible aux régions où la concentration varie sur de courtes distances. La diffusion dépend seulement de la structure locale des interfaces et non de la structure globale. La loi de Porod se traduit par une décroissance en  $q^{-4}$  et se définit suivant l'équation 3.8 :

$$I(q) = \frac{2\pi(\Delta\rho)^2 S}{q^4 V} \quad \text{Equation 3.8}$$

Avec l'aire spécifique qui correspond à  $\frac{S}{V}$

Les expériences de DNPA permettent ainsi de caractériser une macromolécule. On peut ainsi extraire le rayon de giration  $R_g$ , la longueur de persistance  $L_p$ , la taille d'une sous-unité, etc. Comme pour d'autres techniques de diffusion, le traitement des données requiert l'application d'un modèle et nécessite donc la plus grande prudence lors de l'interprétation.

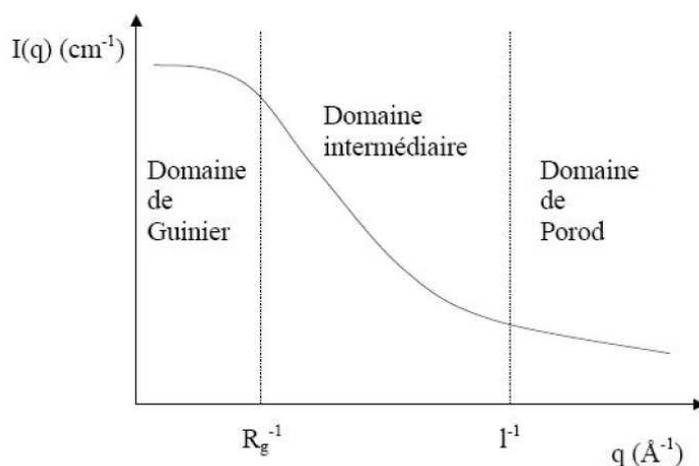


Figure III.3. Courbe obtenue par DNPA représentant l'intensité diffusée  $I(q)$  en fonction du vecteur de diffusion  $q$  avec les différents domaines de diffusion.

## II.2. Résultats

Les copolymères hybrides ont été étudiés par les différentes techniques décrites précédemment, afin de déterminer les organisations supramoléculaires formées. Nous allons dans cette partie, présenter les types d'objets obtenus. Pour cela, on a décidé dans un premier temps, d'effectuer la microscopie électronique à transmission. Cette technique est relativement simple à mettre en œuvre (voir section II.1.1 de ce chapitre). Certains échantillons ont été préparés et observés par nous-mêmes au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB), d'autres par C. Gaillard (INRA, Nantes). Cependant, l'observation en MET s'effectue sur des échantillons séchés, donc assez éloignés de la situation en solution. Nous avons donc également fait observer les échantillons en Cryo-MET par C. GAILLARD et dans ce cas, comme mentionné plus haut, l'échantillon est observé dans un état hydraté. Par ailleurs, pour certains échantillons, nous avons souhaité connaître les paramètres structuraux des objets obtenus. Pour ce faire, les expériences de diffusion des neutrons aux petits angles ont été réalisées en collaboration avec J. Oberdisse au laboratoire Léon Brillouin (LLB, Saclay, France).

### II.2.1. Les diblocs

#### II.2.1.1. PMMA-ODN

Le PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> fut le premier conjugué synthétisé. Rappelons que l'ODN<sub>12</sub> a une masse molaire ~ 3537 g/moles et celle de l'ODN<sub>22</sub> est de 6610 g/moles.

Dans un premier temps, des dépôts de solutions de dibloc PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> traités à l'acétate d'uranyle (coloration négative) ont été effectués, afin de déterminer la morphologie des agrégats (Figure III.4). Les objets apparaissent avec un contraste blanc par rapport à l'acétate d'uranyle qui couvre le fond d'un gris sombre. Il apparaît dans ce cas que les objets sont très réguliers en taille et de forme sphérique. L'analyse des tailles de ces agrégats ont fait apparaître un diamètre moyen de  $22 \pm 5$  nm (moyenne sur 1000 objets).

Dans le cas de la MET, le PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> est totalement séché. Afin d'observer les agrégats de PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> dans un état pleinement hydraté, aussi proche que possible de son état en solution aqueuse, des expériences de Cryo-MET ont été réalisées.

L'étude en Cryo-MET (Figure III.5) a été effectuée à partir des mêmes échantillons que pour la MET. La taille des micelles mesurée sur les images de Cryo-MET nous donne typiquement un diamètre moyen de  $8 \pm 1$  nm.

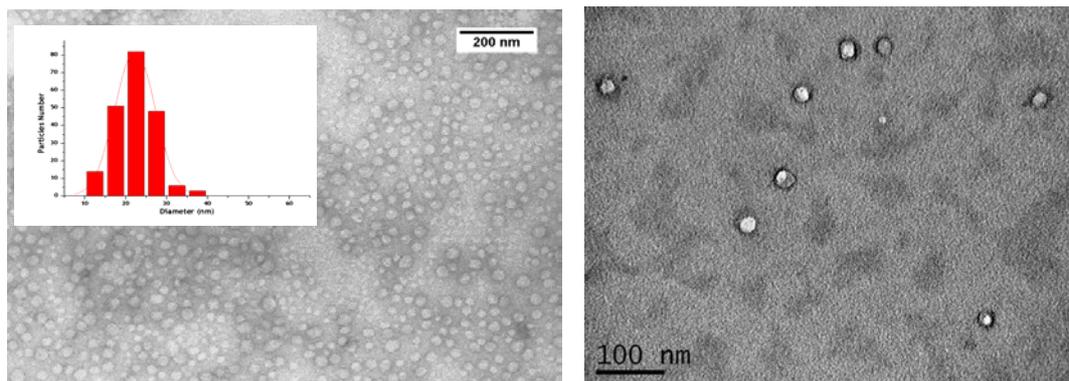


Figure III.4. Micrographes de MET et distribution en taille des agrégats formés par PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> (coloration négative : acétate d'uranyle).

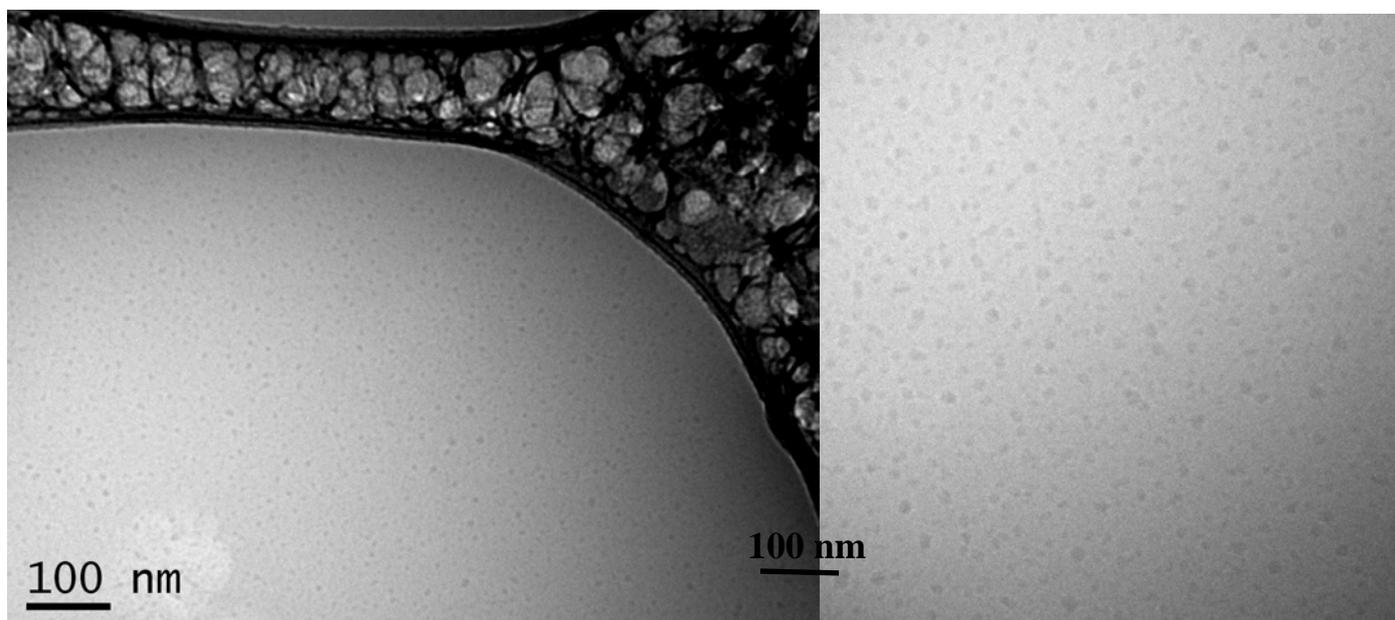


Figure III.5. Images de Cryo- MET d'une solution aqueuse de PMMA6300-ODN<sub>12x</sub>.

Visiblement les tailles obtenues en Cryo-MET sont largement inférieures à celles obtenues en MET. Cela laisse à penser qu'en Cryo-MET, les tailles obtenues correspondent au diamètre dense du cœur hydrophobe PMMA. En effet, la couronne d'oligonucléotide probablement fortement hydratée, d'où un très faible contraste avec l'eau.

Des expériences de DNPA ont été menées afin de déterminer la structure interne de l'objet et le nombre d'agrégation. Rappelons que l'intensité du signal de DNPA est le produit du contraste, du facteur de forme et du facteur de structure (voir section II.1.5 de ce chapitre).

L'auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles en solution peut être étudiée par DNPA sans toutefois perturber l'échantillon.<sup>8,9</sup> Toutefois, il est extrêmement difficile de réaliser des expériences de DNPA, car la gamme de concentrations nécessaires pour faire sortir quelque chose du bruit de fond est de 1% en masse (c'est-à-dire pour des concentrations  $\geq 1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). Ceci implique de manipuler des échelles d'oligonucléotides beaucoup plus grandes que dans des applications de biotechnologies. Par ailleurs, les échantillons pour les mesures de DNPA sont séchés afin d'éliminer l'eau et resolubilisés dans du D<sub>2</sub>O.

En ce qui concerne cet échantillon, PMMA6300-ODN<sub>22</sub>, nous faisons face à un problème de rendement de la réaction. Pour une expérience de DNPA, nous avons accumulé les produits de cinq à sept synthèses à la suite. Ceci nous a permis d'atteindre des concentrations de l'ordre 0,5 mM, ce qui restait un peu juste pour les mesures de DNPA.

Les résultats obtenus avec le PMMA6300-ODN<sub>22</sub> sont présentés sur la Figure III.6a. Dans le cas idéal, l'observation des objets dans des systèmes dilués (c'est à dire sans interactions) conduit à un plateau que l'on appelle Guinier (voir section II.1.5 de ce chapitre) dont l'extrapolation à  $q = 0$  permet de déterminer la masse moyenne sèche et le rayon de giration moyen  $R_g$ . On voit sur la Figure III.6a, une remontée aux petits angles au lieu d'un comportement de Guinier, ce qui suggère la présence de gros objets. Cette remontée peut être raisonnablement ajustée par une loi de Porod en  $1/q^4$ . Il reste une «surintensité» (hachurée en bleu), qui peut être la signature des plus petits objets (Figure III.6a). En soustrayant la loi de Porod, nous obtenons la Figure III.6b. Cette intensité est malheureusement assez bruitée. Aux petits angles, ca semble à peu près fiable, et un ajustement avec une Gaussienne (Guinier) donne le rayon de giration de 12 nm qui correspond à un  $R_{\text{sphère}}$  de 15 nm.

Pour conclure, nous obtenons des expériences de DNPA, qu'il existe :

- de gros objets de taille probablement micronique
- de petits objets d'environ 30 nm de diamètre

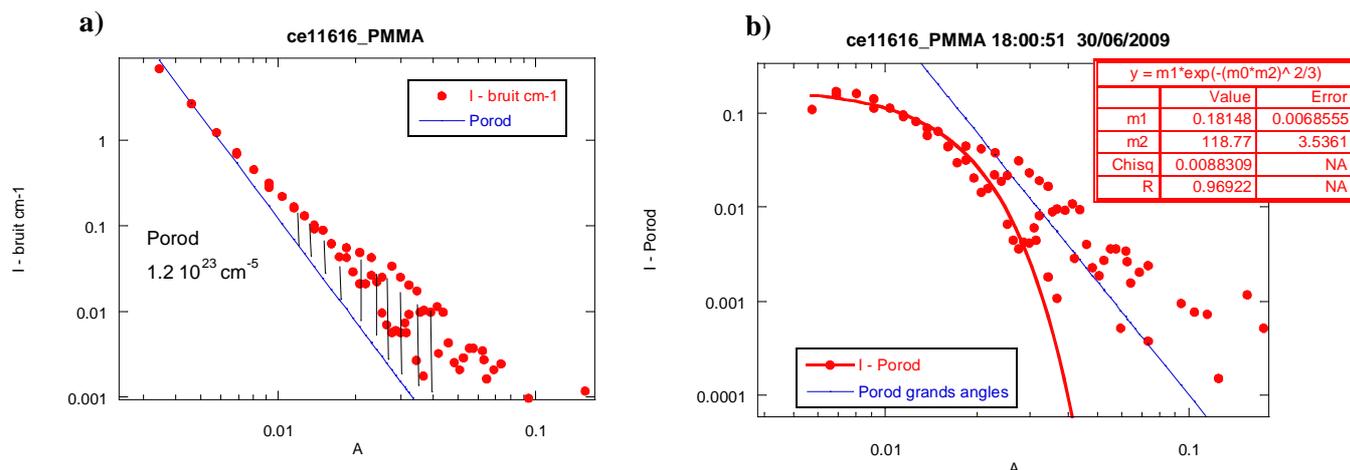


Figure III.6. Etude par DNPA des agrégats obtenus pour le PMMA6300-ODN<sub>22</sub>. (a) Données brutes obtenues (rouge) et ajustement de porod (bleu), (b) Graphe obtenu après élimination de la surintensité (ajustement de Porod aux grand angles).

En DNPA, comme en Cryo-MET, si la couronne d'ODN est gonflée d'eau, elle produit un contraste trop faible pour être visible. Les tailles mesurées en DNPA ( $D = 30$  nm) sont très supérieures à celles observées en Cryo-MET ( $D = 8$  nm). Cette différence peut être due au fait que les mesures de DNPA sont trop bruitées et/ou le traitement pas appropriées ; soit au fait que les objets formés dans les conditions de concentration de Cryo-MET et de DNPA sont différents.

Afin de comparer les tailles obtenues par Cryo-MET à une autre technique, des expériences de DDL ont été effectuées sur le conjugué PMMA6300-ODN<sub>22</sub>. Dans ce cas, il a été difficile d'extraire un diamètre hydrodynamique moyen, car les fonctions d'auto-corrélation sont très complexes. Ceci est probablement dû à la présence de gros objets qui diffusent beaucoup plus que les petits.

*En résumé : Il a été extrêmement difficile pour nous d'obtenir quelque chose de l'analyse des courbes de diffusion du conjugué PMMA6300-ODN<sub>22</sub>. En effet pour avoir un signal correct, il est primordial d'avoir une quantité de matière d'échantillon conséquent. Or la filtration de l'échantillon afin d'éliminer les précipités formés après la mise en solution dans du D<sub>2</sub>O s'accompagne d'une perte de matière. Afin d'éviter cette perte, nous avons donc décidé de ne pas filtrer les solutions lors des expériences de DNPA ; ce qui se traduit par une solution turbide qui se manifeste probablement dans les expériences de DNPA par la présence d'objets de type micronique. Cependant ces gros objets ne sont pas observés avec les autres techniques (MET et Cryo-MET). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la concentration à laquelle on travaille dans ces cas est nettement en dessous de celle des neutrons ou alors que leur fraction est négligeable.*

### II.2.1.2. PDMS-ODN

Les clichés de MET réalisés sur une solution de conjugué de PDMS1000-ODN<sub>12x</sub> traitée à l'acide phosphotungstique (coloration négative), donnent des micelles allongées caractérisées par deux diamètres moyens de  $15 \pm 3$  nm et de  $11 \pm 2$  nm (Figure III.7a). Par ailleurs, le traitement de la solution précédente à l'acétate d'uranyle, nous donne des objets avec une structure en «bandes» (Figure III.7b) caractérisés par une distance entre les bandes de 5 nm. Cette différence de morphologie peut être due à une interaction spécifique de l'oligonucléotide avec le contrastant. Toutefois, la question qui se pose est de savoir pour quelle raison l'oligonucléotide de ce conjugué aurait cette interaction spécifique avec les différents contrastants alors qu'avec les autres conjugués, on n'observe pas ces différences de structure. Nous n'avons pas su répondre à la question.

L'étude en Cryo-MET a également été effectuée sur l'échantillon précédent (Figure III.8). La taille des objets mesurée sur les clichés de Cryo-MET, nous donne des micelles allongées caractérisées par deux diamètres caractéristiques : un de  $37 \pm 7$  nm et l'autre de  $32 \pm 6$  nm. Les tailles obtenues en Cryo-MET sont largement supérieures à celles obtenues en MET, ceci semble cohérent. En effet en Cryo-MET, on regarde le rayon de l'objet hydraté contrairement à la technique de MET, où on regarde un objet séché.

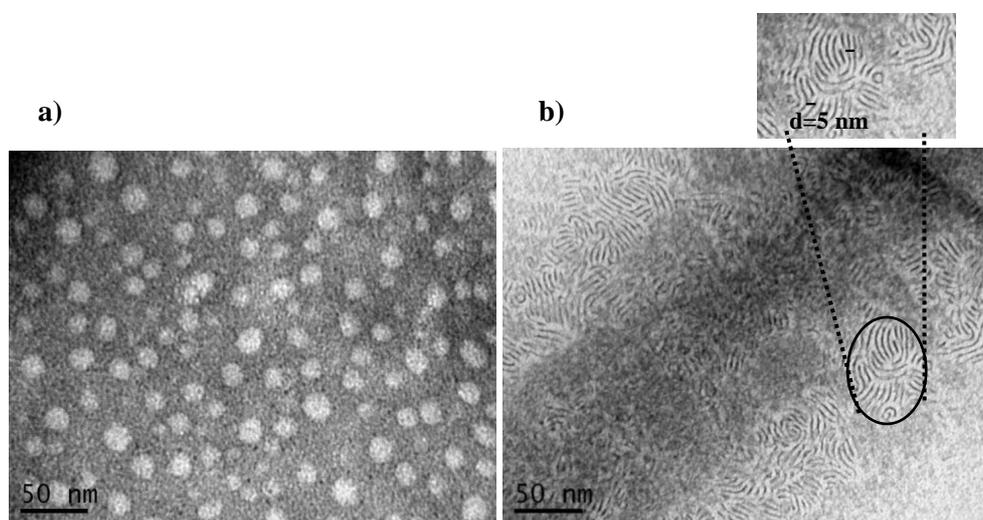


Figure III.7. Micrographes de MET du PDMS1000-ODN<sub>12x</sub>. (a) coloration à l'acide phosphotungstique, (b) coloration à l'acétate d'uranyle.

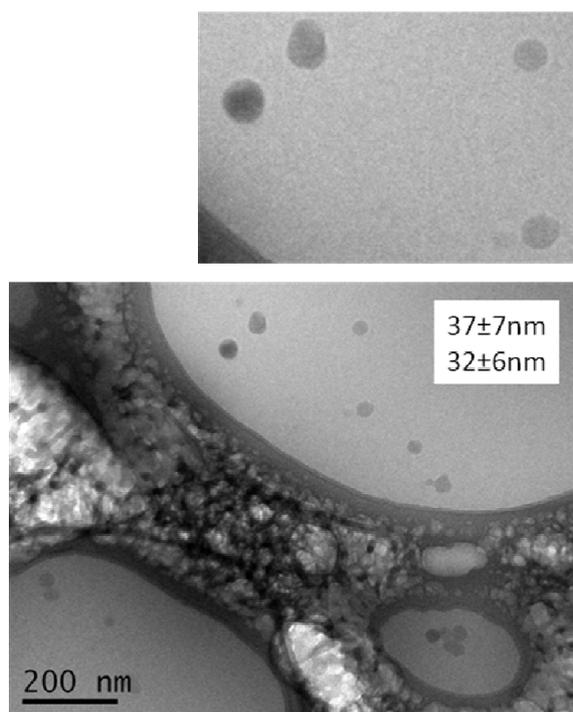


Figure III.8. Clichés de Cryo-MET d'une solution de PDMS1000-ODN<sub>12x</sub>.

### II.2.1.3. PIP-ODN

Les clichés de MET réalisés sur une solution de conjugué PIP6500-ODN<sub>12x</sub> traitée à l'acide phosphotungstique (coloration négative), donnent des micelles allongées caractérisées par deux diamètres caractéristiques de  $33 \pm 3$  nm et de  $11 \pm 2$  nm (Figure III.9).

Les clichés de Cryo-MET réalisés sur ce même échantillon donnent également des objets avec des structures complexes qui s'apparenteraient à des sortes de vésicules (Figure III.10a). Ces objets possèdent un diamètre moyen de  $140 \text{ nm} \pm 12 \text{ nm}$  et une sorte de bicouche caractérisée par une épaisseur  $d = 7$  nm comme on peut le voir sur Figure III.10b.

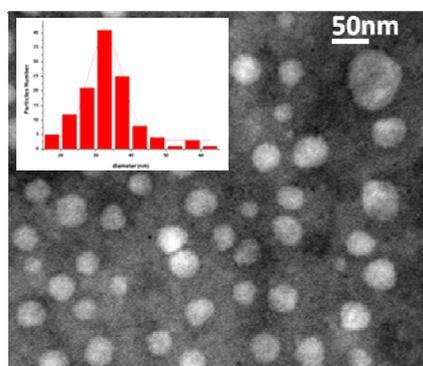


Figure III.9. Micrographes de MET du PIP6500-ODN<sub>12x</sub> (coloration négative : à l'acide phosphotungstique).

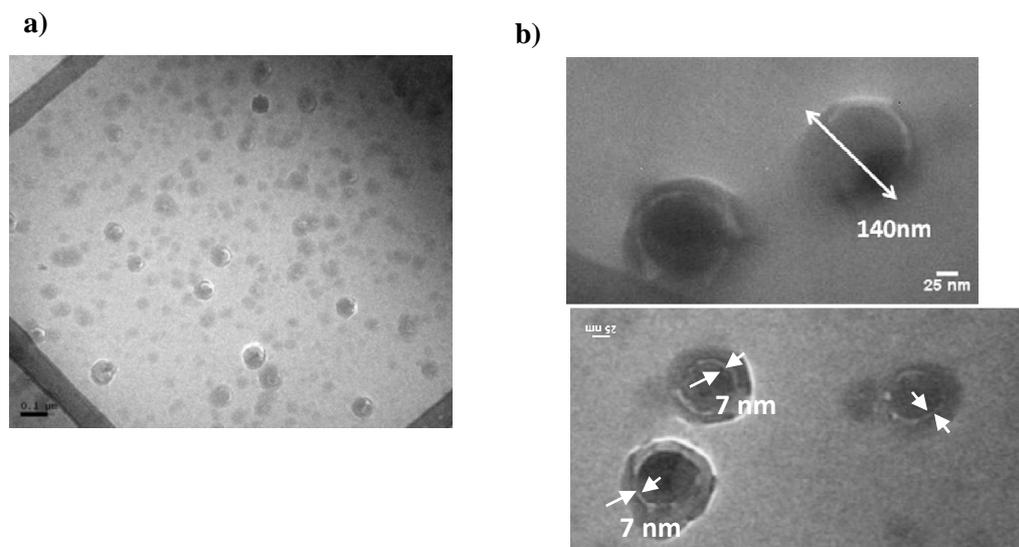


Figure III.10. Clichés de Cryo-MET d'une solution de PIP6500-ODN<sub>12x</sub>.

Il aurait été intéressant d'effectuer des expériences de DNPA sur cet échantillon, cependant en raison du temps qu'il nous était imparti pour les expériences de neutrons, nous n'avons pas pu le faire.

#### II.2.1.4. PCI-ODN

Les dépôts de solution de PCI3700-ODN<sub>12x</sub> ont été traités à l'acide phosphotungstique (coloration négative) (Figure III.11). Il apparaît que les objets ont plutôt la forme d'un ellipsoïde. L'analyse des tailles de ces agrégats fait apparaître deux diamètres moyens:  $D_a$  de  $18 \pm 6$  nm et  $D_b$  de  $13 \pm 5$  nm (moyenne sur 1000 objets). Pour cet échantillon, aucune autre technique physique n'a été effectuée compte tenu du fait que nous avons du mal à synthétiser ce conjugué.

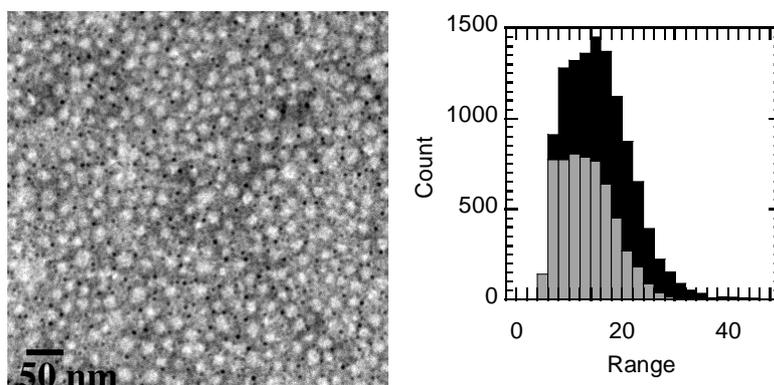


Figure III.11. Clichés de Cryo-MET d'une solution de PCI3700-ODN<sub>12x</sub>.

## II.2.2. Le tribloc

### II.2.2.1. PEO-*b*-PCI-ODN

La synthèse et le protocole de purification ont été optimisés avec ce copolymère tribloc PEO-*b*-PCI-ODN. Par conséquent de nombreuses analyses ont été réalisées avec ce tribloc.

Nous avons dans un premier temps réalisé des expériences de MET sur une solution de conjugué PEO2600-*b*-PCI2000-ODN<sub>22</sub>, traitée à l'acétate d'uranyle (coloration négative). Les clichés de MET donnent des micelles de diamètre moyen de  $28 \pm 11$  nm. De même, les expériences de Cryo-MET réalisées sur ce même échantillon nous donnent des micelles de diamètre moyen compris entre 20 et 30 nm. Visiblement, les micelles ne sont pas de formes sphériques mais anguleuses, comme on le voit sur la Figure III.12. En fait pour les expériences de Cryo-MET, nous avons cherché à améliorer le contraste en ajoutant (0,002 % en masse) de l'acétate d'uranyle à la solution. L'acétate d'uranyle est un complexe cationique qui peut interagir avec le bloc ODN par des interactions électrostatiques. Ainsi, les résultats obtenus laissent penser que les blocs de polymères hydrophiles (PEO et ODN) se séparent pour former des micelles «patchy», comme cela a été décrit précédemment pour d'autres triblocs asymétriques ABC.<sup>10,11</sup>

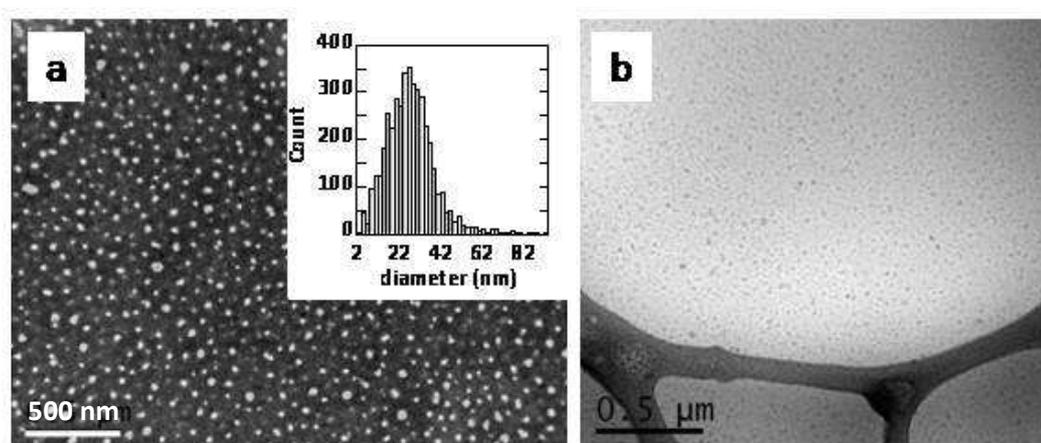


Figure III.12. Clichés d'une solution de PEO2000-*b*-PCL2600-ODN<sub>22</sub> après coloration négative à l'acétate : (a) MET et (b) Cryo-MET.

Par ailleurs, des expériences de Cryo-MET ont été également effectuées sur une solution de tribloc PEO2600-*b*-PCI2000-ODN<sub>12x</sub> (dans ce cas, il n'y a pas de traitement à l'acétate d'uranyle). Les clichés de Cryo-MET nous donnent deux types de populations : une population de petits objets (matérialisés par les petites flèches) et une population de gros objets de forme sphériques caractérisés par un diamètre moyen de  $93 \pm 31$  nm (Figure III-13).

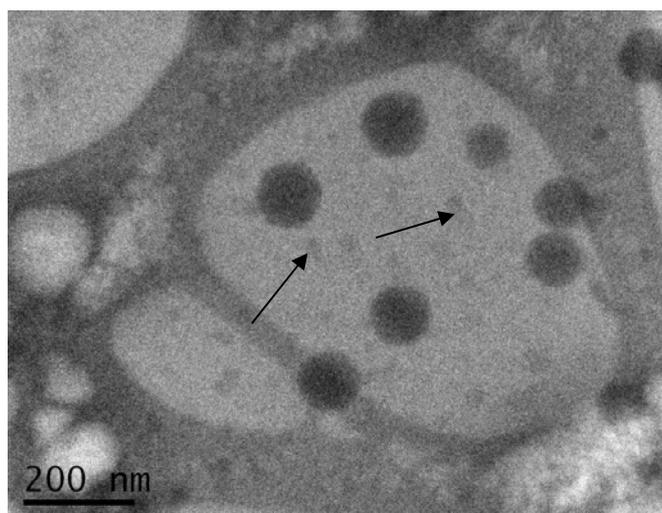


Figure III.13. Clichés de Cryo-MET d'une solution de PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>12x</sub>. Les flèches matérialisent les petits objets.

On observe deux types de populations avec le tribloc PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>12x</sub>, chose que l'on n'observe pas avec le tribloc PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub>. On pourrait supposer que le traitement à l'acétate d'uranyle y est pour quelque chose. De plus, si nous partons sur le postulat que les gros agrégats observés résultent d'une association de plusieurs petites micelles via des liaisons hydrogènes engendrées par les blocs ODN. On peut ainsi supposer que le traitement préalable à l'acétate d'uranyle a empêché la formation de gros agrégats. Etant donné que ce dernier peut effectuer des interactions électrostatiques avec les blocs d'ADN, la formation de gros agrégats via des liaisons hydrogène entre petites micellaires n'aurait plus été possible. Par conséquent, les petits objets observés en Cryo-MET avec le tribloc PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>12x</sub> correspondraient vraisemblablement aux mêmes types d'objets observés avec le tribloc PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub>. Toutefois pour confirmer cette hypothèse, il aurait fallu refaire les expériences de Cryo-MET d'une solution de tribloc PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub> non traitée à l'acétate d'uranyle.

Des expériences d'AFM ont été également réalisées sur les micelles de tribloc PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub> à l'état sec et après réhydratation (Figure III.14). Les mesures d'AFM de l'échantillon sec donnent des objets isolés caractérisés par une hauteur maximale comprise entre 1 et 2 nm et un diamètre compris entre 60 et 80 nm. Le même échantillon sec a été partiellement rehydraté par la suite, juste en ajoutant de l'eau sur le dessus de la couche séchée. Après quelques minutes, un gonflement important des micelles de PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub> s'en est suivi. La mesure dans les plans XY donne un diamètre deux fois plus important que celui obtenu à l'état sec et une hauteur comprise entre 4 et 6 nm.

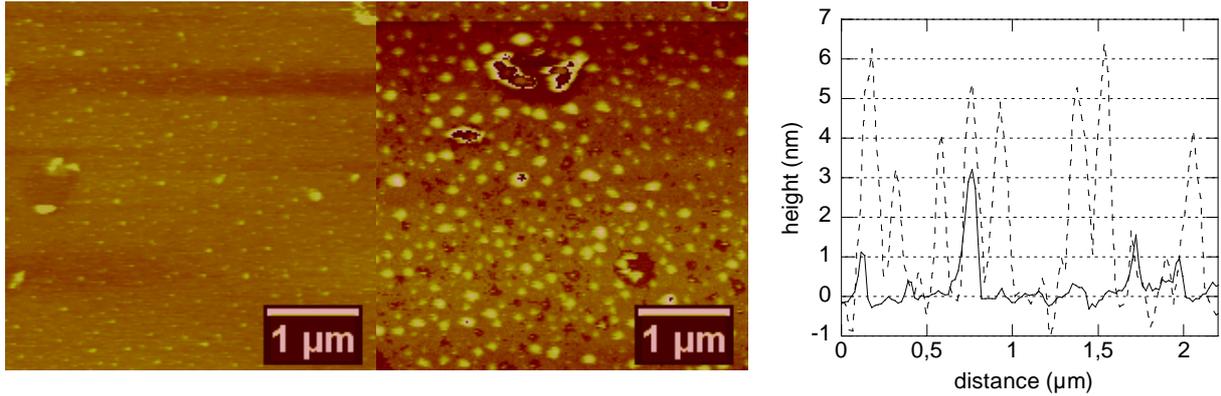


Figure III.14. Images AFM des micelles de tribloc PEO2000-*b*-PCL2600-ODN<sub>22</sub> (dépôt d'une solution de concentration  $\approx 7 \mu M$ ). A gauche : état sec, à droite : état réhydraté. Les profils des hauteurs extraits des images AFM pour l'état sec (trait plein) et réhydraté (trait en pointillé).

Les analyses de DNPA ont été aussi réalisées sur cet échantillon PEO2000-*b*-PCL2600-ODN<sub>22</sub>. Le signal de diffusion du dibloc PEO2000-*b*-PCL2600 (c'est-à-dire avant couplage à l'ODN) présente un plateau de Guinier comme on peut le voir sur la Figure III.15. L'intensité diffusée  $I(q)$  et  $I_0$  sont donc décrites par les équations 3.9 et 3.10 suivantes :

$$I = I_0 e^{\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right)} \quad \text{Equation 3.9}$$

$$I_0 = \frac{cM(\Delta\rho)^2}{N_A d^2} \quad \text{Equation 3.10}$$

Où  $I_0$  peut encore s'écrire de façon la plus simplifiée suivant l'équation 3.11 :

$$I_0 = \Phi V_{\text{séché}} (\Delta\rho)^2 \quad \text{Equation 3.11}$$

Avec  $\Phi$  = fraction volumique et le contraste,  $\Delta\rho = 6,3 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ . L'ajustement de la courbe donne sur la Figure III.15 un volume sec  $V_{\text{séché}} = 689 \text{ nm}^3$  et un rayon de giration  $R_g = 6,2 \text{ nm}$ . On en déduit ainsi un nombre d'agrégation  $N_{\text{Ag}} = 90$  et un rayon de sphère,  $R_{\text{sphère}} = 8 \text{ nm}$ . Le rapport volume séché sur volume équivalent de la sphère  $\left(\frac{4\pi}{3R_{\text{sphère}}^3}\right)$  donne une estimation de la fraction volumique de l'unimère dans la micelle et donc de l'hydratation. Ce qui correspond dans le cas du PEO2000-*b*-PCL2600 à  $1 - V_{\text{séché}} / (4\pi / 3R_{\text{sphère}}^3) = 68\%$ . Soit un tiers des micelles est constitué d'unimères et les deux tiers restants d'eau.

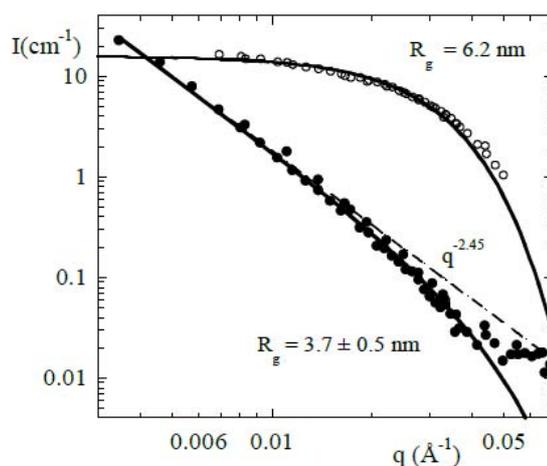


Figure III.15. Intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion  $q$  pour le dibloc PEO2000- $b$ -PCI2600 (○), et tribloc PEO2000- $b$ -PCI2600-ODN22 (●) dans du  $D_2O$ .

Comme ce fut le cas avec le conjugué PMMA-ODN, l'interprétation des résultats de DNPA obtenus avec le tribloc PEO200- $b$ -PCI2600-ODN<sub>22</sub> s'est avérée très difficile. L'intensité diffusée aux faibles  $q$  semble être dominée par une loi de puissance d'environ  $q^{-2.45}$ . Ceci est révélateur de la présence de gros agrégats ( $> 100$  nm), probablement dû à la formation de liaisons hydrogène inter-micellaires créées par les blocs ODN. La présence de ces gros agrégats, empêche un ajustement par la loi de Guinier (équation 3.9) aux faibles  $q$ . Dans le domaine intermédiaire, l'intensité diffusée dévie de cette loi de puissance. Aux valeurs de  $q$  élevées, Le bruit de fond dû à un faible signal de l'intensité rend l'analyse impossible.

La déviation dans le domaine intermédiaire peut être liée à la taille du système. Par analogie avec des fonctions de diffusion de gros agrégats fractals,<sup>12,13</sup> nous avons approximé l'intensité diffusée à une loi de puissance multipliée par une décroissance exponentielle décrite de nouveau par une loi de Guinier (équation 12) :

$$I(q) = Aq^d e^{\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right)} \quad \text{Equation 3.12}$$

L'ajustement des paramètres de l'équation aux points expérimentaux de la Figure III.15, donne un rayon de giration  $R_g \approx 4$  nm, ce qui correspond à un rayon de sphère  $R_{\text{sphère}} = 5$  nm. En raison d'une absence d'information sur la masse de ces micelles, il n'a pas été possible de conclure sur leur état d'hydratation. Toutefois, on remarque que : le rayon du cœur micellaire du copolymère tribloc

PEO2000-*b*-PCL2600-ODN<sub>22</sub> est beaucoup plus petit que celui du dibloc PEO2000-*b*-PCL2600. Ceci est en accord avec les précédents résultats théoriques et expérimentaux obtenus sur des pluronics PEO-*b*-PPO-*b*-PEO et leurs homologues diblocs. En effet, il a été montré que l'augmentation de la longueur du bloc hydrophile ou l'ajout d'un bloc hydrophile conduit à une augmentation de la courbure interface cœur/couronne et donc à un rayon plus petit, dans le but de répondre à un besoin de surface par molécule beaucoup plus important.<sup>14</sup>

Les expériences de DDL ont été également entreprises sur ce tribloc à 20°C à un seul angle 173°C. L'analyse des données en nombre donne un diamètre hydrodynamique moyen de  $56 \pm 21$  nm. Toutefois la distribution en taille est relativement large, comme on peut l'observer sur la Figure III.16.

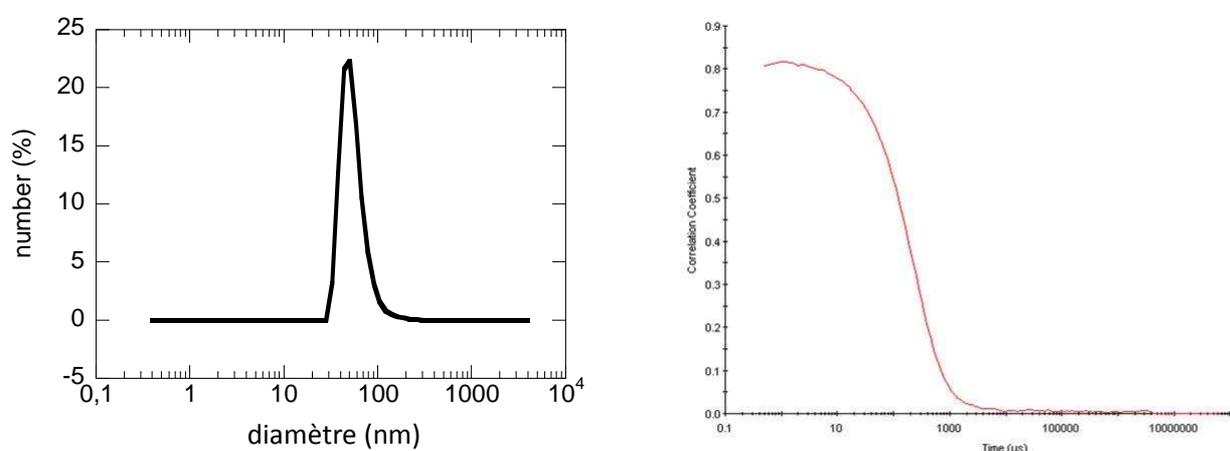


Figure III.16. A gauche : Distribution du diamètre hydrodynamique pour des solutions aqueuses de tribloc PEO2000-*b*-PCL2600-ODN<sub>22</sub> (Concentration = 83.5 mM,  $T = 20^\circ\text{C}$ ). A droite : fonction d'auto-corrélation correspondante.

#### a) Influence de la force ionique

L'effet de l'augmentation de la force ionique sur des systèmes micellaires de polyélectrolytes (caractérisée par une augmentation de la concentration en électrolyte simple tel que le NaCl) a été très largement étudié.<sup>15,16</sup> Nous avons voulu voir si la présence du bloc PEO permettrait d'assurer la stabilité colloïdale même en présence de sel en vue de leur potentielle application en biologie.

Pour ce faire, l'effet de l'ajout du NaCl sur une solution de tribloc PEO2000-*b*-PCL2600-ODN<sub>22</sub> a été effectuée afin d'évaluer les répercussions sur la taille des agrégats en solution. Les mesures de DDL ont été effectuées à un seul angle 173°C sur une solution de tribloc contenant 0 et 1,4 M de NaCl.

La Figure III.17 présente les fonctions d'auto-corrélation obtenues par l'analyse CONTIN des données de DDL collectées. L'analyse des données en nombre nous a donné des diamètres hydrodynamiques de  $59 \pm 30$  nm et de  $48 \pm 22$  nm correspondant respectivement aux cas d'absence et de présence de sel. Rappelons que l'effet d'écrantage pour les systèmes de polyélectrolytes a pour effet de réduire le rayon.<sup>17</sup> Toutefois, les corrélogrammes nous laissent penser qu'il existerait de gros objets et ceci pourrait gêner dans l'interprétation des mesures. Par conséquent les valeurs de tailles obtenues sont à prendre avec des pincettes.

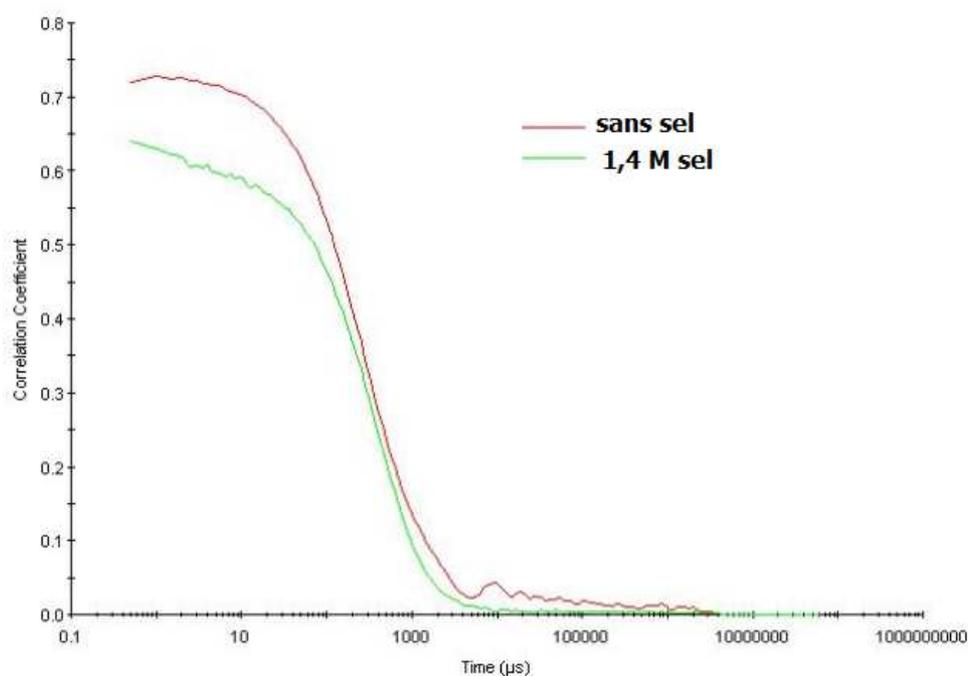


Figure III.17. Influence de l'ajout du sel sur les diamètres hydrodynamiques des agrégats de PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub>.

### b) Influence de la température

Lors de la mise au point des expériences d'hybridation (ce point sera abordé au chapitre IV), nous avons souhaité savoir si le protocole utilisé pour l'hybridation modifierait la taille des agrégats. Pour ce faire, des expériences de DDL ont été effectuées en faisant des montées et descentes en température entre 20°C et 45°C. La figure III.18 nous donne le tracé de la variation du diamètre hydrodynamique moyen (obtenu en nombre) en fonction de la température du tribloc PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub> et dibloc PEO2000-*b*-PCL2600.

On observe ainsi que l'élévation de la température n'a aucun effet sur le dibloc. Le diamètre hydrodynamique moyen du dibloc PEO2000-*b*-PCI2600 est de 15 nm. A contrario, avec le tribloc, nous obtenons de façon surprenante une transition. En effet, pour des températures  $T < 35$  °C, on a des

objets de diamètre moyen de  $50 \pm 10$  nm, Pour  $T = 35$  °C, on a l'apparition de gros objets de 200 nm environ de diamètre. L'augmentation de la température jusqu'à 45 °C conduit à une diminution de la taille des objets. Toutefois celles-ci restent supérieures à 150 nm. Nous nous sommes posé la question de savoir si c'est l'oligonucléotide qui apportait cette transition, étant donné qu'elle n'a pas été observée chez son homologue dibloc.

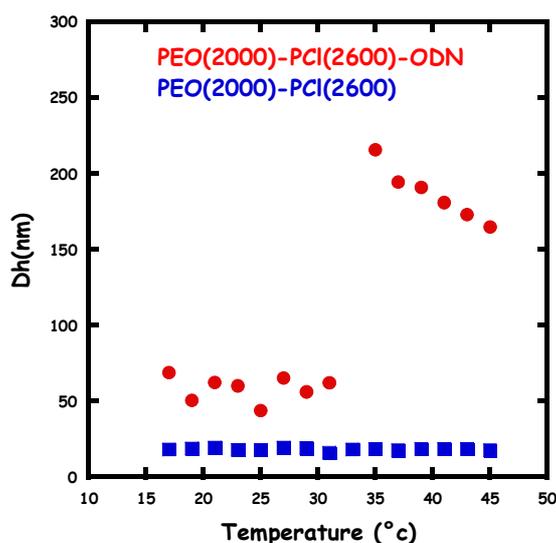


Figure III.18. Variation du  $D_h$  (en nombre) en fonction de la température (°C). (●) PEO2000-b-PCI2600-ODN<sub>22</sub> et (■) PEO2000-b-PCL2600.

Nous avons supposé que cette transition était due à la formation de liaisons hydrogène intermicellaires via des brins d'oligonucléotides. On suppose qu'il existerait des endroits sur la séquence de l'oligonucléotide où les bases sont complémentaires. La formation de paires de Watson-Crick à ces endroits comme l'illustre la Figure III.19 engendrerait la formation de gros agrégats. Toutefois, cette hypothèse n'explique pas pourquoi cette transition est favorisée à température élevée. On pourrait également penser que l'effet d'augmenter la température, pourrait engendrer une ségrégation des blocs hydrophiles (PEO et ODN). Cette ségrégation engendrerait probablement par la suite la création d'un dipôle favorisant ainsi l'attraction entre les agrégats.

Afin de pousser plus loin notre raisonnement, nous avons pensé rompre ces liaisons hydrogène et regarder en DDL la taille des objets. Pour ce faire, nous avons ajouté à cette solution de tribloc de l'urée. L'urée est traditionnellement utilisé lors des gels électrophorèses pour détruire les structures secondaires que peuvent former les oligonucléotides simples brins via des appariements internes de bases. Les mesures de DDL ont été effectuées sur une solution de tribloc 0,1mM contenant de l'urée

8M. Aucun changement n'a été observé sur le diamètre hydrodynamique. Autrement dit, il existait toujours cette transition de taille à 35 °C.

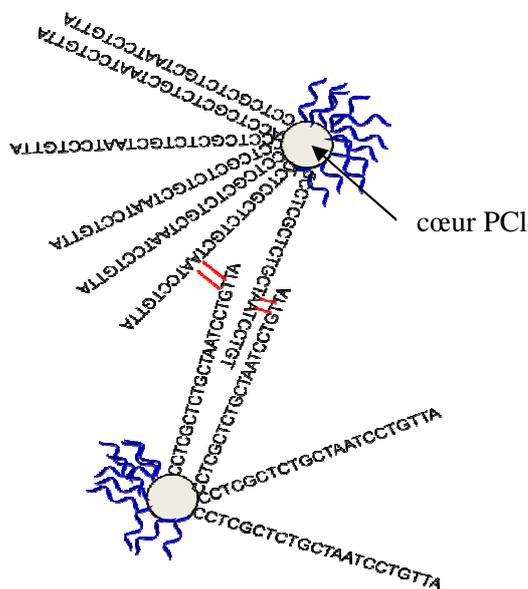


Figure III.18. Illustration de la formation des gros agrégats via des liaisons hydrogènes inter-micellaires. Chaîne de polymère PEO , coeur hydrophobe PCI  et séquence ODN 22bases : 5'-CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTA-3',  Liaison hydrogène.

Pour conclure sur cette partie, différentes techniques ont été utilisées pour déterminer la morphologie des bioconjugués. De manière générale, nous avons obtenu des agrégats sphériques ou allongés de diamètre compris entre 20 et 100 nm. Toutefois, dans certains cas, des objets avec des structures complexes ont été obtenus tel fut le cas du PIP6500-ODN<sub>12x</sub> et PDMS1000-ODN<sub>12x</sub>. Nous avons également observé que pour certains bioconjugués, il coexistait des gros et petits objets mais cette coexistence n'était pas mise en évidence dans toutes les techniques, possiblement du au fait qu'elle dépend de la concentration. Par ailleurs, la détermination de la structure interne de certains bioconjugués par les expériences de DNPA fut un véritable challenge. En effet les problèmes rencontrés tels que la présence de gros objets ou la mauvaise statistique aux grandes valeurs de q, nous ont gêné dans l'interprétation des données. Malgré celà, nous avons pu extraire de ces analyses des rayons de giration et de sphère des agrégats PMMA6500-ODN<sub>22</sub> et PEO2000-b-PCI2600-ODN<sub>22</sub>. Il nous a été difficile de déterminer leur nombre d'agrégation compte tenu du fait que nous ne disposions pas d'informations sur la masse de ces micelles.

Nous avons mis en évidence l'effet de l'ajout du sel sur la taille des objets du tribloc. Toutefois, les corrélogrammes nous montrent qu'il existerait de gros objets. Ceci pourrait être du à la coexistence de deux types de populations mis en évidence par différentes techniques. L'apparition de ces gros

*objets pourrait s'expliquer par la présence de liaisons inter-hydrogènes que pourraient former les oligonucléotides. Il nous a été impossible de rompre ces liaisons par utilisation d'urée. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la température influençait l'agrégation. Nous supposons que la température favoriserait probablement la ségrégation des blocs hydrophiles générant ainsi un dipôle. Ce dipôle pourrait engendrer une attraction entre les agrégats et donc expliquer la formation de gros agrégats.*

### III. Etude de la transition unimères ↔ agrégats

La plupart des travaux menés sur les copolymères à blocs à base d'ADN et plus généralement sur les copolymères à blocs biohybrides se focalisent sur l'étude des morphologies. Très peu d'études sont entreprises afin de vérifier la possible existence d'une concentration d'agrégation critique (CAC), car il est souvent supposé que les agrégats sont gelés. La CAC est une notion décrivant les propriétés physiques et la stabilité d'un agrégat,<sup>18</sup> dérivée de celle de concentration micellaire critique (CMC). La CMC n'a en réalité de sens que si le système est à l'équilibre thermodynamique (cas des tensioactifs) et correspond à la concentration d'unimères en équilibre avec les micelles.

Contrairement au cas des tensioactifs, les agrégats de copolymères à blocs amphiphiles peuvent être cinétiquement gelés, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'échanges dynamiques d'unimères entre les agrégats et les unimères du milieu continu. Il en résulte que la morphologie des agrégats peut aussi être influencée par les conditions de préparation.<sup>19-21</sup>

Le processus d'entrée/sortie des unimères des micelles est le suivant<sup>22</sup> : pour s'extraire/entrer du coeur de la micelle, le bloc hydrophobe du copolymère doit s'extirper de la partie centrale, traverser l'interface puis franchir une couronne constituée des blocs hydrophiles. Ce déplacement est d'autant plus lent que le coeur est rigide et que le bloc hydrophobe est long. La plupart des auteurs qui étudient ces systèmes ont tendance à dire qu'une  $T_g$  trop élevée serait la première cause de formation de nanoparticules gelées. Cependant, même dans le cas où le coeur est non vitreux, la barrière d'activation qu'un unimère devrait franchir pour s'extirper d'une micelle pourrait être suffisamment élevée pour geler le système. Halperin et Alexander<sup>23</sup> ont en effet montré que lors de la micellisation, la barrière énergétique associée au processus d'échange d'unimères est reliée à la tension de surface  $\gamma_{B/solvant}$  entre le bloc hydrophobe (B) et le solvant et au nombre d'unités constitutives du bloc hydrophobe ( $N_B$ ) selon l'équation 3.14 suivante :

$$E_a \propto \gamma_{B/solvant} \cdot N_B^{2/3} \quad \text{Equation 3.14}$$

Des travaux expérimentaux récents montrent que la réalité est plus complexe, tout en confirmant le rôle de la tension interfaciale  $\gamma_{B/solvant}$ . Concrètement, il n'est pas toujours facile de faire une distinction claire entre les agrégats dynamiques et les agrégats gelés. Cette question ne devrait cependant pas être négligée, car la CAC détermine la durée de vie des agrégats et leur stabilité face à la dilution. Autrement dit, l'existence d'une CAC induit la disparition des objets aux fortes dilutions. Ceci peut avoir des conséquences importantes notamment pour les applications biologiques.

### III.1. Cas des copolymères à base d'oligonucléotides : PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> et PCI3700-ODN<sub>22</sub>.

Nous nous sommes posé la question de l'existence d'une transition agrégats ↔ unimères et de la réversibilité de cette transition dans nos systèmes copolymères à blocs à base d'oligonucléotides. Pour ce faire, nous avons sondé expérimentalement l'existence de cette transition réversible agrégats ↔ unimères en utilisant la mesure de tension de surface. Nous avons tout d'abord observé cette transition en diluant successivement nos systèmes (lame de Wilhelmy), puis en les concentrant (goutte sessile).

#### III.1.1. Mesures de tension de surface : méthode de la lame de Wilhelmy et méthode de la goutte sessile

##### III.1.1.1. lame de Wilhelmy

**Principe** : lorsqu'une lame mince est plongée dans un liquide puis tirée vers le haut, la tension de surface se manifeste par la force qui s'oppose à l'allongement du ménisque et qui tire la lame vers le bas. Le bilan des forces verticales montre que le poids apparent du ménisque,  $F$ , vaut  $F = \gamma * P \cos \theta$  où  $\gamma$  est la tension de surface,  $\theta$  l'angle de contact du ménisque avec la lame et  $P$ , le périmètre de la lame avec  $P = 2(L + \ell)$  (Figure III.19). La mesure du poids du ménisque permet donc d'accéder à la tension de surface. Dans notre étude, nous avons utilisé une lame de papier qui mouille totalement ( $\theta = 0$ ). Par ailleurs, compte tenu des faibles quantités de copolymères hybrides obtenues à l'issue de la synthèse, nous avons adapté le dispositif en le miniaturisant (Figure III.19).

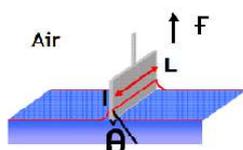


Figure III.19. Schéma montrant le principe de mesure de tension de surface par la méthode de la lame de Wilhelmy (haut) et dispositif miniaturisé (bas).

### III.1.1.2. Goutte sessile

**Principe :** elle consiste à déposer une goutte d'un liquide sur une lame de verre. L'image de la goutte est capturée par une caméra vidéo reliée à l'appareil et l'analyse de la forme prise par la goutte au repos sur la lame de verre donne non seulement une valeur de la tension superficielle  $\gamma_{\text{liquide-air}}$  mais aussi de l'angle de contact  $\theta$ , angle tangent de la goutte liquide au point de contact avec le solide (Figure III.20). L'utilisation de cette technique pour déterminer la CMC de tensioactifs a été décrite pour la première fois par l'équipe de Kaufmann.<sup>24</sup> Cependant dans leur étude, ils ont suivi la variation de l'angle de contact à différentes concentrations en tensioactifs. Dans notre étude, nous n'allons pas mesurer l'angle de contact mais la tension superficielle  $\gamma_{\text{liquide-air}}$ . De plus, nous allons suivre l'évaporation d'une goutte au cours du temps.

Une goutte d'environ 300  $\mu\text{L}$  de solution de copolymères à blocs à base d'oligonucléotides de concentration connue est déposée sur une lame de verre préalablement traitée au trichlorométhylsilane. L'image de la goutte est capturée par une caméra vidéo. Le suivi de l'évaporation de la goutte (mesure du volume et de la tension superficielle) au cours du temps nous permet de remonter à tout moment à la concentration et donc de mesurer la tension superficielle à différentes concentrations du copolymère (Figure III.20).

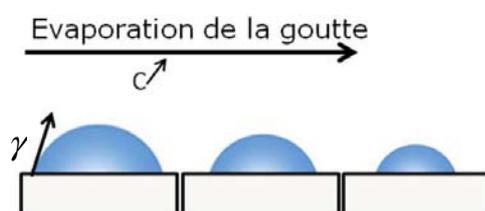


Figure III.20. Principe de mesure de la tension de surface par la méthode de la goutte sessile.

Compte tenu du fait que cette méthode d'évaporation de la goutte sessile n'a été décrite nulle part dans la littérature, nous avons souhaité la valider en effectuant des études préliminaires sur un tensioactif (SDS) et un copolymère à bloc (pluronic P84 ou PEO<sub>19</sub>-PPO<sub>43</sub>-PEO<sub>19</sub>). Les mesures de tensions superficielles effectuées par la méthode de la goutte sessile et celles effectuées par la lame de Wilhelmy ont été tracées sur le même graphe (Figure 21). Les traits en pointillés indiquent les valeurs de CMC rapportées dans la littérature : 9 mM et 6,2 mM respectivement pour le SDS et le pluronic P84. La rupture de pente, correspondant à la transition unimères – micelles, se produit à la même concentration avec les deux méthodes. Les valeurs de tension de surface trouvées avec la goutte sessile sont un peu différentes de celles trouvées avec la lame de Wilhelmy. Toutefois, dans les deux cas, une

transition claire correspondant à la CMC attendue a pu être observée. Nous en concluons que cette technique est adaptée pour sonder les transitions unimères  $\leftrightarrow$  agrégats dans le sens de concentration.

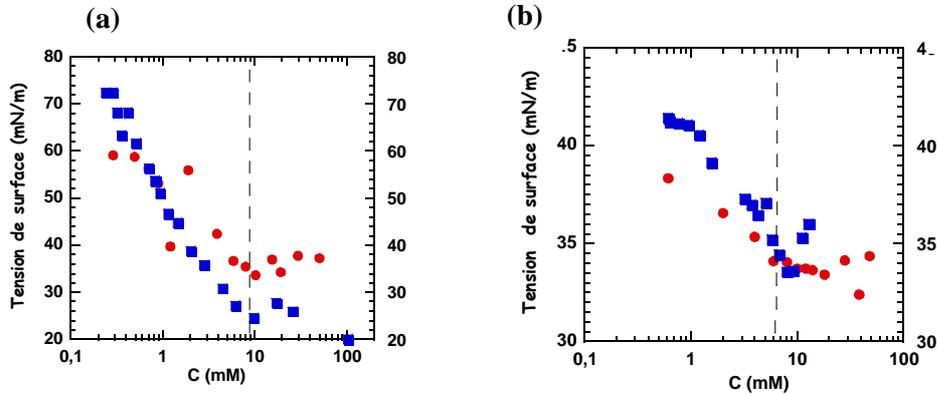


Figure III.21. Mesures des tensions de surface de deux surfactants : (a) SDS ; (b) Pluronic P84. Mesures obtenues avec la lame de Wilhelmy (●) et la goutte sessile (■). Le trait en pointillé matérialise les valeurs de CMC.

Une fois la validation de la méthode effectuée, les mesures de tension superficielles du copolymère PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> et PCI3700-ODN<sub>22</sub> ont été entreprises. La Figure III.22 représente les mesures de tension de surface obtenues au moyen de la goutte sessile et de la lame de Wilhelmy pour le PCI3700-ODN<sub>22</sub> et PMMA6300-ODN<sub>12x</sub>.

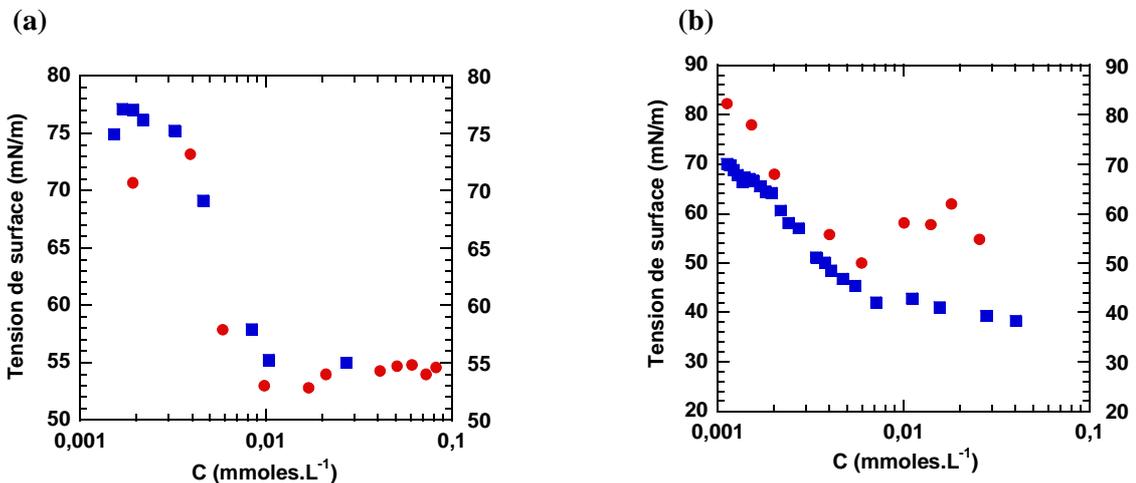


Figure III.22. Mesures des tensions de surface de biohybrides : (a) PCI3700-ODN<sub>22</sub> ; (b) PMMA6300-ODN<sub>12x</sub>. Mesures obtenues avec la lame de Wilhelmy (●) et la goutte sessile (■).

Dans le cas du biohybride PCI3700-ODN<sub>22</sub> (Figure III.22a), les mesures de tension de surface obtenues par les deux techniques nous donnent le même profil. On peut donc se permettre d'affirmer que dans le cas du PCI3700-ODN<sub>22</sub>, il existe une transition réversible. Notons cependant que nous ne sommes pas en mesure de savoir si les agrégats formés sont des micelles (c'est-à-dire correspondent à

un minimum de l'énergie libre) ou si leur croissance est cinétiquement bloquée par une barrière de potentiel très élevée. Dans le cas du PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> (Figure III-22b), les mesures de tension de surface obtenues par la goutte sessile ne se superposent pas aussi bien avec celles de la lame de Wilhelmy, aux fortes concentrations. On peut envisager que le système obtenu par dilution d'une solution concentrée est un peu différent de celui obtenu par concentration d'une solution très diluée, à cause de la barrière de potentiel à franchir pour extraire un polymère d'un agrégats.

### III.1.1.3. Les autres copolymères à base d'oligonucléotides

Nous avons également effectué les mesures de tension superficielles du copolymère PDMS1000-ODN<sub>12x</sub>. Les valeurs obtenues par la méthode de la lame de Wilhelmy sont présentées en fonction de la concentration sur la Figure III.23, de même que les valeurs obtenues avec le PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> et PCI3700-ODN<sub>22</sub>. L'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration montre dans tous les cas 2 régimes : aux faibles concentrations, une diminution de la tension de surface, puis aux fortes concentrations, un plateau ou une pente significativement plus faible. Nous obtenons ainsi des seuils d'agrégation de l'ordre de 4; 9 et 79  $\mu\text{M}$  correspondant respectivement aux copolymères PMMA6300-ODN<sub>12x</sub>, PCI3700-ODN<sub>22</sub> et PDMS1000-ODN<sub>12x</sub>. Si nous comparons les valeurs obtenues entre elles, bien que les blocs hydrophobes soient des polymères différents, on se rend compte qu'une augmentation de la taille du bloc hydrophobe conduit à une diminution de la solubilité, ce qui est tout à fait cohérent. La longueur de l'oligonucléotide semble avoir relativement peu d'effet car le PCI3700-ODN<sub>22</sub> se place bien entre les 2 autres qui portent pourtant des oligonucléotides deux fois plus courts.

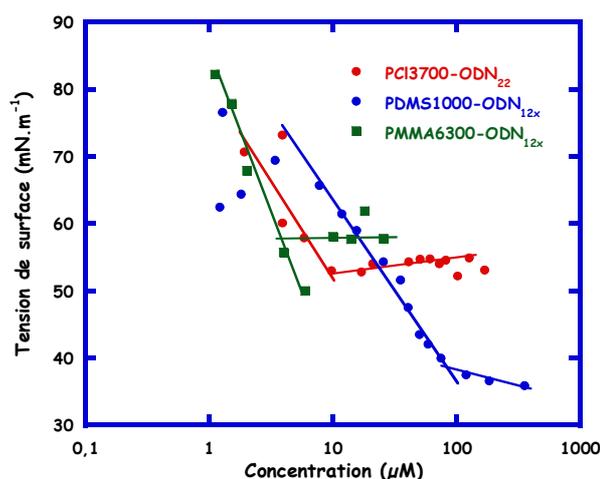


Figure III.23. Variation de la tension de surface en fonction de la concentration en copolymères à blocs à base d'oligonucléotides.

### III.2. Influence de la longueur du bloc hydrophile

Contrairement au bloc hydrophobe,<sup>25-28</sup> l'influence de la taille du bloc hydrophile est très peu étudiée. Afin de regarder de plus près l'effet de l'augmentation du bloc oligonucléotide sur la thermodynamique de nos systèmes, nous avons utilisé les conjugués PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> et PMMA-ODN<sub>22</sub>. Dans cette étude, la longueur du bloc hydrophile ODN augmente alors que la longueur du bloc hydrophobe est maintenue constante.

La figure III.24 donne les mesures de tension de surface en fonction de la concentration obtenue en utilisant l'évaporation de la goutte sessile. Il apparaît que l'augmentation de la longueur de l'oligonucléotide n'influence pas significativement l'agrégation. Ceci est en accord avec ce qui est décrit de la littérature. En effet l'équipe d'Astafieva<sup>29</sup> a montré que pour des copolymères PS-*b*-PANa, la longueur du bloc hydrophile PANa n'influence pas l'agrégation tant que la longueur du bloc hydrophobe PS est plus grande que celle du PANa. Et dans ce cas, la micellisation est dominée par les propriétés hydrophobes. Dans notre cas, le bloc hydrophobe, PMMA, de 6300 g/moles est soit de même longueur ( $M_{\text{ODN}22} = 6610$  g/mole) ou plus long (et  $M_{\text{ODN}12} = 3357$  g/mole) que le bloc hydrophile ODN. Par conséquent la micellisation est dominée par les propriétés hydrophobes du PMMA et la longueur de l'oligonucléotide semble avoir relativement peu d'effet.

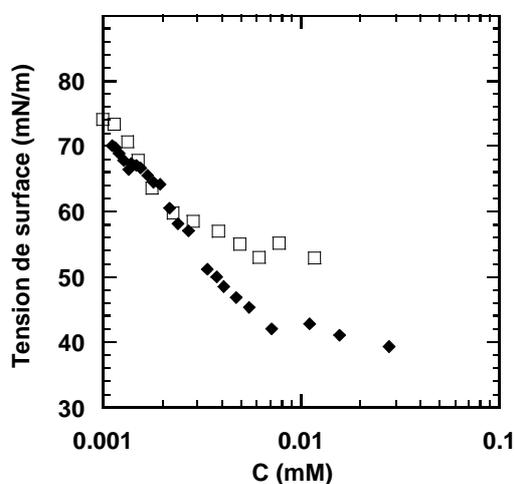


Figure III.24. Influence de la longueur du bloc ODN sur les mesures de tensions de surface obtenues par la goutte sessile. PMMA6300-ODN12x ( □ ) ◆ PMMA6300-ODN22 ( ◆ ). □

*Pour résumer :*

*Nous avons étudié la transition unimère ↔ agrégats et la réversibilité de cette transition par deux méthodes. Les mesures de tension de surface à partir des deux chemins de préparation nous ont permis de montrer que les biohybrides PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> et PCI3700-ODN<sub>22</sub> s'agrègent de manière réversible ; et de déterminer les seuils d'agrégation.*

*Nous avons également montré que la longueur de l'ODN, n'influencait pas ce seuil d'agrégation.*

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé la morphologie des bioconjugués par différentes techniques. Nous avons obtenu de manière générale des agrégats sphériques. Pour certains biohybrides, des structures complexes ont été observées. Dans le cas du tribloc, nous avons mis en évidence la coexistence de deux types de populations : une population de grosse taille et une autre beaucoup plus petite. Nous avons supposé que les gros objets provenaient de la formation de liaisons hydrogène inter-micellaires engendrées par l'oligonucléotide. Il nous a été impossible de rompre ces liaisons par ajout d'urée. La présence de ces gros objets a été un frein à la détermination des paramètres structuraux dans les expériences de DNPA.

Nous nous sommes également intéressés à la dynamique de nos systèmes. Nous avons montré par deux méthodes de préparation différents, qu'il existait un échange d'unimères dans nos systèmes. Toutefois, il nous est impossible de conclure sur le caractère gelé ou non de nos objets. Nous avons montré dans le cas du PMMA-ODN et PCI-ODN que la transition unimères ↔ agrégats sont réversibles, ce qui suggère que les agrégats se dissocient aux fortes concentrations. Il est donc important d'en tenir compte lors des applications.

## Références Bibliographiques

- (1) Z., Tuzar. *Overview of polymer micelles*; Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1996; Vol. 327.
- (2) P., Munk. *Classical methods for the study of block copolymer micelles*; Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1996; Vol. 327.
- (3) Taylor, K. A., et Glaeser, R.M. *J Ultrastruct Res* **1976**, 55, 448.
- (4) Dubochet, J., Lepault, J., Freeman, R., Berriman, J. A., and Homo, J.-C. *Journal of Microscopy* **1982**, 128.
- (5) Lepault, J., Booy, F.P., et Dubochet, J. *J Microsc* **1983**, 129, 89.
- (6) Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J., et McDowall, A.W. *Nature* **1984**, 208, 32.
- (7) Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. *Physical Review Letters* **1982**, 49, 57.
- (8) Hung, A. M.; Noh, H.; Cha, J. N. *Nanoscale* **2010**, 2, 2530.
- (9) Hammouda, B. P. R., 50, 14-39 *Polymer Reviews* **2010**, 50, 14.
- (10) Fang, B.; Walther, A.; Wolf, A.; Xu, Y.; Yuan, J.; Müller, A. H. E. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48, 2877.
- (11) Du, J.; Armes, S. P. *Soft Matter* **2010**, 6, 4851.
- (12) Beaucage, G. *Journal of Applied Crystallography* **1995**, 28, 717.
- (13) Teixeira Jr, F.; Rigler, P.; Vebert-Nardin, C. *Chemical Communications* **2007**, 1130.
- (14) Nagarajan, R.; Ganesh, K. *Journal of Colloid and Interface Science* **1996**, 184, 489.
- (15) Astafieva, I.; Khougaz, K.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1995**, 28, 7127.
- (16) Selb, J. G., Y. *Makromol Chem* **1980**, 181, 809.
- (17) Lee, A. S.; Gast, A. P.; Bütün, V.; Armes, S. P. *Macromolecules* **1999**, 32, 4302.
- (18) Kwon, G.; Naito, M.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. *Langmuir* **1993**, 9, 945.
- (19) Johnson, B. K.; Prud'homme, R. K. *Physical Review Letters* **2003**, 91, 118302.
- (20) Hayward, R. C.; Pochan, D. J. *Macromolecules* **2010**, 43, 3577.
- (21) Cerritelli, S.; Fontana, A.; Velluto, D.; Adrian, M.; Dubochet, J.; De Maria, P.; Hubbell, J. A. *Macromolecules* **2005**, 38, 7845.
- (22) Tian, M.; Qin, A.; Ramireddy, C.; Webber, S. E.; Munk, P.; Tuzar, Z.; Prochazka, K. *Langmuir* **1993**, 9, 1741.
- (23) Halperin, A.; Alexander, S. *Macromolecules* **1989**, 22, 2403.
- (24) Kaufmann, T. C.; Engel, A.; Rémy, H.-W. *Biophysical Journal* **2006**, 90, 310.
- (25) Moffitt, M.; Khougaz, K.; Eisenberg, A. *Accounts of Chemical Research* **1996**, 29, 95.
- (26) Zhang, L.; Barlow, R. J.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1995**, 28, 6055.
- (27) Förster, S.; Hermsdorf, N.; Leube, W.; Schnablegger, H.; Regenbrecht, M.; Akari, S.; Lindner, P.; Böttcher, C. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, 6657.
- (28) Burguière, C.; Chassenieux, C.; Charleux, B. *Polymer* **2003**, 44, 509.
- (29) Astafieva, I.; Zhong, X. F.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1993**, 26, 7339.



# CHAPITRE IV: APPLICATIONS

---



# Sommaire

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>112</b>
<b>I. Encapsulation d'une sonde fluorescente dans les nanoparticules de PEO2000-<i>b</i>-PCI-ODN<sub>22</sub> .....</b>	<b>112</b>
<b>II. Contrôle de l'immobilisation sur surface des nanoparticules de PEO2000-<i>b</i>-PCI-ODN<sub>22</sub>.....</b>	<b>114</b>
<b>II.1. Principe de la QCM .....</b>	<b>115</b>
<b>II.2. Stratégie de l'immobilisation de la nanoparticule de polymères sur une surface d'or .....</b>	<b>116</b>
<b>III. Décoration des nanoparticules de PMMA-ODN<sub>22</sub> par des nanoparticules d'or ....</b>	<b>119</b>
<b>III.1. Choix des particules .....</b>	<b>119</b>
<b>III.2. Stochiométrie .....</b>	<b>119</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>122</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>123</b>

## Introduction

Après avoir effectué la caractérisation des structures résultant de l'auto-organisation des systèmes de copolymères à blocs à base de polymères et d'oligonucléotides, nous allons maintenant nous concentrer sur les applications potentielles de ces bioconjugués. Pour ce faire, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux propriétés d'encapsulation des nanoparticules de PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub>. Rappelons, que dans la suite, nous allons utiliser le terme «nanoparticules» pour parler de nos agrégats, étant donné que nous n'avons aucune information sur le caractère gelé ou non des objets. Par la suite, en utilisant les propriétés d'hybridation de l'ADN, nous avons étudié l'adsorption de ces nanoparticules sur une surface en utilisant la technique de microbalance à quartz (QCM). Pour finir, nous avons utilisé les nanoparticules d'or pour détecter indirectement l'hybridation des brins d'ADN sur des nanoparticules de PMMA6300-ODN<sub>22</sub>.

### I. Encapsulation d'une sonde fluorescente dans les nanoparticules de PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub>

D'une façon générale, les applications des micelles et vésicules de copolymères à blocs impliquent l'encapsulation de composés actifs notamment dans la vectorisation de médicaments. L'objectif principal des micelles ou vésicules de copolymères à blocs, en vectorisation est d'augmenter la durée de vie de l'agent dans la circulation sanguine.<sup>1</sup> Par conséquent, La furtivité de ces nano-objets vis-à-vis du système immunitaire est primordiale pour l'augmentation du temps de circulation in vivo. Pour cela, les micelles aussi bien que les vésicules de copolymères à blocs possèdent un bloc hydrophile PEO connu pour présenter des interactions faibles avec les protéines du sérum (opsonines),<sup>2-4</sup> responsables de la reconnaissance et de l'élimination du vecteur. Par ailleurs, pour des applications de délivrance contrôlée, la dégradation du vecteur dans les conditions physiologiques est un facteur important. Dans cette voie, nous avons utilisé les copolymères à base de polyesters hydrolysables. En effet, les micelles de PEO-*b*-PCI ont été largement utilisées dans les applications de délivrance de médicaments.<sup>5-7</sup> Les études de relargage réalisées avec le copolymère PEO-*b*-PCI ont montré que le relargage se faisait très lentement à cause de la grande hydrophobie du PCI qui retarde son hydrolyse.<sup>8,9</sup> Nous avons donc choisi pour les études d'application un polymère PEO-*b*-PCI-ODN. Le groupe PEO vise à apporter la stabilité colloïdale et éventuellement empêcher l'adsorption des protéines.

Afin de démontrer la propriété d'encapsulation des nanoparticules de tribloc PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub>, nous y avons incorporé l'acide 1-anilino-8 naphthalene sulfonate (ANS). L'ANS (Figure IV.1) est une sonde fluorescente. En fonction de l'environnement, l'intensité de fluorescence de cette

dernière varie.<sup>10,11</sup> L'ANS a été très largement utilisée comme sonde de polarité dans les protéines, les membranes et les agrégats de polymères.<sup>12-14</sup>

Dans un environnement non polaire, la molécule d'ANS présente une forte fluorescence et un haut rendement quantique. A contrario, elle présente une fluorescence de basse énergie et un faible rendement quantique dans un environnement polaire. Par ailleurs, l'émission de fluorescence de l'ANS est presque négligeable dans l'eau. Dans la gamme de pH comprise entre 3 et 9, l'ANS est sous forme anionique en solution aqueuse. Ses propriétés d'émission ne montrent aucune dépendance au pH.<sup>14</sup>

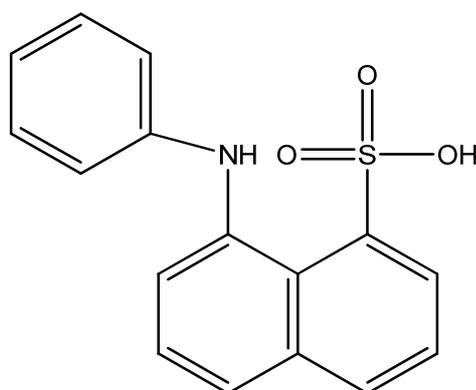


Figure IV.1. Structure chimique de l'acide 1-anilino-8-naphtalène sulfonate (ANS).

Pour toutes les mesures de fluorescence, la concentration de la sonde et la longueur d'onde d'excitation ont été maintenues constantes ( $[ANS] = 30 \pm 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ). Les spectres d'émission présentent deux types de contributions : une aux faibles énergies ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ ) qui reste constante pour toutes les concentrations en polymères. L'autre, à des énergies plus élevées, qui augmente avec la concentration en polymère (Figure IV.2). Pour une analyse quantitative, la contribution à des énergies élevées (exprimée en eV) a été ajustée par une fonction gaussienne après avoir éliminé la contribution aux basses énergies (voir annexe).

Lorsque l'ANS est seule en milieu aqueux, l'intensité d'émission est très faible et son maximum d'émission est à 535 nm (Figure IV.2a). Quand les nanoparticules de triblocs sont ajoutées au milieu, l'intensité de l'émission de l'ANS est beaucoup plus importante et le maximum d'émission se déplace à 451 nm. Ce déplacement indique que la sonde ne se trouve plus dans le même environnement et qu'elle s'est déplacée du milieu aqueux vers le cœur hydrophobe des micelles. Le suivi de la variation de l'intensité d'émission de fluorescence de l'ANS en fonction de l'ajout de nanoparticules de tribloc a été ensuite réalisé (Figure IV 2b). On observe une augmentation de l'intensité de fluorescence de l'ANS avec l'ajout de nanoparticules de tribloc.

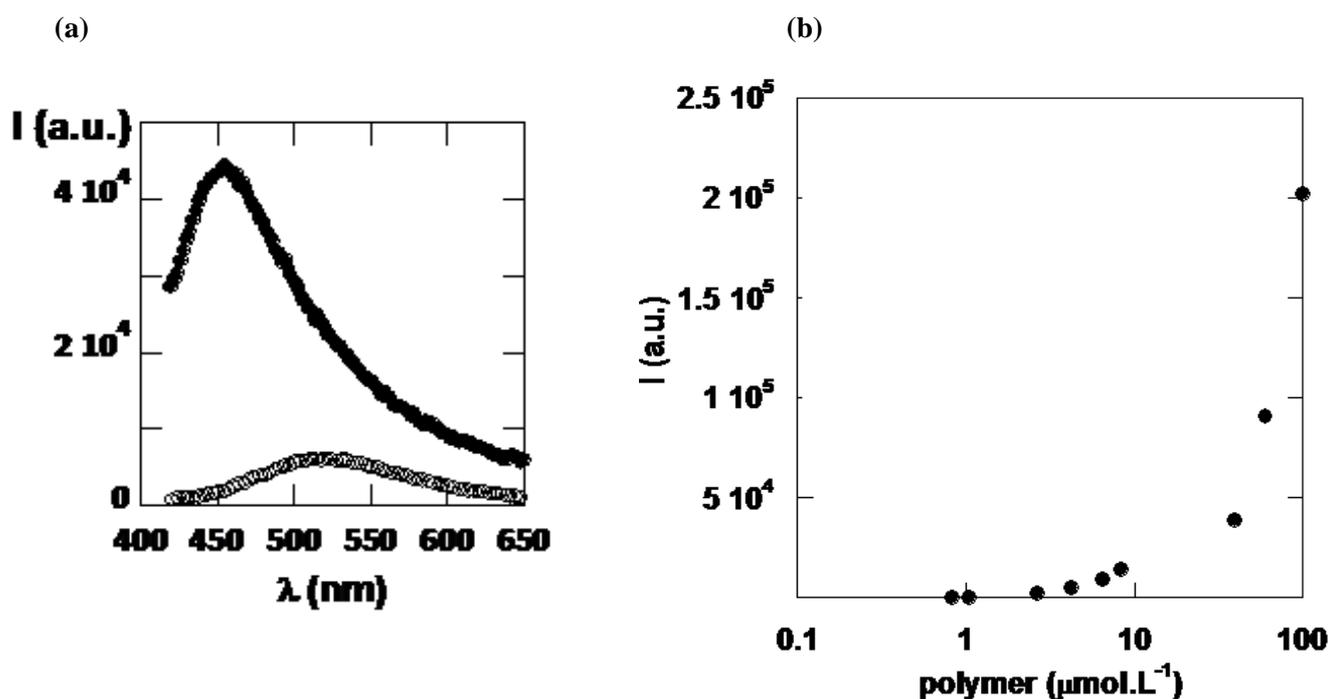


Figure IV.2. (a) Spectre d'émission de l'ANS ( $\lambda_{em} = 450$  nm) dans l'eau pure et ( $\circ$ ) et en présence de  $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de tribloc ( $\bullet$ ),  $[\text{ANS}] = 30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\lambda_{exc} = 350$  nm. (b) Influence de la concentration en tribloc sur le spectre d'émission de l'ANS incorporé dans les solutions de nanoparticules de PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub>. Les valeurs d'intensité ont été extraites de l'ajustement comme mentionné dans le texte.

## II. Contrôle de l'immobilisation sur surface des nanoparticules de PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22S</sub>

Traditionnellement les surfaces structurées à l'échelle nanométrique sont préparées par des méthodes de lithographie classiques (photolithographie, lithographie par faisceau d'électrons ou d'ions, lithographie par mouillage, ...). Ces méthodes sont précises et bien contrôlées et permettent d'obtenir des motifs d'une taille supérieure à 100 nm. Ces techniques bien qu'intéressantes, nécessitent généralement des équipements coûteux et/ou de longs temps d'écriture. Les copolymères à blocs peuvent être imprimés dans les surfaces, généralement *via* un dépôt puis évaporation d'une solution organique de polymère. Cette nano-structuration de surfaces des copolymères à blocs donne naissance ainsi à une nouvelle technologie de modification de surface : «la nano-lithographie assistée par les copolymères à blocs».<sup>15-17</sup>

Nous avons donc pensé que les micelles à base d'oligonucléotides pourraient aussi être utilisées pour diriger et contrôler le dépôt de micelles de copolymères sur des surfaces solides *via* l'hybridation. Le but est de générer un nouveau système de modification de surface.

Nous avons ainsi par hybridation, immobilisé sur une surface, des nanoparticules de tribloc PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22</sub> en utilisant la technique de microbalance à cristal de quartz (QCM). En effet, la technique de QCM est un outil sensible permettant de suivre en temps réel, l'adsorption de macromolécules sur une surface d'or. Avant de décrire la stratégie d'immobilisation de la micelle sur la surface, nous allons tout d'abord expliquer le principe de cette technique.

## II.1. Principe de la QCM

La technologie QCM permet de caractériser la formation de dépôts de protéines, de polymères ou de cellules adsorbés à la surface du quartz en milieu liquide. Le principe de fonctionnement est simple : un cristal piézoélectrique subit une oscillation suite à une stimulation électrique appliquée par des électrodes. La fréquence de résonance du cristal est corrélée à sa masse. Tout ajout ou retrait de masse provoque un glissement de la fréquence de résonance. En mesurant cette différence de fréquence  $\Delta f$ , on peut calculer la différence de masse  $\Delta m$  grâce à la relation de Sauerbrey :

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} \quad \text{Equation 4.1}$$

Avec :

$f_0$  : fréquence de résonance intrinsèque du cristal

$A$  : surface active du cristal (entre les électrodes)

$\rho_q$  : densité du quartz

$\mu_q$  : module de cisaillement du matériau

En suivant les variations de la fréquence de résonance, on peut donc implicitement suivre en temps réel l'adsorption et la désorption des espèces et avoir accès de façon simultanée à des informations sur la masse et la rigidité de la couche ajoutée en surface (courbe de dissipation). En effet, dans ce dernier cas, si la variation de dissipation augmente, cela nous indique que la couche adsorbée est molle (viscoélastique). A l'inverse, si la courbe de dissipation diminue, la couche adsorbée est plutôt de nature rigide.

## II.2. Stratégie d'immobilisation de la nanoparticule de polymères sur une surface d'or

L'immobilisation de la micelle sur la surface s'effectue suivant le processus décrit ci-après (Figure IV.3c) :

Etape 1 : le cristal de quartz revêtu d'or est fonctionnalisé par accrochage d'un brin oligonucléotide thiolé *via* la chimie standard de surface reposant sur la liaison thiol/or.

Etape 2 : par la suite, on fait passer sur le cristal déjà fonctionnalisé, une solution contenant les nanoparticules de PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22S</sub> préalablement hybridées à des brins oligonucléotides complémentaires ODN<sub>33</sub> ("linker"). Ce linker contient également quelques bases capables de s'hybrider sur l'oligonucléotide thiol. Afin d'éliminer toute adsorption non spécifique, la surface sera rincée par la suite avec une solution tampon.

Etape 3 : ensuite, on fait passer une solution d'oligonucléotides antisens ODN<sub>22As</sub>. Cet oligonucléotide est complémentaire sur toutes les bases de l'oligonucléotide ODN<sub>22S</sub> se trouvant sur les nanoparticules de tribloc. On s'attend à ce que l'oligonucléotide ODN<sub>22As</sub>, totalement complémentaire déplace le linker hybridé aux nanoparticules.

Les séquences des oligonucléotides : oligo-SH, linker, ODN<sub>22S</sub> et ODN<sub>22As</sub> sont reportées dans le Tableau IV.1. Notons que le linker est complémentaire à l'ODN<sub>22S</sub> sur 16 bases alors que l'ODN<sub>22As</sub> est complémentaire sur les 22 bases.

Nom	Sequence et modification
ODN <sub>22S</sub>	polymer- <u>5' CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTA</u> 3'
ODN <sub>22As</sub>	3' GGAGCGAGACGATTAGGACAAT5'
Oligo-SH	5' <u>ACCAATTGTTTAAAAAA</u> 3'-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -SH
linker	3' <u>AGACGATTAGGACAATA</u> <sub>6</sub> <u>TGGTTAACAAA</u> 5'

Tableau IV.1. Noms et séquences des oligonucléotides utilisés dans cette étude. Les séquences complémentaires sont soulignées par un trait plein ou un trait en pointillé, à l'exception de l'oligonucléotide ODN<sub>22As</sub> qui est totalement complémentaire à l'oligonucléotide ODN<sub>22S</sub> se trouvant sur la nanoparticule de tribloc.

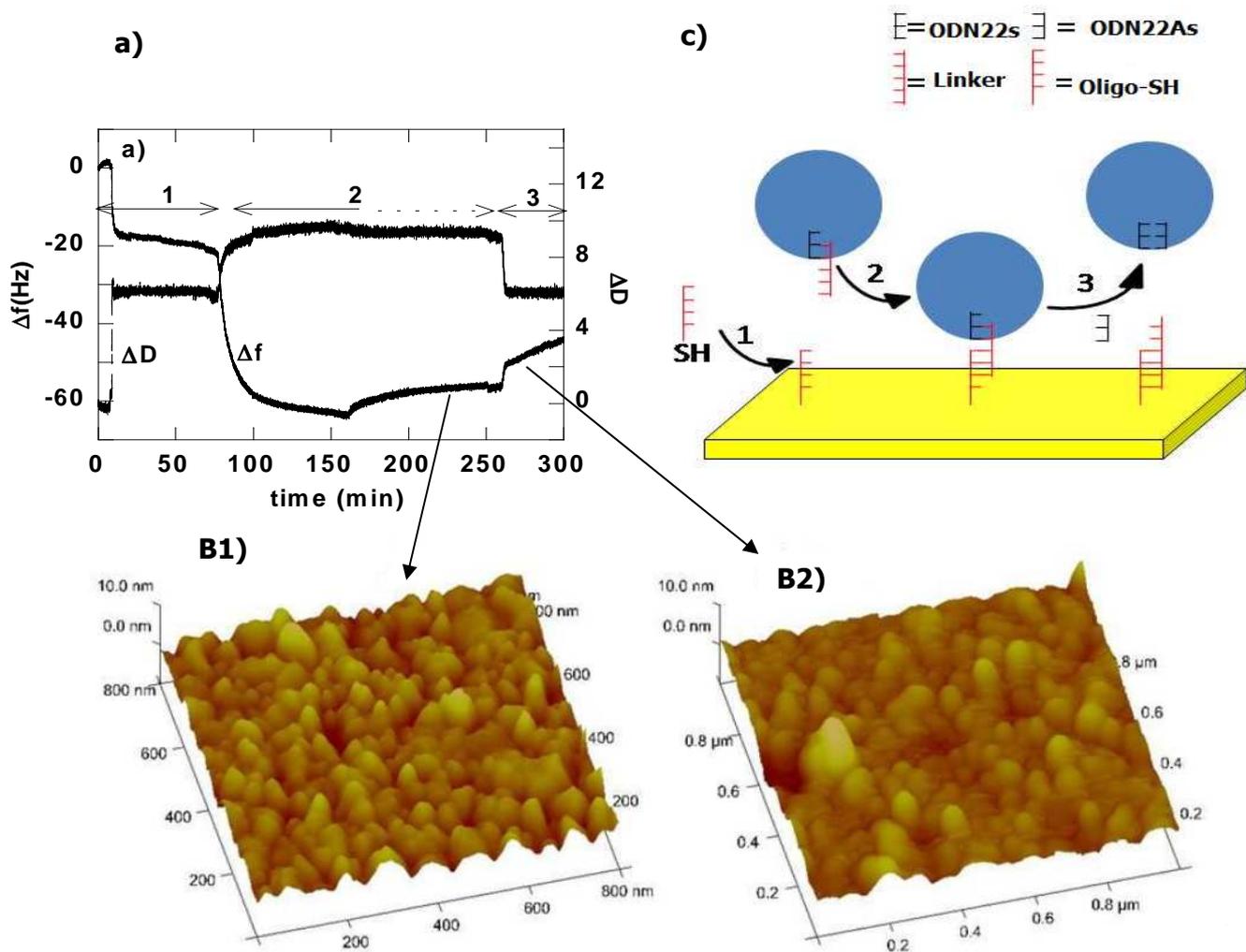


Figure IV.3. a) Suivre QCM. Etape 1 : fonctionnalisation de la surface par des oligonucléotides-SH ; étape 2 : immobilisation des nanoparticules préalablement hybridées au linker, suivi d'un rinçage au tampon (trait en pointillé) ; étape 3 : Passage de l'oligonucléotide totalement complémentaire ODN<sub>22As</sub> (déplacement compétitif des nanoparticules). c) Représentation schématique des cycles d'hybridation/déhybridation suivie par QCM. (B1) et (B2) Images AFM du quartz recouvert d'or : (B1) après immobilisation des nanoparticules de PEO2000-b-PCI2600-ODN<sub>22s</sub> et rinçage au tampon (fin de l'étape 2) ; (B2) après déplacement partiel des nanoparticules de triblocs (étape 3).

Les mesures de QCM correspondant aux différentes étapes d'injection sont présentées sur la Figure IV.3a. L'introduction de l'oligo-SH ( $3 \mu\text{moles.L}^{-1}$ ) dans la chambre QCM (Etape 1), s'accompagne d'une baisse de fréquence de (-18 Hz) et une augmentation de la dissipation (+ 6,2), suggérant ainsi que la surface d'or est fonctionnalisée. L'introduction de la solution de nanoparticules de triblocs (nanoparticules hybridées au linker) ( $3 \mu\text{moles.L}^{-1}$ ) (Etape 2) conduit à une baisse de fréquence encore plus importante (-40 Hz), et une très faible augmentation de la dissipation (+3,5). Ceci est révélateur du dépôt d'une lourde charge sur la surface du quartz et de la formation d'une interface plutôt rigide, correspondant probablement à la formation d'une couche dense de nanoparticules de triblocs sur la

surface de quartz. En comparaison, l'introduction d'une solution uniquement constituée de linker (sans les nanoparticules) conduit à une faible variation ( $\Delta f = 22\text{Hz}$ ;  $\Delta d = +4,2$ ). Après immobilisation des nanoparticules de triblocs, une solution tampon est injectée dans la chambre de QCM (flèche en pointillée) ; le but est d'éliminer toute adsorption non spécifique. Il s'ensuit une remontée de la fréquence sans aucun effet notable sur la dissipation. Ceci indique une perte de masse mais qui n'a aucun effet sur la rigidité de l'interface. Nous avons interprété ces données comme une conséquence de la désorption de la matière déposée sur la première couche de nanoparticules greffées à la surface. En revanche, le passage de l'oligonucléotide ODN<sub>22As</sub> ( $4,8 \mu\text{moles.L}^{-1}$ ) (Etape 3) induit une chute brutale du signal de dissipation, jusqu'à la valeur initiale sans les nanoparticules de triblocs, indiquant ainsi une perturbation de la couche rigide de nanoparticules. La fréquence quant à elle augmente en deux étapes (rapide et lente). Cette augmentation de fréquence est attribuée à une élimination partielle de l'ODN<sub>22S</sub> se trouvant sur les nanoparticules, en raison d'un déplacement du linker par l'oligonucléotide ODN<sub>22As</sub> complémentaire. Comme le montre les clichés d'AFM, obtenus après étape d'immobilisation des nanoparticules de PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22S</sub> sur le quartz et étape de rinçage (étape 2, Figure IV.3B1), la surface a été complètement recouverte de nanoparticules de triblocs. Après addition de l'oligonucléotide ODN<sub>22As</sub>, totalement complémentaire (étape 3 ; Figure IV.3B2), on observe beaucoup moins de nanoparticules. De façon intéressante, nous avons également observé que lorsque le linker n'était pas hybridé aux nanoparticules, il était facilement rincé de la surface par une solution de tampon. Cependant, l'hybridation de celui-ci à l'oligonucléotide de la nanoparticule, restreint son élimination. Nous avons attribué cela à un encombrement stérique apporté par les nanoparticules de PEO2000-*b*-PCI2600-ODN<sub>22S</sub>.

### III. Décoration des nanoparticules de PMMA-ODN<sub>22</sub> par des nanoparticules d'or

Nous avons souhaité recouvrir les nanoparticules de PMMA6300-ODN<sub>22s</sub> de nanoparticules d'or (Figure IV.4) dans un but d'étudier les propriétés plasmoniques de celles-ci.

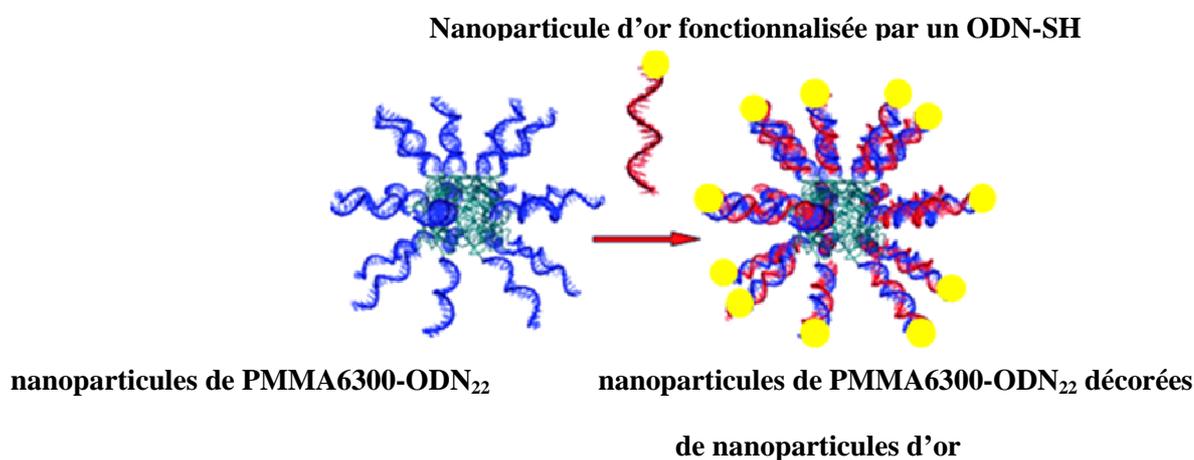


Figure IV.4. Décoration de nanoparticules de PMMA-ODN par des nanoparticules d'or.

#### III.1. Choix des particules

A cause de leurs propriétés optiques et électroniques particulières, les nanoparticules (Nps) de métaux nobles trouvent des applications intéressantes. De plus, les oscillations des électrons de conduction donnent lieu à des plasmons de surface localisés, qui se traduisent par une bande d'absorption de surface (BPS) observable par spectroscopie UV-Visible. La condition de résonance est hautement dépendante de la taille, de la forme et des constantes diélectriques du métal lui-même et du milieu l'environnant. La position de la BPS peut être utilisée pour mettre en évidence une interaction entre un stabilisant et les Nps. En effet, tout changement de solvant ou modification chimique de la surface du métal se traduit par un déplacement de la BPS.

Nous avons choisi de travailler avec des nanoparticules d'or (AuNps). En effet la synthèse des AuNps est facile et présente une grande stabilité chimique. De plus celle-ci est bien maîtrisée dans l'équipe. Les AuNps sont obtenues par réduction de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> par le borohydrure de sodium (NaBH<sub>4</sub>). Nous avons obtenu des nanoparticules ~ 12 nm de diamètre.

#### III.2. Stoechiométrie

Dans un premier temps, Nous avons cherché à savoir quel rapport d'ODN-SH /AuNps/ d'unimères PMMA6300-ODN<sub>22s</sub>, il fallait utiliser afin d'observer une modification de la bande plasmon à 520 nm de la particule d'or. Pour ce faire, Nous avons fait varier les quantités d'ODN-SH, d'AuNps et de

copolymère biohybride PMMA6300-ODN<sub>22S</sub>. Le Tableau IV.2 regroupe les différentes conditions utilisées. On fait varier, La quantité de biohybride PMMA6300-ODN<sub>22</sub> en laissant constant les quantités d'AuNps et d'ODN-SH. Les séquences des oligonucéotides utilisées sont reportées dans le Tableau IV.3.

Conditions	Espèces	[C]	Rapport
A1	AuNps	$9,3.10^{-3} \mu\text{M}$	1
	ODN-SH	$8,2.10^{-2} \mu\text{M}$	8,7
	PMMA6300-ODN <sub>22</sub>	0	0
A6	AuNps	$9,3.10^{-3} \mu\text{M}$	1
	ODN-SH	$8,2.10^{-2} \mu\text{M}$	8,7
	PMMA6300-ODN <sub>22</sub>	$0,72 \mu\text{M}$	77
A7	AuNps	$9,3.10^{-3} \mu\text{M}$	1
	ODN-SH	$8,2.10^{-2} \mu\text{M}$	8,7
	PMMA6300-ODN <sub>22</sub>	$1,8 \mu\text{M}$	193

Tableau IV.2. Tableau récapitulatif des conditions mises en place pour la décoration des nanoparticules de PMMA6300-ODN<sub>22</sub> par les AuNps.

Nom	Sequence et modification
ODN <sub>22S</sub>	PMMA-5' CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTA 3'
ODN-SH	3' GGAGCGAGACGATTAGGACAAT 5' -SH

Tableau IV.2. Noms et séquences des oligonucléotides utilisés dans cette étude.

Le suivi de la modification de la BPS a été effectué par spectroscopie UV-Visible. La figure IV.5 nous donne les spectres d'absorption obtenus après 4 jours dans les 3 conditions.

Lorsque les AuNps sont fonctionnalisées par l'ODN-SH, la longueur d'onde maximum de la BPS est à 520 nm. Lorsqu'on introduit le polymère PMMA6300-ODN<sub>22</sub> la longueur d'onde maximum de la BPS varie un peu, elle passe de 520 nm à 530 nm.

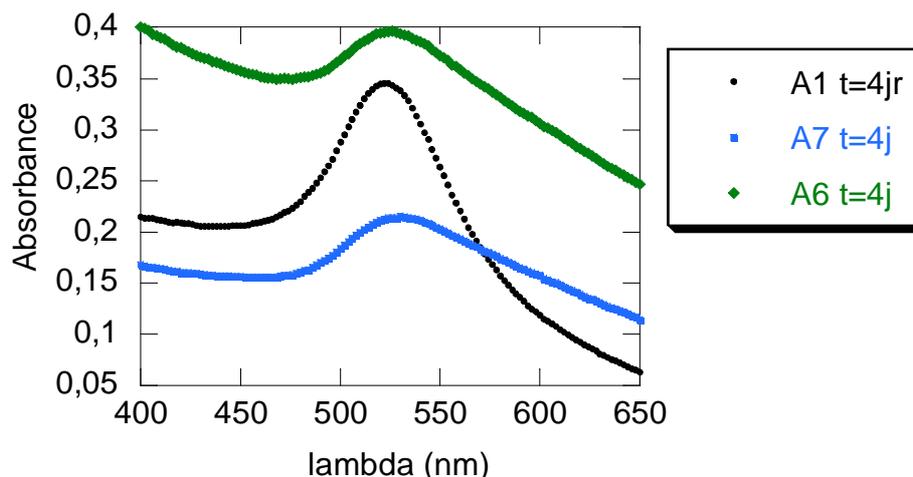


Figure IV.5. Spectre UV-Visible des solutions de AuNps@ODN-SH: sans polymères (noir), en présence de PMMA-ODN condition A6 (vert) et condition A7 (bleu).

Nous avons également réalisé les clichés de MET de ces solutions dans les trois conditions. Pour ce faire des dépôts de microscopie sans coloration de ces solutions ont été effectués (Figure IV.6).

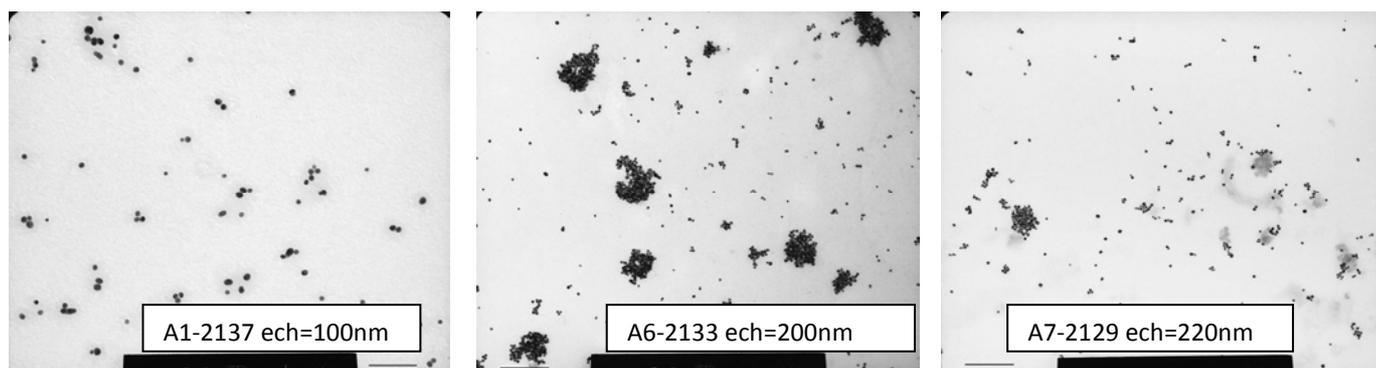


Figure IV.6. Clichés de MET pour AuNps@ODN-SH (condition A1), en présence de PMMA-ODN<sub>22</sub> (condition A6) et (condition A7).

On note qu'en absence de polymère (Figure IV.6 – condition A1), les nanoparticules d'or apparaissent bien dispersées. Lorsque l'on ajoute le biohybride PMMA-ODN<sub>22S</sub>, (condition A6), les AuNps apparaissent agrégées, vraisemblablement autour des nanoparticules de PMMA-ODN<sub>22S</sub>. Néanmoins, cet état d'agrégation est moins prononcé dans la condition A7. Ceci semble cohérent. En effet, lorsqu'on a beaucoup plus de particules par rapport à la quantité de polymères, par conséquent celles-ci s'agrègent. Plus on va augmenter la quantité de polymère, plus le nombre de particules par polymères sera amoindri et moins elles s'agrègeront.

Pour s'assurer que le phénomène bathochrome observé est bien dû à l'hybridation de l'ODN-SH sur les micelles de PMMA-ODN<sub>22S</sub>. Nous avons chauffé une solution à 70°C pendant 10 min et nous avons réalisé le spectre d'absorption. Le but est de déhybrider l'oligonucléotide ODN-SH de la nanoparticule de PMMA-ODN<sub>22S</sub> et de comparer le spectre UV-visible obtenu à celui de l'état

hybridé. La Figure IV.7 nous donne les spectres UV-visible de la solution en condition 7 à 10 °C (avant déhybridation) et après chauffage à 70°C (après déhybridation).

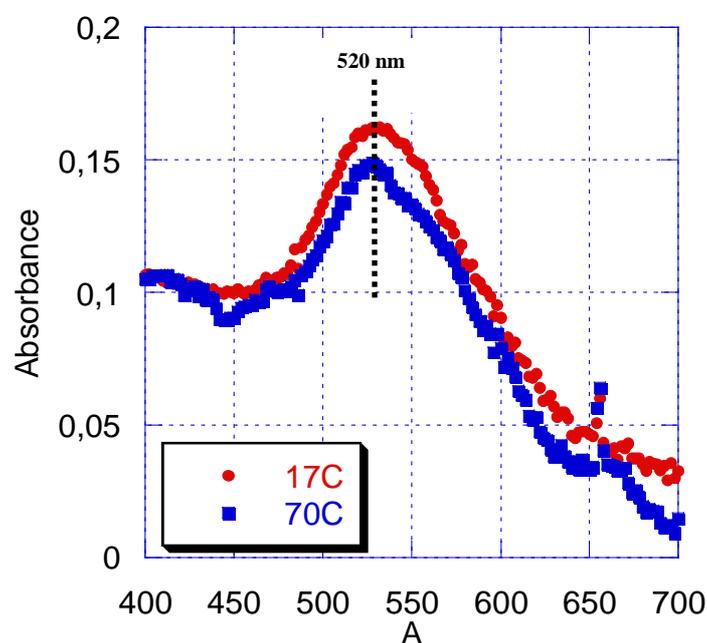


Figure IV.7. Spectres UV-Visible d'AuNps@ODN-SH en présence de PMMA-ODN<sub>22</sub> (condition A7) : Avant déhybridation (rouge), après déhybridation (bleue).

Après chauffage à 70°C de la solution, on observe l'augmentation du pic à 520 nm, correspondant aux AuNps libres. Ce qui suggère qu'une partie au moins des AuNps est libérée des nanoparticules de PMMA-ODN<sub>22</sub> par l'élévation de la température. On suppose que le pic à 650 nm, correspond vraisemblablement aux AuNps encore hybridées aux unimères de PMMA-ODN<sub>22</sub>.

Toutefois, ces résultats sont préliminaires. Des études sont en cours pour mieux comprendre l'effet du chauffage sur la décoration des nanoparticules de polymères par les nanoparticules d'or.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que les nanoparticules de PEO-*b*-PCI-ODN pouvaient être utilisées pour encapsuler des molécules hydrophobes. A travers, la reconnaissance de l'oligonucléotide pour son complémentaire et la technique de QCM, nous avons montré que l'on pouvait modifier une surface d'or en adsorbant des nanoparticules d'oligonucléotides sur cette dernière. De même cette surface pouvait revenir à son état initial (nue) en ajoutant un brin concurrent. Nous avons également montré que l'on pouvait décorer de nanoparticules d'or, les nanoparticules d'oligonucléotides. L'effet observé sur la bande plasmon reste néanmoins très faible. Les résultats obtenus semblent prometteurs, toutefois des études complémentaires sont en cours.

## Références Bibliographiques

- (1) Torchilin, V. P. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, 1532.
- (2) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *Pharmacological Reviews* **2001**, *53*, 283.
- (3) Moghimi, S. M.; Szebeni, J. *Progress in Lipid Research* **2003**, *42*, 463.
- (4) Monfardini, C.; Veronese, F. M. *Bioconjugate Chemistry* **1998**, *9*, 418.
- (5) Rutnakornpituk, M.; Meero, S.; Boontha, B.; Wichai, U. *Polymer* **2009**, *50*, 3508.
- (6) Pourcelle, V.; Freichels, H. I. n.; Stoffelbach, F. o.; Auzély-Velty, R.; Jérôme, C.; Marchand-Brynaert, J. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 966.
- (7) Zhang, P. C. H., L. J.; Wang, Y. C.; Wang, J.; Feng, L. Y.; Li, Y. P. *Pharm. Res*, *27*, 2657.
- (8) Ahmed, F.; Discher, D. E. *Journal of Controlled Release* **2004**, *96*, 37.
- (9) Ahmed, F.; Hategan, A.; Discher, D. E.; Discher, B. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 6505.
- (10) Lakowicz, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy; 2nd ed.*; Kluwer Academic/Plenum: New York, 1999.
- (11) Kosower, E. M.; Kanety, H. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 6236.
- (12) Kujawa, P. W., H.; Tanaka, F.; Winnik, F. *Eur. Phys. J. E* **2005**, *17*, 129.
- (13) Vasilescu, M.; Caragheorghopol, A.; Caldararu, H.; Bandula, R.; Lemmetyinen, H.; Joela, H. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 7740.
- (14) Gasymov, O. K.; Glasgow, B. J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **2007**, *1774*, 403.
- (15) Bang, J.; Jeong, U.; Ryu, D. Y.; Russell, T. P.; Hawker, C. J. *Advanced Materials* **2009**, *21*, 4769.
- (16) Farrell, R. A.; Petkov, N.; Shaw, M. T.; Djara, V.; Holmes, J. D.; Morris, M. A. *Macromolecules* **2010**, *43*, 8651.
- (17) Kim, H.-C.; Park, S.-M.; Hinsberg, W. D. *Chemical Reviews* **2009**, *110*, 146.



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---



L'objectif de ce travail de thèse était de concevoir des copolymères à blocs à base d'oligonucléotides en vue d'obtenir des nano-objets en solution aqueuse et de mettre au point leurs applications.

Nous nous sommes pour cela intéressés à l'élaboration des bioconjugués amphiphiles constitués d'un oligonucléotide simple brin couplé à un polymère hydrophobe ou à un copolymère. Nous avons pour cela utilisé la liaison peptidique et la liaison phosphoramidite. La synthèse peptidique s'est effectuée par activation de la fonction carboxylique du polymère par DCC, NHS et DMT-MM. Nous avons eu du mal à reproduire ce couplage en utilisant les activateurs DCC/NHS, mais la réaction au DMT-MM a donné des résultats satisfaisants. Malgré les faibles rendements, la synthèse phosphoramidite nous a permis d'obtenir une librairie de copolymères à blocs à base d'oligonucléotides. La mise en évidence des couplages n'a été possible que par analyse sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide. Les spectres maldi-tof obtenus n'ont pas été concluants dans un cas général.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur le comportement en solution aqueuse de ces bioconjugués et, en particulier, sur l'étude des structures formées par auto-assemblage. Toutes les morphologies ont pu être caractérisées grâce à l'utilisation de techniques complémentaires de microscopie (MET, Cryo-MET, AFM) et de diffusion du rayonnement (DNPA, DDL). De manière générale, les copolymères à base d'oligonucléotides que nous avons synthétisés s'auto-assemblent pour former des objets sphériques. Toutefois, des structures complexes ont été observées pour certains biohybrides. Nous avons mis en évidence la coexistence de deux types de populations avec le tribloc PEO-*b*-PCI-ODN : une population de grosse taille et une autre beaucoup plus petite. Nous avons supposé que les gros objets provenaient de la formation de liaisons hydrogène inter-micellaires engendrées par l'oligonucléotide. La présence de ces gros objets a été un frein lors de la détermination des paramètres structuraux.

Nous nous sommes également posé la question de l'existence d'une transition agrégats  $\rightarrow$  unimères et de la réversibilité de cette transition dans nos copolymères à blocs à base d'oligonucléotides. Nous avons ainsi sondé l'existence de cette transition en utilisant la mesure de tension de surface soit en diluant successivement des solutions de diblocs PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> et PCI3700-ODN<sub>22</sub> (lame de Wilhelmy), soit en les concentrant progressivement (goutte sessile). L'idée principale était d'étudier l'influence de la méthode de préparation sur le comportement associatif du tribloc car une divergence des propriétés physico-chimiques pour des solutions d'un même copolymère étudiées dans les mêmes conditions mais préparées de manière différentes est une indication que le système est cinétiquement gelé sur l'échelle de temps expérimental. A l'aide des méthodes de la lame de Wilhelmy et de la goutte sessile, il a été montré que les biohybrides PMMA6300-ODN<sub>12x</sub> et PCI3700-ODN<sub>22</sub> présentent des transitions réversibles unimères  $\leftrightarrow$  agrégats.

Nous nous sommes enfin intéressés aux applications potentielles des copolymères à base d'oligonucléotides. Pour cela, nous nous sommes d'abord intéressés aux propriétés d'encapsulation des agrégats de PEO-*b*-PCL-ODN. Nous avons choisi d'encapsuler une sonde fluorescente, l'ANS, dans le cœur hydrophobe des nanoparticules. Nous avons montré que l'intensité d'émission de fluorescence était beaucoup plus importante et que le maximum d'émission se déplaçait lorsque les agrégats de tribloc étaient ajoutés au milieu. Ce déplacement traduisant le passage de la sonde du milieu aqueux vers le cœur hydrophobe des micelles fut une preuve d'encapsulation de la sonde. Nous avons également montré qu'en utilisant les propriétés de reconnaissance de l'oligonucléotide et la technique de QCM, on pouvait modifier une surface en adsorbant des agrégats de tribloc sur cette dernière. Cette surface pouvait être ramenée à son état initial, en ajoutant un brin d'ADN concurrent. Enfin, nous avons montré que l'on pouvait décorer les agrégats de copolymères à bases d'oligonucléotides de nanoparticules d'or.

Les résultats que nous avons obtenus sont intéressants et très originaux et constituent une base solide pour la suite de ces travaux où de nombreuses perspectives s'ouvrent.

Du point de vue de la synthèse, les méthodes de couplage utilisées conduisent soit à de faibles quantités, soit à un problème de reproductibilité. Cette faible quantité constitue un frein pour la caractérisation des objets. Nous pouvons imaginer la possibilité d'utiliser la chimie click mais cette fois en utilisant un oligonucléotide possédant une fonction azide (compte tenu de sa disponibilité commerciale).

Les copolymères à blocs à base d'oligonucléotides présentent des propriétés d'auto-assemblage en milieu aqueux très intéressantes avec la possibilité de pouvoir former soit des agrégats de types micellaires, soit des agrégats de type vésiculaire. Nous pouvons envisager d'effectuer des micelles mixtes de triblocs PEO-*b*-PCL-ODN et de dibloc PEO-*b*-PCL et d'étudier les propriétés d'auto-assemblage.

Des études sont en cours de réalisation pour répondre à la question de la dynamique de nos systèmes. En effet, nous envisageons d'hybrider sur les nanoparticules de triblocs PEO-*b*-PCL-ODN<sub>22s</sub>, un brin complémentaire ODN<sub>22As</sub> et de mixer à cette solution une solution de tribloc PEO-*b*-PCL-ODN<sub>22s</sub> auquel on aurait hybridé un brin complémentaire sur les 22 bases mais possédant 18 bases de plus. L'idée est de regarder en PAGE si il existe une dynamique d'échange entre les micelles et donc de savoir si nos systèmes sont gelés ou pas.

Afin d'envisager l'utilisation du tribloc PEO-*b*-PCL-ODN comme nanovecteur pour encapsuler et relarguer de manière contrôlée des principes actifs. Il serait intéressant de regarder si les oligonucléotides se trouvant sur les nanoparticules de triblocs pourraient résister aux DNases une fois administrés *in vivo*. L'idée serait donc d'effectuer des tests enzymatiques sur le tribloc PEO-*b*-PCL-ODN en présence d'enzymes et de regarder en gel électrophorèse ce que nous obtenons.

Pour finir, nous envisageons de continuer les études de décoration des agrégats de triblocs de nanoparticules d'or. Le but est de pouvoir utiliser par la suite comme métamatériaux.



PARTIE EXPERIMENTALE

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

---



## I. Caractéristiques Chimiques des réactifs et solvants

Les abréviations suivantes sont utilisées: **M** masse molaire (g/moles), **T<sub>f</sub>** température de fusion (°C), **T<sub>e</sub>** température d'ébullition (°C), **d** densité (g/mL), **pureté** (%), **T<sub>m</sub>** température de melting (température de fusion des ODN doubles brins, °C), **ε** coefficient d'extinction molaire (L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

**Les réactifs chimiques:** ils proviennent de Sigma – Aldrich, Aldrich ou Fluka et ont été utilisés sans purification préalable.

Réactifs	M	T <sub>f</sub>	T <sub>e</sub>	Pureté	d	Fournisseur
<b>EDTA</b> (éthylène diamine tétra-acétique sel sodique)	372,24	248,0	-	-	-	Sigma - Aldrich
<b>Acrylamide/Bisacrylamide,</b> 19:1 ratio	-	-	-	-	-	Sigma - Aldrich
<b>Persulfate d'ammonium,</b> pour gel d'électrophorèse	228,2	-	-	> 98,0	-	Sigma - Aldrich
<b>TEMED</b> (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine)	116,20	-55,0	120,0-122,0	99,0	-	Sigma - Aldrich
<b>Tartrate de diammonium</b>	184,15	-	-	> 99,5	1,6	Fluka
<b>Tris-HCl</b> (α,α,α,-tris-(hydroxyméthyl) aminomethane hydrochloride)	157,6	150,0-152,0		99,0		
<b>Urée</b> pour électrophorèse	60,06	133,0-135,0	-	-	1,33	Sigma
<b>Acide borique</b>	61,83	160,0	300,0	> 99,5	1,44	Sigma - Aldrich
<b>Trizma base</b>	121,14	171,2-172,3	219,0-220,0	> 99,9		Sigma
<b>Phosphoramidite</b> (2-cyanoethyl- N,N-diisopropylchlorophosphoramidite)	236,68	-	103,0-105,0	-	1,061	Sigma - Aldrich
<b>DCC</b> (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide)	206,33	34,0-35,0	122,0-124,0	-	-	Sigma
<b>NHS</b> (N-Hydroxysuccinimide)	115,09	95,0-98,0	-	98,0		Sigma - Aldrich
<b>DMTMM</b> (chlorure de 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-méthyl-morpholinium)	276,72	110,0-114,0	-	97,0	-	Sigma - Aldrich
<b>3-HPA</b> (3-Acide Hydroxypicolinique), matrice pour Maldi-MS	139,11	213,0-218,0	-	-	-	Fluka

Les solvants utilisés sont de pureté commerciale. Les solvants utilisés pour la synthèse des conjugués d'ADN sont soigneusement conservés sous argon et ne contiennent pas plus de 10 ppm d'eau.

Solvants	M	T <sub>f</sub>	T <sub>e</sub>	Pureté	d	Fournisseur
<b>DIPEA anhydre</b> (N,N-Diisopropyléthylamine)	129,24	50,0	127,0	99,5	0,74	Sigma - Aldrich
<b>Acétonitrile anhydre</b>	41,05	-48,0	81,0-82,0	99,8	0,79	Sigma - Aldrich
<b>Dichlorométhane anhydre</b>	84,93	-97,0	39,8-40,0	> 99,8	1,32	Sigma - Aldrich
<b>Tétrahydrofurane anhydre</b>	72,11	-108,0	65,0-67,0	> 99,9	0,89	Sigma - Aldrich
<b>Solution de tétrazole,</b> (0,45M dans de l'acétonitrile, pour la synthèse d'ADN)	70,05	-	84,0	-	-	Fluka
<b>Solution d'acide trichloroacétique 30% (m/v) dans du dichlorométhane</b>	163,39	-	-	-	-	Fluka
<b>Diméthylsulfoxyde</b>	78,13	16,0-19,0	189,0	-	1,09	Sigma - Aldrich
<b>Méthanol</b>	32,04	-97,7	64,5	-	0,79	Sigma - Aldrich
<b>Chloroforme</b>	119,38	-63,5	61,2	-	1,44	Sigma - Aldrich
<b>Formamide</b>	45,04	-	210,0	≥ 99,5	-	Sigma
<b>Solution d'ammoniaque aqueuse 28 %</b>	35,05	-60,0	38,0-100,0	-	0,9	Fluka
<b>Triéthylamine</b>	101,19	-115,0	88,8	≥ 99,9	-	Sigma - Aldrich
<b>Eau milliQ</b> Purifiée sur filtre et résine échangeuse d'ions (résistivité ≈ 18 mΩ.cm)	18,02	0,0	100,0	-	1,0	Laboratoire IMRCP

**Les oligonucléotides:** ils proviennent de la société Eurogentec (Belgique). Deux types d'oligonucléotides ont été achetés: d'un côté, des oligonucléotides accrochés sur colonne de verre CPG «Controlled Pore Glass» non purifiés utilisés pour la synthèse des bioconjugués, de l'autre, des oligonucléotides achetés déjà purifiés par HPLC ou gel électrophorèse que nous resuspendons dans de l'eau milliQ ou dans du tampon phosphate selon l'utilisation. Leur concentration a été déterminée par la mesure d'absorbance à 260 nm. Tous les oligonucléotides et bioconjugués d'ADN ont été conservés

à -20 °C dans des Eppendorfs Lobind<sup>Tm</sup> (garantissant une faible adsorption des oligonucléotides sur le matériau et relargage limité de produits indésirables).

Le bilan de tous les différents oligonucléotides utilisés est présenté dans le tableau suivant.

Séquences des oligonucléotides 5'→3'	Nombre de bases (pb)	M	ε	T <sub>m</sub>
CCT CGC TCT GCT AAT CCT GTT A-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -OH	22	6612,3	192100	49,7
CCT CGC TCT GCT AAT CCT GTT A-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -NH <sub>2</sub>	22	6612,3	192100	49,7
TAA CAG GAT TAG CAG AGC GAG G-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -OH	22	6657,5	231100	49,7
TAA CAG GAT TAG CAG AGC GAG G-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -NH <sub>2</sub>	22	6657,5	231100	49,7
AAA AAA AAA AAA AAA AAA A-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -OH	22	6828,6	267400	39,7
AAA CAA TTG GTA AAA AAT AAC AGG ATT AGC AGA C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -OH	33	10243,8	360200	50,6
ACC AAT TGT TTA AAA AA- C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -SH	17	5185,5	179400	40,0
TAA CAG GAT TAG CAG AGC GAG G- C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -SH	22	6857,5	303600	56,3

**Les polymères:** ils ont été achetés pour la plupart chez Polymer Source. Le polymère poly(diméthyl siloxane) (PDMS) provient de Sigma. La poly(caprolactone) utilisée pour la liaison peptidique a été synthétisée au laboratoire. Le tableau ci-dessous regroupe les polymères utilisés avec les abréviations correspondantes.

Polymères	Masse		Terminaison
<b>PMMA</b> Poly(méthacrylate de méthyle)	5500		-COOH
	12000		-COOH
	6300		-OH
<b>PEO<sub>x</sub>-PCL<sub>y</sub></b> Poly(oxyde d'éthylène) <sub>x</sub> - poly(caprolactone) <sub>y</sub>	<b>x</b>	<b>y</b>	-OH
	2000	2600	
	2000	2800	
<b>PIP</b> Poly(isoprène)	<b>6500</b>		-OH
<b>PDMS</b> Poly(diméthyle siloxane)	<b>1000</b>		-OH
<b>PEO</b> Poly(oxyde d'éthylène)	<b>5000</b>		-COOH

## II. Instrumentation

**Balance de précision** : toutes les pesées ont été effectuées sur une balance GENIUS Sartorius AG de précision  $10^{-5}$  g.

**Purification** : les copolymères à blocs à base d'ADN sont purifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en utilisant des cuves d'électrophorèse verticale (Labgene).

**Déssalage** : les produits extraits du gel de polyacrylamide sont déssalés soit par dialyse (MWCO = 1000 g/moles), soit sur colonne Sephadex G25.

**Centrifugation** : la centrifugeuse utilisée est une Eppendorf Mini Spin utilisant des eppendorfs de 1,5 mL.

Les copolymères à blocs à base d'ADN sont séchés soit dans un évaporateur centrifuge de type Speed-Vac, soit sur une rampe à vide.

**Spectrométrie de masse Maldi-Tof** : les spectres de masse ont été réalisés soit par le service commun de spectrométrie de masse de l'université Paul Sabatier, soit par la société Eurogentec (Belgique). La source d'ionisation utilisée est un laser. Les échantillons sont ionisés dans une matrice d'HPA (acide hydroxypicolinique).

**Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)** : les masses moléculaires moyennes en nombre ( $M_n$ ) des polymères PCI synthétisés ont été déterminées par SEC sur un appareil équipé d'une colonne Waters Ultrastaygel HR 4E (éluant: THF; débit: 1mL/min), et de deux détecteurs d'indice de réfraction (Wyatt Optilab) et de diffusion de la lumière Minidawn Wyatt. Les masses moléculaires ont été calculées sur la base d'étalons polystyrène. Des échantillons de concentrations  $\approx 10$  mg/mL dans le THF ont été injectés.

**Résonance magnétique nucléaire (RMN)** : les spectres de RMN (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$ ) ont été réalisés sur un appareil Brücker Advance à 200 ou 300 MHz. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au pic du tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne pour la RMN  $^1\text{H}$  et par rapport à une solution à 85% en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pour la RMN  $^{31}\text{P}$ . Les constantes de couplage sont données en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est symbolisée par les lettres suivantes: s singulet, d doublet, t triplet, q quadruplet et m multiplet.

**Spectrofluorimétrie** : les spectres de fluorescence ont été effectués à 25 °C sur un spectrofluorimètre PTI (Photon Technology International) équipé d'une lampe EIMAC au xénon de 175 Watts.

**Spectroscopie d'absorbance UV-visible (UV-vis)** : La quantification des oligonucléotides, de même que des bioconjugués d'ADN s'est effectuée sur un spectrophotomètre à barrette de diodes Hewlett Packard HP 8452. Les minicuves en quartz (volume  $\approx 100$   $\mu\text{L}$ ) de trajet optique de 1 cm sont utilisées.

**Diffusion dynamique de la lumière (DDL)** : Les mesures de DDL ont été réalisées sur un appareil Zetasizer nano (Malvern) en retrodiffusion à un angle de 173°. La source lumière est un Laser He-Ne de longueur d'onde 633 nm.

**Microscopie Electronique à Transmission (MET)** : Les mesures se font soit au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB) sur un Hitachi HU12A, soit par Cédric Gaillard à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Nantes, France).

**Cryo Microscopie Electronique à transmission (Cryo-MET)** : Les expériences de Cryo-MET ont été réalisées par Cédric Gaillard (INRA, Nantes, France).

**Tension de surface** : Les mesures de tension de surface ont été réalisées soit par la **méthode de la lame de Wilhelmy** sur un appareil Kruss K20 Easy Dyne, soit par la méthode de **la goutte sessile** sur un appareil KRÜSS DSA10-Mk2.

**Diffusion des Neutrons aux Petits Angles (DNPA)** : Les expériences de DNPA ont été réalisées en collaboration avec Julian Oberdisse sur le spectromètre PACE (réacteur Orphée) au laboratoire Léon Brillouin (Saclay). Les solutions de copolymères à bloc à base d'ADN extraits du gel sont séchées au speed-vac et ensuite repris dans du D<sub>2</sub>O dans des cellules en quartz Hellma (2 mm). Trois configurations différentes caractérisées par une longueur d'onde  $\lambda$  et une distance échantillon-détecteur D sont utilisées : ( $\lambda = 12 \text{ \AA}$ , D = 4.7m), ( $\lambda = 5 \text{ \AA}$ , D = 4.7m) and ( $\lambda = 5 \text{ \AA}$ , D = 1.3m). La plage totale de q est 0,002-0,30  $\text{\AA}^{-1}$ . Les intensités diffusées ont été corrigées par la diffusion de la cuve vide, et la normalisation du détecteur a été faite en divisant par la diffusion de 1 mm d'eau légère, avant de réduire les données à l'échelle absolue (à l'aide des constantes d'instrument données par le LLB), et en soustrayant le bruit de fond incohérent.

**Microscopie à Force Atomique (AFM)** : Les mesures d'AFM ont été effectuées en utilisant un microscope Nanoscope V (Veeco). Les mesures ont été effectuées en mode tapping. La pointe utilisée est en nitrure de silicium (SNL-A, constante de raideur 0,58 N.m<sup>-1</sup>, rayon de courbure ~ 6 nm). Une goutte de solutions de conjugués d'ADN ~ 10  $\mu\text{mol}^{-1}$  est déposée sur une lame de verre préalablement activée au plasma et traitée à l'APTES. Les mesures ont été effectuées soit après séchage de la goutte à l'air libre durant toute la nuit ou plusieurs semaines, soit après réhydratation du film.

**Microbalance à Crystal de Quartz (QCM)** : Les mesures de QCM ont été effectuées sur un appareil QSense-E4(Qsense) sur la plateforme Nanobiotechnologie de l'ITAV (Toulouse). Les cristaux de quartz recouverts d'or utilisés ont été achetés chez Liotrap et résonnent à une fréquence de 9 MHz. Les déplacements de fréquence et de dissipation ont été suivis en temps réel en utilisant le logiciel Qsoft401 fourni avec l'appareil.

### III. Synthèse des bioconjugués d'ADN

#### III.1 Synthèse par voie phosphoramidite

La synthèse par voie phosphoramidite s'effectue en deux étapes: (a) une première étape de fonctionnalisation du polymère par le phosphoramidite, (b) une deuxième étape qui va consister à accrocher le polymère fonctionnalisé sur l'oligonucléotide.

## a) Fonctionnalisation du polymère par le phosphoramidite

La synthèse s'effectue sous atmosphère inerte. Avant toute utilisation, les schlenks contenant les barreaux aimantés sont placés sous une rampe à vide (pression 2 mbar) et sont chauffés trois fois au pistolet thermique avec un temps d'attente de 10 min entre chaque chauffage. Par la suite, on place  $x$  mg (où  $1 \text{ mg} \leq x \leq 3 \text{ mg}$ ) de polymère noté R-OH (où R = PIP, PMMA, PDMS ou PEO-*b*-PCL) dans le schlenk placé sous un flux d'argon et on introduit de 2 à 6 mL (en fonction de la masse de polymère introduite) de dichlorométhane anhydre à l'aide d'une seringue purgée à l'argon. Après dissolution complète du polymère, 5 équivalents de DIPEA anhydre, suivi de 2 équivalents d'une solution de 2-cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite, sont introduites à l'aide d'une seringue préalablement purgée à l'argon. Il s'ensuit un dégagement gazeux traduisant la libération du HCl.

Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2h30 sous flux d'argon. Après une RMN de contrôle du  $^{31}\text{P}$  afin de vérifier la disparition du phosphore ( $\delta = 180 \text{ ppm}$ ) du 2-cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite, la réaction est arrêtée, le brut réactionnel est placé dans une ampoule à décanter avec 2 mL d'une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  froide. Le processus est répété une fois. La phase organique est par la suite extraite deux fois avec 2 mL d'une solution saturée froide de NaCl. Les fractions aqueuses sont rassemblées et lavées avec 6 mL de dichlorométhane. Les phases organiques une fois regroupées sont séchées sur  $\text{MgSO}_4$ . Après filtration, puis évaporation du solvant à la rampe vide, le produit est repris dans du dichlorométhane anhydre. Une seconde RMN du  $^{31}\text{P}$  est effectuée afin de vérifier la présence du produit.

## b) Couplage du polymère fonctionnalisé sur l'oligonucléotide : synthèse sur support solide

La réaction de couplage s'effectue en 3h sous un flux d'argon. L'oligonucléotide sur CPG est introduit dans un schlenk préalablement chauffé au pistolet thermique et mis sous flux d'argon comme précédemment. Par la suite, sont introduits en 3 fois dans ce même schlenk, 30 équivalents de polymère fonctionnalisé en solution dans le DCM et 180 équivalents de tétrazole. Entre chaque ajout de polymère et tétrazole, on laisse sous agitation pendant 15 min, puis sans agitation. Ce procédé est répété 2 fois, toutefois lors du troisième ajout, le temps alloué pour la réaction de couplage est d'1h30 min. Par la suite, la réaction est stoppée et le milieu réactionnel est filtré à l'aide d'une canule. Le milieu réactionnel se trouvant toujours sous flux d'argon est ensuite lavé 3 fois au dichlorométhane anhydre et 3 fois à l'acétonitrile anhydre. Après filtration avec une canule, on réalise l'oxydation du phosphite triester en phosphate triester beaucoup plus stable. Pour cela, 2 mL d'iode (solution commerciale d'iode 0,1M dans un mélange pyridine/THF/eau) est introduit dans le schlenk et laissé sous agitation pendant 30 min. A partir de cette étape, on ne travaille plus sous atmosphère inerte. Il s'ensuit une succession de lavages/filtrations des conjugués d'oligonucléotides accrochés sur support

CPG avec de l'acétonitrile, le lavage est stoppé lorsque d'une solution marron foncée, on passe à une solution marron très claire.

Les conjugués d'oligonucléotides sont ensuite décrochés du support CPG et déprotégés *via* un traitement à l'ammoniaque aqueux 28% (2mL/24 heures + 2mL/24 heures + 2mL/24heures) à température ambiante. Les trois fractions collectées sont ensuite chauffées à 55 °C pendant 24 heures. Après refroidissement, la solution est répartie dans des Eppendorfs Lobind<sup>TM</sup>, la totalité de l'ammoniaque est évaporée et les échantillons sont ensuite purifiés sur gel d'électrophorèse.

Les rendements obtenus à partir de la synthèse phosphoramidite sont récapitulés dans le tableau 1 ci-dessous. Pour ce calcul, nous avons estimé la quantité d'ODN actifs dans l'échantillon sur CPG de départ. Celle-ci a été calculée en déprotégeant une masse donnée d'oligonucléotides accrochés sur billes dans de l'ammoniaque. Après purification sur gel electrophorèse, nous savons que 12,5 mg contiennent 21 nmol d'ODN<sub>22</sub>.

Oligonucléotides	Conjugués d'ADN	RMN <sup>31</sup> P issu du couplage des polymères au phosphoramidite $\delta$ (ppm) dans THF ou DCM	Masse molaire déterminée par Maldi :Tof	Masse molaire calculée
ODN <sub>22S</sub>	PMMA <sub>6300</sub> -ODN <sub>22S</sub>	148,7 144,7	-	12912,3
	PEO <sub>2000</sub> -PCL <sub>2800</sub> -ODN <sub>22S</sub>	147,8 145,5	-	11412,3
	PEO <sub>2000</sub> -PCL <sub>2600</sub> -ODN <sub>22S</sub>	148,2 143,5 143,4	-	11212,3
	PDMS <sub>1000</sub> - ODN <sub>12x</sub>	148,8 139,2	-	7612,3
ODN <sub>22AS</sub>	PMMA <sub>6300</sub> -ODN <sub>22AS</sub>		13492,7	13157,5
	PEO <sub>2000</sub> -PCL <sub>2600</sub> -ODN <sub>22AS</sub>		-	11657,7
	PEO <sub>2000</sub> -PCL <sub>2600</sub> -ODN <sub>22AS</sub>		-	11457,5
ODN <sub>22A</sub>	PEO <sub>2000</sub> -PCL <sub>2600</sub> -ODN <sub>22A</sub>		-	11428,6
	PEO <sub>2000</sub> -PCL <sub>2800</sub> -ODN <sub>22A</sub>	145,5 145,3		11628,6

Tableau 1: Récapitulatif des conjugués d'ADN synthétisés avec les déplacements chimiques du phosphore correspondant au couplage des polymères au phosphoramidite et les rendements obtenus après purification sur gel d'électrophorèse.

### III.2. Synthèse par voie peptidique

#### a) Synthèse du polymère PCI

Pour cela, l' $\epsilon$ -caprolactone (5 mL ; 45 mmol) est solubilisée dans 20 mL de toluène, puis sont ajoutés l'acide méthane sulfonique (75  $\mu$ L ; 1,15 mmol) et l'eau (18  $\mu$ L ; 1 mmol). Le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C sous agitation pendant 1h30. Afin de «quencher» la réaction, 50  $\mu$ L de triéthylamine est introduite dans le mélange. Par la suite le mélange est évaporé sous pression réduite et repris dans 30 mL de dichlorométhane. La solution est versée dans 300 mL de méthanol froid, le polymère

précipite. Après filtration sur Büchner et lavage au méthanol du brut réactionnel, le résidu de filtration sous forme de solide blanc est séché à l'étuve.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ =3.99 (t,  $J$ =6.7 Hz, 2H x 32,  $\text{nOCH}_2$ ), 2.23 (t,  $J$ =7.5 Hz, 2H x 32,  $\text{nCOCH}_2$ ), 1.58 (m, 4H x 32,  $\text{nCH}_2$ ), 1.32 (m, 2H x 32,  $\text{nCH}_2$ ).

b) Activation de la fonction acide du polymère

Nous avons utilisé les réactifs de couplage DCC/NHS ou DMT-MM. Pour ce qui est du DMT-MM, l'activation de la fonction acide du polymère s'est effectué en «one pot» pendant le couplage à l'oligonucléotide.

La PCl (1g, 0,27 mmol) est solubilisée dans 5 mL de diméthylsulfoxyde, puis sont ajoutés du DCC (123.6 mg ; 0,6 mmol) et NHS (69 mg ; 0,6 mmol). Le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C sous agitation pendant toute la nuit. Le lendemain, après précipitation du produit activé dans 50 mL de méthanol à froid et filtration sur Büchner et séchage, on obtient un solide blanc.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): =3.99 (t,  $J$ =6.7 Hz, 2H x 32,  $\text{nOCH}_2$ ), 2.77 (br, 4H,  $\text{CH}_2(\text{NHS})$ ), 2.23 (t,  $J$ =7.5 Hz, 2H x 32,  $\text{nCOCH}_2$ ), 1.58 (m, 4H x 32,  $\text{nCH}_2$ ), 1.32 (m, 2H x 32,  $\text{nCH}_2$ ).

c) Couplage du polymère activé à l'oligonucléotide

Dans un eppendorf de 1,5 mL, est dissout la PCl activée (30 mg ; 8.6  $\mu\text{mol}$ ) dans 1,2 mL de diméthylsulfoxyde. A cette solution, on ajoute une solution d'oligonucléotide  $\text{ODN}_{22}\text{-NH}_2$  (60 nmol dans du tampon carbonate 1M, pH10). Le mélange est chauffé à 70 °C durant une journée. Par la suite, la solution est évaporée au speed-vac et le conjugué repris dans 1500  $\mu\text{L}$  d'eau distillée mQ. Après 2 jours d'incubation, le produit est filtrée sur Anopore 0,2  $\mu\text{m}$  afin d'éliminer le polymère qui n'a pas réagi et qui a précipité, le filtrat est récupéré et réparti dans des Eppendorfs pour ensuite être purifié par gel d'électrophorèse.

Pour Le couplage «one-pot» ; les quantités des réactifs utilisées sont les mêmes que celles en deux étapes.

L'activation et le couplage «one pot» avec le DMT-MM sont effectués avec les polymères commerciaux PEO5000, PMMA5500 et PMMA12000.

Avant le couplage, les oligonucléotides  $\text{ODN}_{22\text{S}}\text{-NH}_2$  accrochés sur billes CPG portant en position 5' un groupement DMT (on parle de «DMT-on») ont été déprotégés par une solution d'acide trichloroacétique 3% (m/v) dans le dichlorométhane en suivant ce procédé:

- ajout de 400  $\mu\text{L}$  de la solution d'acide trichloroacétique 3%, agitation pendant 4 min, puis laisser reposer pendant 5 min, puis filtration. Ce procédé est répété 3 fois.

-Il s'ensuit 3 lavages au dichlorométhane ( $\approx 500 \mu\text{l}$  chaque lavage) afin d'éliminer l'acide trichloroacétique.

-Puis 3 lavages à l'acétonitrile ( $\approx 500 \mu\text{L}$  chaque lavage) pour éliminer les autres résidus tels que le DMT. Par la suite, les billes d'oligonucléotides sont séchées sous argon pendant 2h.

Une fois, ce processus effectué, les billes d'oligonucléotides sont reprises dans 1 mL d'une solution de DMT-MM (0,1 M dans 500  $\mu\text{L}$  de tampon carbonate 1 M, pH = 10) et sont ajoutées à cette solution les quantités de polymères dissous dans 500  $\mu\text{L}$  de diméthylsulfoxyde. La solution limpide d'oligonucléotide devient turbide lors de l'ajout de la solution de polymères (PMMA5500 et PMMA12000), en raison de la précipitation du polymère dans la solution aqueuse. Afin de le solubiliser, 500 à 1000  $\mu\text{L}$  de diméthylsulfoxyde sont ajoutés. On n'observe aucun changement avec le PMMA12000 même après sonication. Par la suite, les milieux réactionnels sont laissés sous agitation à température ambiante pendant 5 jours.

Les quantités de polymères utilisées et d'oligonucléotides sont regroupées dans le tableau 2 ci-dessous.

<b>ODN<sub>22S</sub>-NH<sub>2</sub> accrochés sur billes</b>	<b>Polymères</b>	<b>Rdt(%)</b>
(123,2 nmol ; 0,01eq)	63,1 mg de PMMA <sub>5500</sub> (11,5 $\mu\text{mol}$ ; 1eq)	30
(111,2 nmol ; 0,01eq)	131,2 mg de PMMA <sub>12000</sub> (10,9 $\mu\text{mol}$ ; 1eq)	15
(102,4 nmol ; 0,01eq)	48,3 mg de PEO <sub>5000</sub> (9,7 $\mu\text{mol}$ ; 1eq)	80
<b>ODN<sub>22S</sub>-NH<sub>2</sub> achetés déjà purifiés</b>	PεCL <sub>3700</sub> activé	50
(60 nmol ; 0,015eq)	(4 $\mu\text{mol}$ ; 1eq)	

Tableau 2: Détail des quantités d'oligonucléotides et de polymères utilisés pour la synthèse par liaison peptidique.

Le rendement a été calculé comme précédent après que les conjugués d'ADN ont été déprotégés, clivés des billes et purifiés sur gel électrophorèse.

## IV. Purification des bioconjugués d'ADN

- **Méthode d'électrophorèse**

Les électrophorèses ont été réalisées sur des gels de Polyacrylamide (PAGE). Elles sont utilisées pour la purification des bioconjugués d'ADN et pour mettre en évidence l'hybridation entre les brins d'ADN.

### Principe théorique de la PAGE

Cette technique est utilisée afin de séparer au sein d'un mélange les molécules d'ADN de tailles différentes. L'application d'un champ électrique au sein d'un mélange provoquera un déplacement des molécules d'ADN, chargées négativement vers l'anode.

Les gels sont constitués d'acrylamide qui est l'unité de base et de N,N-méthylène-bisacrylamide qui est l'agent réticulant. En fonction des différents taux de ces deux substances, on obtient différentes densités de gel. La matrice qui est sous forme de gel réticulé est obtenue grâce à la polymérisation de l'acrylamide. On peut réaliser les électrophorèses soit en condition native, soit dénaturante.

### Préparation des gels d'électrophorèses

#### Condition dénaturante

Les électrophorèses sont réalisées sur gel de polyacrylamide (PAGE) (ratio 19:1 entre l'acrylamide et le bisacrylamide) de 12% en utilisant du tampon TBE (Tris-borate 89 mM, EDTA 2 mM, pH = 8.0) et en milieu dénaturant (8 M urée). La molécule d'urée va former des liaisons hydrogène avec l'acide nucléique, en saturant tous les sites de liaisons possibles, il n'y a donc plus de possibilité de liaison hydrogène entre les bases nucléiques. L'urée va donc briser les liaisons hydrogènes à l'origine de la structure secondaire des acides nucléiques simples brins mais aussi à l'origine de l'hélicité de la double hélice d'ADN.

#### Condition native

En absence d'agent dénaturant, l'ADN double brin conserve sa structure hélicoïdale et sa forme au cours de la migration électrophorétique. A cet effet, le mélange précédent est effectuée mais sans urée.

De façon générale, le gel est préparé à partir de: 30 mL d'acrylamide /bisacrylamide

48 g d'urée

10 mL de tampon TBE

La solution est préparée, sous agitation, en chauffant le mélange à 50 °C pour faciliter la solubilisation des réactifs. Quand le milieu est homogène, la solution est complétée à 100 mL avec de l'eau distillée mQ. La polymérisation est ensuite initiée par ajout de 30 µL de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine) et de 100 mg de persulfate d'ammonium (APS). Le gel est par la suite coulé entre les plaques de verre, séparées par des espaceurs, en formant un «sandwich» plaque de verre/gel/plaque de verre. L'ensemble est monté sur les cuves d'électrophorèse après polymérisation du gel. Chaque extrémité du gel est en contact avec le tampon TBE dilué au 10<sup>ème</sup> (tampon de migration) contenant des électrolytes qui sont soumis à un potentiel électrique, et va permettre la propagation du courant. Ensuite, chaque Eppendorf contenant les conjugués issu de la synthèse sont solubilisés dans 16 µL d'une solution de bleu de bromophénol (2mg de bleu de bromophénol dissous dans 9,8 mL de formamide + 200 µL de solution EDTA 0,5mM) sont chauffés pendant 10 min à 90 °C, puis déposés au niveau des puits du gel d'électrophorèse.

La solution de bleu de bromophénol va permettre de suivre visuellement la migration et de stopper celle-ci. La migration s'effectue sous une puissance de 400 Watts, 33mA, pendant environ 3h30min.

- Analyse du gel

Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est illuminé sous une lampe ultra-violette à 254 nm (habituellement en plaçant le gel recouvert de papier film sur une plaque de silice), les oligonucléotides apparaissent comme des bandes roses sur un fond fluorescent vert. Les oligonucléotides couplés aux polymères migrent moins vite que les oligonucléotides non conjugués, par conséquent se trouvent vers le haut du gel.

- Extraction des conjugués d'ADN du gel et dessalage

Les bandes correspondantes aux conjugués d'ADN sont découpées, broyées et déposées dans un tube en verre. Les bandes de gel sont ensuite imbibées de 500 µL de tampon phosphate 0.1M, NaCl 1,4M, pH = 8, puis la préparation est gardée à 4°C au réfrigérateur pendant 24H. La solution des conjugués d'ADN est récupérée après filtration par centrifugation sur filtre anopore 0,2 µm. Le processus est répété 3 fois afin de s'assurer que le produit a été extrait totalement. Par la suite, afin de se débarrasser des sels, les solutions de conjugués sont dessalées sur colonne de gel Sephadex G25 ou à partir d'une dialyse avec un MWCO de 1 kDa. La colonne de Sephadex G25 sépare les substances de haut poids

moléculaire car seules sont retenues les petites molécules. Cette technique est plus rapide que la dialyse.

### Préparation des tampons

Tous les tampons sont stockés au réfrigérateur à 4 °C.

#### Tampon tris-borate-EDTA (TBE):

Ce tampon est stocké sous forme d'une solution mère concentrée (10X). Pour préparer cette solution «10X», il faut mettre en solution 108 g de base Tris, 55 g d'acide borique, et 40 mL d'EDTA (0,5 M, pH = 8) dans 1L d'eau distillée. Le pH est ajusté par la suite pour qu'il soit à 8.0. Le tampon «1X» utilisé pour la migration de l'électrophorèse sera de concentration finale : 89 mM de tris-borate et 2mM en EDTA.

#### Tampon phosphate 0,1 M, pH = 8:

0,2 M d'une solution  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

0,2 M d'une solution  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

1,4 M NaCl

#### Tampon carbonate 1 M, pH = 9,6:

1 M d'une solution  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

1 M d'une solution de  $\text{NaHCO}_3$

Le pH est ajusté avec une solution d'hydroxyde de sodium NaOH.

### Quantification UV-visible des bioconjugués d'ADN

La quantité de bioconjugués d'ADN ainsi que d'oligonucléotide est déterminée par spectrophotométrie UV-visible à température ambiante, dans l'eau ou dans du tampon en utilisant la loi de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon.l.C$$

-A: absorbance

- $\varepsilon$ : coefficient d'extinction molaire en  $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

-l: longueur du trajet optique qui traverse la cuve d'analyse en cm

-C: concentration en mol.L<sup>-1</sup>

D'après la valeur de l'absorbance à 260 nm, on obtient la quantité de produit présent dans l'échantillon analysé. On emploie cette méthode pour déterminer précisément les quantités d'oligonucléotides et de bioconjugués d'ADN synthétisés. Les coefficients d'extinction molaire des oligonucléotides proviennent de la fiche produit d'Eurogentec. La mesure de la densité optique se fait en utilisant une mini cuve en quartz de 50 µL et de 1 cm de trajet optique.

## V. Caractérisation des objets

### V.1. Préparation des objets

Les solutions des conjugués d'ADN sont préparées de deux façons:

-Soit en récupérant le surnageant à l'issue de l'extraction des conjugués d'ADN du gel

-Soit par simple solubilisation des conjugués préalablement séchées au speed-vac dans de l'eau mQ,

### IV.2. Mesures de tension de surface

Pour la lame de Wilhelmy, une solution mère de conjugués d'ADN obtenue après la PAGE est diluée successivement. Les mesures sont effectuées, en laissant au moins 5 min entre le moment où la lame est plongée dans la solution et la mesure, afin de laisser le temps au système d'atteindre l'équilibre.

Pour la goutte sessile, un volume connu (~ 300 µL) de conjugués d'ADN est déposé sur une lame de verre. Avant utilisation, les lames de verre sont trempées pendant 2h dans une solution 2 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH dans un mélange eau/éthanol 95% (2 : 3 vol). Par la suite, les lames sont rincées à l'eau mQ jusqu'à ce que le pH revienne à la neutralité. Les lames sont ensuite traitées au trichlorométhylsilane pour permettre une bonne adhésion de la goutte. La mesure du volume de la goutte en fonction du temps nous permet de remonter à tout moment à la concentration en conjugués d'ADN. Ceci se fait grâce à une caméra reliée à l'appareil tensiomètre Krüss digital DSA 10-Mk2 et au logiciel Drop shape analysis intégré à l'appareil.

### IV.3. Fluorescence

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrophotomètre PTI. Toutes les mesures ont été effectuées à 20 °C. Le 1-anilino-8-naphtalène sulfonate (ANS, aldrich) a été utilisé comme sonde fluorescente ( $c = 30 \pm 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). L'ouverture des fentes était de 2 nm pour l'excitation comme pour l'émission. La longueur d'onde d'excitation est de 350 nm. Les solutions ont été préparées à partir d'une solution mère de PEO-*b*-PCl-ODN<sub>22S</sub> ( $c = 500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Les solutions n'ont pas été dégazées avant les mesures. Pour l'analyse mathématique des données, les longueurs d'onde ont été d'abord

converties en énergie (eV). Cela a permis de bien ajuster les données d'émission avec des fonctions gaussiennes.

## VI. Adsorption de nanoparticules de polymères sur une surface

Les expériences d'hybridation sur surface ont été réalisées sur Microbalance à Crystal de Quartz (QCM). Toutes les solutions injectées en QCM ont été préparées dans un tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH = 8, [NaCl] = 1,4 mol.L<sup>-1</sup>). La solution des agrégats de tribloc hybridés avec l'oligonucléotide «linker» a été obtenue par mélange à volume égal de solutions tampons d'agrégats de PEO-*b*-PCL-ODN<sub>22S</sub> (3 μmol.L<sup>-1</sup>) et de linker (3 μmol.L<sup>-1</sup>) préalablement chauffés à 90 °C pendant 10 min, puis refroidir à T = 20 °C. Les études par QCM ont été effectuées sur des cristaux de quartz AT – Cut 9 MHz (Lot-Oriel) recouverts d'or.

La QCM (QSense-E4) est pilotée par le logiciel Qsoft401 fournie par Qsense. Avant toute utilisation, les cristaux de quartz ont été exposés au plasma d'oxygène pendant 5 min à 1,5 Hertz de puissance. Ce procédé permet d'éliminer toute matière organique qui se serait adsorbée à la surface du quartz et qui fausserait la mesure. Pendant toutes les expériences, la température a été maintenue à 20 °C et le débit à 30 μL.min<sup>-1</sup>.

Premièrement, nous avons injecté la solution tampon pendant 12 min. Le greffage de l'ODN-SH sur la surface d'or a été réalisé par injection d'une solution tampon de <sup>5</sup>CAC AAT TGT TTA AAA AA<sup>3'</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-SH (3 μmol.L<sup>-1</sup>) pendant 15 min. Ensuite, le flux a été arrêté jusqu'à ce que les vibrations du quartz restent stables. Les oligonucléotides non immobilisés ont été rincés avec une solution tampon pendant 15 min (pas de changement du signal). Puis la solution tampon des agrégats de tribloc hybridés à l'oligonucléotide linker a été injectée pendant 33 min, puis 15 min d'équilibration sans écoulement ont suivi. Une solution tampon de rinçage a ensuite été injectée pour 1 heure pour enlever les agrégats non immobilisés, et le flux a été arrêté pour une autre heure. Enfin, la solution tampon d'ODN<sub>22As</sub> (13,3 μmol.L<sup>-1</sup>) a été injectée pendant 45 min, avant que le débit a été de nouveau arrêté (21min).

## VII. Synthèse des particules AuNps et caractérisation des systèmes AuNps/PMMA-ODN

### VII.1. Synthèse des nanoparticules d'or

A 94,25 mL d'H<sub>2</sub>O sont ajoutés 5 mL d'une solution aqueuse de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> à 1,0.10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>, suivie de 250 μL d'une solution aqueuse de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. Le pH est alors égal à 8. Puis, sous agitation manuelle, 500 μL d'une solution de NaBH<sub>4</sub> fraîchement préparée à 1,0.10<sup>-1</sup> mol.L<sup>-1</sup> sont ajoutés. La solution passe immédiatement d'un jaune pâle à rouge profond.

## **VII.2. Caractérisation des systèmes AuNPs/PMMA-ODN**

Une solution d'oligonucléotide ODN-SH ( $c = 5-18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) sont mises en présence des AuNPs durant 15h. Cette solution est par la suite utilisée pour décorer les nanoparticules de PMMA-ODN.



ANNEXE

# ANNEXE

---



Pour une analyse quantitative, la contribution à des énergies élevées (exprimée en eV) présente sur les spectres d'émission de l'ANS a été ajustée par une fonction gaussienne après avoir éliminé la contribution aux basses énergies (cf. Figure ci-dessous).

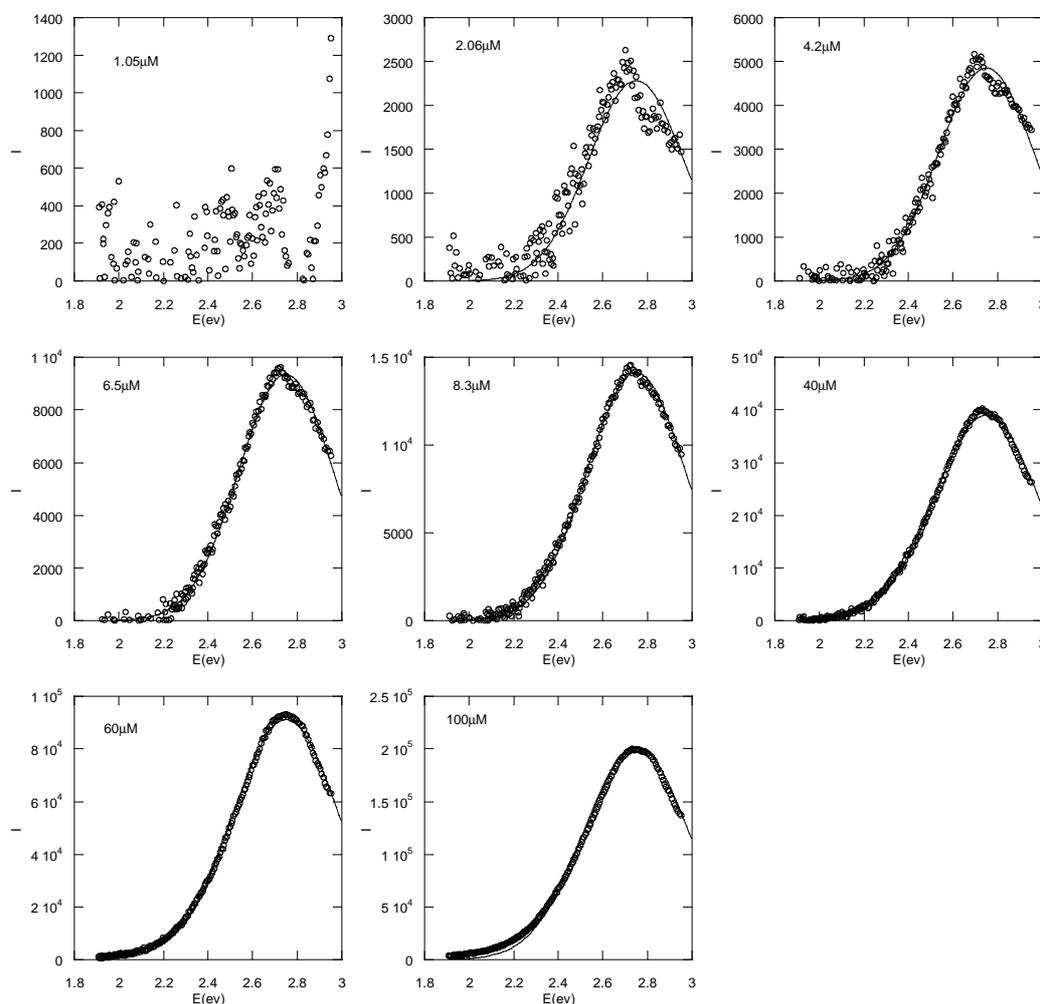


Figure : Spectres d'émission, après soustraction de la contribution aux bases énergies de l'ANS incorporé dans les solutions de de nanoparticules de tribloc. Concentration en polymères comprises entre 1 et 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  comme indiqué sur les graphes.  $[\text{ANS}] = 30 \pm 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$  : Les intensités d'émission sont en unité arbitraire, en utilisant la même échelle pour tous les graphiques, La ligne pleine correspond à l'ajustement par une fonction gaussienne centrée à 2,75eV.



## **« Copolymères à base d'ADN: Synthèse – Auto-assemblage – Application »**

Au cours de ce travail, nous avons cherché à obtenir une librairie de copolymères à base d'ADN, en utilisant différentes stratégies de synthèse visant à coupler un oligonucléotide à des polymères (hydrophobes, diblocs). Différentes techniques d'analyse (DDL, MET, DNPA, Cryo-MET...) ont permis d'étudier et de caractériser les structures auto-assemblées en solution aqueuse de ces biohybrides. Nous avons montré que les nano-objets formés à partir de polymères tribloc pouvaient encapsuler les molécules hydrophobes. Nous avons également montré qu'en utilisant les propriétés de reconnaissance de l'oligonucléotide, il était possible d'adsorber les nanoparticules de copolymères d'ADN sur une surface et de décorer celles-ci de nanoparticules d'or. Ces différents résultats ouvrent la voie à diverses applications des nanohybrides.

Mots clés : Copolymères, ADN, biohybrides, reconnaissance, nanoparticules

## **« Copolymers based on DNA : Synthesis – Self-assembling - Application »**

In this work, we built a library of copolymers based on DNA. For that purpose, we used various strategies of synthesis to link polymers (hydrophobic, diblocs) with oligonucleotides. Different techniques (DLS, TEM, SANS, Cryo-TEM...) allowed us to study and characterize the self-assembled structures in aqueous solution of these biohybrids. We worked out the potential applications of these biohybrids. We have shown that tribloc nanoparticles can encapsulate hydrophobic molecules. Using oligonucleotide recognition, it was possible to adsorb DNA copolymers nanoparticles on a surface and decorate these of golden nanoparticles. These results pave the way to new applications of nanohybrids.

Keywords: Copolymers, DNA, biohybrids, recognition, nanoparticles