

MICELLES SENSIBLES À LA CHALEUR, AU PH ET À LA LUMIÈRE

par

Maxime Pelletier

Mémoire présenté à la Faculté des sciences en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2009



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-49561-2
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-49561-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Le 20 mars 2009

le jury a accepté le mémoire de M. Maxime Pelletier dans sa version finale.

Membres du jury

M. Yue Zhao
Directeur
Département de chimie

M. Pierre Harvey
Membre
Département de chimie

M. Armand Soldera
Président-rapporteur
Département de chimie

SOMMAIRE

L'ouverture des micelles de copolymère à blocs (CPB) contrôlée par un stimulus (chaleur, pH, lumière, etc.) suscite beaucoup d'intérêts dans le domaine de la libération contrôlée de médicaments. L'amélioration du contrôle de l'ouverture des micelles à un endroit spécifique et à un temps précis est un enjeu majeur. La plupart des micelles sensibles à la chaleur utilisent la température critique inférieure (LCST) d'un bloc pour déstabiliser les micelles. Dans un premier temps, l'étude porte sur l'élaboration d'un nouveau type de micelles CPB qui sont sensibles à la chaleur via un groupement protecteur thermolabile. Le copolymère étudié est le poly(oxyde d'éthylène)-*bloc*-poly(méthacrylate de 2-tétrahydropyranyl) (PEO-*b*-PThPMA). En effet, l'hydrolyse du groupement tétrahydropyranyl (THP) est sensible à la chaleur ainsi qu'au pH acide. Le copolymère a été synthétisé par polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP). L'analyse du CPB a été effectuée par chromatographie de perméation de gel (GPC), spectroscopie infrarouge, résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H), et par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Pour ce qui est de l'effet de la chaleur et du pH sur les micelles du PEO-*b*-PThPMA, la spectroscopie de fluorescence, la diffusion dynamique de la lumière (DLS), ainsi que la microscopie électronique à balayage (MEB) ont été utilisées. L'étude démontre que la déstabilisation des micelles est influencée par la chaleur, le pH et la longueur des blocs du copolymère. De plus, pour la première fois trois événements liés à l'ouverture des micelles ont été suivis.

La seconde partie du mémoire est consacrée à l'étude de micelles photosensibles. Un deuxième nouveau CPB a été synthétisé par ATRP, soit le copolymère poly(oxyde d'éthylène)-*bloc*-poly(méthacrylate de [7-(diéthylamino)coumarine-4-yl]méthyl) (PEO-*b*-PDEACMMA). Le bloc contenant la molécule de coumarine est photosensible. Elle peut être clivée par l'absorption d'un photon UV ou de deux photons proche infrarouge, déplaçant ainsi la balance hydrophile/hydrophobe vers la déstabilisation des micelles. La caractérisation du copolymère ainsi que des micelles a été effectuée avec les mêmes méthodes que pour le premier projet.

L'étude démontre une amélioration de la sensibilité des micelles à l'absorption à deux photons, ce qui est un avantage pour la libération de médicaments à l'aide de la lumière.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Pr. Yue Zhao, pour la confiance qu'il m'a démontrée lors de ma maîtrise. J'ai beaucoup appris sur les polymères photosensibles lors des discussions que l'on a eues. De près ou de loin, il a su me guider tout au long des deux années de recherche en sa compagnie.

Je remercie aussi Jérôme Babin avec qui j'ai appris beaucoup sur les polymères, la polymérisation et les méthodes d'analyse. Ainsi que tous les membres du groupe passés et présents avec qui j'ai eu des discussions sur les différents problèmes de chimie et sur une culture différente que la mienne.

Merci à la compagnie St-Jean Photochimie, pour m'avoir donné le goût d'en apprendre plus sur la chimie lors de mes stages au baccalauréat, et pour m'avoir fourni le monomère pour la première partie de mes recherches.

J'aimerais remercier ma famille, ma conjointe, et plus particulièrement, mes parents pour m'avoir supporté moralement et financièrement tout au long de mes études.

Finalement, j'aimerais remercier le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), le Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) et l'Université de Sherbrooke pour leur support financier tout au long de ma maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	i
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des figures.....	v
Liste des schémas	viii
Introduction	1
I.1 Généralités	1
I.2 Association des copolymères.....	1
I.2.1. Formation et taille des micelles.....	4
I.3 Transporteur micellaire.....	5
I.3.1. Micelles sensibles aux stimulus	7
I.4 Absorption à deux photons	15
Chapitre 1	19
Micelles sensibles à la chaleur et au pH.....	19
1.1. Avant-propos.....	19
1.2 Investigation of A New Thermosensitive Block Copolymer Micelle: Hydrolysis, Disruption and Release	21
Chapitre 2 :	55
Micelles sensibles aux photons proche infrarouge (NIR).....	55
2.1. Avant-propos.....	55
2.2. New Two-Photon Sensitive Block Copolymer Nanocarrier	57
Chapitre 3	70
Discussion.....	70
Conclusion.....	74
Conclusion	74
Perspectives.....	75
Bibliographie	77

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Illustration des différentes morphologies auto-organisées par microséparation de phases. Les morphologies peuvent être divisées en phase classique : lamellaire (L), cylindrique (C), et sphérique (S), et complexes : gyroïde (G), lamelle perforée (PL), et diamant-double. La vue agrandie de la phase L montre l'auto-assemblage des molécules individuelles b) Diagramme de phase théorique pour une ségrégation faible. LAM, Hex et BCC correspondent à des symétries lamellaire, hexagonal (morphologie cylindrique), et cubique centrée (morphologie sphérique). 2
- Figure 2 : Illustration a) d'une micelle de surfactant, et b) d'une micelle de copolymère à blocs. . 3
- Figure 3 : Fabrication d'une micelle photo-active. La déstabilisation du copolymère et de la micelle par la lumière déplace la balance hydrophile/hydrophobe, ce qui induit la dissociation des micelles 10
- Figure 4 : Structure chimique d'un copolymère à blocs, où le bloc hydrophobe est constitué d'azobenzène. La polarité du groupement hydrophobe peut être changée par une irradiation UV ou visible..... 11
- Figure 5 : Changement en transmittance pour une solution de vésicules du copolymère azobenzène. Les photos MEB montrent les vésicules avant irradiation UV (a), sous irradiation UV (b), et sous irradiation visible(c). 12
- Figure 6 : Structure chimique du PEO-*b*-PPyMA. La réaction de photolyse clive la fonction pyrène, convertissant le bloc hydrophobe en un bloc hydrophile, le poly(acide méthacrylique) (PMA), ce qui mène à la dissociation des micelles..... 13
- Figure 7 : Structure chimique du PEO-*b*-PNBMA. La réaction de photolyse par un ou deux photons clive la fonction nitrobenzyl, convertissant la partie hydrophobe en partie hydrophile menant à la dissociation des micelles..... 14
- Figure 8 : Limite de la zone proche infrarouge, où il y a le minimum d'absorption de photons par l'hémoglobine et l'eau 14

Article 1

Figure 1 (a) Thermosensitive hydrolysis of the block copolymer composed of poly(ethylene oxide) and poly(2-tetrahydropyranyl methacrylate) (PEO- <i>b</i> -PThPMA). (b) Schematic illustration of the disruption of block copolymer micelles in aqueous solution as a result of the hydrolysis (swelling and dissolution).	42
Figure 2. (a) GPC and (b) DSC curves of the PEO- <i>b</i> -PThPMA samples of various compositions as indicated in Scheme 1.	42
Figure 3. ¹ H NMR spectra of PEO ₁₁₂ - <i>b</i> -PThPMA ₁₆₄ : (a) dissolved in THF- <i>d</i> ₈ , (b) upon addition of D ₂ O in THF solution inducing the formation of micelles, (c) aqueous micellar solution obtained by dialysis against D ₂ O, and (d) aqueous micellar solution heated to 80 °C for 30 min.	42
Figure 4. Aqueous micellar solution of PEO ₁₁₂ - <i>b</i> -PThPMA ₁₆₄ heated to 80 °C: (a) evolution of the distribution of hydrodynamic diameters of micellar aggregates before and after 60 min, and (b) changes in the scattered intensity measured at 90°	42
Figure 5. SEM images of (a) micelles of PEO ₁₁₂ - <i>b</i> -PThPMA ₁₆₄ observed by casting the micellar solution at room temperature, and (b) large aggregates formed after heating the micellar solution to 80 °C for 100 min.	42
Figure 6. Aqueous micellar solution of PEO ₁₁₂ - <i>b</i> -PThPMA ₁₆₄ heated to 37 °C (pH 7): (a) evolution of the distribution of hydrodynamic diameters of micellar aggregates before and after 74 h, and (b) changes in the scattered intensity measured at 90°.	42
Figure 7. Simultaneous characterizations of the aqueous micellar solution of PEO ₁₁₂ - <i>b</i> -PThPMA ₁₆₄ heated to 80 °C by combining the use of three techniques: (a) ¹ H spectra showing the hydrolytic cleavage of tetrahydropyranyl (THP) groups over time, (b) DLS results showing the evolution of the size distribution of the aggregates upon micellar disruption, and (c) fluorescence emission spectra of Nile Red (NR) loaded in the micelles (λ _{ex} =540 nm) showing its release into an aqueous medium.	42
Figure 8. Comparison of the kinetics of the three events occurring in the micellar solution of PEO ₁₁₂ - <i>b</i> -PThPMA ₁₆₄ at 80 °C: (1) the hydrolytic cleavage of tetrahydropyranyl (THP) groups indicated by the change in the normalized integral of the resonance signal at 5.33 ppm, (2) the resulting micellar disruption related to the decrease in the normalized light scattering intensity by the solution, and (3) the concomitant release of loaded Nile Red (NR)	

from the micelles into the aqueous medium as revealed by the change in the normalized fluorescence intensity at the maximum emission wavelength.....	43
Figure 9. (a) Normalized fluorescence intensity of Nile Red vs time for the micellar solution of PEO ₁₁₂ - <i>b</i> -PTHPMA ₁₆₄ at 37 °C for three pH values (5, 6 and 7). (b) Normalized fluorescence intensity of Nile Red vs. time for micellar solutions at pH 7 prepared with three copolymer samples having the same PEO block but different lengths for the PTHPMA block.	43
Article 2	
Figure 1. a) Fluorescence emission spectra ($\lambda_{exc} = 380$ nm) of micellar solution of 1 (1mg/mL) loaded with Nile Red under UV irradiation at 365nm (500 mW.cm ⁻²). b) Normalized fluorescence emission intensity of Nile Red at 622 nm ($\lambda_{exc} = 550$ nm) in response to UV irradiation (365 nm) at 120 mW.cm ⁻² and 500 mW.cm ⁻² powers. c) Change of the normalized fluorescence emission intensity at 622 nm ($\lambda_{exc} = 560$ nm) of Nile Red in response to intermittent UV irradiation (365 nm, 120 mW.cm ⁻²).	58
Figure 2. a) A schematic showing the photoinduced release of coumarin dye from the micellar solution placed in a dialysis cap and subjected to an irradiation, the cell being filled with pure water. B) Release kinetics of coumarin dye as revealed by the increase in fluorescence emission at 475 nm ($\lambda_{exc} = 380$ nm) after irradiations (365 nm, 500 mW.cm ⁻²) of different times, the fluorescence being measured in the cell, outside the dialysis cap.	58
Figure 3. BCP micelles under irradiation at 794 nm: a) and b) fluorescence emission spectra with excitation at 380 and 550 nm, respectively; c) normalized fluorescence emission intensity of Nile Red at 622 nm ($\lambda_{exc} = 560$ nm), d) scanning electron microscopy images of micellar solutions of 1 equilibrated with Nile Red cast on a silicon wafer, before and after irradiation; and e) fluorescence emission spectra of a micellar solution of PEO ₄₅ - <i>b</i> -PMMA ₆₉ loaded with Nile Red under irradiation at 794 nm.....	65
Figure S3 : SEC of PEO112 macroinitiator and PEO- <i>b</i> -PDEACMM block copolymer.....	67
Figure S4 : Dynamic Light Scattering measurement of block copolymer micelles of 1 in aqueous solution;	69
Figure 9 : Nouveaux copolymères dérivés du PEO- <i>b</i> -PTHPMA	75

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1 : Diagramme de Jablonski simplifié de l'absorption d'un ou de deux photons.....	16
Schéma 2 : a) Réaction de déprotection des dérivés de coumarine. b) Diagramme de Jablonski de la photoréaction	17
Article 1	
Scheme 1: Synthetic route to block copolymers of PEO- <i>b</i> -PThPMA of various compositions. .	44
Article 2	
Scheme 1. Chemical structure and photolysis of the coumarin-containing amphiphilic block copolymer 1.	57
Scheme S1: Synthetic route to the coumarin monomer 2.....	63
Schéma 3 : Photolithographie d'un homopolymère contenant un groupement THP	76

INTRODUCTION

I.1 Généralités

Un polymère est une macromolécule formée de l'association de plusieurs molécules de plus petite masse (monomère, oligomère), identique ou non (1). L'association des petites molécules (monomères) par des liens covalents formera une molécule ayant des caractéristiques et des comportements différents des petites molécules seules. Dans le cas où il y a seulement un seul monomère au début de la polymérisation, il y aura formation d'un homopolymère. Par contre, si le polymère est formé de deux ou plusieurs monomères différents, on parlera de copolymère. Il y a différents types de copolymères. Prenons l'exemple d'un polymère formé par deux motifs monomères différents : A et B. Dans le cas où les unités A et B sont répartis de façon aléatoire le long de la chaîne, on parlera d'un copolymère statistique. Si les unités sont alternées les unes par rapports autres, ce sera un copolymère alterné. Un copolymère greffé, quant à lui, est une chaîne principale du monomère A à laquelle des blocs B sont greffés, ou vice-versa. Finalement, il y a les copolymères à blocs (CPB). Les monomères A et B forment de longs blocs séparés le long de la chaîne principale. Les méthodes de synthèse ont beaucoup évolué au fil du temps, débutant par la polycondensation jusqu'aux différentes méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée récemment développées. Les nouvelles techniques permettent de préparer des copolymères avec des compositions, des masses moléculaires et des structures élaborées beaucoup plus facilement.

I.2 Association des copolymères

L'intérêt pour les CPB est en pleine expansion, car ils ont des propriétés intéressantes à l'état solide dues à leurs structures particulières. En effet, en attachant deux blocs ayant des caractéristiques différentes, les interactions des segments avec le solvant, ou entre les segments,

mèneront aux différentes morphologies du copolymère. À l'état solide, un CPB peut s'organiser de façon structurée lorsque l'incompatibilité entre les segments est assez élevée (figure 1)(2,3).

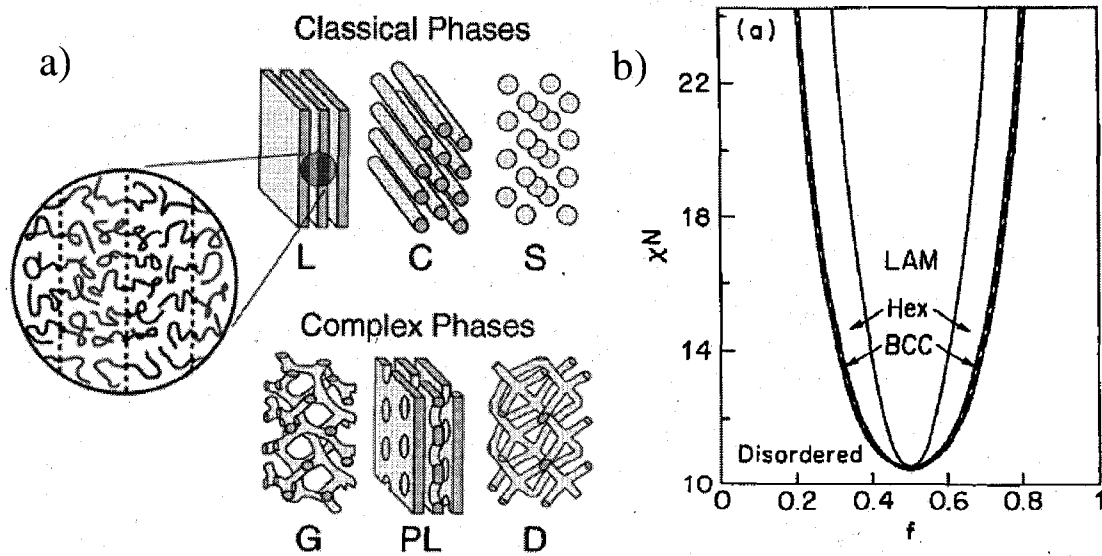


Figure 1 : a) Illustration des différentes morphologies auto-organisées par microséparation de phases. Les morphologies peuvent être divisées en phases classiques : lamellaire (L), cylindrique (C), et sphérique (S), et complexes : gyroïde (G), lamelle perforée (PL), et diamant-double. La vue agrandie de la phase L montre l'auto-assemblage des molécules individuelles. b) Diagramme de phase théorique pour une ségrégation faible. LAM, Hex et BCC correspondent à des symétries lamellaire, hexagonal (morphologie cylindrique), et cubique centrée (morphologie sphérique)

En solution plus diluée, l'interaction entre les segments et le solvant, ainsi que les segments entre eux peuvent mener à la formation de micelles de CPB. Il existe deux types de micelles, les micelles de tensio-actif et les micelles de CPB. Une micelle de tensio-actif est un agrégat sphérique de molécules ayant une tête polaire et une longue chaîne hydrophobe. Dans l'eau, la tête polaire sera dirigée vers l'extérieur et la chaîne hydrophobe vers l'intérieur (figure 2a). Dans le cas des micelles formées à partir de CPB, la tête polaire sera remplacée par un bloc de polymère polaire. Dans l'eau, la chaîne polaire formera une couronne avec les chaînes

hydrophiles autour du noyau qui est constitué des segments hydrophobes de copolymère (figure 2b). La couronne sert à stabiliser la micelle. En fait, lorsqu'un CPB est dissous dans un solvant qui est bon pour un segment du copolymère, et mauvais pour l'autre, les chaînes des copolymères se regrouperont réversiblement pour former des agrégats micellaires.

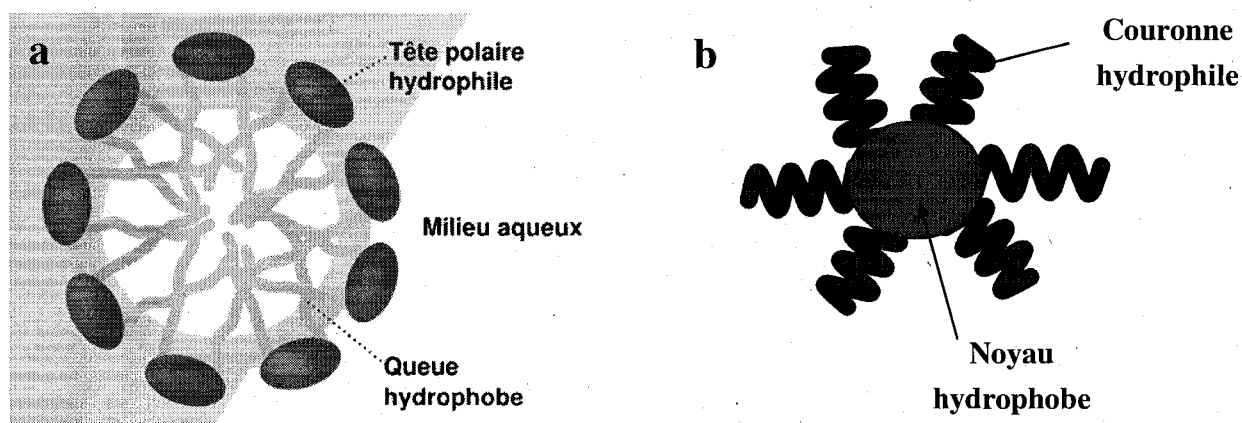


Figure 2 : Illustration a) d'une micelle de surfactant, et b) d'une micelle de copolymère à blocs.

La micellisation de CPB se produit dans une solution diluée, dans un solvant sélectif pour un bloc, à une température fixée et au-dessus de la concentration critique de micellisation (CCM). La CCM est la concentration minimale pour qu'il y ait début de la micellisation. Généralement, un CPB en dessous de la CCM sera dissous sous forme d'unimère (chaînes polymériques seules), et au-dessus il formera des micelles. Les unimères sont en équilibre avec les agrégats micellaires au-dessus de la CCM. Du côté thermodynamique, il est établi que la micellisation d'un CPB dans un solvant est favorisée par l'enthalpie. Ce phénomène se traduit par une variation de l'énergie libre de Gibbs de micellisation (ΔG^0) négative,

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (I-1)$$

où le facteur enthalpique (ΔH^0) dominant est négatif, et le facteur entropique (ΔS^0) est aussi négatif. La valeur négative de ΔS^0 vient du fait qu'il y a une perte de mouvement des chaînes de

copolymère formant le noyau compact et que le nombre de conformations que les chaînes peuvent prendre est diminué dû au regroupement des chaînes en pelote compacte et couronne pour former les micelles. La valeur ΔH^0 est négative, car les interactions défavorables polymère-solvant sont remplacées par des interactions polymère-polymère et solvant-solvant plus favorable. En effet, la partie hydrophobe n'a pas beaucoup d'interaction avec l'eau, par contre une fois dans le cœur des micelles, les interactions van der Waals entre les chaînes hydrophobes sont plus importantes.

I.2.1. Formation et taille des micelles

La micellisation des copolymères est généralement effectuée par le biais de deux méthodes (4). Le choix repose sur la solubilité du copolymère au départ. La première est une méthode directe. Il s'agit de dissoudre le copolymère dans l'eau à la température de la pièce ou à une température élevée favorisant la dissolution et à une concentration bien au-dessus de la CCM. Les copolymères utilisés avec cette méthode sont solubles dans l'eau au départ. La deuxième technique consiste à dissoudre le copolymère dans un solvant qui est bon pour les deux blocs, et qui est miscible à l'eau. Ensuite, on ajoute de l'eau pour induire la formation des micelles. Le solvant commun est enlevé graduellement par dialyse avec l'eau. Cette méthode est utilisée pour les copolymères très peu solubles dans les milieux aqueux au départ. La méthode de dialyse a été utilisée lors des deux études de ce mémoire.

La taille des micelles et l'évolution de la distribution des tailles sont généralement déterminées par diffusion dynamique de la lumière (DLS). La lumière généralement utilisée est un laser ayant une longueur d'onde de 633 nm, et la source est cohérente et monochromatique. Dans le cas où les particules sont plus petites que la longueur d'onde, la lumière interagit avec les particules, et les photons peuvent être diffusés dans toutes les directions (diffusion de Rayleigh). Il y a une variation de l'intensité de diffusion en fonction du temps. Cette fluctuation est due au fait que les petites particules ont un mouvement brownien en solution, donc la distance entre les particules

qui diffusent la lumière change constamment en fonction du temps. La lumière diffusée aura de l'interférence constructive ou destructive avec celle des particules à proximité. Cette fluctuation d'intensité donne de l'information sur l'échelle de temps des mouvements. L'information sur les particules vient de la fonction d'auto corrélation d'intensité tirée du graphique de la variation d'intensité de lumière diffusée dans le temps obtenu lors de l'expérience. La courbe de deuxième ordre d'auto-corrélation est générée à partir du graphique d'intensité par l'équation suivante :

$$g^2(q; \tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (I-2)$$

$g^2(q; \tau)$ est la fonction d'auto-corrélation pour un vecteur d'onde q , et un temps de délais τ . I est l'intensité. À un court délai, la corrélation est élevée, car les particules n'ont pas le temps de se déplacer. Les signaux ne sont presque pas changés l'un par rapport à l'autre. Au fur et à mesure que le délai augmente, l'auto-corrélation décroît exponentiellement jusqu'à atteindre zéro. Ceci signifie qu'à un long délai, il n'y a plus de corrélation entre les intensités diffusées de l'état de départ et l'état final (comportement arrhénien). La diminution exponentielle est due au mouvement des particules, lié au coefficient de diffusion. Ensuite, la courbe d'auto-corrélation est analysée par différentes méthodes numériques basées sur le calcul des distributions possibles. Dans le cas où il y a seulement une population micellaire, la courbe d'auto-corrélation peut être superposée à une simple diminution exponentielle. Par contre, dans d'autres cas, il est possible qu'il y ait plus d'une population de micelles. La méthode d'analyse de l'auto-corrélation sera une transformée inverse de Laplace nommée CONTINE. Cette méthode est la mieux adaptée pour des systèmes micellaires polydisperses ou multimodaux et a été utilisée pour les deux projets.

I.3 Transporteur micellaire

Les micelles de CPB utilisés comme transporteurs de médicament ont été proposées pour la première fois par Bader et al. en 1984 (5). Il y a plusieurs avantages à utiliser des transporteurs

micellaires pour des principes actifs dans le corps humain. En effet, ceux-ci peuvent prévenir la dégradation prématurée de médicament, éliminer les effets secondaires sur les cellules saines et les organes, varier la pharmacocinétique et la biodisponibilité et aider à la solubilisation des molécules hydrophobes. Plusieurs transporteurs micellaires de médicaments sont déjà utilisés ou en cours d'évaluation (6). Il y a trois étapes pour avoir un bon système de transport. Premièrement, les micelles doivent être capables d'encapsuler des principes actifs et d'être stables. Une fois administrées dans le corps humain, les micelles doivent être stables et prévenir le relâchement des molécules encapsulées aux endroits non voulus. Le corps humain est majoritairement constitué d'eau, donc la solubilité des médicaments dans l'eau est très importante. Certains d'entre eux ayant une bonne activité contre certaines maladies ne sont pas utiles, en raison de leur faible solubilité. L'utilisation de micelles de copolymère peut aider à cette solubilisation. Deuxièmement, les micelles doivent avoir une affinité pour les cellules ou organes à traiter. Les cellules cancéreuses ont souvent un récepteur à leur surface que l'on retrouve en plus grande quantité. En plaçant un ligand complémentaire au récepteur à la surface des micelles, elles ont une affinité plus grande pour les cellules cancéreuses. La dernière étape est le relâchement du médicament au site voulu. Ce point n'est pas facile à réaliser à cause de la première étape. En effet, l'encapsulation doit stabiliser le médicament pour avoir une longue circulation dans le corps, mais les micelles doivent être capables de relâcher l'élément actif au site pathologique, ce qui est contradictoire.

Il y a des recherches pour améliorer toutes les phases de l'utilisation des micelles pour le transport de médicament. Par contre, une des étapes où beaucoup des recherches sont concentrées est le relâchement à des sites spécifiques. En effet, les chercheurs essaient de trouver un moyen très efficace de pouvoir relâcher les principes actifs à l'endroit voulu et au temps voulu. De nos jours, les micelles répondant à différents stimulus (pH, température, hydrolyse, lumière) sont les plus étudiées. Les sites pathologiques ont généralement une augmentation de la température (2-5°C) et/ou une diminution du pH de 1-2,5 unités (7,8). L'efficacité du relâchement des molécules hydrophobes encapsulées dans le cœur des transporteurs micellaires peut être amélioré en utilisant des CPB qui seront sensibles à ces variations (stimulus).

I.3.1. Micelles sensibles aux stimulus

Les micelles sensibles aux stimulus sont capables de changer leurs structures ou morphologies rapidement. La majorité des recherches sur les micelles sensibles aux stimulus sont concentrées dans deux domaines. Le premier est celui des micelles sensibles aux variations de température. Le copolymère à la base des micelles est constitué d'un bloc soluble dans l'eau, qui constitue la couronne de la micelle, et un bloc plus hydrophobe qui forme le noyau de la micelle. Dans la majorité des cas, la partie hydrophobe est un polymère ayant une température critique inférieure (LCST) qui est la température la plus basse sous laquelle le polymère est soluble dans l'eau (une seule phase). En élevant la température au-dessus de la LCST, le polymère devient insoluble et la séparation de phase a lieu. Un des principaux polymères utilisés à cette fin est le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm). Il a une LCST de 32 °C dans une solution aqueuse (9). En dessous de cette température, le polymère est soluble dans l'eau parce que les ponts hydrogènes avec les molécules d'eau sont dominants. Le facteur enthalpique est déterminant. Cependant, au-dessus de la LCST les ponts hydrogènes sont affaiblis et les interactions entre les segments de chaîne du PNIPAAm deviennent dominantes, ce qui conduit à la séparation de phases. En utilisant ce polymère comme partie hydrophobe, il est possible de faire une micelle sensible à la température et qui libérera un composé encapsulé. En diminuant la température sous 32°C, le noyau de la micelle deviendra soluble, la micelle sera détruite et laissera échapper le composé préalablement encapsulé. Par exemple, une étude montre qu'en utilisant le poly(oxyde d'éthylène) (PEO) comme bloc hydrophile et le PNIPAAm comme bloc hydrophobe, il serait possible de faire le relâchement d'un composé hydrophobe encapsulé dans le noyau des micelles (10).

Le PNIPAAm peut aussi être utilisé comme la partie hydrophile d'un CPB. En effet, en copolymérisant le PNIPAAm avec le poly (méthacrylate de butyle) (PBMA), le PNIPAAm formera la couronne polaire des micelles, s'il est sous la LCST (donc soluble dans l'eau) (11). Il est possible de relâcher un médicament encapsulé dans le noyau (PBMA) en augmentant la température au-dessus de la LCST du NIPAAm. En effet, il y aura précipitation de la couronne

(PNIPAAm), et les blocs du PBMA qui forment un noyau ($T_g < 20\text{ °C}$) sont perturbés et déformés, relâchant ainsi le médicament encapsulé.

Il est aussi possible d'ajuster la LCST du PNIPAAm à la hausse ou à la baisse en incorporant des motifs comonomères hydrophiles ou hydrophobes (12). Une utilisation de ce phénomène a été développée par Neradovic et al (13), qui ont fait un copolymère avec un bloc PEO et un bloc composé de NIPAAm et N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide lactate (NHPMAAm-lactate). En copolymérisant le NIPAAm avec le NHPMAAm-lactate qui est hydrophobe, la LCST diminue. Au départ, près de 37 °C , le copolymère est sous forme micellaire. Avec le temps, il y a une hydrolyse des groupements lactates, déprotégeant des groupements alcools polaires. Il y a une augmentation de la polarité du bloc et par le fait même une augmentation de la LSCT. Lorsque la LSCT devient plus élevée que 37 °C , le noyau devient soluble et il y a une déstabilisation des micelles.

Un autre stimulus très étudié est le pH, car comme il a été préalablement mentionné, il y a un changement de pH au niveau des sites pathologiques. Deux méthodes sont principalement utilisées pour induire la dissociation des micelles avec le changement de pH. La première est l'utilisation d'un bloc neutre à un certain pH, mais en augmentant ou diminuant le pH il y aura ionisation du bloc, et les charges se repousseront dissociant ainsi les micelles. La deuxième méthode est l'utilisation d'un lien sensible au pH. Certains liens chimiques comme les esters, les amides, les cétales et les acétales sont sensibles au changement de pH. Le principe est d'incorporer un groupement protecteur ayant un de ces liens chimiques. Le groupement protecteur protégera une fonction polaire. Une fois protégée, cette partie sera la partie hydrophobe du copolymère, donc formera le cœur de la micelle. En changeant le pH, il y aura bris du lien sensible, la balance hydrophile/hydrophobe augmentera provoquant ainsi l'ouverture des micelles et le relâchement des molécules encapsulées. Cette réaction avec le pH de la solution se rapproche d'une hydrolyse favorisée par pH acide ou basique. En effet, dans la majorité des cas, l'eau jouera un rôle dans le bris du lien. De plus, il est possible de combiner un effet de température. La réaction d'hydrolyse est accélérée par la chaleur, augmentant ainsi la vitesse de dissolution des micelles. Sant et al.

(14) ont exploré quelques copolymères sensibles aux pH pour la libération de médicaments hydrophobes (indométhacin, fénofibrate, progestérone). Ils ont synthétisé leurs copolymères en utilisant le poly(méthacrylate de t-butyle) (PtBMA) ou le poly(acrylate d'éthyle) (PEA) ou le poly(acrylate de n-butyle) (PnBA) comme bloc hydrophobe et le PEO comme bloc hydrophile. En variant la longueur des différents blocs, ils ont pu optimiser la quantité de molécules encapsulées et montrer que le relâchement est accéléré avec un pH plus basique. En effet, l'hydrolyse forme des groupements acides carboxyliques. En milieu basique, il y a ionisation, et répulsion des charges, donc l'ouverture des micelles et le relâchement des médicaments.

Tel que mentionné précédemment, les micelles peuvent aussi être sensibles au pH via un lien. Soga et al. (15) ont synthétisé le copolymère poly(N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamidolactate)-*bloc*-PEO (PHPMAmDL-*b*-PEO). Les micelles formées à partir de ce copolymère sont stables à pH 5,0 et température de 37°C. Cependant, lorsqu'elles sont incubées dans une solution aqueuse à pH 9,0 et température 37°C, l'hydrolyse du groupement lactate a lieu, déplaçant la balance hydrophile/hydrophobe, ce qui fait gonfler les micelles jusqu'à leur dissolution complète après 9h. La réaction est accélérée en milieu plus basique. Ils ont encapsulé du pyrène dans le coeur des micelles et ont démontré que l'environnement du pyrène devient de plus en plus hydraté avec le clivage des groupements lactate.

De leur côté, Hruby et al. (16) ont attaché le médicament contre le cancer doxorubicin (DOX) via un lien hydrazone sensible au pH acide à un copolymère. Ce copolymère peut s'auto-assembler en micelles en milieu aqueux. L'étude démontre que la libération du DOX est beaucoup plus rapide à pH 5,0 qu'à pH 7,4. L'utilisation des liens sensibles au pH acide est utile, car les cellules cancéreuses et certaines parties des cellules (endosome) ont un pH plus acide favorisant le bris du lien.

Un autre stimulus des plus intéressants est la lumière. Elle présente des caractéristiques particulières pour la libération contrôlée. En plus de pouvoir être combiné aux autres stimulus

(pH, température, etc.), la lumière a l'avantage d'avoir un meilleur contrôle sur le relâchement. En effet, la lumière peut être manipulée à l'extérieur du corps humain, donc il est possible d'avoir un contrôle temporel et spatial du relâchement des molécules encapsulées. Le contrôle temporel peut être effectué en irradiant les micelles au moment voulu, et dans le cas du contrôle spatial, il est possible d'irradier seulement la partie où le relâchement doit avoir lieu. Cette fois-ci, le bloc hydrophobe porte des groupements qui sont sensibles à la lumière. La figure 3 présente ce qui se passe avec un copolymère sensible à la lumière en solution aqueuse sous irradiation lumineuse. Le bloc photosensible et hydrophobe forme le noyau de la micelle. La couronne sera formée par un bloc hydrophile. En irradiant les micelles, le chromophore absorbe la lumière, et subit une photoréaction à l'intérieur du noyau. Il y a deux types de photoréaction, soit un changement conformationnel du chromophore modifiant le moment dipolaire de la molécule ou le clivage du lien entre le chromophore et le polymère. La balance hydrophobe/hydrophile est déplacée vers la déstabilisation et l'ouverture des micelles.

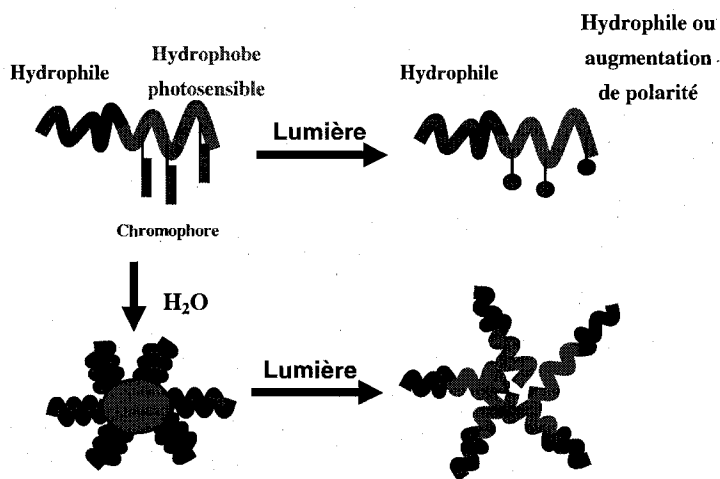


Figure 3 : Fabrication d'une micelle photo-active. La déstabilisation du copolymère et de la micelle par la lumière déplace la balance hydrophile/hydrophobe, ce qui induit la dissociation des micelles

Le laboratoire du professeur Zhao étudie beaucoup les micelles photoactives. En 2004, ils ont publié la première micelle polymère photocontrôlable (17). La partie hydrophile du copolymère utilisé est un copolymère aléatoire de poly(acrylate de *t*-butyle-co-acide acrylique) (P(*t*BA-co-

AA)), et la partie hydrophobe P(AzoMA) est un polyméthacrylate portant un groupement azobenzène (figure 4). Lorsque les micelles sont irradiées avec la lumière UV, les groupes azobenzène passent de la forme trans vers la forme cis. Cette isomérisation est réversible, car si les isomères cis sont irradiés avec la lumière visible, ils retrouvent leurs formes trans. Au départ, le cœur des micelles est constitué des groupements plus hydrophobes d'azobenzène sous la forme trans. Lorsque la solution micellaire est irradiée avec la lumière UV, les molécules s'isomérisent à la forme cis. Cette isomérisation change grandement la polarité des groupements azobenzène. Des calculs ont montré que les molécules azobenzène trans ont un moment dipolaire presque nul, alors que sous la forme cis le moment dipolaire est de 4,4D (18). Sous irradiation UV, ce changement de polarité mène à la dissociation des micelles, car la balance hydrophile/hydrophobe est changée.

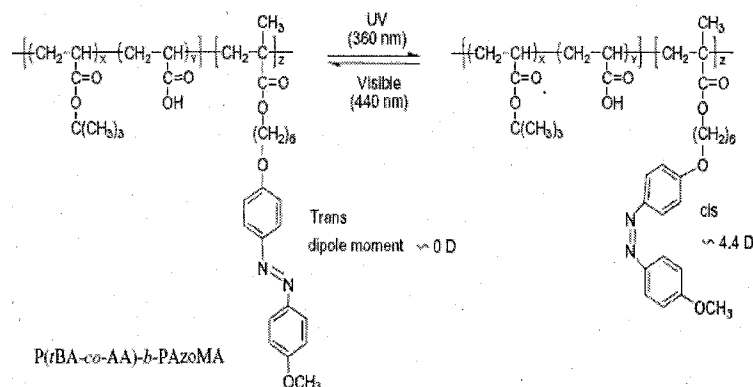


Figure 4 : Structure chimique d'un copolymère à blocs, où le bloc hydrophobe est constitué d'azobenzène. La polarité du groupement hydrophobe peut être changée par une irradiation UV ou visible.

Comme la réaction d'isomérisation est réversible (cis vers trans), il est possible de reformer les micelles en irradiant la solution avec la lumière visible (figure 5). En effet, les molécules azobenzènes retrouvent leur état initial, donc leur hydrophobicité, et les micelles peuvent être reformées.

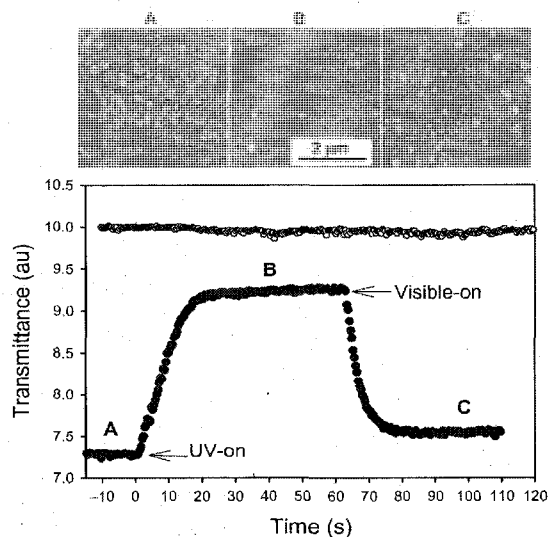


Figure 5 : Changement en transmittance pour une solution de vésicules du copolymère azobenzène. Les photos MEB montrent les vésicules avant irradiation UV (a), sous irradiation UV (b), et sous irradiation visible(c) (17).

La versatilité du concept a été prouvée. En effet, un groupe de recherche a utilisé différentes molécules (spiropyrans et diaryléthylènes) pour fabriquer des micelles photo-actives (19). Le principe est d'utiliser une molécule qui a deux formes stables de polarité différente et le changement de forme peut être induit par la lumière.

Des micelles sensibles à la lumière, dont la dissolution n'est pas réversible, ont aussi été développées. Le principe dans ce type de micelle photosensible est d'attacher un chromophore photoclivable hydrophobe au copolymère. Lorsque le copolymère est irradié, il y a clivage du lien entre le chromophore et le copolymère, libérant une fonction polaire et une molécule hydrophobe. Deux copolymères ont été étudiés par le groupe du professeur Zhao (20,21). Le premier copolymère est formé d'un bloc hydrophile PEO et d'un bloc hydrophobe photosensible, soit le poly(méthacrylate de 1-pyrenylmethyl) (PEO-*b*-PPyMA) (figure 6).

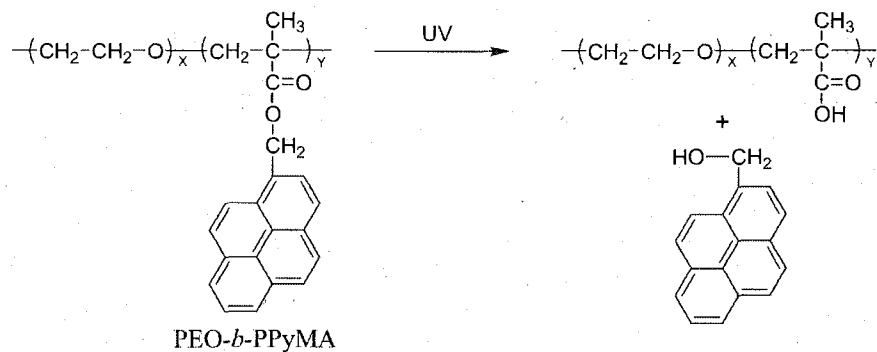


Figure 6 : Structure chimique du PEO-*b*-PPyMA. La réaction de photolyse clive la fonction pyrène, convertissant le bloc hydrophobe en un bloc hydrophile, le poly(acide méthacrylique) (PMA), ce qui mène à la dissociation des micelles (20).

Lorsqu'une solution micellaire du PEO-*b*-PPyMA est irradiée avec de la lumière UV, il y a une photoréaction avec le pyrène menant à son clivage et formant le 1-pyrenemethanol. Le clivage du lien ester mène à la formation d'un groupement acide polaire. Le changement de polarité conduit à la dissociation des micelles et à la libération des molécules préalablement encapsulées.

Le deuxième polymère étudié a aussi le PEO comme bloc hydrophile, mais le bloc hydrophobe est le poly(méthacrylate de 2-nitrobenzylmethyl) (PEO-*b*-PNBMA) (Figure 7) (21). Ce copolymère n'est pas seulement un autre exemple dérivé du premier copolymère. En effet, le clivage du nitrobenzyl peut se faire à l'état solide ou en solution, et peut être provoqué par l'absorption d'un photon UV ou de deux photons proche infrarouge. Le clivage est provoqué par un réarrangement de la molécule nitrobenzyl.

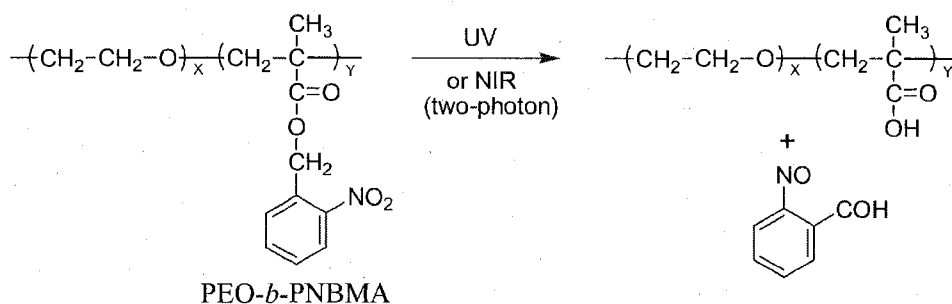


Figure 7 : Structure chimique du PEO-b-PNBMA. La réaction de photolyse par un ou deux photons clive la fonction nitrobenzyl, convertissant la partie hydrophobe en partie hydrophile menant à la dissociation des micelles (21).

En effet, les photons infrarouges proches peuvent pénétrer plus profondément dans le corps humain (500 μm jusqu'au cm), parce que l'absorption par l'eau et l'hémoglobine est à son minimum dans cette partie du spectre lumineux (figure 8) (22) Le développement est encore à ses balbutiements, c'est-à-dire que la possibilité d'ouvrir des micelles par l'absorption de deux photons infrarouges est possible, mais cette méthode est loin d'être utilisée dans le corps humain. Cependant, le potentiel et l'enjeu d'une percée pour ce type de transporteur sont grands.

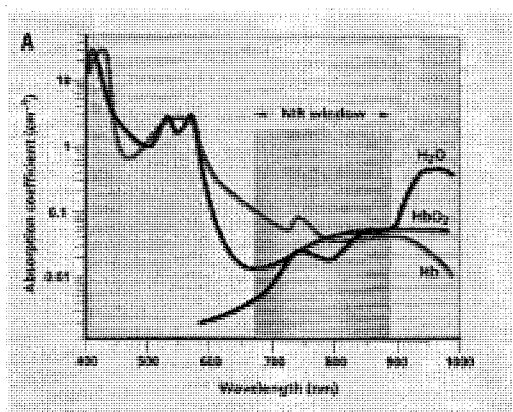


Figure 8 : Limite de la zone proche infrarouge, où il y a le minimum d'absorption de photons par l'hémoglobine et l'eau

I.4 Absorption à deux photons

L'absorption à deux photons implique les mêmes étapes que la photochimie à un photon comme on peut le voir sur le schéma 1. Cependant, au lieu d'absorber un photon d'énergie $h\nu$ pour une transition du niveau fondamental S_0 au premier niveau excité S_1 , la molécule absorbera simultanément deux photons d'énergie $1/2h\nu$. L'énergie des deux photons n'est pas obligatoirement divisée exactement par deux. Par contre, le total de l'énergie doit être égal à l'énergie nécessaire pour faire la transition. Cependant, il est plus facile d'utiliser le demi de l'énergie, car un seul laser de longueur d'onde égal à $1/2h\nu$ est utilisé.

L'absorption à deux photons est plus difficile à réaliser que l'absorption d'un photon. En effet, la probabilité d'absorber simultanément deux photons est proportionnelle au carré de l'intensité du champ d'excitation (23). Le laser femtoseconde (fs) est la principale source lumineuse utilisée. En effet, ce type de laser produit des pics d'énergie d'environ 30 MW avec une énergie moyenne d'environ 300 mW. La quantité de photons en un temps donné et à un endroit donné est grande. Les molécules utilisées doivent avoir une capacité d'absorption plus élevée, car la probabilité d'absorption est plus faible pour deux photons.

Les dérivés de nitrobenzyl ont la capacité d'absorber deux photons dans l'infrarouge proche. Par contre, il existe une autre catégorie de molécule plus efficace. Ce sont les dérivés de coumarine. Ces deux types de composés sont utilisés comme groupement protecteur photolabile en synthèse organique, biotechnologie et biologie. La lumière est une condition douce pour déprotéger des fonctions chimiques ou biologiques. En biologie, ces composés sont utilisés pour relâcher précisément des molécules bioactives dans les cellules et évaluer la cinétique des réactions liée à cette molécule (24). La molécule protégée par le groupement n'est pas active au départ, mais lorsque la lumière est appliquée, il y a une augmentation instantanée des molécules actives due à la déprotection, et la réponse biologique peut être évaluée presque sans délai

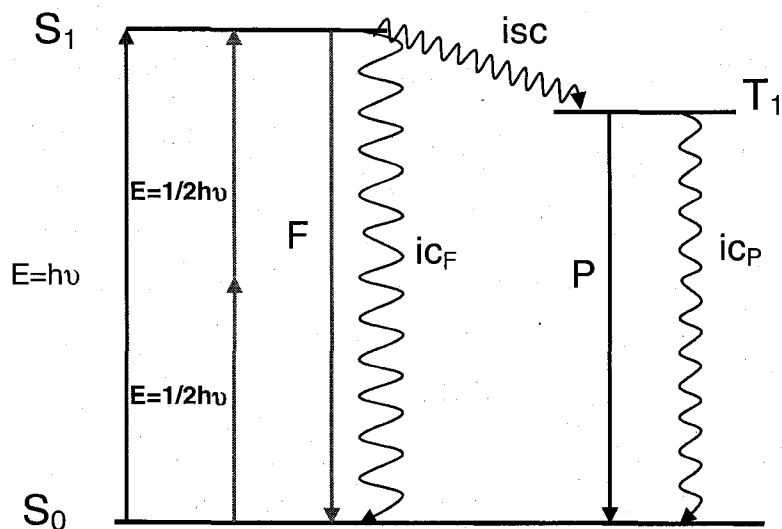


Schéma 1 : Diagramme de Jablonski simplifié de l'absorption d'un ou de deux photons. S_0 : état fondamentale, S_1 : premier état excité, F : fluorescence, isc : croisement inter-système, ic_F : conversion interne (fluorescence), T_1 : premier état triplet, P : phosphorescence, ic_P : croisement inter-système (phosphorescence)

La photosensibilité de ces composés est comparée en terme de la section transversale d'action de déprotection δ_u (uncaging action cross section). δ_u est le produit de la section transversale d'absorption (δ) et le rendement quantique de déprotection (q) (25). L'unité de δ_u est le Goeppert-Mayer (GM), où 1 GM est défini comme $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s}$ par photon. Idéalement, les molécules utilisées doivent avoir une $\delta_u \geq 0.1 \text{ GM}$ pour être assez sensibles. Un des dérivés de nitrobenzyl beaucoup utilisé, le dimethoxy-6-nitrobenzyl, à un δ_u de 0.01 GM à 720 nm, ce qui est un ordre de grandeur plus petite que la valeur limite (26). Par contre, les dérivés de coumarine ont des δ_u entre 1 et 2 GM, ce qui est bon pour leur utilisation comme groupement protecteur sensible à l'absorption à deux photons (27).

Le mécanisme de déprotection des dérivés de coumarine est connu (28). Le schéma 2 présente la réaction (a) et le mécanisme (b) de photoclivage des dérivés de coumarine.

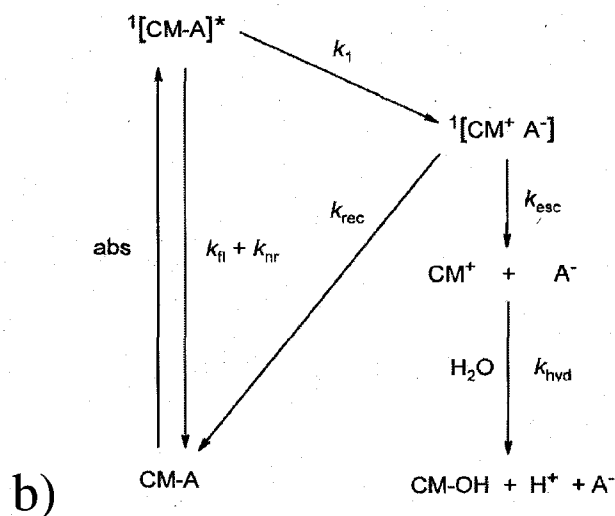
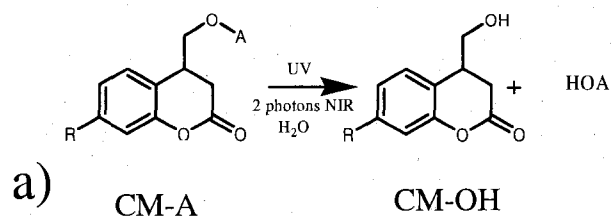


Schéma 2 : a) Réaction de déprotection des dérivés de coumarine. b) Diagramme de Jablonski de la photoréaction. Abs : absorption, k_{fl} : constante de vitesse de fluorescence, k_{nr} : constante de vitesse du processus non-radiatif, k_1 : constante de vitesse photohétérolyse, k_{rec} : constante de vitesse recombinaison, k_{esc} : constante de vitesse fuite de la cage du solvant, k_{hyd} : constante de vitesse hydratation

Pour déterminer si le mécanisme de réaction passe par une photo $\text{S}_{\text{N}}1$ (photohétérolyse assisté par le solvant) ou par une photosolvolyse, une molécule dérivée de la coumarine a été solubilisée dans un mélange d'eau deutéré et d'acétonitrile et irradié. L'analyse de spectrométrie de masse par ionisation par électrospray (ESI) a démontré que ^{18}O se retrouvait seulement sur 1, la molécule A clivée n'était pas marquée. Ce résultat démontre que le mécanisme est une photo $\text{S}_{\text{N}}1$. Le schéma 2b présente le diagramme de Jablonski pour la photoréaction. La molécule de coumarine est excitée et passe du niveau fondamental (S_0), au premier niveau excité (S_1). Ensuite, trois chemins sont possibles. Les deux premiers correspondent à la descente au niveau

fondamental par fluorescence (k_{fl}) ou processus non radiatif (k_{nr}) et le dernier est le clivage hétérolytique du lien CH_2-OA (k_1) formant la paire d'ions singulet $^1[CM^+ A^-]$. La recombinaison mène à l'état fondamental (k_{rec}), et la formation des produits finaux se fait en deux étapes. La première est la fuite des molécules de la cage de solvant (k_{esc}), et la deuxième est une réaction d'hydratation (k_{hyd}). CM^+ réagit avec l'eau et il y a une déprotonation rapide par A^- pour former respectivement $CM-OH$ et HOA . La réaction déterminante pour ce type de réaction est la photohétérolyse (k_1). La réaction sera favorisée par plusieurs facteurs : (a) les vitesses de réactions en compétition avec k_1 (k_{fl} et k_{nr}) sont moins rapides, (b) la stabilité du dérivé de CM^+ et A^- est grande, (c) la fuite des molécules (k_{esc}) de la cage du solvant est favorisée. Schmidt et al. ont déterminé les conditions pour avoir le photoclivage optimal (29). Les deux ions formés après le clivage doivent être stabilisés. Le cation est stabilisé en ajoutant des substituants électrodonneurs sur les dérivés de coumarine, l'anion doit être choisi en fonction d'une faible basicité et d'un faible pKa. Les facteurs qui accélèrent le clivage hétérolytique retardent aussi la recombinaison des ions, ce qui donne une double amélioration.

Un dérivé de la coumarine a déjà été utilisé pour la libération du médicament paclitaxel (30). Au départ, la molécule est inactive, mais après irradiation il y a clivage du groupement coumarine et un réarrangement libérant le principe actif. D'après nos recherches bibliographiques, l'utilisation des dérivés de coumarine sous forme de transporteur micellaire n'a jamais été réalisée.

CHAPITRE 1

MICELLES SENSIBLES À LA CHALEUR ET AU PH

1.1. Avant-propos

Dans l'introduction, nous avons montré que la majorité des micelles sensibles à la chaleur sont basées sur la présence d'une LCST. L'objectif de l'étude présentée dans l'article qui suit est d'utiliser une approche différente. Le groupement tétrahydropyranyle (THP) est un groupement protecteur sensible à la chaleur. En chauffant un homopolymère de poly(méthacrylate de tétrahydropyranyl) (PThPMA) à l'état solide à plus de 150 °C, il est possible de déprotéger les fonctions acides du polymère (thermolyse) (31). Dans le même article, il a été démontré qu'en solution, la réaction de déprotection pouvait se faire dans des conditions plus douces, et que cette réaction était catalysée par un milieu aqueux acide.

Ma contribution à cet article a été d'effectuer la synthèse et la caractérisation d'un nouveau copolymère sensible à la chaleur et d'obtenir les résultats présentés dans cet article. Les discussions avec Jérôme Babin sur les méthodes de caractérisation ont été très utiles tout au long de l'étude et Luc Tremblay nous a aidés pour le suivi des micelles à l'aide du RMN ^1H 600 MHz. La partie hydrophile du copolymère est le PEO et la partie hydrophobe est le PThPMA. La partie hydrophobe est constituée de fonctions acides protégées par des groupements THP moins polaire. La caractérisation du copolymère à l'état solide a été effectuée à l'aide de la chromatographie par perméation de gel (GPC), la résonance magnétique nucléaire de proton (RMN ^1H) ainsi que la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Ensuite, les micelles du copolymère ont été produites par la méthode de dialyse décrite dans l'introduction. La caractérisation des micelles et l'étude dynamique de leur comportement ont été effectuées à l'aide de plusieurs méthodes. J'ai

utilisé la diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour suivre l'évolution de la taille des micelles à différentes températures (80°C et 37°C). À 80°C, l'étude a montré qu'il y a un gonflement suivi d'une dissolution des micelles. À 37 °C, la réaction se produit, mais elle est beaucoup plus lente. J'ai aussi utilisé les spectroscopies d'absorbance et de fluorescence pour suivre la déstabilisation des micelles et le relâchement des molécules de Nile Red (NR) encapsulées. Le NR n'est pas soluble dans l'eau, mais il peut être solubilisé par le cœur des micelles. Au départ, il est possible de mesurer l'intensité de fluorescence, mais au fur et à mesure que les micelles s'ouvrent, il y a une diminution en intensité, car le NR est relâché dans l'eau. Deux appareils de RMN ¹H ont été utilisés : le 300 MHz pour observer l'évolution de la micellisation en additionnant l'eau, après la dialyse et après chauffage de la solution micellaire, le 600 MHz a été utilisé pour suivre la cinétique de la réaction d'hydrolyse des groupements THP du cœur des micelles à 80 °C.

De plus, j'ai suivi trois événements simultanément. C'est la première fois que ce genre d'expérience était réalisée. Des études dans la littérature faisaient le suivi d'un, ou de deux événements seulement. Dans notre article, j'ai suivi la dissolution des micelles par diffusion dynamique de la lumière, l'hydrolyse des groupements THP dans les micelles par RMN ¹H 600 MHz, et le relâchement des molécules de NR encapsulées par les micelles. Les données cinétiques ont montré que ces trois événements reliés procédaient à une vitesse similaire. De plus, les résultats avec les copolymères ayant des blocs PTHPMA et PEO différents montrent qu'il est possible d'accélérer ou de ralentir le relâchement des molécules hydrophobes en changeant les longueurs relatives des blocs. Les résultats de relâchements obtenus à différents pH démontrent que l'on peut aussi faire varier le pH pour accélérer ou ralentir l'ouverture des micelles.

Cette étude démontre une alternative à l'utilisation des copolymères à blocs ayant une LCST. La sensibilité à la chaleur et au pH acide de notre copolymère et des micelles est basée sur le groupement thermolabile THP.

1.2 Investigation of A New Thermosensitive Block Copolymer Micelle: Hydrolysis, Disruption and Release

Maxime Pelletier,¹ Jérôme Babin,¹ Luc Tremblay² and Yue Zhao^{1,*}

¹Département de chimie, ² Département de médecine nucléaire et de radiobiologie and Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

J1K 2R1

(Corresponding author: yue.zhao@usherbrooke.ca)

Abstract

Thermosensitive polymer micelles are generally obtained with block copolymers in which one block exhibits a lower critical solution temperature (LCST) in aqueous solution. We investigate a different design that is based on the use of one block bearing a thermally labile side group, whose hydrolysis upon heating shifts the hydrophilic-hydrophobic balance towards the destabilization of block copolymer micelles. Atom transfer radical polymerization (ATRP) was utilized to synthesize a series of diblock copolymers composed of hydrophilic poly(ethylene oxide) (PEO) and hydrophobic poly(2-tetrahydropyranyl methacrylate) (PThPMA). We show that micelles of PEO-*b*-PThPMA in aqueous solution can be destabilized as a result of the thermosensitive hydrolytic cleavage of tetrahydropyranyl (THP) groups that transforms PThPMA into hydrophilic poly(methacrylic acid) (PMAA). The three related processes occurring in aqueous solution, namely, hydrolytic cleavage of THP, destabilization of micelles and release of loaded Nile Red (NR), were investigated simultaneously using ¹H NMR, dynamic light scattering (DLS) and

fluorescence spectroscopy, respectively. At 80 °C, the results suggest that the three events proceed with a similar kinetics. Though slower than at elevated temperatures, the disruption of PEO-*b*-PThPMA micelles can take place at the body temperature (~ 37 °C), and the release kinetics of NR can be adjusted by changing the relative lengths of the two blocks or the pH of the solution.

Introduction

Thermosensitive block copolymer (BCP) core-shell micelles are of interest for controlled delivery applications. Such micelles can be destabilized either in response to a change in temperature or at the body temperature ($\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) with an appropriate kinetics, which enables the drug pre-encapsulated by the hydrophobic micelle core to be released in a controlled manner. Generally, thermosensitive polymer micelles are obtained with BCPs that have one block exhibiting a lower critical solution temperature (LCST), below which the block is soluble in water while above which it is insoluble. The most used polymer is poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) having a LCST $\sim 32\text{ }^{\circ}\text{C}$.¹⁻⁵ To mention only a few examples, with poly(ethylene oxide) (PEO) as the hydrophilic block, PNIPAAm was used as the hydrophobic block at $T > \text{LCST}$, whose micelles can be dissolved at $T < \text{LCST}$ and expected to give a quick release of loaded drugs.¹ Whereas with poly(butyl methacrylate) (PBMA) as the hydrophobic block, PNIPAAm was also utilized as the hydrophilic block at $T < \text{LCST}$.² In this case, the micellar destabilization occurs at $T > \text{LCST}$ with the outer shell of PNIPAAm becoming insoluble in water and precipitating; the perturbation was shown to give rise to release of a loaded drug due to the low- T_g micelle core of PBMA ($\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C} < \text{LCST}$ of PNIPAAm). Moreover, it is known that the LCST of PNIPAAm can be adjusted to a higher or lower temperature by incorporation of hydrophilic or hydrophobic comonomer units respectively.⁴ An interesting development of thermosensitive BCP micelles is the use of a diblock copolymer composed of PEO and a random copolymer of NIPAAm and N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide lactate) (NHPMAAm-lactate).⁵ At the physiological conditions (pH 7.4, 37°C), the hydrolysis of the lactate side groups increases the amount of hydrophilic comonomer units and thus the LCST of the polyacrylamide block; when the LCST raises to above

37 °C, the micelles are destabilized. PNHPMAAm-lactate can also be used without PNIPAAm to design thermosensitive BCP micelles based on the same principle of changing LCST upon hydrolysis of the lactate groups.⁶ A recent study also explored the combined use of thermo- and photosensitivity of micelles formed by a block copolymer of PEO and poly(ethoxytri(ethylene glycol) acrylate-*co*-*o*-nitrobenzyl acrylate) (PEO-*b*-P(TEGEA-*co*-NBA)).⁷ Upon UV irradiation, the photoinduced cleavage of *o*-nitrobenzyl groups increases the amount of acrylic acid group in the thermosensitive P(TEGEA-*co*-NBA) block and thus its LCST. In another example of study, methacrylamide-based copolymers with pendent *ortho* ester groups were found to form micelles that are both thermo- and pH-sensitive.⁸

The purpose of the present study was to investigate a different design for thermosensitive BCP micelles, which is inspired by our studies of photocontrollable polymer micelles.⁹ We have synthesized an amphiphilic diblock copolymer composed of hydrophilic PEO and hydrophobic poly(2-tetrahydropyranyl methacrylate) (PThPMA). The use of PThPMA allows PEO-*b*-PThPMA micelles to be thermosensitive since the THP side groups are known as being thermal-labile. Indeed, THP moiety has been widely used as a protecting group in organic¹⁰ and polymer synthesis¹¹ and can be removed through thermolytic cleavage in the solid state.¹² Therefore, as depicted in Figure 1, it was expected that the hydrolytic cleavage of THP groups from PEO-*b*-PThPMA micelles in aqueous solution would be sensitive to temperature. And for the micelles, the cleavage of THP means destabilization (swelling and dissolution as will be discussed later), because the reaction converts the hydrophobic PThPMA onto water-soluble poly(methacrylic acid) (PMAA) and, consequently, shifts the hydrophilic-hydrophobic balance toward the

destabilization of the micelles.⁹ Compared to the aforementioned PEO-*b*-PNHPMAAm-lactate,^{5,6} the present BCP design is not just about a different polymer, it is of interest for at least two reasons. First, the use of PTHPMA extends the hydrolysis-based approach to poly(meth)acrylates that do not have a LCST like polyacrylamides. Secondly, although the present study mainly dealt with the thermal effect, the micelles of PEO-*b*-PTHPMA are also pH-sensitive. PTHPMA has been used as a photoresist that, in the presence of a photoacid generator, can undergo acid-mediated cleavage reaction.¹³ However, contrarily to the hydrolysis of lactate groups that is enhanced by basic pH,⁶ the hydrolysis of THP is sensitive to acidic pH, This may make PTHPMA-based micelles more suitable as drug delivery nanocarriers that respond to the relatively acidic tumor tissues (pH ~ 6.8) and the endosomal and lysosomal compartments of cells (pH ~ 5-6) with respect to the physiological pH 7.4.¹⁴ Besides, pH-mediated dissolution of PTHPMA homopolymer nanoparticles prepared by emulsion methods, were shown to be good for drug delivery applications due to, among other things, a low toxicity of PTHPMA.¹⁵ More importantly, the first simultaneous investigation of the kinetics of three related events (hydrolysis, micellar disruption and release) by using ¹H NMR, dynamic light scattering and fluorescence spectroscopy provides new physical insight into the complicated processes.

Experimental Section

1. Synthesis

Materials. Dichloromethane (DCM, 99%) was purified by distillation from calcium hydride. Tetrahydrofuran (THF, 99%) was purified by distillation from sodium with benzophenone. Tetrahydropyranyl methacrylate (THPMA, 99%) was provided by St-Jean-Photochemicals

(Quebec, Canada) and passed through a column of basic alumina silica before use. 2-Bromoisobutyryl bromide, Nile Red (NR), copper chloride (Cu(I)Cl, 98%), N, N, N', N', N''-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA, 99%) and poly(ethylene glycol) methyl ether with a number-average molecular weight of 2000 and 5000 g mol⁻¹ were purchased from Aldrich and used without further purification.

Synthesis of Diblock Copolymers of Ethylene Oxide and Tetrahydropyranyl Methacrylate (PEO-*b*-PTHPMA). As shown in Scheme 1, diblock copolymers were synthesized using ATRP. Bromine end-capped PEO macroinitiators with molecular weight of 2000 or 5000 g mol⁻¹, designated as PEO₄₅-Br or PEO₁₁₂-Br, were prepared following a literature method,¹⁶ details are not repeated here. What follows is an example of ATRP of the THPMA monomer using a macroinitiator PEO₁₁₂-Br. THPMA (4.5 g, 26.4 mmol), PMDETA (64.9 mg, 0.37 mmol) and Cu(I)Cl (16.1mg, 0.16 mmol) were added to a solution of PEO₁₁₂-Br (547 mg, 0.11 mmol) dissolved in DMF (3.4 g). The reactive mixture placed in a flask was degassed three times using the freeze-pump-thaw procedure. After 30 min stirring at room temperature, it was immersed in a preheated oil bath at 70 °C for 2 hours. Afterward, the mixture was passed through a neutral Al₂O₃ column with THF as eluent to remove the catalyst. The solution was concentrated upon solvent evaporation under reduced pressure and then precipitated twice in cold ether (ice bath). The white diblock copolymer powder (2.02 g, yield ~ 45%) was collected by filtration and dried in a vacuum oven. This reaction gave the sample of PEO₁₁₂-*b*-PTHPMA₁₆₄ (P1 in Scheme 1). ¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm): 5.95 (broad, 1H, -OCHO-, THPMA), 3.90 (m, 2H, -OCHOCH₂-, THPMA), 3.65 (s, 4H, -CH₂CH₂O-, PEO), 1.60 (broad, 6H, (OCHCH₂CH₂CH₂-, THPMA), 1.25

(s, 3H, CH₃CCOO-, THPMA). M_n (¹H NMR)= 32500 g mol⁻¹, M_n (GPC)= 32800 g mol⁻¹, $M_w/M_n=1.20$.

2. Preparation of Aqueous Micellar Solutions with or without Loaded Nile Red.

The samples of PEO-*b*-PThPMA synthesized for this study are insoluble in water. Therefore, the conventional “dialysis” method of preparing aqueous micellar solutions was utilized. A sample was first dissolved in THF that is a good solvent for both PEO and PThPMA, water was then added slowly to the THF solution to induce the formation of micelles with a hydrophobic PThPMA core and a hydrophilic PEO shell; finally, THF was completely removed through dialysis of the micellar solution against water, resulting in an aqueous solution of PEO-*b*-PThPMA micelles. The loading of the hydrophobic dye Nile Red (NR) was easily achieved using the same method, only in this case, both NR and a PEO-*b*-PThPMA sample were dissolved in THF prior to the addition of water; while upon micelle formation when water was mixed with THF, an amount of NR could be solubilized by the hydrophobic PThPMA core. The NR-loaded micelles in aqueous solution were prepared as follows. PEO₁₁₂-*b*-PThPMA₁₆₄ (3.0 mg) was dissolved in dry THF (4.6 mL); the solution was then mixed with a THF solution of NR (25 μL, 0.2 mg mL⁻¹). Under vigorous stirring, 1.2 mL of water was added slowly (about 25 μL over every 30 s) to the THF solution of polymer and NR, which was followed by quick addition of another 1 mL of water at the end. The solution was stirred for 1 h at room temperature before being placed in a dialysis bag (Spectrum, MW cutoff 3500) for dialysis against water for three days (water was frequently refreshed); unloaded NR, precipitated in water, was removed through microfiltration (0.45 μm cellulose acetate membrane). For all measurements at acidic pH, a 1 M

HCl solution was added in the aqueous micellar solution, the pH change being measured with a pH meter (Orion 410A plus).

3. Characterization

Unless otherwise stated, ^1H NMR spectra were obtained with a Bruker Spectrometer (300MHz, AC 300). To monitor the hydrolysis reaction at elevated temperatures as a function of time, a Varian spectrometer (600 MHz, INOVA system) was used to record spectra at a time interval of 5 min, by inserting an NMR tube filled with the micellar solution into the pre-heated and thermostat probe. Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed on a Brookhaven goniometer (BI-200) equipped with a high sensitive avalanche photodiode detector (Brookhaven, BI-APD), a digital correlator (Brookhaven, TurboCorr) that calculates the photon intensity autocorrelation function $g^2(t)$, a helium-neon laser (wavelength $\lambda = 632.8$ nm) and a thermostat sample holder. The hydrodynamic diameter (D_H) of micellar aggregates was obtained by a cumulant and CONTIN analysis, and the change in scattered light intensity was measured at 90° . UV-vis absorption and steady-state fluorescence emission spectra were recorded using a UV-vis (Varian Cary 50 Bio) and a fluorescence spectrophotometer (Varian Cary Eclipse) respectively. The excitation wavelength was 540 nm for Nile Red (excitation and emission slit widths set at 5 nm, and the scan rate at 10 nm s^{-1}); a single cell Peltier was used for controlled-temperature measurements. SEM observations were carried out using a Hitachi S-4700 Emission Gun Scanning Electron Microscope. Samples for SEM were prepared by depositing one drop of diluted micellar solution on a silicon wafer, followed by drying at room temperature. Gel permeation chromatography (GPC) measurements were conducted on a Waters systems equipped with a

refractive index detector (RI 410), a photodiode array detector (PDA 996) and one column (Styragel 5HE, 7.8 mm × 300 mm). THF being used as eluent (elution rate, 1 mL min⁻¹) and polystyrene standards used for calibration. Thermal properties of the polymers were investigated using a Perkin-Elmer DSC-7 differential scanning calorimeter with a heating or cooling rate of 10 °C min⁻¹.

Results and Discussion

1. Syntheses and Characterization

A series of PEO-*b*-PThPMA diblock copolymers with various relative block lengths were obtained, as indicated in Scheme 1. Using the known molecular weight of PEO, the number of PThPMA units was estimated based on the BCP composition as revealed by ¹H NMR spectra, comparing the resonance signals of the two blocks (the peaks at 5.95 and 3.65 ppm for PThPMA and PEO respectively). Before studying micelles in aqueous solution, BCP samples were characterized by means of a number of techniques. An example of the results is given in Figure 2.

Figure 2a presents the GPC curves of PEO₁₁₂-Br and three BCP samples obtained with the same macroinitiator. The controlled growth of the PThPMA block can be noticed from the single peak shifting to shorter retention times; whereas the polydispersity indexes (M_w/M_n) remain low from ~ 1.06 for the macroinitiator to about 1.20 for PEO-*b*-PThPMA. Figure 2b shows the DSC heating curves for the same series of samples, together with PEO₄₅-*b*-PThPMA₂₂. The thermolytic cleavage of THP groups for the copolymers in the solid state occurs at temperatures above 140 °C, indicated by the appearance of an endothermic peak. In addition to the observation

that the cleavage heat is proportional to the content of THPMA groups, being highest for PEO₁₁₂-*b*-PTHMPMA₁₆₄, it is interesting to notice the mutual influence of the two blocks on their properties. Indeed, compared to the PEO macroinitiator, the melting endotherm of crystalline PEO of the block copolymer appears at a lower temperature and becomes less and less prominent with increasing the content of PTHMPMA (indiscernible for PEO₁₁₂-*b*-PTHMPMA₁₆₄), while on the other hand, the crystalline PEO block apparently increases the thermolytic cleavage temperature of THP groups, which is mostly clear for PEO₁₁₂-*b*-PTHMPMA₂₄. Comparing PEO₄₅-*b*-PTHMPMA₂₂ with PEO₁₁₂-*b*-PTHMPMA₅₄, it is seen that at similar relative block lengths ratio (PEO:PTHMPMA ~ 2:1), shorter block lengths lower the melting temperature of crystalline PEO as well as the thermolytic cleavage temperature of the side groups of PTHMPMA.

2. Thermosensitive Micelles in Aqueous Solution

Unless otherwise stated, the experiments described in this paper used the sample of PEO₁₁₂-*b*-PTHMPMA₁₆₄. Figure 3 compares ¹H NMR spectra of the BCP sample in deuterated THF (THF-d₈), upon addition of heavy water (D₂O), after dialysis against heavy water, and after heating of the aqueous micellar solution at 80 °C. As indicated in the figure, in THF-d₈, the characteristic resonance signals of both PEO (3.55 ppm, partly overlapped by a signal of THF-d₈) and PTHMPMA (5.93 ppm) are visible (spectrum a). As D₂O is added into the solution inducing the formation of micelles, the peak of PEO remains, while the signals of PTHMPMA are almost completely disappeared, indicating that PTHMPMA chains are aggregated into the compact micelle core and no longer solvated (spectrum b). The situation is the same after THF is removed through dialysis against water, the proton signal of THF-d₈ (3.58 and 1.73 ppm) being gone (spectrum c).

Spectrum d was recorded after heating the aqueous micellar solution to 80 °C for 30 min, the disruption of the micelles is revealed by the spectral changes. Indeed, the characteristic peak of tetrahydropyran-2-ol (5.33 ppm) appears, which is formed after the hydrolytic removal of THP groups from the BCP (Fig.1). Other resonance signals of PTHPMA or from the resulting PMAA also appear, indicating either dissolved polymer chains or hydrated BCP micelle cores as a result of the hydrolysis of PTHPMA at 80 °C. This preliminary result confirms that in aqueous solution, the hydrolysis of PTHPMA can be thermally activated at temperatures much lower than what is required for the thermolytic cleavage in the solid state, and induce the destabilization of the micelles of PEO-*b*-PTHPMA.

The destabilization of the micelles in aqueous solution at 80 °C was further monitored using DLS. Figure 4a shows the distribution of hydrodynamic diameters of micellar solution before and after 60 min heating. It is seen that prior to the temperature increase, the micelles are uniform in size and their average hydrodynamic diameter is centered at 70 nm. After 60 min heating, we can notice that the micelles peak become larger, shifts to higher diameter (~ 85 nm) and decreases in intensity, while aggregates peaks above 200 nm can be observed. The accompanying change in the scattered intensity by the micellar solution is shown in Figure 4b. Despite some fluctuations of the data, the scattering intensity decreases continuously after an increase at the beginning of the process. The early increase in scattering intensity (about the first 10-20 min) was observed in all experiments carried out at elevated temperatures. Combining these results we can suggest that prior to dissolution or disintegration, micelles first undergo a swelling that induces an increase of the scattered intensity. As the hydrolytic cleavage of THP groups takes place, leading to the

formation of methacrylic acid groups, the increased hydrophilicity of the micelle core can result in more absorption of water molecules. The subsequent decrease in the scattered intensity implies that a majority of swollen micelles start to fall apart and be dissolved. Thus, after 60 min heating, swollen micelles and large aggregates apparently coexist in solution, and the presence of large aggregates prevents the detection by DLS of molecularly dissolved PEO-*b*-PMAA block copolymer. It was also observed that the hydrolysis only resulted in a small decrease in pH of the micellar solution (about 0.2) presumably due to the very low concentration of the PTHPMA block in the solution (about 0.37 mg mL⁻¹) and an incomplete hydrolysis reaction under the used conditions. Now, how to explain the formation of the large aggregates with the concomitant decrease in scattered light intensity? On the one hand, the complexation of dissolved polymer chains is unlikely to occur for the following reason. Although complete hydrolysis of PEO-*b*-PTHPMA gives rise to PEO-*b*-PMAA, at pH 7, the ionized carboxylic acid groups should prevent the polymer chains complexation driven by H-bonding between PEO and PMAA chains.¹⁷ On the other hand, even for polymer micelles in equilibrium, chain exchange can take place through two mechanisms that are insertion and expulsion of single chains and merging and splitting of micelles.^{17,18} It is conceivable that this dynamic nature would be enhanced in the present system that undergoes a continuous structural change and perturbation. As the hydrolysis goes on, the micelle core becomes increasingly hydrophilic and absorbs more and more water, leading to the swelling of the micelle. But the disruption process is not simply the dissolution of micelles into individual chains; rather it is a constant structural and morphological evolution over time that may involve micelles swelling, their merging upon encounter, splitting, and polymer chains dissolution. In other words, the large aggregates could be formed by merging swollen and

hydrated micelles through chains rearrangement in the course of the evolution process. A thorough understanding of the complicated dynamic processes is the subject of future investigations.

The dissolution of the micelles is consistent with the visual observation that the solution turned clearer over time. SEM observations also confirm the analysis. Figure 5 shows images obtained with the micellar solution before and after heating to 80 °C for 100 min, deposited on a silicon wafer and dried. Before heating, dried micelles with an average diameter of about 62 nm are visible and they are quit uniform in size. After the hydrolysis at 80 °C, large aggregates are observed. It is easy to imagine that large hydrated micelles are easier to collapse and coalesce during the film drying, giving rise to the observed large aggregates in the solid state. Since the hydrolysis of PEO-*b*-PTHPMA gives rise to PEO-*b*-PMAA, it should be mentioned that the self-complexation of the latter due to hydrogen bonding between PEO and PMAA would not happen in the present case because of the ionization of MAA groups under the used conditions (pH 7).¹⁷

Interestingly, the thermosensitivity of the hydrolysis of PTHPMA makes the micelles unstable at the body temperature, suggesting the relevance of PTHPMA-based BCP micelles for drug delivery applications. Figure 6 shows the results obtained at 37 °C (pH=7). From the changes in the size distributions and scattering intensity, it appears that the destabilization of the micelles at 37 °C follows the same path as that at 80 °C, with the only difference that the process is much slower. Because of the slow kinetics, no initial increase of the scattering intensity was captured.

3. Simultaneous Investigation of Hydrolysis, Destabilization and Release

For an aqueous solution of PEO-*b*-PTHPMA micelles, as the thermal hydrolysis of THP groups progresses, the initially hydrophobic PTHPMA core becomes increasingly hydrophilic as the micelle core, being made up with a random copolymer of THPMA and MAA, contains more and more carboxylic acid groups. It is easy to imagine that the micelle core, absorbing an increasing amount of water, swells and eventually dissolves into unimolecular chains. If the BCP micelle is loaded with a hydrophobic compound solubilized by the PTHPMA core, it would be interesting, and challenging, to investigate simultaneously the three related events, i.e., hydrolysis of THP groups, micelle disruption and release of the loaded guest into the aqueous medium. We made an attempt using Nile Red (NR)-loaded BCP micelles. The release of NR can readily be monitored through fluorescence measurements since the emission of NR is quenched by water in which it is insoluble.^{14a} The experiment was conducted at 80 °C to have a faster hydrolysis, while using 1) ¹H NMR to observe the cleavage of THP groups from BCP micelles in aqueous solution, 2) DLS to monitor the micelles disruption and 3) change in fluorescence emission of NR to follow its release in solution.

The most challenging experiment is to observe the kinetics of the hydrolytic cleavage of THP groups from the micelles. To do this, micelles in heavy water (D₂O) were prepared using the same method as described in the Experimental Section, while the removal of THF was carried out by dialysis against D₂O. With the more sensitive 600 MHz NMR spectrometer, the possibility to obtain a spectrum with a short acquisition time (79 s in the present study) allows the hydrolysis kinetics to be monitored by recording spectra at a time interval of 5 min. Figure 7a shows

examples of the ^1H NMR spectra of the micellar solution before heating (spectrum a), after 12, 42 and 62 min at $80\text{ }^\circ\text{C}$, respectively. Despite the high noise level and some remained THF traces in the solution, the signal at 5.33 ppm, arising from cleaved tetrahydropyran-2-ol molecules, increases its intensity in time, indicating the progress of the hydrolysis reaction. In parallel, as the hydrolytic cleavage goes on, the resonance signals of the remaining PTHPMA and resulting PMAA in other regions become more and more prominent, indicating an increased hydration of the micelle cores. The two other events occurring in the same time can be investigated more easily. Figure 7b shows the change in the distribution of hydrodynamic diameters of micellar aggregates in the solution upon heating to $80\text{ }^\circ\text{C}$. The micellar disruption via swelling and disintegration or dissolution as discussed above is clearly visible. It is worth being noted that prior to the hydrolysis at elevated temperature, micelles loaded with NR (average hydrodynamic diameter $\sim 89\text{ nm}$) do not display the same size distribution as the micelles without loaded dye molecules (Fig.4a), which is not unusual since the encapsulation is known to affect the micellar aggregates. Figure 7c shows the concomitant change in fluorescence emission of NR as a function of time at $80\text{ }^\circ\text{C}$. Not only the intensity peaked at 603 nm decreases, but the emission maximum also displays a significant red-shift (by about 32 nm after 100 min). This is characteristic of NR's quenching by water.^{14a} Of course, the quenching can occur either with NR molecules released into water due to the dissolution of polymer micelles or with NR molecules retained inside the swelling micelles upon absorption of water.

The simultaneous characterizations make it possible to compare the kinetics of the three events, providing information on the relationship between them. Figure 8 shows the plots of three

normalized quantities vs. hydrolysis time at 80 °C for the micellar solution. These are 1) the integral of the 5.33 ppm peak that is indicative of the amount of cleaved THP groups, 2) the light scattering intensity related to the overall disruption of micelles, and 3) the decrease in fluorescence intensity revealing the contact of loaded NR molecules with water. We feel that the decrease in scattering intensity describes better the kinetics of the structural and morphological changes of polymer micelles in solution than the apparent changes in the hydrodynamic diameter. Similar to the case of micelles without NR loading (Fig. 4), the early-time increase in light scattering is likely to be caused by swelling of the micelles without dissolution. As the swelling develops over time, some micelles can be dissolved while others absorb more water inside, leading to the observed decrease in light scattering. Inspection of Figure 8 shows that within experimental error the three events basically follow the same kinetics, indicating that they are closely related to each other. This is not nonlogical. Once the hydrolytic cleavage of THP groups takes place in the aqueous solution, the micelle core absorbs more water molecules. This triggers the micelle swelling, while the encounter of NR molecules with water leads to the quenching of their fluorescence emission. That the fluorescence quenching of NR follows the same kinetics as the hydrolysis reaction and the decrease in scattered light intensity also suggests that the release of the chromophore into an aqueous media is mostly determined by the micellar swelling and dissolution, while the observed large hydrated aggregates should have little effect on the release process.

4. Effects of pH and Block Copolymer Composition

As mentioned earlier, the hydrolysis of PTHPMA block can also be enhanced by acidic pH, in contrast to lactate-based polymers whose hydrolysis is favoured by basic pH.⁶ Using aqueous solutions of micelles formed by PEO₁₁₂-*b*-PTHPMA₁₆₄ loaded with NR, the effect of pH on the micelles disruption and release was investigated by monitoring the fluorescence emission of NR. Figure 9a compares the plots of normalized fluorescence of NR vs. the time for the same micellar solution thermostated at 37 °C under three different pH. Indeed, as pH is decreased from 7 to 6 and to 5, the rate of fluorescence quenching increases continuously, indicating faster micelles disruption at acidic pH.

Another parameter that can affect the micelles disruption and the release of loaded molecules is the block copolymer composition. This was investigated by comparing the release rate of NR loaded in micelles of three samples with different relative lengths of the two blocks, PEO₁₁₂-*b*-PTHPMA₁₆₄, PEO₁₁₂-*b*-PTHPMA₄₂ and PEO₁₁₂-*b*-PTHPMA₂₄ (P3, P5 and P1 in Scheme 1), all measurements being carried out at fixed pH=7 and T=37 °C. As can be seen from the results in Figure 9b, with the same hydrophilic corona (the same PEO₁₁₂ block), the rate of NR fluorescence quenching becomes faster as the hydrophobic core of PTHPMA becomes smaller due to a shorter PTHPMA block. This is understandable. With a smaller micelle core, water molecules are more accessible to PTHPMA (and loaded NR). This not only may favour the hydrolysis reaction but also, as the hydrolysis takes place, can shift the hydrophilic-hydrophobic balance more quickly toward the micellar destabilization, leading to a faster micelles disruption and thus quenching of NR fluorescence.

Conclusion

We synthesized a new amphiphilic diblock copolymer composed of PEO and PTHPMA, and investigated the thermal sensitivity of its micelle in aqueous solution. In contrast to other thermosensitive polymer micelles usually related to the LCST of one block, the thermal sensitivity of the present system stems from the hydrolytic cleavage of the thermally labile THP groups. The hydrolysis of THP transforms the initially amphiphilic PEO-*b*-PTHPMA onto the double-hydrophilic PEO-*b*-PMAA, which destabilizes the micelles. The hydrolysis of PEO-*b*-PTHPMA micelles can occur slowly under physiological conditions (37 °C and pH=7), while the reaction rate becomes faster at elevated temperatures. For the first time, we were able to use ¹H NMR, DLS and fluorescence spectroscopy to monitor simultaneously the removal of THP groups, the disruption of micelles and the release into aqueous medium of loaded NR molecules. The results suggest that the three seemingly distinct events are closely related to each other, and follow basically the same kinetics. The disruption of micelles as a result of the hydrolysis proceeds mainly through a process involving swelling, disintegration and dissolution of the micelles in aqueous solution (depicted in Fig.1). Moreover, the rate of micelles disruption and thus the rate of release of NR are also enhanced by acidic pH or by using micelles with a smaller PTHPMA core.

Acknowledgement We acknowledge the financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies of Québec (FQRNT) and le centre d'étude des matériaux optiques et photoniques de l'université de Sherbrooke (CEMOPUS). We are grateful to St-Jean Photochemicals Inc. (St-Jean-sur-Richelieu, Quebec, Canada) for providing us with the monomer of tetrahydropyranyl methacrylate. YZ is a member of the FQRNT-funded Center for Self-Assembled Chemical Structures.

References

- (1) Topp, M. D. C.; Dijkstra, P. J.; Talsma, H.; Feijen, J. *Macromolecules* **1997**, *30*, 8518.
- (2) Chung, J. E.; Yokoyama, M.; Okano, T. *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 93.
- (3) Schilli, C. M.; Zhang, M.; Rizzardo, E.; Thang, S. H.; Chong, Y. K.; Edwards, K.; Karlsson, G.; Muller, A. H. E. *Macromolecules* **2004**, *37*, 7861-7866
- (4) Taillefer, J.; Jones, M. -C.; Brasseur, N.; Van Lier, J. E.; Leroux, J. -C. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 52.
- (5) Neradovic, D.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7589.
- (6) Soga, O.; van Nostrum, C. F.; Ramzi, A.; Visser, T. ; Soulimani, F. ; Frederik, P. M.; Bomans, P. H. H.; Hennink, W. E. *Langmuir* **2004**, *20*, 9388.
- (7) Jiang, X.; Lavender, C. A.; Woodcock, J. W.; Zhao, B. *Macromolecules* **2008**, *41*, 2632.
- (8) Huang, X.; Du, F.; Ju, R. ; Li, Z. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 597.
- (9) (a) Wang, G.; Tong, X.; Zhao, Y. *Macromolecules* **2004**, *37*, 8911. (b) Tong, X.; Wang, G.; Soldera, A.; Zhao, Y. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 20281. (c) Jiang, J.; Tong, X.; Zhao, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8290. (d) Jiang, J.; Tong, X.; Morris, D.; Zhao, Y. *Macromolecules* **2006**, *39*, 4633. (e) Jiang, J.; Qi, B.; Lepage, M.; Zhao, Y. *Macromolecules* **2007**, *40*, 790. (f) Babin, J.; Lepage, M.; Zhao, Y. *Macromolecules* **2008**, *41*, 1246.
- (10) Tsukano, C.; Ebine, M.; Sasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4326.
- (11) Lowe, A. B.; Billingham, N. C.; Armes, S. P. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5991.
- (12) Kearns, J. E.; Mclean, C. D.; Solomon, D. H. *J. Macromol. Sci.-Chem.* **1974**, *A8*, 673.
- (13) Zhou, W.; Kuebler, S. M.; Braun, K. L.; Yu, T.; Cammack, J. K.; Ober, C. K.; Perry, J. W.; Marder, S. R. *Science* **2002**, *296*, 1106.

- (14) See, for example, (a) Gillies, E. R.; Frechet, J. M. J. *Chem. Commun.* **2003**, 1640-1641. (b) Bellomo, E. G.; Wyrsta, M. D.; Pakstis, L.; Pochan, D. J.; Deming, T. J. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 244-248. (c) Bae, Y.; Fukushima, S.; Harada, A.; Kataoka, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4640-4643.
- (15) Jung, J.; Lee, I.-H.; Lee, E.; Park, J.; Jon, S. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3401.
- (16) Tian, Y.; Watanabe, K.; Kong, X.; Abe, J.; Iyoda, T. *Macromolecules* **2002**, *35*, 3739.
- (17) Holappa, S.; Kantonen L.; Winnik, F. M.; Tenhu, H. *Macromolecules* **2004**, *37*, 7008.
- (18) Haliloglu, T.; Bahar, I.; Erman, B.; Mattice, W. L. *Macromolecules* **1996**, *29*, 4764.

Figure Captions

Figure 1 (a) Thermosensitive hydrolysis of the block copolymer composed of poly(ethylene oxide) and poly(2-tetrahydropyranyl methacrylate) (PEO-*b*-PThPMA). (b) Schematic illustration of the disruption of block copolymer micelles in aqueous solution as a result of the hydrolysis (swelling and dissolution).

Figure 2. (a) GPC and (b) DSC curves of the PEO-*b*-PThPMA samples of various compositions as indicated in Scheme 1.

Figure 3. ^1H NMR spectra of PEO₁₁₂-*b*-PThPMA₁₆₄: (a) dissolved in THF-*d*₈, (b) upon addition of D₂O in THF solution inducing the formation of micelles, (c) aqueous micellar solution obtained by dialysis against D₂O, and (d) aqueous micellar solution heated to 80 °C for 30 min.

Figure 4. Aqueous micellar solution of PEO₁₁₂-*b*-PThPMA₁₆₄ heated to 80 °C: (a) evolution of the distribution of hydrodynamic diameters of micellar aggregates before and after 60 min, and (b) changes in the scattered intensity measured at 90°.

Figure 5. SEM images of (a) micelles of PEO₁₁₂-*b*-PThPMA₁₆₄ observed by casting the micellar solution at room temperature, and (b) large aggregates formed after heating the micellar solution to 80 °C for 100 min.

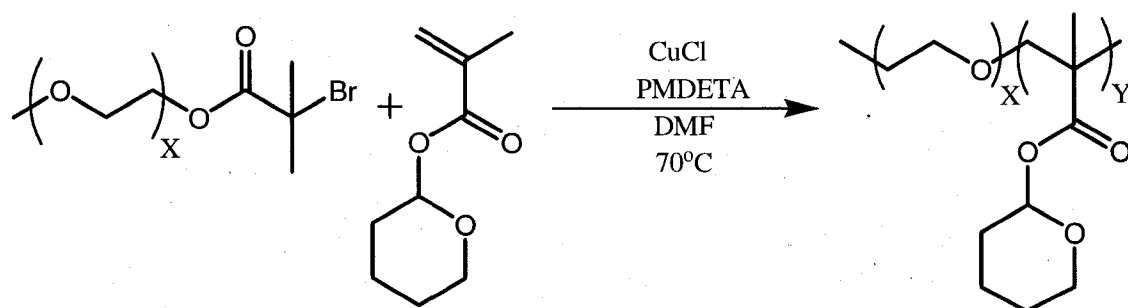
Figure 6. Aqueous micellar solution of PEO₁₁₂-*b*-PThPMA₁₆₄ heated to 37 °C (pH 7): (a) evolution of the distribution of hydrodynamic diameters of micellar aggregates before and after 74 h, and (b) changes in the scattered intensity measured at 90°.

Figure 7. Simultaneous characterizations of the aqueous micellar solution of PEO₁₁₂-*b*-PThPMA₁₆₄ heated to 80 °C by combining the use of three techniques: (a) ^1H spectra showing the hydrolytic cleavage of tetrahydropyranyl (THP) groups over time, (b) DLS results showing the

evolution of the size distribution of the aggregates upon micellar disruption, and (c) fluorescence emission spectra of Nile Red (NR) loaded in the micelles ($\lambda_{ex}=540$ nm) showing its release into an aqueous medium.

Figure 8. Comparison of the kinetics of the three events occurring in the micellar solution of PEO₁₁₂-*b*-PTHPMA₁₆₄ at 80 °C: (1) the hydrolytic cleavage of tetrahydropyranyl (THP) groups indicated by the change in the normalized integral of the resonance signal at 5.33 ppm, (2) the resulting micellar disruption related to the decrease in the normalized light scattering intensity by the solution, and (3) the concomitant release of loaded Nile Red (NR) from the micelles into the aqueous medium as revealed by the change in the normalized fluorescence intensity at the maximum emission wavelength.

Figure 9. (a) Normalized fluorescence intensity of Nile Red vs time for the micellar solution of PEO₁₁₂-*b*-PTHPMA₁₆₄ at 37 °C for three pH values (5, 6 and 7). (b) Normalized fluorescence intensity of Nile Red vs. time for micellar solutions at pH 7 prepared with three copolymer samples having the same PEO block but different lengths for the PTHPMA block.



Sample	X	Y
P0	112	-
P1	112	24
P2	112	54
P3	112	164
P4	45	22
P5	112	42

Scheme 1: Synthetic route to block copolymers of PEO-*b*-PTHPMA of various compositions.

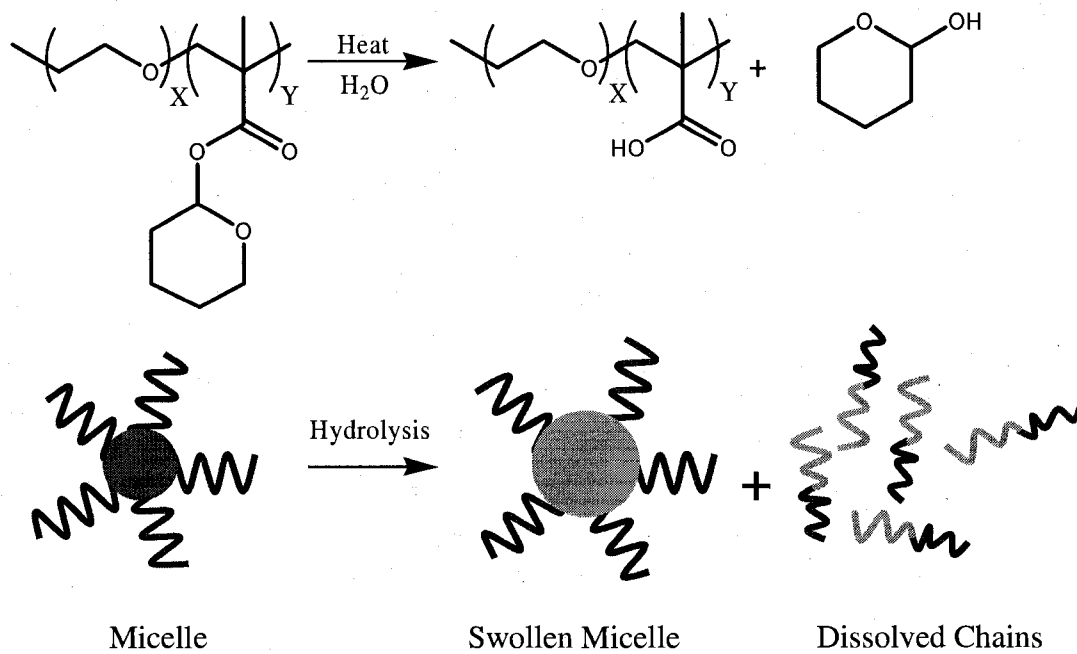


Figure 1

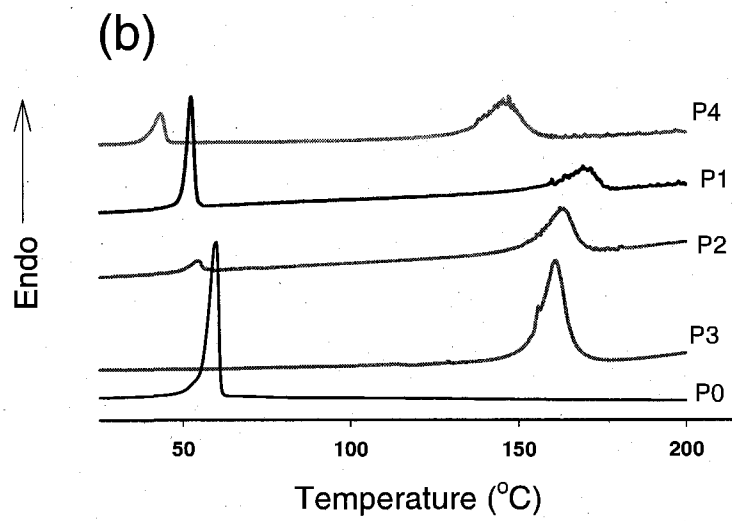
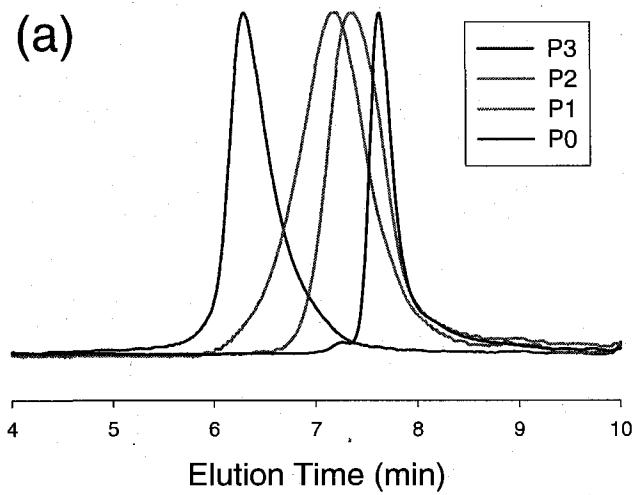


Figure 2

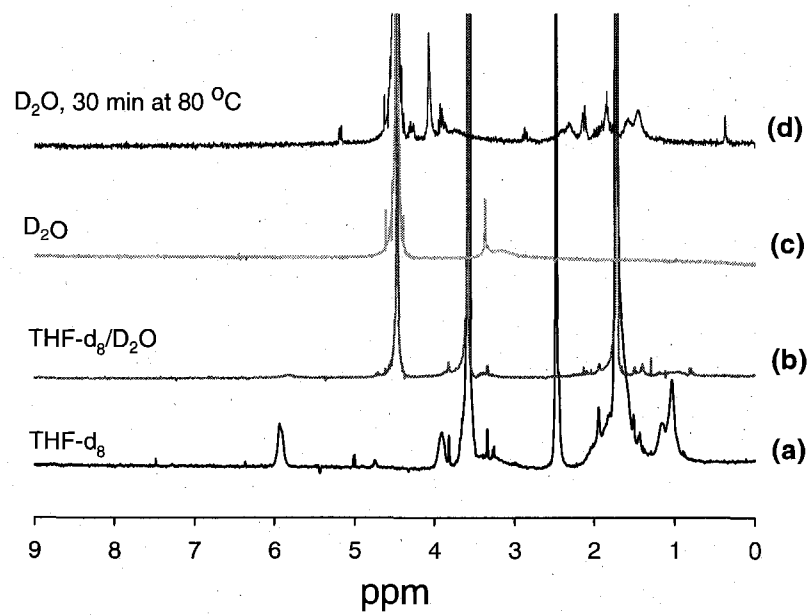


Figure 3

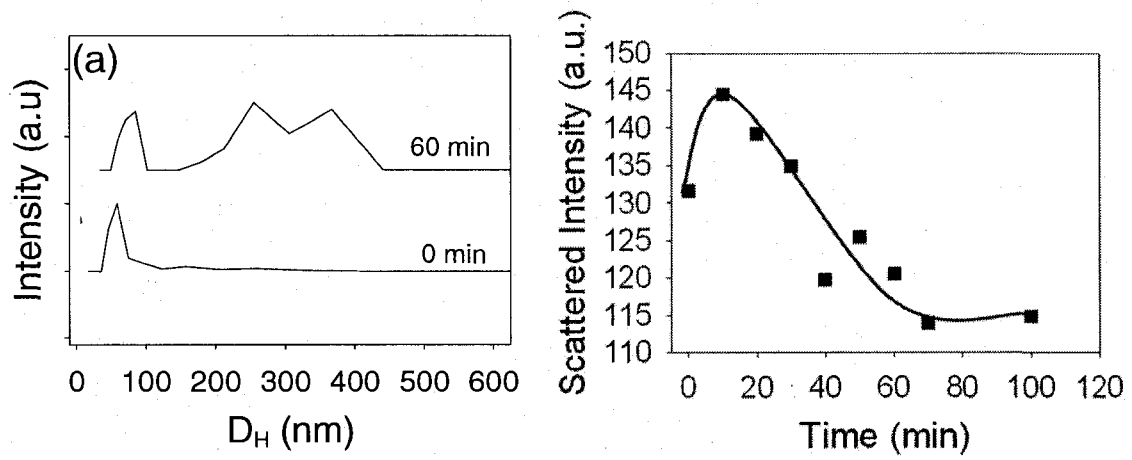


Figure 4

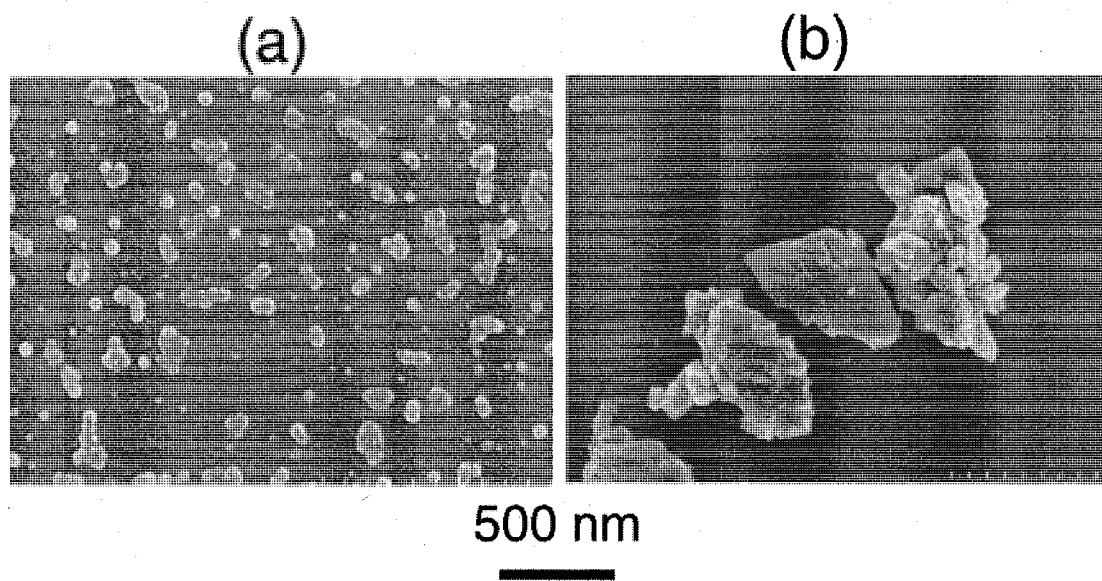


Figure 5

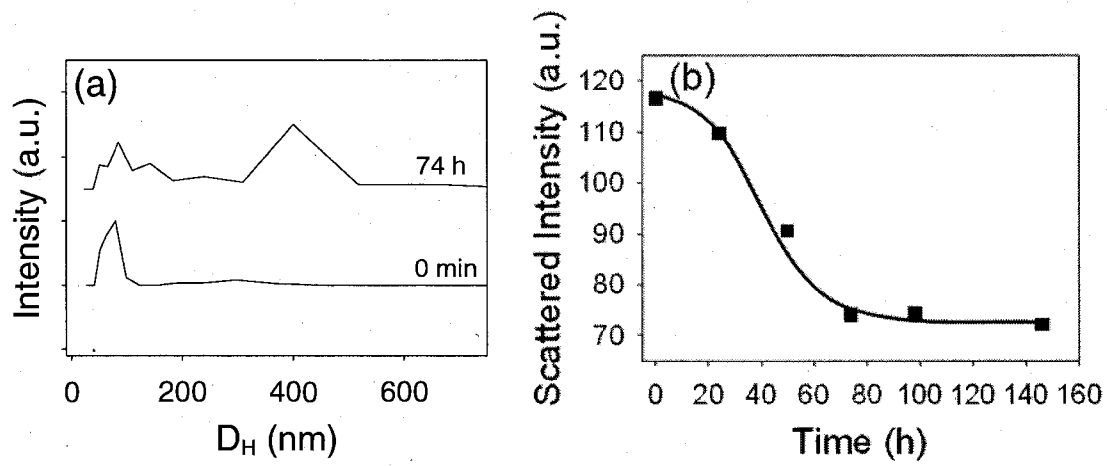


Figure 6

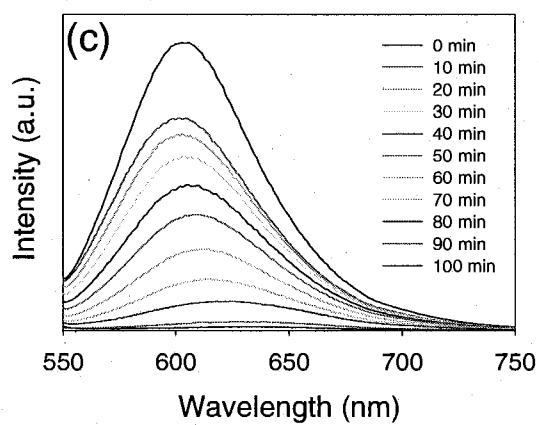
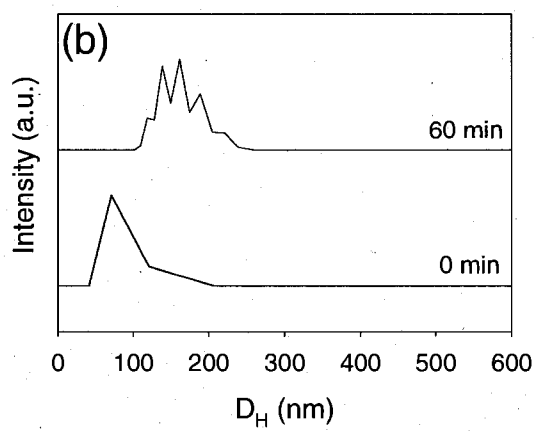
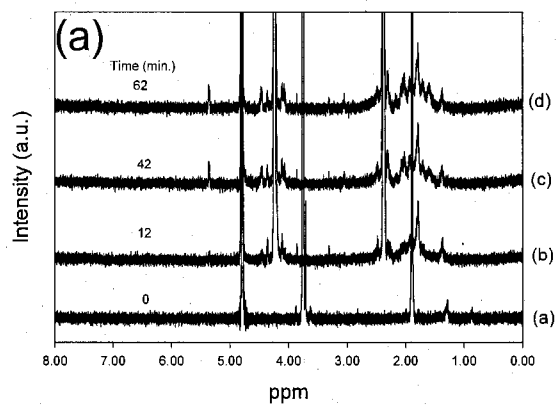


Figure 7

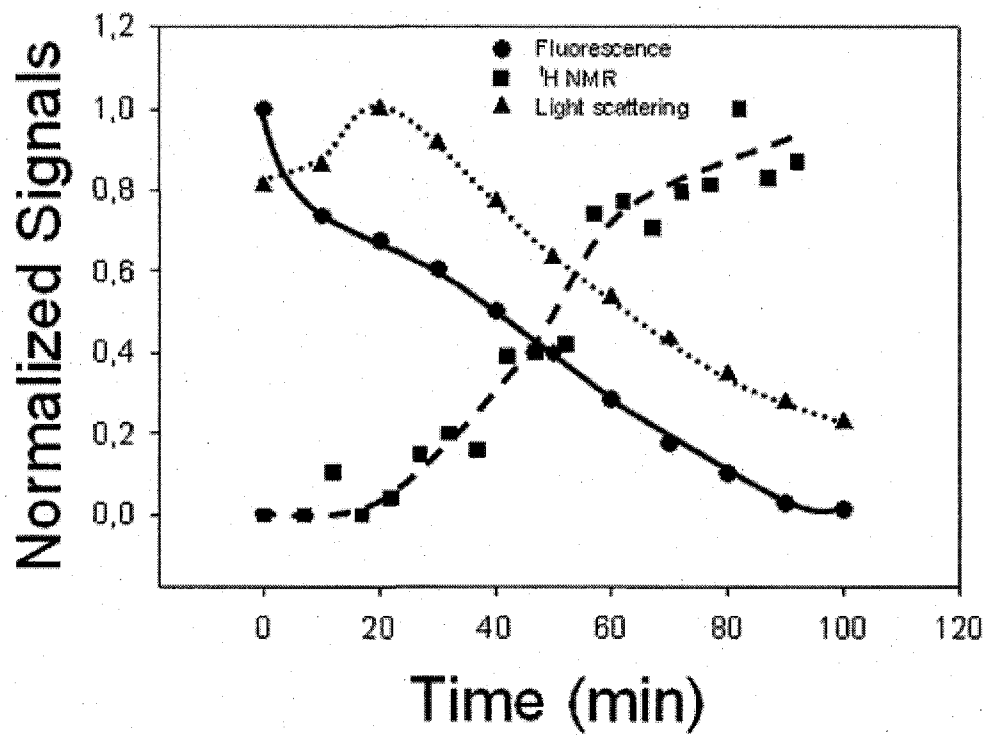


Figure 8

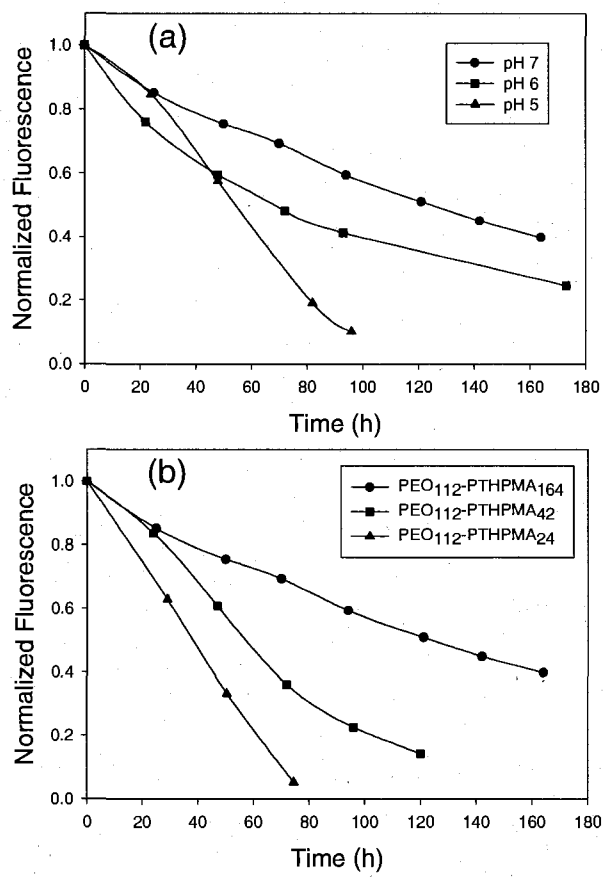
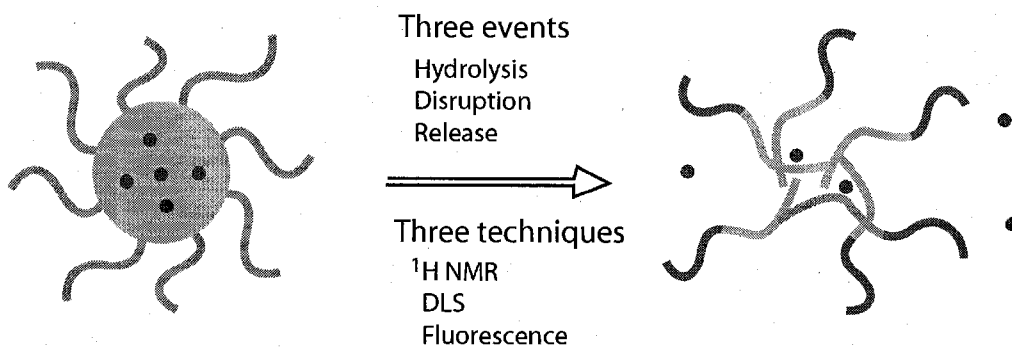


Figure 9

Graphics for Table of Contents



CHAPITRE 2

MICELLES SENSIBLES AUX PHOTONS PROCHE INFRAROUGE (NIR)

2.1. Avant-propos

Le laboratoire du Pr. Zhao a développé un des premiers systèmes micellaires sensibles aux photons proche infrarouge (NIR). Ils ont utilisé le copolymère à blocs poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(méthacrylate de 2-méthylnitrobenzyl) (PEO-*b*-PNBMA) pour former des micelles (21). Le chromophore nitrobenzyle peut être photolysé par l'absorption UV (un photon) ou NIR (deux photons), menant à la déstabilisation des micelles. Par contre, la sensibilité du système à l'absorption à deux photons est faible. L'objectif de l'étude présentée dans cet article est d'améliorer cette sensibilité. Les dérivés de coumarine ont une sensibilité plus grande d'absorption à deux photons comparativement aux molécules de nitrobenzyl (26,27). Selon nos recherches, aucun système micellaire basé sur un copolymère à blocs de dérivé de coumarine n'avait déjà été étudié.

La rédaction de l'article et la synthèse du copolymère à blocs poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly{méthacrylate de [méthyl-7-(diéthyleamino)coumarine-4-yl]} (PEO-*b*-PDEACMM) a été effectué par Dr. Jérôme Babin. Ma contribution à cet article a été d'effectuer la caractérisation du système micellaire et d'obtenir les résultats présentés dans l'article. Jean-François Allard et le Pr. Denis Morris nous ont été d'une grande aide pour la partie sur l'absorption à deux photons. Les micelles du copolymère ont été produites par la méthode de dialyse décrite dans l'introduction. La couronne polaire des micelles est formée du bloc PEO et le cœur par le PDEACMM. En absorbant un photon UV ou deux photons NIR, un groupement DEACMM peut être photolysé déplaçant la balance hydrophile/hydrophobe et menant à la déstabilisation des micelles. La

caractérisation et l'étude de l'évolution du système micellaire ont été effectuées à l'aide de la spectroscopie d'absorption et la spectroscopie de fluorescence. L'étude montre qu'en variant l'intensité de la lampe UV, il est possible de modifier la cinétique du relâchement du Nile Red encapsulé dans les micelles. De plus, une expérience pour évaluer la sensibilité et l'évolution des micelles avec des courtes irradiations a démontrée que le système était rapidement déstabilisé laissant fuir les molécules de Nile Red (NR), pour ensuite se réorganiser. Une expérience pour suivre le clivage des groupements de coumarine a été effectuée et a prouvé que les molécules de coumarine pouvaient être relâchées dans le milieu aqueux et servir de sonde pour la photoréaction. La partie la plus importante de l'étude est l'irradiation de la solution micellaire avec un laser à 794 nm pour faire l'absorption à deux photons. Avec la spectroscopie de fluorescence, il a été possible de suivre le relâchement des molécules de NR encapsulées. De plus, la concentration des micelles en solution influence relativement peu la cinétique de relâchement. Pour confirmer que les micelles étaient bien déstabilisées, la microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée pour observer les micelles avant et après irradiation à 794 nm. Les images montrent la dégradation des micelles par l'irradiation proche infrarouge. Ces résultats confirment la sensibilité de ce nouveau copolymère à un rayonnement dans le proche infrarouge via l'absorption de deux photons.

Cette étude présente le développement de micelles sensibles à l'absorption de deux photons plus sensible que celle développée précédemment dans le laboratoire du Pr.Zhao.

2.2. New Two-Photon Sensitive Block Copolymer Nanocarrier

Two-Photon Release

DOI: 10.1002/anie.200((will be filled in by the editorial staff))

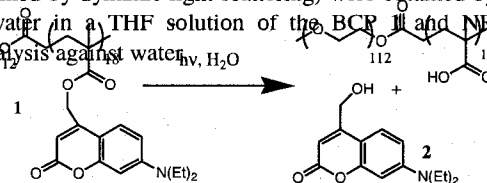
A New Two-Photon Sensitive Block Copolymer Nanocarrier

Jérôme Babin, Maxime Pelletier, Martin Lepage, Jean-François Allard, Denis Morris, Yue Zhao*

Much research effort has been and continues to be devoted to block copolymer (BCP) micelles that respond to changing environmental conditions or stimuli such as pH^[1-5] and temperature^[6-9]. In recent years, there has been a growing interest on light-responsive BCP micelles whose aggregation state in solution can be disrupted by illumination.^[10-19] The use of an optical stimulus is appealing because it could provide a greater selectivity in terms of control over the time and the location of micellar disruption. Basically, to make BCP micelles sensitive to light, the polymer should contain photochromic groups (generally on the hydrophobic block) whose photoreaction upon illumination increases the polymer polarity and shifts the hydrophilic-hydrophobic balance toward the disruption of the micelles. Reversible photoisomerization and irreversible photocleavage reactions of a number of chromophores have been exploited to design reversible or irreversible light-dissociable BCP micelles^[10-15]. More recently, the reversible photodimerization of coumarin has also been used to make photocontrollable BCP micelles^[20,21]. Although a surfactant-like amphiphile and a linear-dendritic copolymer sensitive to near infrared light (NIR) have been reported,^[22] light-responsive BCP micelles reported so far are mainly activated by UV and visible light. Only in one case, the photoreaction of 2-nitrobenzyl groups could occur upon two-photon absorption at 700 nm, but the sensitivity was low due to inefficient two-photon absorption^[13]. It is known that NIR with wavelengths in the range of ~700-1000 nm is more suitable for biomedical applications than UV or visible light. At these longer wavelengths, not only the irradiation is

less detrimental to healthy cells, but its absorption and scattering by water and biological substances are reduced, which results in a greater penetration depth for NIR light (in the order of millimeters to centimetres),^[23,24]. In view of this, the development of BCP micelles sensitive to NIR is crucial toward eventual applications. In this Communication, we report on a study of a novel BCP whose micellar disruption can effectively be triggered by two-photon absorption of NIR at 794 nm. To achieve this NIR sensitivity, a coumarin chromophore, namely, [7-(diethylamino)coumarin-4-yl]methyl (DEACM), was used in designing the BCP. DEACM is known to have large two-photon absorption cross section.^[24-26] This achievement is a significant step forward toward polymer micelles controllable with infrared light.

The amphiphilic light sensitive BCP **1**, is composed of a poly(ethylene oxide) (PEO) hydrophilic block and a poly([7-(diethylamino)coumarin-4-yl]methyl methacrylate) (PDEACMM) hydrophobic block (Scheme 1). Under UV or NIR light irradiation the photosolvolysis of [7-(diethylamino)coumarin-4-yl]methyl esters gives rise to the cleavage of 7-diethylamino-4-(hydroxymethyl)coumarin **2**, which converts the ester groups to carboxylic acid groups and the hydrophobic PDEACMM to hydrophilic poly(methacrylic acid) (PMA). For the preparation of **1**, the new monomer [7-(diethylamino)coumarin-4-yl]methyl methacrylate was firstly synthesized by esterification of 7-diethylamino-4-(hydroxymethyl)coumarin **2** with methacryloyl chloride and subsequently polymerized by atom transfer radical polymerization using a PEO₁₁₂ macroinitiator. A well defined BCP (*I*_p = 1.25) was thus obtained containing about eighteen chromophore side-groups as determined by ¹H NMR (see Supporting Information for synthesis and characterization details). The hydrophobic dye, Nile Red (NR), was used for monitoring the micelle formation and disruption under light irradiation. Indeed, the fluorescence emission of NR (excited at 550 nm) is strongly dependent on the environment polarity. It's high in hydrophobic medium, but becomes less intense and red shifted when solubilized in water due to a very low solubility.^[13,22] NR loaded polymer micelles with an average hydrodynamic diameter around 55nm (determined by dynamic light scattering) were obtained by slow addition of water in a THF solution of the BCP **1** and NR, and subsequent dialysis against water.¹¹²



Scheme 1. Chemical structure and photolysis of the coumarin-containing amphiphilic block copolymer **1**.

[*] Dr. J. Babin, M. Pelletier, Prof. Dr. Y. Zhao
Département de chimie
Université de Sherbrooke
Sherbrooke, Québec, J1K2R1 (Canada)
Fax: (+1) 819-821-8017
E-mail: yue.zhao@usherbrooke.ca
Homepage: <http://pages.usherbrooke.ca/yzhao/>

Prof. Dr. M. Lepage
Département de médecine nucléaire et de radiobiologie and
Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke
Université de Sherbrooke
Sherbrooke, Québec, J1K2R1 (Canada)

J.-F. Allard, Prof. Dr. D. Morris
Département de physique
Université de Sherbrooke
Sherbrooke, Québec, J1K2R1 (Canada)

[**] This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies of Québec via The Centre for Self-Assembled Chemical Structures (CSACS) and the Cancer Research Society Inc. (Canada)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org>

Prior to investigating the reaction of BCP micelles under NIR irradiation, UV light (365 nm) was first used to assess the photosensitivity. With NR-loaded micelles of **1**, the two chromophores (coumarin and NR) can fluoresce. Figure 1a shows

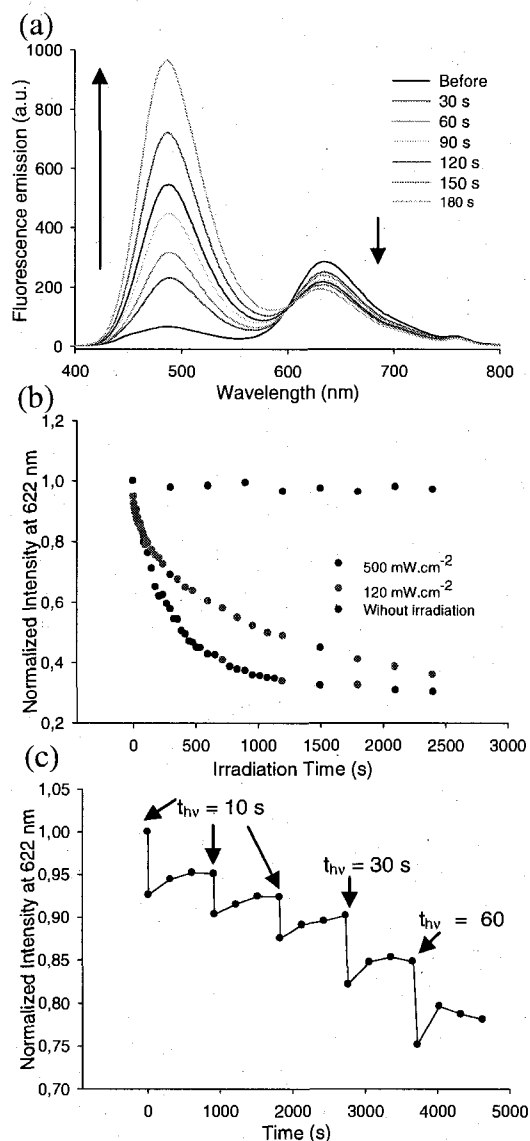


Figure 1. a) Fluorescence emission spectra ($\lambda_{exc} = 380$ nm) of micellar solution of **1** (1mg/mL) loaded with Nile Red under UV irradiation at 365nm (500 mW.cm⁻²). b) Normalized fluorescence emission intensity of Nile Red at 622 nm ($\lambda_{exc} = 550$ nm) in response to UV irradiation (365 nm) at 120 mW.cm⁻² and 500 mW.cm⁻² powers. c) Change of the normalized fluorescence emission intensity at 622 nm ($\lambda_{exc} = 560$ nm) of Nile Red in response to intermittent UV irradiation (365 nm, 120 mW.cm⁻²).

the fluorescence emission spectra of a micellar solution upon excitation of coumarin side-groups ($\lambda_{ex} = 380$ nm), recorded as a function of UV exposure time. Before UV irradiation, the emission of coumarin at 480 nm is low, which is no surprise because of self-quenching due to the high concentration of coumarin groups confined in the micelle core (low emission was also observed for micelles

without loaded NR, Supporting Information). However, the fluorescence emission of NR centred at 622 nm suggests the occurrence of nonradiative energy transfer (NRET) from excited coumarin to NR since NR has no absorption at the excitation wavelength of 380 nm and there is a significant overlap of the emission spectrum of coumarin with the absorption spectrum of NR. This result indicates the close distance between the two dyes as a result of the encapsulation of NR by the core of the hydrophobic PDEACMM block. Under UV light, the cleavage of 7-diethylamino-4-(hydroxymethyl)coumarin **2** and its release with NR was clearly

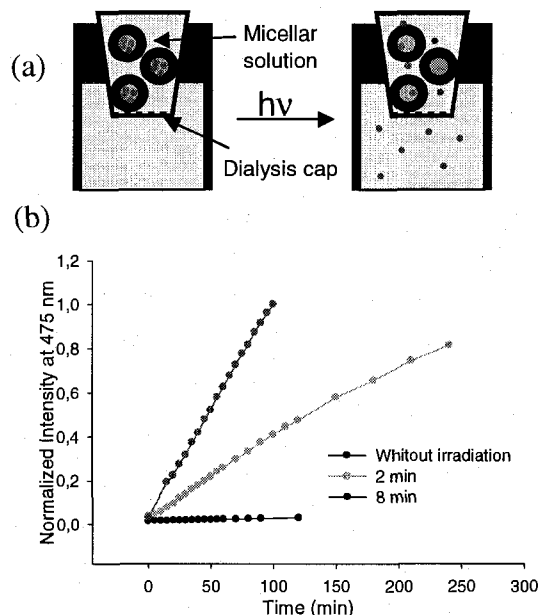


Figure 2. a) A schematic showing the photoinduced release of coumarin dye from the micellar solution placed in a dialysis cap and subjected to an irradiation, the cell being filled with pure water. B) Release kinetics of coumarin dye as revealed by the increase in fluorescence emission at 475 nm ($\lambda_{exc} = 380$ nm) after irradiations (365 nm, 500 mW.cm⁻²) of different times, the fluorescence being measured in the cell, outside the dialysis cap.

evidenced by changes in their fluorescence emission (Figure 1a). While the 622 nm emission of NR decreases, the 480 nm emission of **2**, being diluted in water, rises. This drastic change in emission of **2** (also observed with micelles without NR) is mainly caused by a strong reduction of self-quenching of coumarin dye. The concomitant release of NR into aqueous medium as a result of the photoreaction induced micellar disruption can better be observed by exciting this chromophore ($\lambda_{ex} = 550$ nm) without the intervention of coumarin. The emission intensity of NR decreases with irradiation time (spectra not shown). Figure 1b shows the plots of normalized fluorescence intensity at 622 nm vs irradiation time, and this for two irradiation intensities. In the absence of irradiation, no decrease of the fluorescence intensity of NR was recorded, indicating no release of NR from the micelles and thus denoting a good stability of the micellar aggregates. This result demonstrates that [7-(diethylamino)coumarin-4-yl]methyl esters are highly resistant to spontaneous hydrolysis in the dark and/or sufficiently protected in the hydrophobic core of the micelle, in accordance with the literature.²⁶ Upon UV irradiation the NR release takes place and the process becomes faster as the irradiation intensity increases, because high UV

power speeds up the photosolvolysis of [7-(diethylamino)coumarin-4-yl]methyl esters and, consequently, the disruption of BCP micelles. In all cases the remaining fluorescence was about 35-40% of the initial level. At UV light intensity of 120 mW.cm^{-2} , it took about 20 min to reduce the fluorescence to half, while it took about 7 min with an intensity of 500 mW.cm^{-2} . For these measurements, the emission spectra were recorded immediately after an irradiation. Figure 1c shows the change in the normalized emission intensity following a short time (from 10 to 60 s) irradiation (120 mW.cm^{-2}). The stepped curve clearly shows an instantaneous drop of fluorescence of NR even after 10 s irradiation. The height of step, which is related to the amount of NR put in contact with water, seems to be well correlated to the length of irradiation. However, there is a partial recovery of fluorescence emission after turning off the irradiation. This may be

attributed to a balancing process of the released NR molecules into intact micelles or into remaining hydrophobic parts of disrupted micelles. These results obtained with a 365 nm irradiation confirm the high photosensitivity of the BCP **1** and its use as a nanocarrier of hydrophobic molecules for photocontrollable release into an aqueous solution. We should notice that the kinetics of release of NR does not reflect necessarily the kinetics of dissociation of the polymer micelles. Under UV light, the photolysis of [7-(diethylamino)coumarin-4-yl]methyl esters starts quickly and disrupts the micelles due to the changing hydrophilic-hydrophobic balance of **1**, the exposure of entrapped NR molecules to water, which quenches the fluorescence, may occur once the micelle core becomes more hydrated. For instance, we have recently shown that the disruption of a thermosensitive BCP micelle proceeds through

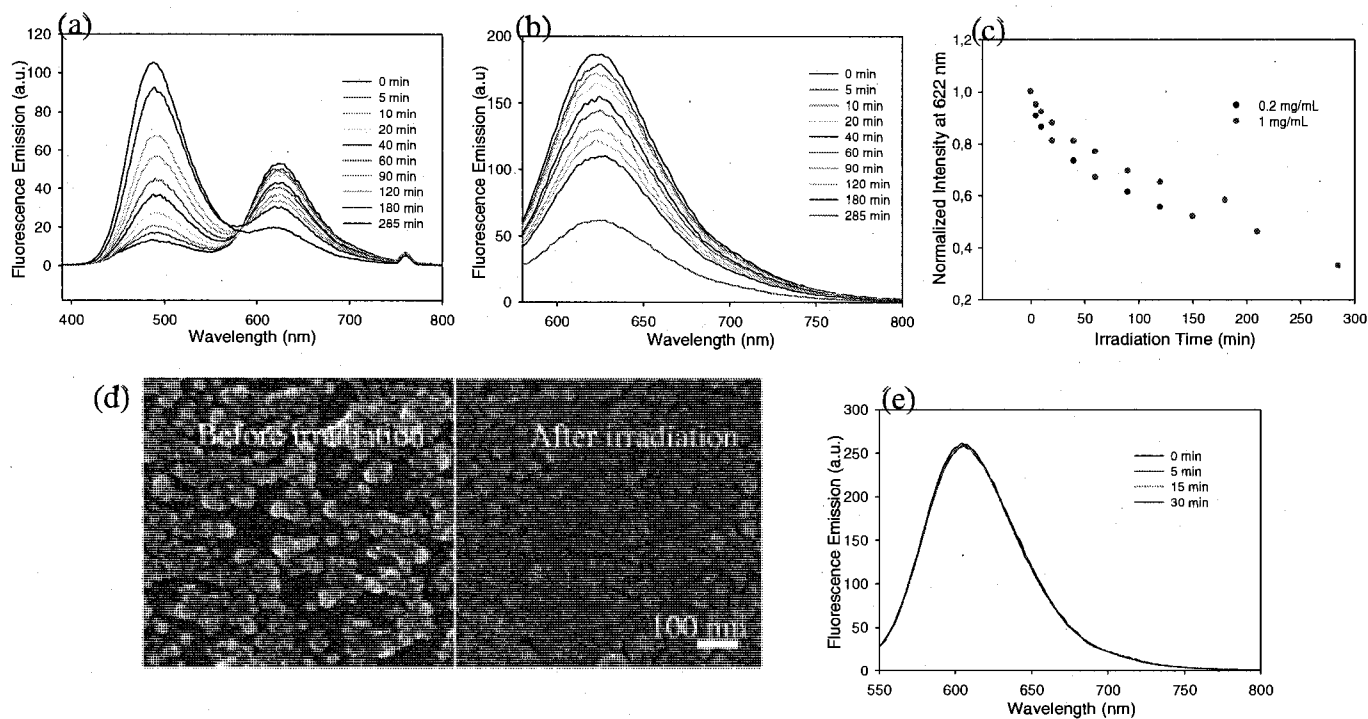


Figure 3. BCP micelles under irradiation at 794 nm: a) and b) fluorescence emission spectra with excitation at 380 and 550 nm, respectively; c) normalized fluorescence emission intensity of Nile Red at 622 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 560 \text{ nm}$), d) scanning electron microscopy images of micellar solutions of **1** equilibrated with Nile Red cast on a silicon wafer, before and after irradiation; and e) fluorescence emission spectra of a micellar solution of $\text{PEO}_{45}\text{-}b\text{-PMMA}_{69}$ loaded with Nile Red under irradiation at 794 nm.

a process involving swelling, disintegration, and dissolution of the aggregates in aqueous solution.^[27]

Another interesting feature of the micelles of BCP 1 is provided by the coumarin chromophore himself. As mentioned before, when confined in the micelle core, coumarin groups suffer from self-quenching and has a low fluorescence emission, while after its photosolvolytic release into water, its fluorescence emission is drastically increased. This behaviour should enhance the fluorescent contrast between irradiated and non-irradiated aggregates. Therefore, recording the photorelease of the water-soluble 7-diethylamino-4-(hydroxymethyl)coumarin 2, could be used to detect the micellar disruption and, indirectly, the release of guest hydrophobic molecules in-vitro and in-vivo. The experiment schematically illustrated in Figure 2a was designed to validate this concept. A UV cell filled with pure water was carefully closed with a dialysis cap whose membrane was immersed in water. Then, a micellar solution of BCP 1 was poured into the dialysis cap and submitted to an irradiation for the photoreaction. By sampling the solution underneath the dialysis membrane, the fluorescence emission of coumarin 2 released from BCP 1 and diffused into the UV cell through the membrane could be measured (NR, being insoluble in water, cannot diffuse into the cell). Figure 2b shows the release kinetics of 2 recorded following an irradiation for a certain amount of time. In the absence of irradiation, no fluorescence emission was detected from the UV cell, confirming the good stability of the micellar aggregates in the dark. After a 365 nm irradiation, the release of 2 takes place and the process becomes faster as the initial irradiation time increases. Longer illumination enhances the photohydrolysis of [7-(diethylamino)coumarin-4-yl]methyl esters and consequently, the disruption of BCP micelles. The results show that BCP micelles of 1 provide an interesting internal fluorescence marker which could be used to detect and track, in situ, the occurrence of the photodegradation process.

Similar experiments were performed by irradiating NR-loaded micellar solutions at 794 nm; the results summarized in Figure 3 clearly demonstrate the sensitivity of the micelles of BCP 1 to two-photon absorption of NIR light. For these experiments, 80 fs pulses at 794 nm and at a repetition rate of 1 KHz were generated from a Ti:sapphire laser; without optical focalization, the excitation beam having a spot diameter of ~ 1 mm was directed to a 0.3 mL micellar solution placed in a microcuvette; the fluorescence emission spectra were recorded as a function of cumulative time of irradiation. Under the 794 nm irradiation, the spectral changes are the same as with the UV irradiation at 365 nm. Upon excitation at 380 nm, the fluorescence emission of coumarin groups rises as a result of their photoreaction leading to the release of 2 into water (Fig.3a); while upon excitation at 550 nm, the decrease of the fluorescence emission of NR indicates its release as a result of the micellar disruption (Fig.3b). Given in Figure 3c are the plots of normalized fluorescence emission intensity of NR at 622 nm vs. NIR irradiation time for two micellar solutions with different BCP concentrations (0.2 and 1 mg/mL), showing a similar kinetic process for the release of NR. As expected, the two-photon process is slower than the one-photon process due to the much smaller two-photon absorption cross-section as compared with one-photon absorption. Nevertheless, knowing that the probability of two-photon absorption is proportional to the square of the irradiation intensity, these results, obtained with a non-focalized NIR beam and a large volume of the micellar solution, indicate the two-photon sensitivity of the micelles of BCP 1. SEM images (Fig. 4d) confirm the NIR light-

induced disruption of the polymer micelles. Before irradiation, spherical aggregates could clearly be observed; while after the NIR exposure (285 min), micelles appeared to be highly degraded, although part of the aggregates were still visible. Therefore, under the used conditions of NIR exposure, BCP micelles were not completely dissociated but their disintegration was enough to release loaded NR. As a control test, the same experiment was performed with a NR equilibrated micellar solution of a block copolymer composed of PEO and poly(methyl methacrylate), PEO₃₅-*b*-PMMA₆₉, which has no photoresponsive properties and whose chemical structure is close to the BCP 1. In that case, no changes of the NR fluorescence emission spectra were detected under irradiation at 794 nm (Fig.3e). This result further points out that the release of NR accompanying the disruption of the micelles of BCP 1 is only due to the photohydrolysis of the coumarin 2 under NIR irradiation.

In summary, this new BCP carrying coumarin groups on the hydrophobic block shows potential as an NIR light-sensitive nanocarrier with interesting features. The disruption of micelles under irradiation (one-photon UV or two-photon NIR) leads to the release of both pre-loaded Nile Red and photo-cleaved coumarin molecules 2 from the hydrophobic micelle core into aqueous solution, with the two dyes displaying opposite changes in their fluorescence emission intensity.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online on ((will be filled in by the editorial staff))

Keywords: photochemistry · block copolymers · encapsulation · photocontrollable release · micelles

- [1] E. R. Gillies, J. M. J. Frechet, *Chem. Commun.* **2003**, 1640-1641.
- [2] E. G. Bellomo, M. D. Wyrsta, L. Pakstis, D. J. Pochan, T. J. Deming, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 244-248.
- [3] Y. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4640-4643.
- [4] S. Liu, S. P. Armes, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17982-17983.
- [5] Y. Li, W. Du, G. Sun, K. L. Wooley, *Macromolecules* **2008**, *41*, 6605-6607.
- [6] J. E. Chung, M. Yokoyama, T. Okano, *J. Control. Release* **2000**, *65*, 93-103.
- [7] C. M. Schilli, M. Zhang, E. Rizzardo, S. H. Thang, Y. K. Chong, K. Edwards, G. Karlsson, A. H. E. Muller, *Macromolecules* **2004**, *37*, 7861-7866.
- [8] S. Qin, Y. Geng, D. E. Discher, S. Yang, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2905-2909.
- [9] J. Rodriguez-Hernandez, F. Checot, Y. Gnanou, S. Lecommandoux, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 712-724.
- [10] G. Wang, X. Tong, Y. Zhao, *Macromolecules* **2004**, *37*, 8911-8917.
- [11] X. Tong, G. Wang, A. Soldera, Y. Zhao, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 20281-20287.
- [12] J. Jiang, X. Tong, Y. Zhao, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8290-8291.
- [13] J. Jiang, X. Tong, D. Morris, Y. Zhao, *Macromolecules* **2006**, *39*, 4633-4640.
- [14] H. Lee, W. Wu, J. K. Oh, L. Mueller, G. Sherwood, L. Peteanu, T. Kowalewski, K. Matyjaszewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2453-2457.
- [15] X. Liu, M. Jiang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3846-3850.
- [16] W. Su, Y. Luo, Q. Yan, S. Wu, K. Han, Q. Zhang, Y. Gu, Y. Li, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 1251-1256.

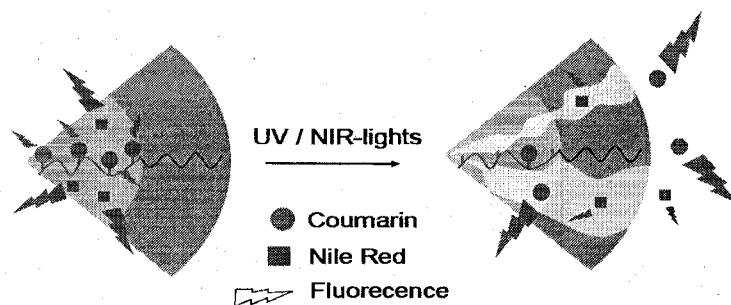
-
- [17] K. Han, W. Su, M. Zhong, Q. Yan, Y. Luo, Q. Zhang, Y. Li, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1866-1870.
- [18] C. J. F. Rijcken, O. Soga, W. E. Hennink, C. F. van Nostrum, *J. Control. Release* **2007**, *120*, 131-148.
- [19] X. Jiang, C. A. Lavender, J. W. Woodcock, B. Zhao, *Macromolecules* **2008**, *41*, 2632-2643.
- [20] J. Jiang, B. Qi, M. Lepage, Y. Zhao, *Macromolecules* **2007**, *40*, 790-792.
- [21] J. Babin, M. Lepage and Y. Zhao, *Macromolecules*, **2008**, *41*, 1246-1253.
- [22] a) A. P. Goodwin, J. L. Mynar, Y. Ma, G. R. Fleming, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 9952-9953; b) J. L. Mynar, A. P. Goodwin, J. A. Cohen, Y. Ma, G. R. Fleming, J. M. J. Fréchet, *Chem. Commun.* **2007**, 2081-2082.
- [23] A. G. Skirtach, A. A. Antipov, D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **2004**, *20*, 6988-6992.
- [24] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1193-1200
- [25] O. D. Fedoryak, T. Dore, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419-3422.
- [26] V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geibler, D. Lorentz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf, B. Wiesner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7887-7891.
- [27] M. Pelletier, J. Babin, L. Tremblay, Y. Zhao, *Langmuir* **2008**, *24*, 12664-12670.

Entry for the Table of Contents

Two-Photon Release

Jérôme Babin, Maxime Pelletier, Martin Lepage, Jean-François Allard, Denis Morris, Yue Zhao* ___ Page – Page

A New Two-Photon Sensitive Block Copolymer Nanocarrier ((Title Text))



Micelles of a new amphiphilic block copolymer carrying coumarin groups are sensitive to near infrared light via two-photon absorption of the chromophore. Their disruption under 794 nm irradiation results in release of both photo-cleaved coumarin and encapsulated Nile Red from the hydrophobic core of micelle into aqueous solution, giving rise to opposite changes in fluorescence emission intensity.

Supporting information

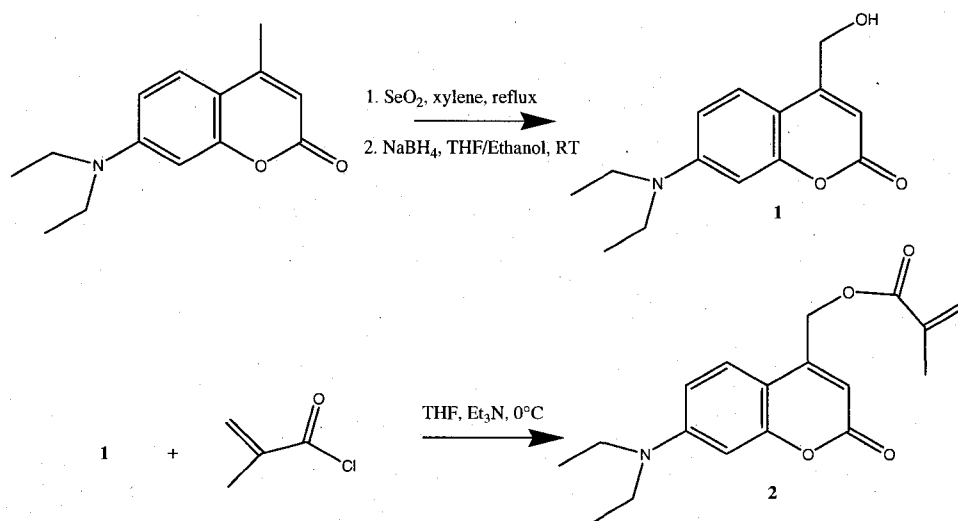
A New Two-Photon Sensitive Block Copolymer Nanocarrier

Jérôme Babin, Maxime Pelletier, Martin Lepage, Jean-François Allard, Denis Morris, Yue Zhao*

Département de chimie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1K2R1 (Canada)

1) Synthesis and Characterization of Diblock Copolymer.

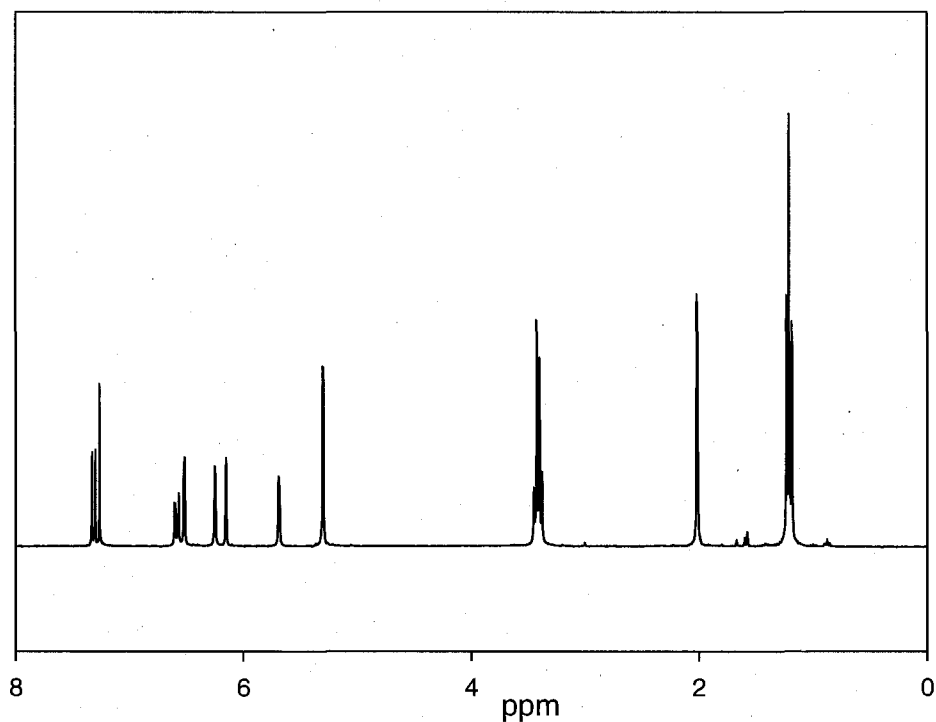
Materials. Tetrahydrofuran (THF, 99 %) was distilled from sodium benzophenone. Triethylamine (99%) was distilled over KOH. Sodium borohydride (NaBH_4 , 98%), selenium dioxide (99.8%), 7-diethylamino-4-methylcoumarin (99%), Copper(I) bromide (CuBr , 98%), N,N,N',N',N'' -pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA, 99%), and methacryloyl chloride (97%) were purchased from Aldrich and used as received. Poly(ethylene Oxyde) macroinitiator ($\text{PEO}_{112}\text{-Br}$) with the number average molecular weight of $5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ was prepared according to the literature methods.



Scheme S1: Synthetic route to the coumarin monomer 2

Synthesis of 7-N,N-Diethylamino-4-hydroxymethylcoumarin (1). In a 500 mL round-bottom flask flamed and dried under vacuum, the 7-diethylamino-4-methylcoumarin (20g, 8.64×10^{-2} mol) was dissolved in hot xylene (150 mL) along with selenium dioxide (13.4 g, 1.2×10^{-1} mol) After stirring for 16 h at reflux, the insoluble black selenium dioxide was removed by filtration, and most of the solvent was removed by rotary evaporation. The residue was dissolved with 150 ml of a dry ethanol/THF mixture (1:1; v:v) and 3.86 g (8.64×10^{-2} mol) of NaBH₄ was added slowly. After 4 h excess of NaBH₄ was carefully hydrolyzed with 1 M HCl (20 mL). Most of the organic solvent mixture was evaporated, the residue was diluted with CH₂Cl₂ and washed three times with aqueous K₂CO₃ solution. The organic phase was separated, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The pure product (**1**) was recovered by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/acetone 5:1). *R_f* 0.27 (hexane/EtOAc 1:2). Yield = 48 %. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.30 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.27 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H), 4.82 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 3.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

Synthesis of 7-(diethylamino)coumarin-4-yl]methyl methacrylate (2). In a 125 mL round-bottom flask flamed and dried under vacuum, the 7-N,N-Diethylamino-4-hydroxymethylcoumarin (**1**) (2.4g, 1×10^{-3} mol) was dissolved in dry THF (50 mL) along with triethylamine (4 mL, 3×10^{-3} mol). A solution of methacryloyl chloride (1.5 mL, 1.25×10^{-3} mol) in THF (20 mL) was added dropwise at 0°C over a period of 10 min. After stirring for 4 h at room temperature, the resulting insoluble amine hydrochloride salt was removed by filtration, and most of the THF solvent was removed by rotary evaporation. The residue was dissolved with dichloromethane and extracted three times with a K₂CO₃ water solution. The organic phase was separated, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness. Finally, after recrystallization in hexane and vacuum drying, the coumarin based monomer (**2**) was obtained. Yield = 92 %. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.30 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.27 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 5.7 (s, 1H), 5.3 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 3.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2 (s, 3H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).



Synthesis poly(ethylene oxide)-*b*-poly([7-(diethylamino)coumarin-4-yl]methyl methacrylate) PEO-*b*-PDEACMM block copolymer. A round-bottom flask flamed and dried under vacuum, was charged

with 0.004 g (2.5×10^{-5} mol) of CuBr, 5.3 μ L (2.5×10^{-5} mol) of PMDETA, 1 mL of THF, 0.063 g (1.3×10^{-5} mol) of PEO₁₁₂-Br, 0.200 g (6.35×10^{-4} mol) of monomer (2) under N₂ atmosphere. The reaction mixture was degassed by three freeze-pump-thaw cycles, back filled with N₂. After 24 h polymerization at 60°C. The reaction was cooled with liquid nitrogen and the contents were diluted in THF. The reaction mixture was then passed through a column of neutral alumina to remove the copper salts. The polymer was precipitated twice from an excess of cold pentane, filtered, and dried at 25 °C under vacuum for 24 h. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.30 (, 1H),

6.55 (1H), 6.46 (d, 1H), 6.27 (1H), 5.3 (2H), 3.6 (4H), 3.39 (4H), 2 (3H), 1.19 (6H).. SEC (THF): $M_n = 11\ 000\ \text{g mol}^{-1}$, $M_w/M_n = 1.25$.

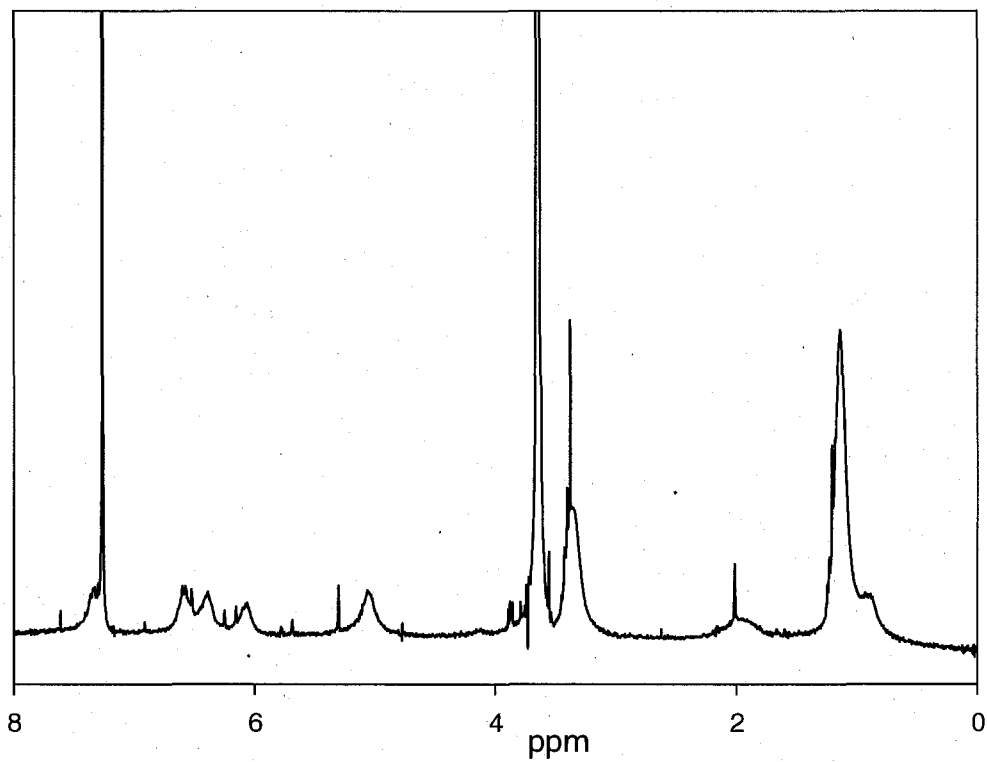


Figure S2 : ^1H NMR spectra of PEO-*b*-PDEACMM block copolymer in CDCl_3 .

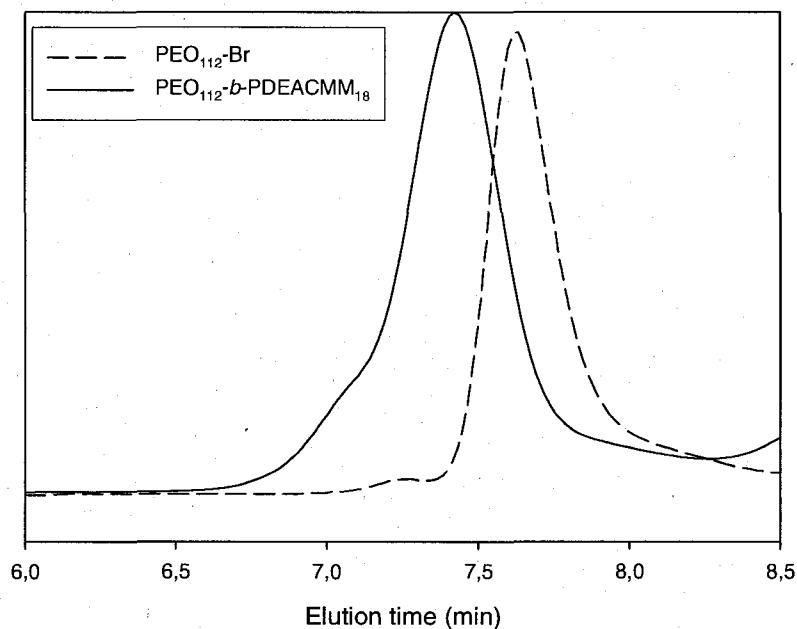


Figure S3 : SEC of PEO112 macroinitiator and PEO-b-PDEACMM block copolymer.

2) Characterizations ¹H NMR spectra were recorded at room temperature on a Bruker spectrometer (300 MHz, AC 300). UV-vis absorption and fluorescence emission spectra were recorded on the Varian spectrophotometers of Cary 50 and Cary Eclipse, respectively. Size exclusion chromatography (SEC) measurements were performed using a Waters system equipped with a refractive index detector (RI 410), a photodiode array detector (PDA 996) and one column (Styragel 5HE 7.8 mm * 300 mm). The eluent used was tetrahydrofuran (elution rate, 1 mL min⁻¹) at 40°C. SEC was calibrated using polystyrene standards. Micellar aggregates were examined using a Hitachi S-4700 Field-Emission-Gun SEM operating at 3 kV. The samples were prepared by casting a drop of micellar solution, either before or after irradiation, on a silicon wafer, followed by drying at room temperature. Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed on a Brookhaven goniometer (BI-200) equipped with a high sensitive avalanche photodiode detector (Brookhaven, BI-APD), a digital correlator (Brookhaven, TurboCorr) that calculates the photon intensity autocorrelation function $g^2(t)$ and a helium-neon laser ($\lambda = 632.8$ nm). The hydrodynamic diameter (D_H) and polydispersity (PDI) values of the aggregates were obtained by a cumulant and CONTIN analysis.

To study the photoinduced dissociation of polymer micelles and the release of encapsulated NR, UV irradiation of variable intensities was obtained from a UV-vis spot curing system (Novacure) combined with a 365 nm filter. Unless otherwise specified, for the UV-vis absorption 50 μ L of micellar solution was diluted with 0.5 mL of water and for the fluorescence emission, 0,6 ml of the micellar solution was placed in a microcuvette. The solution was exposed to UV light under stirring, having a spot size of 1 cm², applied vertically from the top of the cuvette. In the case of two-photon absorption of near-infrared light, 80 fs pulses at 794 nm and at a repetition rate of 1 kHz was produced by a Ti:Sa regenerative amplifier. The excitation spot diameter was lightly focalized to about 1 mm and nearly constant over the length of the microcuvette, in which 0.3 mL of micellar solution was placed. The excitation spot diameter was about 1 mm and nearly constant over the length of the microcuvette, in which 0.3 mL of micellar solution was placed. The power was fixed at 0.35 W, which corresponds to an energy density of 44.5 mJ cm⁻². The solution was stirred with a magnetic bar along the irradiation time.

3) Preparation of Aqueous Micellar Solutions with or without Loaded NR. The samples of PEO-*b*-PDEACMM block copolymer synthesized for this study are insoluble directly in water. Therefore, the conventional “dialysis” method of preparing aqueous micellar solutions was utilized. A sample was first dissolved in THF, which is a good solvent for both PEO and PDEACMM, and water was then added slowly to the THF solution to induce the formation of micelles with a hydrophobic PDEACMM core and a hydrophilic PEO shell; finally, THF was completely removed through dialysis of the micellar solution against water, resulting in an aqueous solution of PEO-*b*- PDEACMM micelles. The loading of the hydrophobic dye NR was easily achieved using the same method, only, in this case, both NR and a PEO-*b*-PDEACMM sample were dissolved in THF prior to the addition of water; while upon micelle formation when water was mixed with THF, an amount of NR could be solubilized by the hydrophobic PDEACMM core. The NR-loaded micelles in aqueous solution were prepared as follows. PEO₁₁₂-*b*- PDEACMM₁₈ (5 mg) was dissolved in dry THF (5 mL); the solution was then mixed with a THF solution of NR (25 μ L, 0.2 mg mL⁻¹). Under vigorous stirring, 5 mL of water was added slowly (about 25 μ L over every 30 s) to the THF solution of polymer and NR, which was followed by quick addition of another 1 mL of water at the end. The solution was stirred for 1 h at

room temperature before being placed in a dialysis bag (Spectrum, MWcutoff 3500) for dialysis against water for three days (water was frequently refreshed); unloaded NR, precipitated in water, was removed through microfiltration (0.45 μm cellulose acetate membrane).

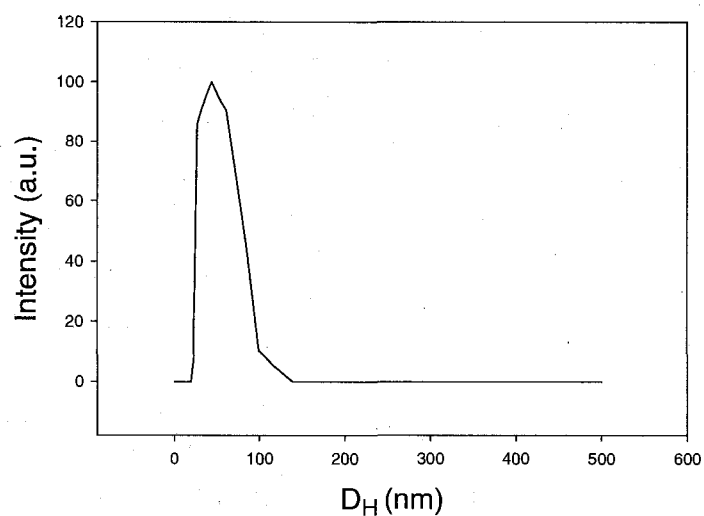


Figure S4 : Dynamic Light Scattering measurement of block copolymer micelles of **1** in aqueous solution;

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Les systèmes micellaires étudiés ont montré une augmentation de la sensibilité face à leurs stimulus respectifs. Dans le premier cas, les micelles de PEO-*b*-PThPMA ont un mode d'action différent des systèmes micellaires basés sur la LCST d'un des blocs du copolymère. En effet, le mécanisme de relâchement des molécules encapsulées fait intervenir trois événements simultanément. Au départ, avec la chaleur, les micelles gonflent et l'eau vient en contact avec le Nile Red contenu dans le cœur des micelles. Ceci fait diminuer l'intensité de la fluorescence du Nile Red, car il n'est pas soluble dans l'eau. En même temps, l'hydrolyse des groupements THP se développe, ce qui provoque avec le temps, la déstabilisation et la dissolution des micelles. La dissolution se reflète par une diminution de l'intensité de la lumière diffusée. Pour la première fois, nous avons suivi trois événements simultanément, et montrer que leurs cinétiques étaient similaires. En augmentant la température de la solution de 37°C à 80 °C, la dissolution des micelles et le relargage des molécules encapsulées sont accélérés. À une température plus élevée, la réaction d'hydrolyse des groupements THP est plus rapide, ce qui accélère les cinétiques. La MEB nous a permis de confirmer les résultats de diffusion dynamique de la lumière. Il est important de noter que les micelles ne sont plus en solution lors de l'analyse, car l'échantillon doit être séché avant de l'introduire dans le microscope. Au départ, les micelles sont bien définies et leur taille est d'environ 70 nm. Par contre, après 100 min à 80 °C, il y a la formation de très larges agrégats (>500 nm). En chauffant, les micelles gonflent, sont de plus en plus diffuses et en séchant, les micelles se fusionnent pour former les larges agrégats.

De plus, il est possible de modifier la vitesse de relargage en variant différents paramètres du système. Tout d'abord, en augmentant la longueur du bloc PThPMA, la vitesse est moins rapide. Prenons l'exemple PEO₁₁₂-*b*-PThPMA₁₆₄ comparativement à PEO₁₁₂-*b*-PThPMA₂₄, l'hydrolyse

d'un groupement THP sur 24 pourrait déplacer plus rapidement la balance hydrophile/hydrophobe, déstabilisant les micelles, que l'hydrolyse d'un groupement sur 164 dans le cas du plus grand bloc PTHPMA. Aussi, des séries de mesures en variant le pH ont été faites et ont prouvé que la vitesse de relargage du Nile Red accélérât au pH plus acide. Ceci est dû au fait que l'hydrolyse des groupements THP est accélérée au pH acide et par le fait même la déstabilisation des micelles devient plus rapide. La caractérisation sous forme solide à l'aide la DSC nous a permis de voir qu'il y avait une influence mutuelle entre les deux blocs du copolymère. En effet, en polymérisant le bloc PTHPMA, la cristallisation du PEO se fait de plus en plus difficilement, ce qui se reflète par une diminution de sa température de fusion. La cristallisation est plus difficile, car la séparation de phases se fait plus difficilement avec l'allongement du bloc PTHPMA (la fraction volumique du PEO diminue).

Pour ce qui est des micelles sensibles à l'absorption à deux photons, les résultats ont montré une grande amélioration de la sensibilité. Au départ, l'étude de l'absorption d'un photon UV nous a permis de mieux comprendre l'évolution du système micellaire qui est plus complexe que le premier système. En effet, comparativement au premier, deux chromophores peuvent émettre de la fluorescence. Au départ, la molécule de coumarine est dans le cœur des micelles à proximité des molécules de Nile Red. En excitant la solution à 380 nm (excitation de la coumarine), on constate qu'il y a un transfert d'énergie non radiatif entre les molécules de coumarine et les molécules de Nile Red. Ce phénomène est dû à la superposition du spectre d'émission de la coumarine avec le spectre d'absorption du Nile Red, ainsi qu'à leur proximité dans le cœur des micelles. En irradiant la solution avec un rayonnement UV à 365 nm, il y a photolyse des esters méthyl [7-(diéthylamino)coumarine-4-yl], ce qui donne la molécule de 7-(diéthylamino)-4-(hydroxyméthyl)coumarin (hydroxycoumarine) qui est soluble dans l'eau. On a effectué un suivi de la photoréaction par spectroscopie de fluorescence. En excitant la solution à 380 nm, il y a une augmentation du signal de fluorescence de l'hydroxycoumarine et une diminution de la fluorescence du Nile Red dû à l'ouverture des micelles. En effet, lorsque les micelles sont déstabilisées, les molécules d'hydroxycoumarine ne sont plus assez près des molécules de Nile Red pour faire le transfert d'énergie non radiatif. De plus, le Nile Red vient en contact avec l'eau

ce qui fait diminuer la fluorescence, car il n'est pas soluble. Pour s'assurer que les molécules de Nile Red étaient bien en contact avec l'eau, la fluorescence de la solution micellaire excitée à 550 nm (excitation du Nile Red) a été suivie dans le temps. On a remarqué que la fluorescence du Nile Red diminuait avec le temps d'irradiation, ce qui démontre bien son relargage dans l'eau.

L'intensité d'irradiation fait aussi varier la vitesse de relargage du Nile Red. En augmentant l'intensité de 120 mW cm^{-2} à 500 mW cm^{-2} , le temps pour réduire la fluorescence de moitié passe de 20 min à 7 min. Une intensité plus élevée amène plus de photons par unité de surface et par unité de temps, ce qui favorise la photoréaction des groupements de coumarine. Nous avons vérifié la sensibilité et l'évolution du système micellaire en faisant des courtes irradiations (10 s, 30 s, 60s) et en laissant le système revenir à l'équilibre pendant 15 min. Le suivi de la fluorescence du Nile Red a permis de constater qu'il était possible de libérer une petite quantité de Nile Red et d'accroître la libération graduellement à l'aide de courtes irradiations successives. De plus, l'expérience a permis de montrer qu'il y avait une restructuration des micelles avec le temps entre deux irradiations menant à une augmentation de la fluorescence du Nile Red.

Comme il est mentionné plus haut, une caractéristique intéressante du système est que la molécule clivée par la photolyse est soluble dans l'eau et fluorescente. Cette molécule pourrait être utilisée comme sonde pour l'irradiation. En effet, en suivant l'augmentation de la fluorescence de la partie irradiée, il serait possible de faire un lien entre l'intensité de fluorescence émise et la quantité des molécules libérées. En utilisant une capsule possédant une membrane de dialyse, remplie de la solution micellaire, et mise en contact avec de l'eau, on a démontré qu'il était possible de suivre la déstabilisation des micelles. Avec le temps d'irradiation, il y a une plus grande quantité d'hydroxycoumarine produite, augmentant ainsi l'intensité de la fluorescence dans la cuvette remplie d'eau.

Pour les expériences à deux photons, nous avons utilisé un laser Ti:sapphire femto seconde (80 fs) à 794 nm avec un taux de répétition de 1 KHz. Il est important de noter que le faisceau a été légèrement focalisé et que le diamètre du laser était de 1 mm. L'évolution des spectres de

fluorescence suit la même évolution que les résultats préalablement obtenus avec l'absorption d'un photon UV. Il y a une augmentation de la fluorescence due au clivage de la molécule de 7-(diéthylamino)-4-(hydroxyméthyl)coumarine et une diminution de la fluorescence du Nile Red dû à son relargage dans l'eau. Les photos de MEB ont montré que les micelles étaient beaucoup plus diffuses après l'irradiation à 794 nm, ce qui nous indique qu'il y a bien eu déstabilisation et dégradation de celles-ci. Les résultats obtenus avec un grand volume de la solution micellaire et un laser qui était peu focalisé, démontrent bien que le système que nous avons développé est plus sensible à l'absorption de deux photons dans l'infrarouge que celui du nitrobenzyl.

CONCLUSION

Conclusion

Les deux études sur les micelles sensibles aux stimulus présentées dans ce mémoire représentent des avancements dans leur domaine respectif. Dans un premier temps, les micelles de copolymère PEO-*b*-PTHPMA sensibles à la température d'hydrolyse sont une bonne alternative aux micelles thermosensibles basées sur la LCST d'un des blocs du copolymère. Cette étude montre qu'il est possible de varier la cinétique de relâchement d'un composé préalablement encapsulé en variant le pH de la solution et en faisant varier la longueur du bloc PTHPMA. Pour la première fois, le suivi de trois événements a été fait simultanément. La dissolution des micelles, l'hydrolyse des groupements de THPMA et le relargage du Nile Red progressent en suivant une cinétique similaire.

Dans un deuxième temps, les micelles de copolymère à blocs PEO-*b*-PDEACMM ont montré une plus grande sensibilité à l'absorption à deux photons dans le proche infrarouge. La photolyse des groupements de coumarine peut être activée par un rayonnement UV (365 nm, absorption un photon) ou un rayonnement infrarouge (794 nm, absorption à deux photons). Une intensité d'irradiation plus élevée augmente la vitesse de relâchement des molécules préalablement encapsulées. De plus, la déstabilisation du système avec un temps d'irradiation court se fait rapidement, et est suivie d'un rééquilibrage du système. Le clivage de la molécule de coumarine à l'intérieur du cœur des micelles menant à la déstabilisation des micelles a été prouvé. Pour ce qui est de l'absorption à deux photons dans le proche infrarouge à 794 nm, ce nouveau copolymère à base de coumarine est plus efficace que le copolymère à base de nitrobenzyl.

Perspectives

Toujours dans le but d'améliorer les caractéristiques des systèmes, deux actions peuvent être entreprises. Dans un premier temps, la synthèse de trois nouveaux copolymères dérivés du copolymère à blocs PEO-*b*-PThPMA a été faite (figure 9). Il serait intéressant de voir l'effet de la structure du bloc hydrophobe sur la vitesse d'hydrolyse des groupements et la déstabilisation des micelles. Certains systèmes demandent une hydrolyse lente et constante, alors que pour d'autres systèmes, il est préférable que le relâchement soit rapide.

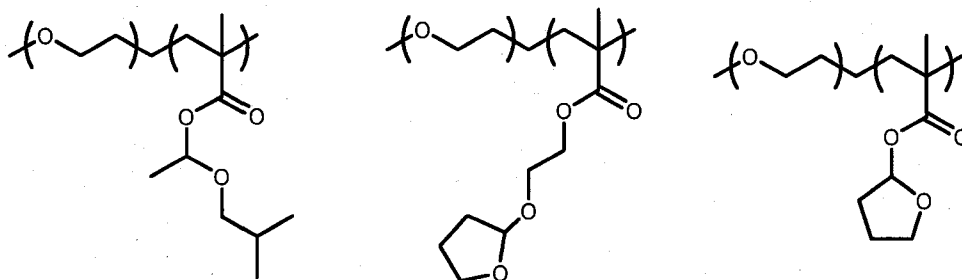


Figure 9 : Nouveaux copolymères dérivés du PEO-*b*-PThPMA

De plus, il serait intéressant d'incorporer dans le cœur des micelles un composé qui peut générer de la chaleur en absorbant des photons. Un exemple est le Quantum 830 qui est utilisé en photolithographie. Un substrat sur lequel est déposé un film d'un polymère portant des groupements THP hydrophobes, dans lequel le Quantum 830 est incorporé, est irradié avec un laser. En absorbant l'énergie, la molécule est excitée et elle génère de la chaleur. La chaleur déprotège les fonctions hydrophobes PThPMA laissant une fonction alcool polaire. En trempant le substrat dans le MeOH, les parties hydrophiles sont enlevées laissant un patron hydrophobe (figure 10) (32) En utilisant le même principe, il serait intéressant de voir s'il est possible de déstabiliser les micelles non pas en chauffant la solution, mais en l'irradiant avec un laser.

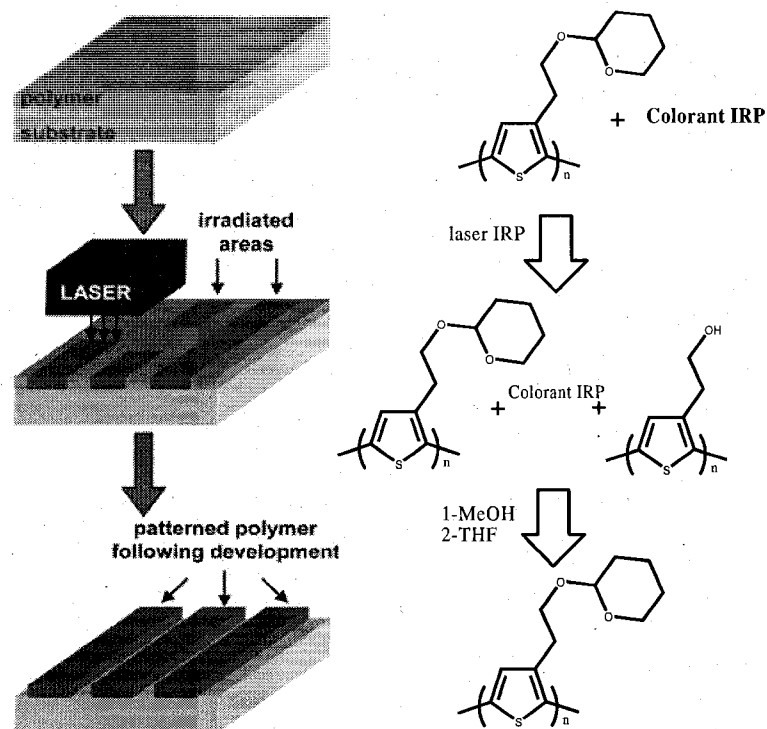


Schéma 3 : Photolithographie d'un homopolymère contenant un groupement THP

Les deux projets se rejoignent sur ce point. En effet, le Quantum 830 absorbe un photon à 810 nm pour générer de la chaleur. Le système PEO-*b*-PDEACMM doit absorber deux photons simultanément pour provoquer la déstabilisation des micelles, ce qui nécessite un laser femto seconde puissant pour avoir une intensité suffisante de photons sur la molécule pour provoquer l'excitation. L'utilisation d'une molécule qui absorbe seulement un photon permet d'utiliser des lasers diodes plus accessibles et moins dispendieux. En combinant le copolymère le plus sensible à la chaleur avec l'encapsulation du Quantum 830, on aurait possiblement la première micelle sensible à l'infrarouge proche par l'absorption d'un photon.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ <http://pr2008.bvdep.com/version-1/pr1.asp>, consultation août 2008
- ² M. W. MATSEN, *J. Phys.: Condens. Matter*, 14, R21 (2002)
- ³ F. S. BATES, G. H. FREDRICKSON, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 41, 525 (1990)
- ⁴ C. ALLEN, D. MAYSINGER, A. EISENBERG, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 16, 3 (1999)
- ⁵ H. BADER, H. RINGSORF, B. SCMDT, *Angew. Makromol. Chem.*, 123, 457 (1984)
- ⁶ T. M. ALLEN et P. R. CULLIS, *Science*, 303, 1818 (2004)
- ⁷ G. HELMLINGER, F. YUAN, M. DELLIAN et R.K Jain, *Nat. Med.*, 3, 177 (1997)
- ⁸ I.F. TANNOCK et D. ROTIN, *Cancer Res.*, 49, 4373 (1989)
- ⁹ X. ZHANG, R. ZHUO, Y. YANG, *Biomaterials*, 26, 1313 (2002)
- ¹⁰ M. D. C. TOPP, P. J. DIJKSTRA, H. TALSMA, J. FEIJEN, *Macromolecules*, 30, 8518 (1997)
- ¹¹ J. E. CHUNG, M. YOKOYAMA, T. OKANO, *J. Controlled Release*, 65, 93, (2000)
- ¹² C. M. SCHILLI, M. ZHANG, E. RIZZARD, S. H. THANG, Y. K. CHONG, K. EDWARDS, G. KARLSSON, A. H. E. MULLER, *Macromolecules*, 37, 7861 (2004)
- ¹³ D. NERADOVIC, C. F. VAN NOSTRUM, W. E. HENNINK, *Macromolecules*, 34, 7589 (2001)
- ¹⁴ V. P. SANT, D. SMITH, J. C. LEROUX, *J. Control. Release*, 97, 301 (2004)
- ¹⁵ O. SOGA, C. F. VAN NOSTRUM, A RAMZI, T. VISSER, F. SOULIMANI, P. M. FREDERIK, P. H. H. BOMANS, W. E. HENNINK, *Langmuir*, 20, 9388 (2004)
- ¹⁶ M. HRUBY, C. KONAK, K. ULBRICH, *J. Control. Release*, 103, 137 (2005)
- ¹⁷ G. WANG, X. TONG, Y. ZHAO, *Macromolecules*, 37, 8911 (2004)
- ¹⁸ X. TONG, G. WANG, A. SOLDERA, Y. ZHAO, *J. Phys. Chem. B*, 109, 20281 (2005)
- ¹⁹ G. MAYER, A. HECKEL, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 4900 (2006)
- ²⁰ J. JIANG, X. TONG, Y. ZHAO, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 8290 (2005)
- ²¹ J. JIANG, X. TONG, D. MORRIS, Y. ZHAO, *Macromolecules*, 39, 4633 (2006)
- ²² R. WEISSLEDER, *Nature Biotechnology*, 19, 316 (2001)
- ²³ O. NAKAMURA, *Microscopy Reasearch and Technique*, 47, 165 (1999)

-
- ²⁴ T. ECKARDT, V. HAGEN, B. SCHADE, R. SCHMIDT, C. SCHWEITZER, J. BENDIG, J. Org. Chem, 67, 703 (2002)
- ²⁵ E. B. BROWN, J. B. SHEAR, S. R. ADAMS, R. Y. TSIEN, W. W. WEBB, Biophysical Journal, 76, 489 (1999)
- ²⁶ E. BROWN, J. B. SHEAR, S. R. ADAMS, R. Y. TSIEN, W. WEBB, Biophys. J., 76, 489 (1999)
- ²⁷ T. FURUTA, A. S.-H. WANG, J. L. DANTZKER, T. M. DORE, W. J. BYBEE, E. M. CALLAWAY, W. DENK, R. Y. TSIEN, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 1193 (1999)
- ²⁸ B. SCHADE, V. HAGEN, R. SCHMIDT, R. HERBRICH, E. KRAUSE, T. ECKARDT, J. BENDIG, J. Org. Chem., 64, 9109 (1999)
- ²⁹ R. SCHMIDT, D. GEISSLER, V. HAGEN, J. BENDIG, J. Phys. Chem. A, 111, 5768 (2007)
- ³⁰ M. SKWARCZYSKI, M. NOGUCHI, S. HIROTA, Y. SOHMA, T. KIMURA, Y. HAYASHI, Y. KISO, Bioorg. Med. Chem. Lett., 16, 4492 (2006)
- ³¹ J. E. KEARNS, C. D. McLEAN, D. H. SOLOMON, J. Macromol. SCI.-CHEM., A8, 673 (1974)
- ³² T. J. GORDON, J. YU, C. YANG, S. HOLDCROFT, Chem. Mater., 19, 2155 (2007)