



HAL
open science

Nanoparticules polymères de deuxième et troisième générations pour des applications thérapeutiques anti-cancer et anti-HIV

Maxime Laville

► **To cite this version:**

Maxime Laville. Nanoparticules polymères de deuxième et troisième générations pour des applications thérapeutiques anti-cancer et anti-HIV. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0023 . tel-01749420

HAL Id: tel-01749420

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749420>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

NANOPARTICULES POLYMERES DE DEUXIEME ET TROISIEME GENERATIONS

POUR DES APPLICATIONS THERAPEUTIQUES ANTI-CANCER ET ANTI-HIV

Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire (LCPM) - Nancy

Ecole doctorale Ressources Procédés et Produits de l'Environnement (RP2E) - Nancy

Pour le grade de Docteur de l'Université de Lorraine

Maxime LAVILLE

2013

Soutenue publiquement le 22-02-2013

Jury de soutenance

Rapporteurs:

Jacques DESBRIERES

Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour

Luc PICTON

Professeur, Université de Rouen

Examineurs:

Michèle REBOUD

Professeur, Université Pierre et Marie Curie

Cécile HUIN

Maître de Conférences, Université Évry-val-d'Essonne

Jérôme BABIN

Maître de Conférences, Université de Lorraine

Jean-Luc SIX

Professeur, Université de Lorraine

Michèle LEONARD

Directrice de thèse, Chargée de Recherche CNRS

Régis VANDERESSE

Co-directeur de thèse, Chargé de Recherche CNRS

Remerciements

Je souhaiterais remercier en premier lieu tous les membres du jury pour avoir accepté de faire partie de ce travail par leur regard extérieur. Merci également aux rapporteurs pour avoir accepté de consacrer de leur temps pour la lecture de ce manuscrit.

Durant ma thèse j'ai pu assister au changement de directeur du LCPM, aussi je remercie Brigitte Jamart de m'avoir accueilli au sein du LCPM et Alain Durand pour avoir soutenu mon travail par la suite.

Mes remerciements vont également à mes directeurs de thèse Michèle Léonard et Régis Vanderesse pour m'avoir proposé ce sujet par le biais duquel j'ai énormément appris au niveau scientifique mais également au niveau personnel.

Ce travail n'aurait jamais pu se faire sans l'aide précieuse des permanents du laboratoire. Je pense plus particulièrement à Cécile, Carole et Jérôme. Jérôme sans qui je n'aurais jamais appris autant à la paillasse! Le jeune Padawan te remercie pour ton aide, tes conseils et ta bonne humeur!

Merci à Isabel, Mélanie et Clémence. Outre le plaisir de n'avoir que des jeunes femmes pour stagiaires, leur sympathie et leur sérieux m'a été très important pour beaucoup de manipulations notamment sur le travail de la Chimie-Click. Je leur souhaite beaucoup de bonnes choses pour la suite de leur vie professionnelle!

Des incantations magiques réalisées pour notre Jésus national (Jean-Claude) et ses réparations d'appareils - pour Marie-Christine et la réalisation des tests de viscosimétrie, SEC et autres toujours demandés à la dernière minute par les thésards- pour Olivier et la réalisation de centaine de spectres RMN - pour Mathilde et les synthèses de peptides réussies - les aides administratives toujours impossibles (Jeanine et Amélie, ainsi que Dominique avant son départ). Voilà le quotidien de ceux qui nous soutiennent dans notre travail qui serait bien plus compliqué sans eux! Merci à vous.

Un laboratoire vit et vivra toujours au son de ses thésards et post-docs, mais c'est aussi grâce à eux que j'ai beaucoup appris et que je n'ai aucun regret d'avoir réalisé cette thèse. Je ne pourrais jamais oublier nos soirées aux Berthom's, ces parties pocker avec le fils illégitime de Magnum, ces repas du midi avec Miss Bogota et sa boîte à déjeuner HelloKitty et nos aller-retour au kébab, ainsi les magnifique Rudismes qui nous ont fait rire à pleurer. Merci à Charlotte, Hervé, Rudy, Mélanie, Johanna, Ludovic, Khalid, Hicham, Jin pour votre présence, votre aide et surtout votre amitié! J'espère pouvoir garder contact avec vous et attend avec impatience la prochaine soirée Berthom's !!!

Je n'aurais jamais pu terminer cette thèse sans le soutien de mes proches, familles, amis et miss. Je ne rentrerai pas en détails, les remerciements à ces personnes n'ont pas leur place dans ce manuscrit, mais qu'ils sachent que je leur suis énormément reconnaissant d'avoir été à mes côtés et surtout d'y être resté !!!! Car une thèse et sa rédaction peuvent faire de vous une des personnes les plus détestables dans les périodes de "mauvais résultats"!!!

Je souhaitais ensuite terminer ces remerciements par la personne qui m'a fait connaître ce laboratoire ainsi que ce sujet de thèse. Vous m'avez supporté en tant qu'élève à l'EEIGM, en tant que thésard dans votre équipe et en tant que thésard officieux. Merci d'avoir supporté ma tête dure, ma mauvaise foi, mes râleries quotidiennes, mes mots de mécontentement sur tous les murs du laboratoire, mes résultats "pas toujours" explicables et surtout, surtout, merci d'avoir supporté pour un temps ma façon de rédiger.

Vous m'avez aidé pour mon entretien d'embauche, m'avez soutenu lorsque j'ai pris un travail en parallèle de la rédaction et n'avez jamais lâché le morceau durant la rédaction malgré la quantité de travail que cela vous a rajouté. Sachez que je suis conscient de l'aide que vous avez pu m'apporter alors que vous aviez, et de loin, bien d'autres préoccupations. Ce manuscrit n'aurait jamais été terminé sans vous.

Merci Jean-Luc !

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AE : Acétate d'éthyle
AlEt₃ : triéthylaluminium
Al(O-iPr)₃ : triisopropylate d'aluminium
ARN : Acide ribonucléique
BAP : 2,2-bis(azidométhylène)-1,3-propanediol
BSA : Albumine de sérum bovin (Bovin Serum Albumin)
CDCl₃ : Chloroforme deutérié
CDI : carbonyldiimidazole
CMC : concentration micellaire critique
DexC6-n : avec (n) le taux de substitution défini comme le nombre de chaînes aliphatiques greffées sur 100 unités glucosidiques
DLVO (théorie): Théorie par Derjaguin et Landau (1941) et Verwey et Owerbeek (1948)
DMSO: diméthylsulfoxyde
DMSO-d₆ : Diméthylsulfoxyde deutérié
DMF: N,N-diméthylformamide
DO : densité optique
DP_n : Degré de polymérisation en nombre
DS : degré de substitution
EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EPO : érythropoïétine
FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine
HAART: High Activity Antiretroviral Therapy
HPLC: Chromatographie Liquide haute pression (High Pressure Liquid Chromatographie)
HPPS: High performance particles sizer
K_{id}: Constante d'inhibition de la dimérisation
MEB : Microscope Electronique à Balayage
 \overline{M}_n et \overline{DP}_n : Masse molaire moyenne en nombre et Degré de polymérisation moyen en nombre
MPEO: Monométhoxypoly(oxyde d'éthylène)
MTT (Sel de tétrazolium): bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MWCO : Molecular Weight Cut Off
NHS: N-hydroxysuccinimide
NRP1 : Neuropiline 1 - Corécepteur de VEGF
ONUSIDA : Programme Commun des Nations Unies sur le Syndrome de l'immunodéficience acquise
PA : Principe Actif
PAA : Acide polyacrylique
PAMAM : Dendrimère de Poly(amido amine)
PBCA : Poly(cyanoacrylate de butyle)
PBS : Tampon Phosphate salin (Phosphate Buffered Saline)
PCL : Poly(ε-caprolactone)
PDI : indice de polydispersité

PDT : Thérapie photodynamique
PEG : Poly(éthylène glycol)
PEHA: pentaéthylènehexamine
PHA : Poly(3-hydroxyalkanoate)
PHEMA : poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle)
PICBA: Poly(indène-C60) bisadduct
PLA : Poly(D,L-lactide)
PLGA: Poly(D,L-lactide-co-glycolide)
POC : Polymérisation par ouverture de cycle
POEGMEMA : Poly(méthacrylate d'oligo-(éthylène glycol)méthyléther)
PS : Photosensibilisateur
PVA : Poly(alcool vinylique)
PVDF : Poly(fluorure de vinylidène)
RAFT : Polymérisation radicalaire contrôlée (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer).
RI : Index de Réfraction
RMN: Résonance magnétique nucléaire
SDS : dodécylsulfate de sodium
SEC : Chromatographie d'exclusion stérique
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise
SIV: simian immunodeficiency virus
Sn(Oct)₂: bis(2-éthylhexanoate d'étain)
SOP : Procédure Opératoire Standardisée
TBAOH : hydroxyde de tétrabutyl ammonium
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TIPS : triisopropyl silane
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factors
VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 1

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS	19
1.1. QU'EST CE QUE « LA VECTORIZATION D'UN PRINCIPE ACTIF » ?	19
1.1.1. <i>Définition</i>	19
1.1.2. <i>Les moyens mis en œuvre pour la vectorisation</i>	20
1.1.3. <i>L'encapsulation d'un principe actif demande beaucoup de précautions</i>	21
1.1.4. <i>Libération des principes actifs</i>	21
1.2. METHODES D'ELABORATION DES NANOPARTICULES	22
1.2.1. <i>Emulsion/évaporation de solvant</i>	23
1.2.2. <i>Nanoprécipitation par injection</i>	24
1.2.3. <i>Les nanoparticules recouvertes d'une couronne externe hydrophile</i>	25
1.2.4. <i>Elaboration de particules cœur hydrophobe/ couronne hydrophile</i>	27
1.2.4.1. Par fixation chimique de polymère hydrophile sur des particules hydrophobes.....	27
1.2.4.2. Par adsorption physique de polymères amphiphiles sur des particules hydrophobes.....	29
1.2.5. <i>Des copolymères amphiphiles peuvent former des nanoparticules cœur/ couronne</i>	31
1.2.6. <i>Nanoparticules à couronne dextrane</i>	33
1.2.6.1. Généralités sur le dextrane	33
1.2.6.2. Dérivés alkylés du dextrane.....	34
1.2.6.3. Les copolymères dextrane-g-acide polylactique	35
2. LUTTE CONTRE LE VIH-1	37
2.1. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (VIH-1)	37
2.1.1. <i>Histoire de la découverte du VIH</i>	37
2.1.2. <i>Le VIH dans le monde</i>	39
2.1.3. <i>Qu'est ce que le Syndrome de l'Immunodéficience Acquisée (SIDA) ?</i>	40
2.1.4. <i>Du VIH au SIDA</i>	40
2.1.4.1. Structure du VIH-1.....	40
2.1.4.2. Cycle cellulaire du VIH-1	41
2.1.5. <i>Structure de la protéase du VIH-1</i>	42
2.1.6. <i>Les inhibiteurs de la dimérisation de la protéase du VIH-1 : une recherche prometteuse</i> 44	
2.1.6.1. L'évolution des traitements.....	48
2.2. NANOPARTICULES DE 1 ^{ERE} ET 2 ^{EME} GENERATIONS POUR UNE VECTORIZATION EFFICACE CONTRE LE VIH-1.....	51
3. LUTTE CONTRE LE CANCER	52
3.1. LE CANCER	52
3.1.1. <i>Qu'est ce qu'un cancer ?</i>	52
3.1.2. <i>Les traitements classiques du cancer</i>	52
3.1.2.1. La chirurgie	52
3.1.2.2. La radiothérapie	52
3.1.2.3. La chimiothérapie.....	53
3.1.2.4. La Thérapie Photodynamique Anticancéreuse	54
3.1.3. <i>Description du développement tumoral</i>	55
3.1.3.1. Les facteurs angiogéniques.....	56
3.2. LES PARTICULES DE 3 ^{EME} GENERATION AU SECOURS DE LA THERAPIE ANTICANCEREUSE	57
3.2.1. <i>Particules de troisième génération</i>	57

3.2.1.1.	Réactions de Chimie-click pour fonctionnaliser une particule.....	59
3.2.1.1.1.	Fonctionnalisation par Chimie-click de type Thiol - yne / Thiol - ène.....	60
3.2.1.1.2.	Fonctionnalisation par Chimie-click de type Diels-Alder.....	62
3.2.1.1.3.	Fonctionnalisation par cycloaddition dipolaire 1,3 de Huisgen.....	62
3.2.1.1.4.	Fonctionnalisation par Chimie-click en absence de cuivre.....	68
4.	CONCLUSION	72
5.	BIBLIOGRAPHIE	74

CHAPITRE 2: SYNTHESE SES DERIVES AMPHIPHILES DU DEXTRANE

1.	LES DERIVES AMPHIPHILES DEXC₆	88
1.1.	ESTIMATION DU TAUX DE MODIFICATION PAR RMN ¹ H.....	89
1.2.	INFLUENCE DES CONDITIONS OPERATOIRES SUR LE TAUX DE MODIFICATION OBTENU.....	90
1.2.1.	<i>Effet de la quantité de 1,2-époxyoctane.....</i>	<i>90</i>
1.2.2.	<i>Effet de la quantité d'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAOH).....</i>	<i>92</i>
1.2.3.	<i>Influence de la concentration initiale en dextrane.....</i>	<i>93</i>
1.2.4.	<i>Influence de la température du milieu réactionnel.....</i>	<i>94</i>
1.2.5.	<i>Caractérisation des DexC₆ par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....</i>	<i>95</i>
1.3.	PROPRIETES TENSIOACTIVES DES DEXC ₆	96
2.	LES DERIVES AMPHIPHILES DEX-G-PLA	97
2.1.	SYNTHESE DES PRECURSEURS A LA CHIMIE-CLICK.....	98
2.1.1.	<i>DexN₃.....</i>	<i>98</i>
2.1.1.1.	<i>Caractérisation par RMN ¹H.....</i>	<i>98</i>
2.1.1.2.	<i>Caractérisation par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).....</i>	<i>101</i>
2.1.1.3.	<i>Etude de la tension superficielle.....</i>	<i>102</i>
2.1.2.	<i>PLA α-alcyne.....</i>	<i>103</i>
2.2.	SYNTHESE DES COPOLYMERES DEX-G-PLA-G-N ₃	105
2.2.1.	<i>Caractérisation des Dex-g-PLA-g-N₃.....</i>	<i>108</i>
2.2.1.1.	<i>Caractérisation par RMN ¹H.....</i>	<i>108</i>
2.2.1.2.	<i>Caractérisation par Chromatographie d'Exclusion Stérique.....</i>	<i>109</i>
2.2.1.3.	<i>Etude de la tension superficielle.....</i>	<i>112</i>
3.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	114
4.	BIBLIOGRAPHIE	115

CHAPITRE 3: ELABORATION DE NANOPARTICULES POUR L'ENCAPSULATION D'UN INHIBITEUR DE LA DIMERISATION DE LA PROTEASE DU VIH1

1.	LES COMPOSES ET PROCEDES EMPLOYES	118
1.1.	PAM-LEY, LE LIPOPEPTIDE UTILISE.....	118
1.2.	POLYMERES MIS EN JEU POUR ELABORER CES NANOPARTICULES.....	119
1.3.	PROCEDE D'EMULSION/EVAPORATION DE SOLVANT.....	119
1.4.	PROCEDE DE NANOPRECIPITATION PAR INJECTION.....	120
2.	OPTIMISATION DES NANOPARTICULES.....	121
2.1.	PROCEDE D'EMULSION/EVAPORATION DE SOLVANT.....	121
2.1.1.	<i>Effet du taux de substitution des DexC₆.....</i>	<i>122</i>
2.1.2.	<i>Influence de la sonication.....</i>	<i>123</i>

2.1.3.	<i>Influence de la concentration en tensioactif</i>	125
2.1.4.	<i>Effet du solvant organique employé</i>	128
2.1.5.	<i>Conclusion</i>	129
2.2.	PROCEDE DE NANOPRECIPITATION.....	129
2.3.	RECUPERATION ET CONDITIONNEMENT FINAL DES NANOPARTICULES.....	131
3.	CARACTERISATION DES NANOPARTICULES OBTENUES	132
3.1.	POTENTIEL ZETA.....	132
3.1.1.	<i>Principe</i>	132
3.1.2.	<i>Mise en évidence d'un recouvrement par le dextrane</i>	135
3.1.3.	<i>Epaisseur de couche hydrophile</i>	137
3.2.	STABILITE COLLOÏDALE DES PARTICULES.....	138
3.2.1.	<i>Théorie DLVO</i>	139
3.2.2.	<i>Etude de la stabilité colloïdale des particules cœur/couronne formulées</i>	142
3.3.	ETUDE DU TAUX DE RECOUVREMENT.....	146
3.4.	STABILITE COLLOÏDALE DES NANOPARTICULES EN PRESENCE DE SODIUM DODECYLE SULFATE (SDS).....	150
4.	ETUDE DE L'ENCAPSULATION DU PAM-LEY	152
4.1.	SOLUBILITE DU PAM-LEY.....	152
4.2.	ENCAPSULATION DU PAM-LEY.....	153
4.3.	ETUDE DE LA LIBERATION DU PAM-LEY.....	154
4.4.	EVALUATION BIOLOGIQUE.....	156
4.4.1.	<i>Effet des nanoparticules sur l'activité de la protéase du VIH-1 in vitro</i>	156
4.4.2.	<i>Effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire d'une lignée humaine modèle</i>	157
4.4.3.	<i>Effet des nanoparticules sur des cellules infectées par le VIH-1 ou le VIH-2</i>	157
5.	CONCLUSIONS	158
6.	BIBLIOGRAPHIE	159

CHAPITRE 4: UTILISATION DE LA CHIMIE CLICK POUR LA FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES DESTINEES AU CIBLAGE DE PRINCIPES ACTIFS DANS LA THERAPIE ANTICANCEREUSE

1.	NANOPARTICULES ELABOREES PAR UNE ETAPE DE CHIMIE-CLICK	162
1.1.	EMULSION/ EVAPORATION DE SOLVANT AVEC CHIMIE-CLICK IN SITU.....	162
1.1.1.	<i>Mise en évidence de la réaction de Chimie-click</i>	162
1.2.	CARACTERISATION DES PARTICULES PRODUITES A PARTIR DE PLA A-ALCYNE ET DE DEX-N ₃ -15.....	166
1.3.	NANOPRECIPITATION DE COPOLYMERES DEX-G-PLA-G-N ₃ PREFORMES.....	168
1.4.	CARACTERISATION DES NANOPARTICULES - COMPARAISON AVEC LES NANOPARTICULES RECOUVERTES DE DEXC ₆	169
1.4.1.	<i>Mesure de taille</i>	169
1.4.1.1.	Nanoparticules obtenues par émulsion/évaporation de solvant.....	169
1.4.1.2.	Nanoparticules obtenues par nanoprécipitation.....	170
1.4.2.	<i>Quantité de dextrane dans la particule</i>	171
1.4.2.1.	Nanoparticules obtenues par nanoprécipitation.....	172
1.4.2.2.	Nanoparticules obtenues par émulsion/évaporation de solvant.....	172
1.4.3.	<i>Potentiel Zeta</i>	173
1.4.4.	<i>Stabilité colloïdale</i>	175
1.4.5.	<i>Désorption de la couche de dextrane en présence de SDS</i>	180
1.5.	PUBLICATION.....	183
2.	NANOPARTICULES DE TROISIEME GENERATION : FONCTIONNALISATION EN SURFACE	224

2.1.	POST-FONCTIONNALISATION A L'AIDE D'UNE SONDE FLUORESCENTE MODELE	225
2.2.	POST-FONCTIONNALISATION A L'AIDE D'UN PEPTIDE DE RECONNAISSANCE	227
2.2.1.	<i>Introduction</i>	227
2.2.2.	<i>Greffage du peptide</i>	228
2.2.3.	<i>Preuve par RMN ¹H</i>	230
2.2.4.	<i>Preuve par fluorescence</i>	235
3.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	237
4.	BIBLIO	238

CHAPITRE 5: MATERIELS ET METHODES

1.	DEXC₆	241
1.1.	SYNTHESE	241
1.1.1.	<i>Schéma réactionnel</i>	241
1.1.2.	<i>Protocole</i>	241
1.1.3.	<i>Estimation du taux de modification par RMN ¹H</i>	242
2.	DEX-G-PLA-G-N₃	243
2.1.	SYNTHESE DES DEXN ₃	243
2.1.1.	<i>Acide activé porteur d'une fonction azide</i>	243
2.1.2.	<i>Fonctionnalisation du dextrane par des groupes N₃</i>	244
2.2.	SYNTHESE DES PLA A-ALCYNE	245
2.3.	SYNTHESE DES COPOLYMERES DEX-G-PLA-G-N ₃	246
2.3.1.	<i>Protocole opératoire</i>	246
2.3.2.	<i>Purification des copolymères</i>	247
2.3.3.	<i>Caractérisation par RMN ¹H</i>	247
3.	TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES DERIVES DU DEXTRANE	250
3.1.	MESURE DE TENSION SUPERFICIELLE	250
3.1.1.	<i>Principe</i>	250
3.1.2.	<i>Mode opératoire</i>	251
3.2.	CARACTERISATION SEC	252
3.2.1.	<i>Détermination de l'incrément d'indice de réfraction</i>	252
3.2.2.	<i>Chromatographie d'Exclusion Stérique</i>	252
3.2.3.	<i>Système employé</i>	253
4.	ELABORATION DES NANOPARTICULES	254
4.1.	PROCEDE D'EMULSION/EVAPORATION DE SOLVANT	254
4.1.1.	<i>Cas des systèmes PLA commercial + DexC₆ ou DexN₃</i>	254
4.1.2.	<i>Réalisation d'une Chimie-click in situ</i>	255
4.2.	PROCEDE DE NANOPRECIPITATION	255
4.2.1.	<i>Nanoprécipitation de PLA dans une solution aqueuse de DexC₆ ou DexN₃</i>	255
4.2.2.	<i>Nanoprécipitation de copolymères Dex-g-PLA-g-N₃</i>	255
4.3.	CARACTERISATION DES SYSTEMES PARTICULAIRES	256
4.3.1.	<i>Mesure de taille</i>	256
4.3.1.1.	HPPS	256
4.3.1.1.1.	<i>Protocole</i>	257
4.3.1.2.	Granulomètre Malvern	257
4.3.1.2.1.	<i>Principe de la mesure</i>	257
	• <i>Protocole opératoire</i>	258

4.3.2.	<i>Stabilité colloïdale des nanoparticules par turbidimétrie</i>	259
4.3.2.1.	Principe de la mesure.....	259
4.3.2.2.	Mode opératoire.....	259
4.3.3.	<i>Stabilité des nanoparticules en présence de Sodium dodécyl sulfate (SDS)</i>	260
4.3.4.	<i>Potentiel Zêta</i>	260
5.	ENCAPSULATION DU PAM-LEY	260
5.1.	SYNTHÈSE DU PAM-LEY	260
5.2.	DOSAGE PAR HPLC DU PAM-LEY.....	261
5.3.	ÉTUDE DE LA LIBÉRATION	262
5.4.	TESTS CELLULAIRES	263
5.4.1.	<i>Effet de la viabilité cellulaire</i>	263
5.4.2.	<i>Tests cellulaires sur cellules infectées par le VIH</i>	264
6.	POST-FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DES NANOPARTICULES	265
6.1.	POST-FONCTIONNALISATION PAR UNE SONDE FLUORESCENTE MODÈLE	265
6.1.1.	<i>Protocole opératoire</i>	265
6.1.2.	<i>Purification des nanoparticules</i>	265
6.2.	SYNTHÈSE DU PEPTIDE DE RECONNAISSANCE : ATWLPPR Ω -ALCYNE	266
6.3.	POST-FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES PAR ATWLPPR Ω -ALCYNE.....	267
6.3.1.	<i>Protocole opératoire</i>	267
6.3.2.	<i>Purification des particules</i>	267
6.4.	ÉTUDE DE LA FLUORESCENCE DES NANOPARTICULES	268
7.	BIBLIOGRAPHIE	269

CONCLUSION GENERALE

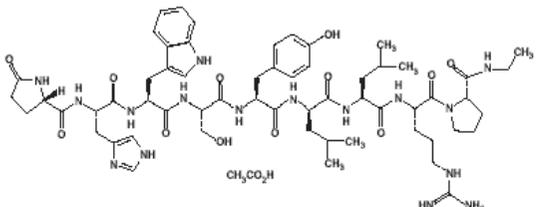
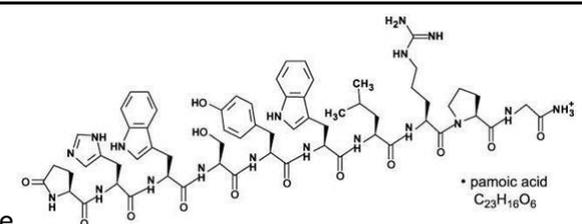
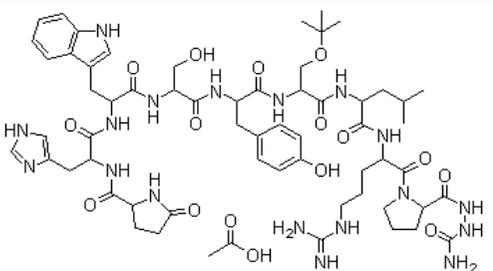
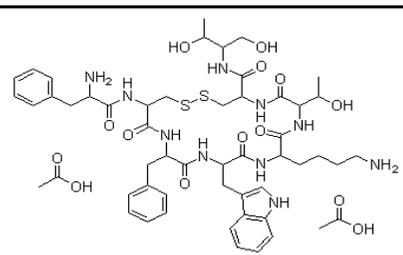
INTRODUCTION GENERALE

Afin de lutter contre les divers virus, maladies ou pandémies, les chercheurs ont depuis toujours tenté de répondre à certaines questions comme « *Comment fonctionne une maladie ?* » ou encore « *Comment pouvons-nous lutter contre elle et l'éradiquer ?* » Alors que la compréhension du mécanisme par lequel se déclenche une maladie s'accroît de jours en jours, des traitements de plus en plus sophistiqués sont progressivement mis sur le marché. C'est ainsi que certains cancers voient leur progression ralentir grâce à des thérapies chimiques ou photochimiques, alors que les malades du SIDA peuvent prétendre à une espérance de vie prolongée de plusieurs années grâce à l'existence des trithérapies. Malheureusement un traitement parfait implique une recherche complexe. En effet, l'impact du traitement, mais surtout de ses effets secondaires, surviennent parfois après plusieurs années. De plus, malgré l'évolution des traitements, ces maladies continuent d'évoluer, de muter et de faire des victimes.

Parmi les différentes évolutions de traitements qui intéressent les chercheurs du monde entier, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur la vectorisation des principes actifs. On estimait en 2009 le marché mondial de la vectorisation pour la santé à 67 milliards de \$ [1]. Les nanoparticules cœur/couronne constituées de polymères biodégradables sont plus particulièrement les systèmes sur lesquels porte ce manuscrit de thèse. Ces nanoparticules ont été décrites dans un nombre de plus en plus impressionnant d'articles dans la littérature scientifique [2] au fil des dix dernières années, même si, à notre connaissance, elles ne sont pas commercialisées ce qui n'est pas le cas des microparticules polymères biodégradables contenant des principes actifs (voir tableau et figure).

Depuis plus d'une dizaine d'années, le Groupe Polymères et Matériaux de Spécialité du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire s'est intéressé à l'élaboration de nanoparticules de poly(acide lactique) (PLA) recouvertes d'une couronne hydrophile de dextrane. Les premières nanoparticules élaborées par ce groupe avaient été mises au point par la technique d'émulsion/évaporation de solvant

Tableau : Quelques microsphères polymères biodégradables commercialisées.

Noms commerciaux (Laboratoire)	Cœur	Principe actif encapsulé	Traitements
Lupron Depot (Abbott Lab.)	PLGA	 <p>Leuprolide acétate</p>	Cancer de la prostate Endométriose Fibrome utérin
Trelstar Depot (Watson Pharmaceuticals)	PLGA	 <p>Triptorelin Pamoate</p>	Cancer de la prostate
Zoladex (AstraZeneca)	PLA	 <p>Goséréline acétate</p> <p>Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-Azagly-NH₂</p>	Cancer de la prostate Cancer du sein Endométriose
Sandostatin LAR (Novartis)	PLGA-glucose	 <p>Acétate d'octréotide</p> <p>H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol</p>	Tumeurs intestinales Tumeurs carcinoides Acromégalie

en utilisant un dérivé amphiphile du dextrane comme stabilisant d'interfaces. Progressivement, la nature chimique de ce dérivé amphiphile a évolué (dextrane modifié par des groupements phénoxy [3], des chaînes alkyle [4] ou encore des copolymères greffés amphiphiles [5]). Plus récemment, le LCPM s'est intéressé au procédé de nanoprecipitation qui a permis d'obtenir des nanoparticules présentant des caractéristiques comparables à celles élaborées par la technique précédente en termes de diamètre moyen, potentiel Zêta, etc [6]. C'est avec ces connaissances que nous nous sommes intéressés à 3 objectifs :

- Objectif 1 : Encapsulation d'un principe actif inhibiteur de la dimérisation de la protéase du VIH-1 [7] au sein des nanoparticules recouvertes par adsorption physique de dextrane. L'inhibiteur étudié dans le cadre de cette thèse est non soluble en milieu aqueux malgré le fait qu'il semble plus actif que les inhibiteurs actuellement commercialisés. Son encapsulation devrait permettre d'accroître sa biodisponibilité après son injection dans le circuit sanguin et donc son efficacité.
- Objectif 2 : Amélioration de la stabilité colloïdale des nanoparticules en présence de fluides biologiques. Notons qu'un meilleur ancrage de cette couche surfacique devrait être obtenu en assurant une liaison covalente irréversible entre la couronne dextrane et le cœur PLA. Pour cela, nous mettrons en œuvre une chimie-click afin d'obtenir des copolymères dextrane-g-PLA par deux voies différentes. Les nanoparticules seront élaborées par les techniques émulsion/évaporation de solvant organique et nanoprecipitation.
- Objectif 3 : Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules afin d'envisager une thérapie plus efficace pour lutter contre le cancer. Pour cela un peptide de reconnaissance des néo-vaisseaux irriguant les cellules tumorales sera fixé en surface des particules. Ainsi fonctionnalisées, ces nanoparticules devraient permettre un ciblage actif des néo-vaisseaux. La destruction des cellules cancéreuses, *via* l'encapsulation d'une molécule photosensible par exemple, pourra ultérieurement être considérée mais n'a pas été étudiée dans le cadre de ces travaux par manque de temps.

Le chapitre 1 de ce manuscrit nous permettra de réaliser un tour d'horizon sur les nanoparticules polymères destinées à la vectorisation de principes actifs. Nous y retrouverons également une description non exhaustive du VIH, de son fonctionnement et de ses conséquences au niveau mondial. Une rapide présentation de la recherche en cours sur les nouveaux traitements contre le SIDA sera également donnée. Ce premier chapitre se clôturera avec quelques pages dévolues à la description de l'évolution d'une tumeur cancéreuse et à la thérapie anti-cancéreuse. Pour chaque cas (cancer et SIDA), nous présenterons l'emploi de nanovecteurs de médicaments.

Le chapitre suivant « Synthèse des dextrane amphiphiles » décrira la première étape de mon travail. La synthèse et les caractérisations de plusieurs composés amphiphiles à base de dextrane (DexC₆, DexN₃ et Dex-g-PLA) présentant différentes structures et natures chimiques seront présentées. Le caractère amphiphile de ces composés sera caractérisé *via* l'étude de leur capacité à réduire la tension superficielle d'une solution aqueuse.

Le Chapitre 3 mettra à profit les composés préalablement synthétisés pour élaborer des nanoparticules par deux procédés distincts : émulsion/évaporation de solvant et nanoprecipitation. Nous optimiserons les paramètres d'élaboration et étudierons les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules obtenues, à savoir leur taille, stabilité colloïdale,.... Ce chapitre aboutira sur l'encapsulation d'un lipopeptide inhibiteur de la dimérisation de la protéase du VIH-1 mis au point conjointement par les

équipes du Pr. Michèle Reboud (Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle de l'Université Pierre et Marie Curie) et du Dr. Régis Vanderesse (Groupe de Synthèse Organique et Biostructure du LCPM). Nous terminerons ce chapitre par de brefs mais encourageants résultats sur les premiers tests biologiques concernant des nanoparticules polymères encapsulant ce lipopeptide. Cependant, les études réalisées sur de telles nanoparticules ont pu révéler quelques problèmes de stabilité, notamment en présence de SDS (pour mimer les propriétés tensioactives de certaines protéines sanguines), ce qui constitue une limite à de potentielles applications.

C'est à ce problème de stabilité que nous nous sommes proposés de répondre dans le chapitre 4. Une fonctionnalisation de la surface des nanoparticules a également été tentée dans ce chapitre en employant un heptapeptide (ATWLPPR) pouvant cibler certains récepteurs surexprimés au niveau des cellules cancéreuses. Le but de ce chapitre était ainsi de fonctionnaliser nos précédentes nanoparticules et de réduire les problèmes de stabilité de la couche hydrophile. Pour cela, l'outil auquel nous avons eu recours est la cycloaddition de Huisgens catalysé par le cuivre. Après des résultats plus qu'encourageants nous sommes dans l'attente des premiers tests biologiques pour valider l'efficacité biologique de notre fonctionnalisation.

Enfin, ce manuscrit se clôt par un chapitre « Matériel et Méthodes » dans lequel le lecteur pourra retrouver les principaux protocoles de manipulations et de calculs que nous avons utilisés. Une conclusion générale reprendra les principaux résultats obtenus et des perspectives seront évoquées.

Bibliographie

- [1] http://www.industrie.gouv.fr/techno_cles_2010/html/viv_50.html
- [2] J. Prasad Rao, Kurt E. Geckelera, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, Prog. Polym. Sci. 36 (2011) p. 887-913
- [3] C. Rouzes, R. Gref, M. Leonard, A. De Sousa Delgado, E. Dellacherie, Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in a o/w emulsion/evaporation technique, J. Biomed Mater. Res. 50(2000) p. 557-5651
- [4] Rouzes C., Leonard M., Durand A., Dellacherie E. Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres, Colloid surfaces B 32 (2003) p. 125-135
- [5] Nouvel C., Raynaud J., Marie E., Dellacherie E., Six J.-L., Durand A. Biodegradable nanoparticles made from polylactide-grafted dextran copolymers, J. Colloid Interf. Sci. 330 (2009) p. 337-343
- [6] C Gavory, A Durand, J-L Six, C Nouvel, E Marie, M Leonard, Polysaccharide-covered nanoparticles prepared by nanoprecipitation. Carbohydr. Polym. 84 (2011) p.133-140
- [7] Bannwarth L., Rose T., Dufau L., Vanderesse R., Dumond J., Jamart-Gregoire B., Pannecouque C., DeClercq E., Reboud-Ravaux M. Dimer Disruption and Monomer Sequestration by Alkyl Tripeptides Are Successful Strategies for Inhibiting Wild-Type and Multidrug-Resistant Mutated HIV-1 Proteases, Biochem. 48 (2009) p. 379-387

BIBLIOGRAPHIE

De nombreuses maladies subies par l'homme ont été étudiées pour être combattues. Un des moyens de lutter contre certaines maladies est la vectorisation de principes actifs. Dans le cadre de ce doctorat nous nous sommes intéressés à deux pathologies : le SIDA et le Cancer.

1. Vectorisation de principes actifs

1.1. Qu'est ce que « la vectorisation d'un principe actif » ?

1.1.1. Définition

Le rapport entre la quantité de principe actif administrée et celle qui est effectivement utilisée au niveau de la zone à traiter définit la biodisponibilité du principe actif. Cette notion a toujours constitué une préoccupation majeure pour le domaine biomédical. Une partie des recherches menées pour améliorer cette biodisponibilité réside dans l'étude de la vectorisation de principes thérapeutiques. Ceci permet de prolonger la durée de vie dans l'organisme de ces molécules bioactives en favorisant une libération progressive de celles-ci et en améliorant leur passage au travers des barrières naturelles dans l'organisme. Ces vecteurs doivent donc être stables dans l'organisme et capables de véhiculer une substance chimique biologiquement active du site d'administration vers le site actif, suivant un dosage et une cinétique stricts. Les vecteurs médicamenteux sont classifiés en trois générations, en fonction de leur biodisponibilité (*Figure 1*).

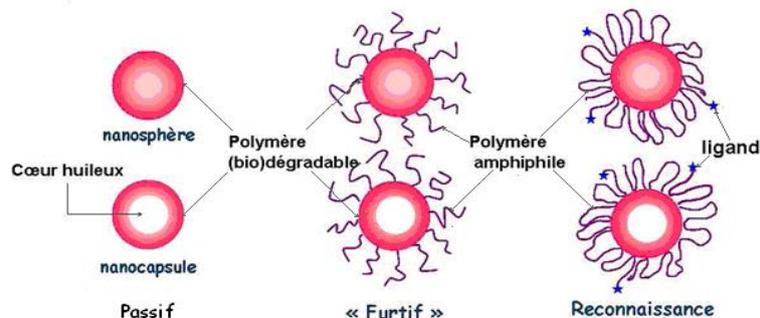


Figure 1 - Représentation schématique des différents modes de ciblage

Les vecteurs de première génération dont la surface est de nature plutôt hydrophobe sont repérés et capturés par le système immunitaire (macrophages) en quelques minutes. Aussi, le médicament est donc libéré essentiellement dans le foie, la rate, les reins et la moelle osseuse.

La surface des vecteurs de deuxième génération est rendue hydrophile par adsorption physique de polymères amphiphiles ou par fixation chimique de polymères hydrophiles. De cette manière, la couche hydrophile externe joue le rôle de barrière stérique et empêche l'adsorption de protéines plasmiques (opsonines) qui déclenche la capture de ce corps étranger par les macrophages. Ces nanoparticules à surface hydrophile sont qualifiées de « furtives » et présentent une durée de vie accrue dans l'organisme (quelques heures).

Dans certains cas, il est cependant nécessaire d'utiliser des médicaments relativement toxiques (lors de traitements anticancéreux par exemple), donc de contrôler les quantités administrées en ciblant précisément les zones à traiter. Pour ce faire, les vecteurs de troisième génération peuvent reconnaître sélectivement des marqueurs spécifiques surexprimés à la surface de cellules cibles grâce à des ligands (anticorps, peptides, sucres,...) fixés à la surface de nanoparticules « furtives ».

La vectorisation de principes thérapeutiques présente plusieurs avantages. Elle permet tout d'abord une protection du principe actif contre son inactivation chimique, enzymatique ou immunologique. De plus, les profils de libération sont améliorés, en réduisant les fluctuations de concentration en principe actif dans le sang. Le ciblage des zones à traiter permet également une réduction des effets secondaires des médicaments, tout en augmentant leur efficacité [1][2]. La vectorisation est ainsi une technologie qui permet d'améliorer l'efficacité d'un principe actif tout en augmentant sa biodisponibilité.

Dans le domaine de la santé, la mise en place de systèmes de délivrance de principes actifs moins contraignants pour les patients correspond aussi à une voie de recherche. Ainsi par exemple, l'insuline encapsulée et inhalée représente pour les patients diabétiques un réel progrès par rapport à son injection. Les formes galéniques « retard » d'insuline qui réduisent le nombre d'injections nécessaires sont aussi issues des recherches menées sur la vectorisation de cette protéine.

Plusieurs techniques ont été développées pour vectoriser un principe actif :

- son encapsulation (au sein de micro- ou nanoparticules, de liposomes, etc.)
- sa modification chimique (création de prodrogues par exemple)
- son système d'administration (patch, spray, implantation d'appareils dans l'organisme pour libérer progressivement le principe actif directement sur la cible)

Ces techniques de vectorisation font appel à des disciplines variées : biotechnologies, chimie, microsystemes et microfluidique, nanotechnologies, physico-chimie, thérapie génique ...

Outre le coût de production (investissements lourds de plusieurs dizaines de M€) et la complexité de tels systèmes, des verrous technologiques subsistent et ralentissent leur apparition sur le marché : difficulté à maîtriser les aspects toxicologiques ou encore biocompatibilité et biodégradabilité des matériaux d'encapsulation du système [3].

1.1.2. Les moyens mis en œuvre pour la vectorisation

C'est en 1906 que Paul Ehrlich a édité pour la première fois la théorie des « magic bullets » (balles magiques)[4]. Depuis lors, les scientifiques ont développé tout un arsenal de moyens, que ce soit au niveau de la chimie des polymères ou de celle des métaux [5] pour produire de tels systèmes.

Le ciblage utilisant la surface spécifique des nanoparticules peut avoir lieu aux niveaux des organes/tissus ou des cellules. Dans le premier cas, les propriétés de surface et la taille des nanoparticules déterminera quel organe sera ciblé ou retiendra ces objets, et combien de temps cela durera. Un ciblage dit « actif » peut ainsi avoir lieu si un de ces organes de retenue est ciblé [6][7][8]. À l'opposé, un vecteur dit passif n'est capté par aucun organe en particulier et ne présente donc aucune propriété de ciblage spécifique. Il faut donc trouver un compromis de façon à ce qu'une nanoparticule soit capturée spécifiquement par l'organe ou la cellule à traiter.

Dans tout ce manuscrit, nous nous limiterons aux vecteurs de type polymères et majoritairement biodégradables et biocompatibles.

1.1.3. L'encapsulation d'un principe actif demande beaucoup de précautions

En effet, dans le cas de molécules fragiles, l'intégrité de cette dernière pourra être compromise par les facteurs entrant en compte pendant son encapsulation, lesquels peuvent conduire à sa dénaturation ou même à sa désactivation. Il conviendra donc d'utiliser des conditions relativement 'douces' et d'écarter tous facteurs dangereux pour la molécule, tels que des solvants agressifs, une température élevée, un pH ou une pression extrême, etc.

L'encapsulation de la molécule dite active nécessite dans la plupart des cas l'utilisation de deux solvants : un bon solvant de la molécule et un mauvais solvant. Cependant, la solubilité seule de la molécule active ne suffira pas à fixer les paramètres d'élaboration des vecteurs. Il est par exemple primordial de prendre en compte des paramètres comme le coefficient de partage entre deux solvants (organique et aqueux) mis en jeu pour encapsuler la molécule.

Fixer une molécule de façon covalente au cœur d'une particule pour ainsi assurer une bonne encapsulation mais peut conduire à la désactivation ou la modification des propriétés du médicament. [9]

Enfin, les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, comme leur taille, leur distribution de taille, leur charge de surface et la nature des polymères utilisés sont autant de paramètres influençant le sort *in vivo* des particules. Il est généralement reconnu qu'une taille appropriée de particule pour des utilisations intra veineuses se situe entre 20 et 200nm. On peut également dire que des particules non chargées en surface subissent une moindre opsonisation par rapport aux particules à surface chargée ou hydrophobe [10] [11].

1.1.4. Libération des principes actifs

Les vecteurs nanoparticulaires sont des systèmes à libération contrôlée par lesquels on cherche à délivrer le principe actif à une vitesse déterminée et constante, pendant une durée suffisamment longue (*Figure 2*). Il existe deux mécanismes fondamentaux qui conduisent à la libération d'un principe actif et qui permettent de contrôler sa vitesse de libération [12] :

- La diffusion du médicament au travers de la membrane polymère (cas des systèmes réservoirs comme les nanocapsules) ou de la matrice macromoléculaire (cas des systèmes matriciels comme les nanosphères). Cette diffusion correspond à la migration du principe actif et à sa libération progressive. Selon la porosité de la membrane ou de la matrice, la vitesse de libération du principe actif est plus ou moins importante.
- La dégradation du vecteur. Il peut s'agir d'une réelle dégradation du polymère matriciel (hydrolyse par l'eau ou par une enzyme) ou du clivage de liaisons ou d'interactions entre le polymère et le principe actif, qui entraîne sa diffusion hors du système particulaire.

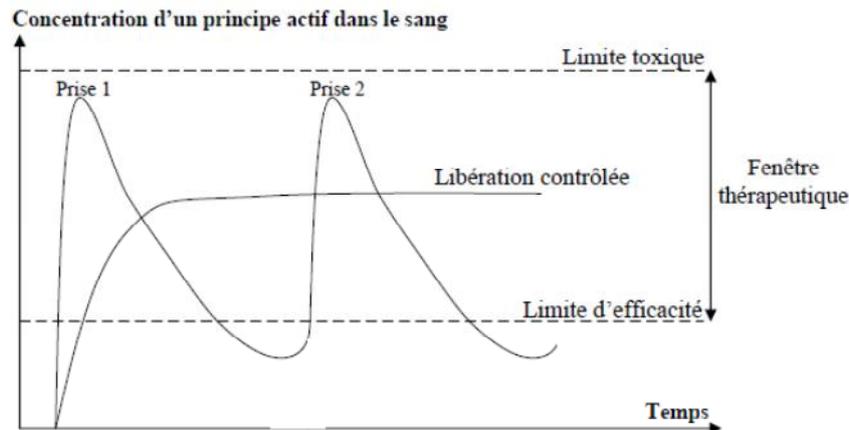


Figure 2 - Représentation schématique de la libération d'un principe actif dans l'organisme

De plus, la distribution en taille des nanoparticules, la charge et la répartition en principe actif au sein de la matrice polymère, la nature et la masse molaire du polymère constituant le vecteur peuvent avoir une influence sur le profil de libération d'un principe actif encapsulé.[13] Idéalement, le profil cinétique de libération d'un principe actif encapsulé au sein d'un vecteur nanoparticulaire doit être d'ordre zéro, c'est-à-dire que la quantité libérée cumulée en principe actif doit être quasi-proportionnelle au temps de libération. Ce phénomène serait en effet synonyme d'une libération du principe actif constante au cours du temps, de manière contrôlée et prolongée, ce qui assurerait une efficacité maximale du médicament.

Dans la *Figure 2*, on observe qu'une libération contrôlée permettrait de rester dans la fenêtre thérapeutique, à une concentration de principe actif dans l'organisme constante au court du temps. Par contre, dans le cas de multiples prises régulières de principe actif, la limite de toxicité est parfois presque atteinte mais la concentration du principe actif décroît rapidement, d'où une faible efficacité. Dans ce cas, plusieurs prises sont nécessaires pour atteindre une efficacité sur le long terme.

1.2. Méthodes d'élaboration des nanoparticules

Il existe de très nombreuses méthodes d'élaborations de nano-objets permettant l'encapsulation de substances hydrophobes ou non. Ces méthodes peuvent de classer selon deux catégories. Les élaborations directes et celles à base de polymères préformés. Parmi les élaborations directes on peut ainsi citer la polymérisation en émulsion qui permet de créer rapidement des nanoparticules. Cette technique est également utilisée pour l'élaboration de nanocapsules en réalisant une polymérisation interfaciale (par exemple de cyanoacrylate). Cela permet ainsi d'obtenir une capsule contenant un cœur non solide et une couronne de polymère plus ou moins dense ou épaisse.

Les méthodes utilisant un polymère préformé sont très nombreuses : les procédés de simple et double émulsion/évaporation de solvants permettent d'obtenir des nano-objets à cœur hydrophobe ou hydrophile suivant le polymère et les solvants utilisés. Une autre méthode dérive de l'émulsion : c'est la méthode de « salting out » qui reprend le principe de diffusion d'un solvant miscible à l'eau par

l'ajout d'un agent salin. La technique de nanoprécipitation regroupe la nanoprécipitation par injection ou encore par dialyse [14].

Dans ces travaux de thèse nous nous sommes intéressés à deux procédés : la simple émulsion/évaporation de solvant (émulsion huile dans eau) et la nanoprécipitation par injection d'un polymère non soluble dans l'eau dans une solution aqueuse.

1.2.1. Emulsion/évaporation de solvant

L'émulsion/évaporation de solvant consiste à former une émulsion préalable à partir de deux phases non miscibles. La phase continue contient des tensioactifs, moléculaires ou polymères, qui s'adsorbent alors à l'interface liquide/liquide et stabilisent ainsi l'émulsion. La phase dispersée contient le ou les polymères destinés à former le cœur des particules. Un apport d'énergie (agitation mécanique, vortex ou ultrasons...) est nécessaire pour former les gouttes. Dans le cas de la fabrication de nanoparticules, des ultrasons sont couramment utilisés. Une fois les nanogouttes formées, le solvant organique est évaporé dans une seconde étape. C'est pourquoi il doit être volatil. Une dispersion de nanoparticules solides est alors obtenue (voir Figure 3).

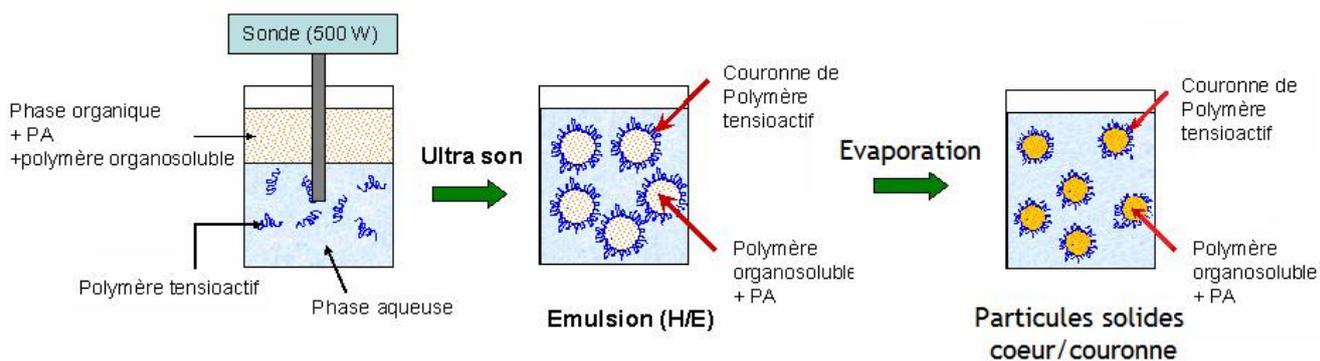


Figure 3 - Obtention de nanoparticules par émulsion/évaporation de solvant.

L'avantage majeur du procédé d'émulsion/évaporation de solvant est l'efficacité d'encapsulation des principes actifs hydrophobes. Du fait de la non miscibilité des deux phases employées [15], le principe actif hydrophobe est majoritairement présent dans la phase discontinue et se trouve ensuite encapsulé au cœur des particules.

L'encapsulation de principes actifs hydrophiles présente quant à elle une efficacité amoindrie. Afin de pallier ce problème, des émulsions doubles sont mises en œuvre. On peut par exemple citer les nanoparticules de PLGA recouvertes d'une couche hydrophile d'acide hyaluronique et contenant une sonde fluorescente hydrosoluble modèle, le dextrane-FITC [16]. Ces nanoparticules ont été élaborées dans le cadre d'un traitement de l'arthrite et cette sonde permet une visualisation aisée de ces nano-objets après injection.

Dans leurs travaux, C. Nouvel et al. ont étudié la préparation de nanoparticules de dextrane-g-acide polylactique (dextrane-g-PLA) obtenue par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant. Pour cela,

deux types de copolymères ont été testés. Ceux portant de courtes chaînes PLA demeurent solubles dans les solvants aqueux et se sont comportés en stabilisants stériques (*Figure 4.a*), alors que ceux possédant des longues chaînes solubles dans les solvants organiques ont constitué le cœur des particules (*Figure 4.b*). A noter que ces copolymères sont également capables de stabiliser des émulsions directes ou inverses selon leur solubilité [17][18]

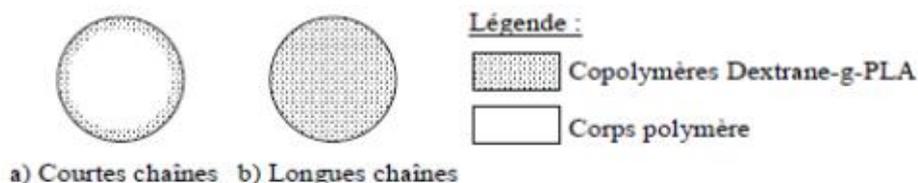


Figure 4 - Types de nanoparticules obtenues selon la longueur des greffons PLA. Cas des dextrane-g-PLA

Néanmoins, un des inconvénients de ce procédé émulsion/évaporation de solvant est l'emploi de tensioactifs qui peuvent s'avérer toxiques s'ils ne sont pas biocompatibles, puisqu'ils se retrouvent adsorbés à la surface des particules. Des recherches dans ce sens ont été menées pour utiliser des tensioactifs polymères de type polysaccharides, assimilables par le corps humain.

Les dispersions finales obtenues par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant sont des systèmes très dilués. Les introduire dans le corps sans les concentrer serait inadapté car, pour atteindre les concentrations thérapeutiques suffisantes, il faudrait introduire des volumes beaucoup trop importants. Des méthodes de concentration des suspensions doivent donc se développer. Celles qui existent aujourd'hui sont peu performantes et conduisent souvent à la formation d'agrégats [12][19].

1.2.2. Nanoprécipitation par injection

Cette méthode, qui requiert l'emploi de deux solvants miscibles, est fondée sur l'interdiffusion de ces derniers quand ils sont mis en contact. Le polymère est solubilisé dans un premier solvant organique (bon solvant). Le deuxième solvant doit être choisi de façon à être miscible avec le premier, mais ne doit pas solubiliser le polymère (non-solvant). Ce deuxième solvant est en général l'eau. Il peut contenir des tensioactifs permettant la stabilisation des particules formées lors de la précipitation de la goutte organique au contact de l'eau. Toutefois, si le polymère étudié est amphiphile, il peut lui-même jouer le rôle de tensioactif.

L'ajout goutte-à-goutte et sous agitation de la solution de polymère dans le non-solvant entraîne la formation des nanoparticules par précipitation du polymère (voir *Figure 5* et *Figure 6*). L'utilisation de solutions diluées permet une précipitation du polymère à l'échelle nanométrique. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation ou par dialyse.

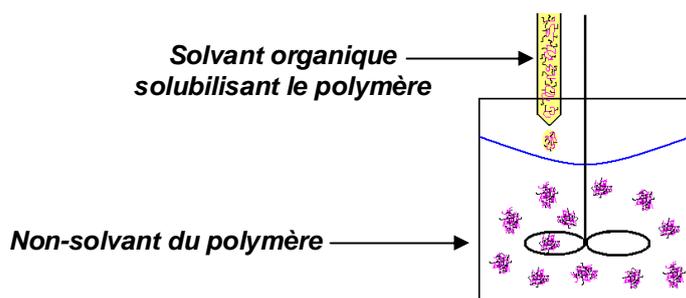


Figure 5 - Obtention de nanoparticules par nanoprécipitation.

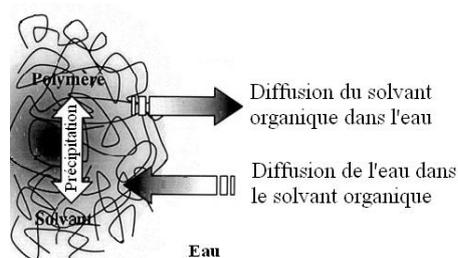


Figure 6 - Interdiffusion des solvants pendant la nanoprécipitation [20].

La nanoprécipitation présente plusieurs avantages qu'il convient de citer. Il a été démontré que l'élaboration de nanoparticules par nanoprécipitation conduit à des objets de tailles plus petites par rapport à d'autres méthodes comme l'émulsion/évaporation de solvant, ainsi qu'à des distributions de tailles plus étroites [21]. Cette réduction de la taille des nanoparticules contribue à accroître la stabilité du système colloïdal (pas de phénomène de sédimentation par exemple). La nanoprécipitation est donc particulièrement intéressante en termes de stabilité lors de la préparation de dispersions et de leur stockage.

Cette méthode est facile à mettre en œuvre et permet d'utiliser des solvants non toxiques. Elle est également plus économique que l'émulsion-évaporation de solvant car l'apport d'énergie (agitation magnétique) est moindre par rapport au précédent procédé (ultrasons).

L'inconvénient majeur de la nanoprécipitation est sa faible efficacité d'encapsulation du principe actif par rapport au procédé d'émulsion/évaporation de solvant. Néanmoins, il est possible d'améliorer l'encapsulation des principes actifs hydrophobes lorsque le non-solvant employé est l'eau [12][19][22].

1.2.3. Les nanoparticules recouvertes d'une couronne externe hydrophile

Les vecteurs nanoparticulaires de première génération constitués de polymères biodégradables (PLA, PLGA (poly(lactide-co-glycolide)) par exemple) ont montré des avantages indéniables dans la protection des principes actifs encapsulés contre la dégradation, et dans leur capacité à permettre le contrôle de la libération de ces principes actifs. En effet, l'inconvénient majeur de ces vecteurs est leur surface hydrophobe qui est sujette à l'adhésion des opsonines, ce qui conduit à leur élimination rapide par les macrophages du système réticulo-endothélial et donc à l'accumulation des principes actifs dans des tissus non visés (principalement le foie et la rate). C'est pourquoi les recherches se sont

orientées vers le développement de nanoparticules à surface modifiée. Parmi les nombreux articles publiés, on peut par exemple citer ceux traitant des nanoparticules à cœur PLA ou PLGA et recouvertes de PEG (poly(éthylène glycol)). En effet, il a été démontré que les nanoparticules recouvertes de PEG ont une durée de vie dans le sang plus importante et une capture par le foie plus faible que les mêmes nanoparticules non recouvertes de PEG [23][24]. Après injection intraveineuse, on retrouve encore des nanoparticules recouvertes de PEG dans le sang après plusieurs heures alors que les nanoparticules non recouvertes disparaissent du système sanguin après seulement quelques minutes. Ceci est expliqué par le fait que le PEG forme une barrière stérique à l'opsonisation. Toutefois, Beletsi et al. ont également montré que la durée de vie dans l'organisme de ces nanoparticules dépend de la quantité de PEG présent sur les nanoparticules [25].

Dans la littérature, la formation d'un certain nombre de systèmes nanoparticulaires mettant en jeu des polysaccharides amphiphiles a également été étudiée, dans la mesure où ces polymères présentent un grand nombre d'avantages. Ils permettent en effet d'hydrophiliser la surface des nanoparticules, ce qui est nécessaire pour prévenir l'adsorption non spécifique des protéines circulant dans le système sanguin. Dans certains cas, ces polysaccharides peuvent assurer un ciblage actif des nanoparticules vers des cellules cibles. Ceci s'explique par la présence de récepteurs spécifiques de ces polysaccharides sur certains organes ou tissus. C'est le cas par exemple des nanoparticules cœur PLGA/couronne acide hyaluronique destinées au traitement articulaire [16]. De plus, plusieurs polysaccharides présentent de bonnes caractéristiques de biocompatibilité et de biodégradabilité nécessaires à un usage médical.

L'enrobage de nanoparticules par le dextrane est une possibilité que le LCPM explore depuis près de 15 ans. Le laboratoire a testé un certain nombre de méthodes qui seront par la suite décrites.

Les résultats mentionnés précédemment peuvent être complétés par le *Tableau 1*, extrait des travaux de Lemarchand et coll. [26] qui ont publié une revue traitant des nanoparticules enrobées par divers polysaccharides. On pourra se rapporter à leur publication pour connaître les références relatives aux données exposées.

Tableau 1 - Méthodologie d'élaboration et caractéristiques physicochimiques de nanoparticules enrobées par des polysaccharides [26]

Table 1
Methodology and physicochemical characteristics of polysaccharide-coated nanoparticles

Polysaccharide coating	Nanoparticle core	Methodology for coating	Nanoparticle size (nm)	Zeta potential (mV)	Amount of polysaccharide at the surface	Reference
Orosomucoïd	PACA	Adsorption	220	ND	4.5 mg/m ²	[39,74]
Dextran	Iron oxide	Coprecipitation	28	-25	ND	[56]
Dextran	PLA	Adsorption on NP (hydrophobically modified dextran)	160		6.6 mg/m ²	[41]
Dextran	PLA	Adsorption during the NP preparation (hydrophobically modified dextran)	170		5.6 mg/m ²	[41]
Dextran	PCL	Direct formation using amphiphilic grafted copolymers	220–280	-15	0.7 mg DEX/mg copolymer	[72,73]
Dextran	PMMA	Radical polymerization	72	-6	ND	[67]
Dextran	PACA	Radical polymerization (pH 1)	200–290	-15	ND	[69]
Degradé dextran	Iron oxide	Coprecipitation	32	-30	ND	[56]
DEAE-dextran	Iron oxide	Coprecipitation	104	+20	ND	[56]
DEAE-dextran	PACA	Emulsion polymerization (pH < 2.5)	165	+37	ND	[98]
Dextran sulfate	PACA	Radical polymerization (pH 1)	190–270	-40	ND	[69]
Heparin	PMMA	Radical polymerization	78	-44	ND	[67]
Heparin	PACA	Radical polymerization (pH 1)	93	-45	ND	[69]
Heparin + dextran	PACA	Radical polymerization (pH 1)	190	-24	ND	[69]
Hyaluronic acid	PCL	Adsorption on positively charged nanoparticles	200–500	-45	41.6 ± 18.0 µg HA/mg PCL	[42]
Chitosan, hyaluronic acid, pectin	PACA	Radical polymerization (pH 1)	30–60 µm	ND	ND	[69]
Chitosan	PACA	Emulsion polymerization (pH 2)	60	+39	ND	[63]
Chitosan	PACA	Emulsion polymerization (pH > 3)	60	+21	ND	[64]
Chitosan	PLA	Adsorption	500	+21	ND	[44]

ND, not determined.

La littérature sur les divers systèmes nanoparticulaires biodégradables et biocompatibles étant très dense, nous avons volontairement décidé de nous limiter par la suite aux systèmes de cœur PLA et de couronne dextrane.

1.2.4. Elaboration de particules cœur hydrophobe/couronne hydrophile

1.2.4.1. Par fixation chimique de polymère hydrophile sur des particules hydrophobes

Il existe plusieurs possibilités pour fixer de façon chimique un polymère hydrophile à la surface d'un matériau hydrophobe et ainsi en modifier les propriétés de surface. Il est ainsi possible de :

- Polymériser un monomère hydrophile à partir d'une espèce active présente à la surface des particules [27]. Il s'agit de la stratégie « grafting from » qui peut être aussi bien appliquée à des particules minérales qu'à des particules organiques. De nombreux mécanismes de polymérisation ont été testés et il existe de nombreux articles et revues [28][29][30][31]. Dans la *Figure 7*, nous avons représenté cette stratégie employée lors d'une polymérisation RAFT/Madix. Dans ce cas, deux approches s'opposent.

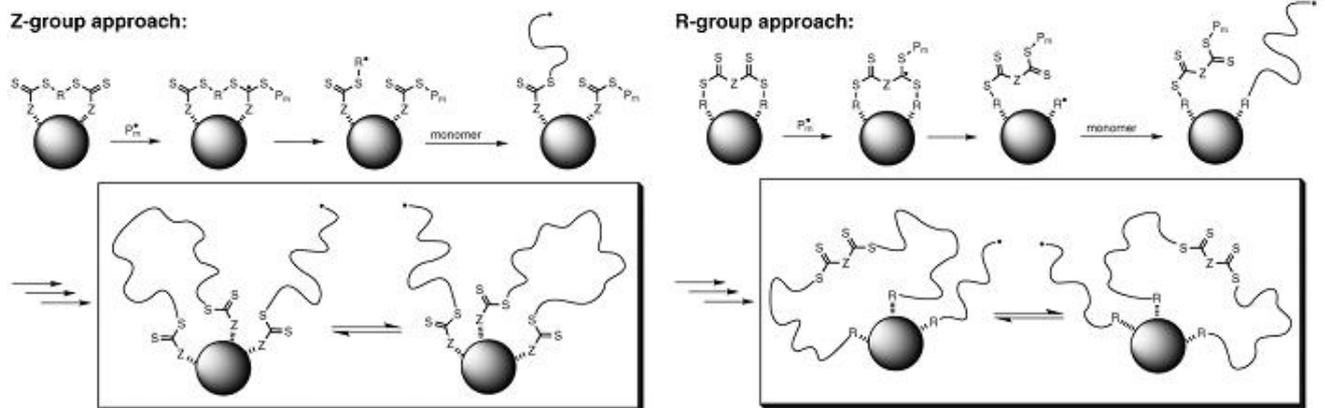


Figure 7 - Représentation de la stratégie "Grafting-from" utilisée lors d'une polymérisation RAFT/Madix. Illustration des deux approches possibles dans ce cas [28]

- Coupler chimiquement un polymère hydrophile préformé à la surface des particules [32]. On parle alors de « grafting to ». Cette technique est très employée car facile à mettre en œuvre. De nombreuses réactions chimiques ont ainsi été testées pour obtenir un bon recouvrement [33].

- Recourir à la technique « grafting through » qui consiste à employer un macromonomère hydrosoluble, utilisé alors comme tensioactif, lors d'une polymérisation en émulsion. C'est ainsi que Möller [34] a obtenu des particules polystyrène à surface modifiée par des oligoglycidols fonctionnalisés. On peut également citer, parmi les nombreux articles, l'emploi de macromonomères à base de PEG utilisés avec succès pour mener une polymérisation par métathèse en milieu dispersé [35].

- Une autre manière est de réaliser une polymérisation en milieu dispersé en employant un polysaccharide solubilisé dans la phase aqueuse externe. Celui-ci peut alors jouer le rôle de co-amorceur de la polymérisation ou simplement subir des réactions radicalaires de transfert. Dans tous les cas, il se retrouve alors fixé en surface de la particule obtenue. C'est ainsi que le LCPM a proposé la préparation de nanoparticules de polystyrène recouvertes de dextrane par le procédé de polymérisation par émulsion du styrène en présence de dextrane natif solubilisé dans la solution externe aqueuse [36]. Avec une approche similaire, Yang et coll.[37] ont synthétisé des nanoparticules de poly(cyanoacrylate de butyle) (PBCA) stabilisées par du chitosane, et donc chargées positivement, par polymérisation en émulsion du cyanoacrylate, en présence de chitosane solubilisé dans la phase aqueuse acidifiée. Ces études ont montré que le chitosane amorce la polymérisation du monomère grâce aux nombreuses fonctions amine qu'il possède.

1.2.4.2. Par adsorption physique de polymères amphiphiles sur des particules hydrophobes

L'hydrophilisation de nanoparticules hydrophobes peut également être réalisée par adsorption physique de polymères amphiphiles à leur surface. Ce type d'adsorption se fait par associations hydrophobes, liaisons hydrogène ou interactions ioniques (selon le polymère à adsorber) et nécessite donc la présence d'extrémités ou de groupements interagissant avec la surface de l'objet. Des polymères amphiphiles divers peuvent être utilisés. Ils peuvent être des copolymères à blocs (tel que dextrane-b-poly(cyanoacrylate d'isobutyle) [38] ou MPEO-b-PLA [39]) ou encore des copolymères greffés constitués d'une dorsale hydrophile et de segments hydrophobes (ou inversement).

La partie hydrophobe du copolymère amphiphile présente une affinité pour le cœur PLA de la particule, la partie hydrophile se place à l'interface entre la phase aqueuse externe et le cœur de la particule. Les copolymères diblocs offrent un seul point d'ancrage dans la particule alors que les copolymères greffés présentent plusieurs points d'ancrage, ce qui permet d'atteindre une stabilité accrue de la couche adsorbée (*Figure 8*) [19]. Si les segments hydrophobes sont très compatibles avec le PLA, une zone d'enchevêtrement de ces segments dans le PLA va se créer à l'interface entre la couronne et le cœur. L'ancrage est alors plus stable. (*Figure 8*).

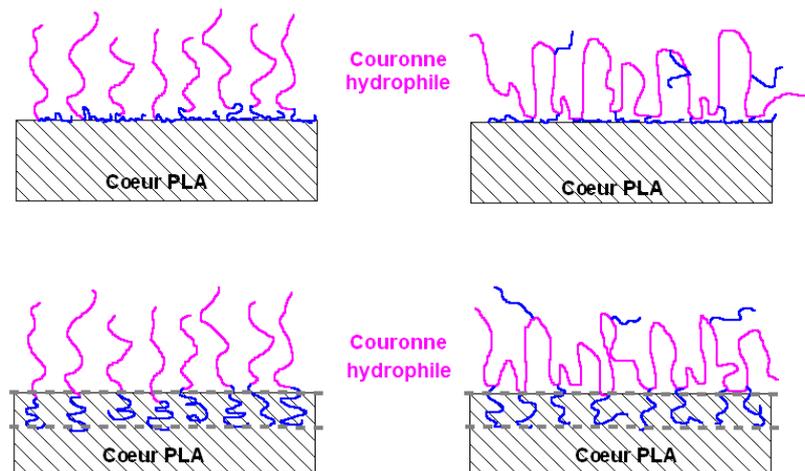


Figure 8 - Adsorption de polymère amphiphile à la surface des nanoparticules de PLA. Les deux schémas de gauche représentent le cas de polymères amphiphiles diblocs, alors que les deux de droite les polymères amphiphiles greffés. La zone de pénétration des chaînes hydrophobes dans le cœur PLA représente la zone d'enchevêtrement et dépend de la nature du bloc hydrophobe.

Par exemple, afin d'enrober des nanoparticules d'acide polylactique par une couche de dextrane, Rouzes et al. [19] ont synthétisé des dextrans hydrophobisés par des groupements phénoxy ou alkyle (C_6 ou C_{10}). Grâce à leurs propriétés amphiphiles, ces dextrans hydrophobisés peuvent s'adsorber à la surface des nanoparticules de PLA lors de leur formulation par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant. Le mécanisme impliqué dans cette adsorption physique est basé sur les interactions hydrophobes entre les groupements hydrocarbonés du dextrane modifié et la surface des nanoparticules PLA. Des objets similaires cœur PLA et couronne dextrane ont également été obtenus par le même procédé, mais en utilisant directement des dextrane-g-PLA amphiphiles comme

stabilisants¹. Dans un premier temps, le PLA et des copolymères dextrane-g-PLA organosolubles ont été dissous dans le dichlorométhane. La sonication de ce système a conduit à des particules de taille supérieure à 500 nm. Des mesures de tension interfaciale eau/dichlorométhane avaient effectivement permis de vérifier que les copolymères dextrane-g-PLA organosolubles abaissaient faiblement la tension de surface et ne permettaient pas la stabilisation d'émulsions constituées de gouttes de faible taille. Le deuxième type d'expériences consistait à utiliser des copolymères dextrane-g-PLA solubles dans l'eau et pouvant stabiliser une émulsion directe. Dans ce cas là, la phase organique ne contient que du PLA. L'influence de la concentration en dérivé de dextrane (0 à 10 g/L) et du rapport $V_{\text{dichlorométhane}}/V_{\text{eau}}$ sur la taille des particules a été étudiée. La taille des nanoparticules alors obtenues est d'environ 200 nm pour des ratios supérieurs à 0,05. Lorsque ce ratio est fixé à 0,05, la concentration en dérivé de dextrane peut varier entre 0,5 et 1 g/L sans modification de la taille des objets (environ 200 nm). Il a aussi été démontré que plus les greffons PLA de ces composés sont courts plus la stabilité des nanoparticules formulées est réduite. En effet, la désorption des copolymères adsorbés dextrane-g-PLA est plus aisée, ce qui est dû au faible enchevêtrement des courts segments de PLA dans le cœur PLA de la nanoparticule [17].

Ma et al. ont décrit une méthode permettant de recouvrir des particules de PLA par une couronne de dextrane hydrophobisé par des groupes cholestérol. Ces dérivés sont solubilisés dans la phase aqueuse alors que la phase organique était constituée de PLA dissout dans de l'acétone. Après sonication, les nanoparticules obtenues sont sphériques et présentent des diamètres inférieurs à 250 nm. Des mesures de potentiel zêta ont permis aux auteurs de vérifier qu'une couche de dextrane recouvrait les nanoparticules puisque les valeurs de potentiel zêta obtenues correspondaient à des valeurs observées pour des particules de dextrane [40]. Dans le même ordre d'idées, Gu et al. ont préparé des nanoparticules PLA recouvertes par un dérivé de dextrane. Dans ce cas, le dextrane est modifié par des groupements cholestérol et des fonctions aldéhyde. Les nanoparticules ont été réalisées par une méthode de dialyse (eau/diméthylsulfoxyde). Le PLA et les dérivés de dextrane ont alors été dissous dans la phase organique (à hauteur de 0,4 g/L et 2 g/L respectivement), la phase aqueuse ne contenait aucun émulsifiant. Les groupements cholestérol du dextrane permettent à ce tensioactif d'interagir avec le cœur PLA par des interactions physiques. Une deuxième étape menée par ces auteurs a consisté à lier chimiquement des molécules de transferrine (protéine permettant le transport du fer dans l'organisme) à la surface de la couronne de dextrane, via des fonctions aldéhyde présentes dans la couronne dextrane [41].

L'équipe de Christine Vauthier a quant à elle travaillé sur l'élaboration de nanoparticules en utilisant un copolymère diblocs PICBA-Dextrane. Ils ont ainsi étudié l'influence de la couche diffuse sur l'adsorption de différentes protéines [42].

Un autre cas est la synthèse de nanoparticules de PLGA recouvertes de chitosane [43]. L'élaboration de ces nanoparticules est effectuée par nanoprécipitation : le chitosane est dissous dans la phase aqueuse acidifiée alors que la phase organique contient du PLGA et de la lécithine (*Figure 9*). Il s'avère que les molécules de chitosane s'ancrent à la surface des nanoparticules de PLGA grâce à l'adhésion intermédiaire de la lécithine sur la surface PLGA. En effet, les chaînes grasses de la lécithine

¹ La synthèse des dextrane-g-PLA sera évoquée dans le paragraphe 1.2.6.3

s'adsorbent à la surface des particules, fonctionnalisant alors la surface de groupements phosphonylcholine sur lesquels interagissent les fonctions ammonium du chitosane.

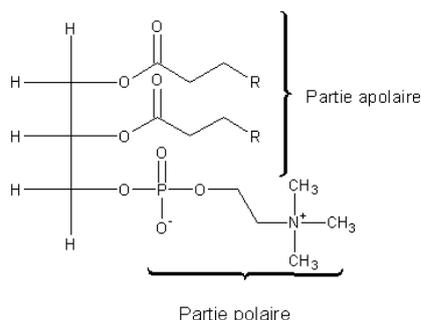


Figure 9 - Formule semi-développée de la lécithine

D'autres polymères que les polysaccharides sont utilisés pour rendre hydrophile la surface des nanoparticules, en particulier le PEG (poly(éthylène glycol)). Nous donnons ici quelques exemples qui décrivent l'emploi de ce polymère pour obtenir une couronne hydrophile puisque ce polymère est très utilisé pour cette application dans la littérature. Patil et al. ont préparé des nanoparticules à base de PLGA recouvertes de copolymères diblocs PEG-PLA fonctionnalisés à l'extrémité du bloc PEG par de l'acide folique. Les particules ont été réalisées par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant. Le solvant choisi était le chloroforme dans lequel le PLGA et les copolymères PEG-PLA ont été dissous. La phase aqueuse contenait du PVA (poly(alcool vinylique)) afin de stabiliser l'émulsion [44].

Un autre exemple d'hydrophilisation de la surface de particules de PLGA par une brosse de PEG a été décrit par Kanakubo et al. Dans ce cas, les nanoparticules sont formées par émulsification par membrane. La phase aqueuse contient un stabilisant tel que le PVA. La phase organique contient quant à elle le PLGA destiné à constituer le cœur des particules ainsi qu'un copolymère dibloc acétal-PEG-PLA. Après émulsification et évaporation du solvant, le copolymère amphiphile se retrouve localisé à la surface des particules et les segments PEG confèrent alors aux nanovecteurs une surface hydrophile.

1.2.5. Des copolymères amphiphiles peuvent former des nanoparticules cœur/couronne

Quand les copolymères amphiphiles sont placés dans un environnement aqueux, ces composés peuvent former, au-delà d'une certaine concentration, des micelles ou s'auto-organiser du fait de l'association entre leurs parties hydrophobes. Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées afin d'examiner les possibilités de formuler des nanoparticules se formant par agrégation des copolymères amphiphiles à base de polysaccharides. Quelques exemples sont présentés ici :

Le pullulane est un polysaccharide qui ne peut pas s'auto-organiser en solution aqueuse du fait de son hydrophilie. Par contre, l'acétate de pullulane est quant à lui un dérivé hydrophobisé qui peut permettre la formation de nanoparticules. Zhang et coll.[45] ont examiné la possibilité de formuler des nanoparticules avec ce composé par la méthode de diffusion de solvant: une certaine quantité d'acétate de pullulane est dissoute dans de la diméthylformamide et la solution est additionnée goutte-à-goutte directement dans une phase aqueuse sous agitation magnétique. Dès lors, les groupements hydrophobes s'auto-agrègent pour former des nano-objets recouverts par le pullulane. Les particules non chargées en principe actives obtenues dans les conditions de l'étude sont sphériques et leur taille est de l'ordre de 50 à 100 nm. Une étude complémentaire [46] a testé l'influence de la force

ionique sur les caractéristiques de nanoparticules d'acétate de pullulane préparées cette fois-ci par dialyse. Il s'avère que la taille de ces nanoparticules augmente de 70nm à 380nm dès les premières minutes lorsqu'elles sont placées en suspension dans une phase aqueuse de force ionique égale à 0.15 M. Les nanoparticules s'agrègent donc très rapidement, ce qui est sans doute dû à une intensification de l'effet hydrophobe entre les particules, cet effet étant renforcé en présence de sel.

Des macromolécules amphiphiles composées de pullulane et de poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA), hydrophobe, ont été synthétisées afin d'élaborer des vecteurs particulaires. Le copolymère final n'étant plus soluble dans l'eau mais dans le DMSO, les particules sont préparées par dialyse d'une solution de copolymères dans ce solvant. Il semble que la structure des nanoparticules formulées (diamètre de 75 à 120 nm) soit de type noyau-écorce, le squelette de pullulane se plaçant à la périphérie d'un cœur hydrophobe de PLGA. L'efficacité d'encapsulation de l'adriamycine² (Figure 10) avec ce type de nanoparticules est de l'ordre de 20-30 % [47].

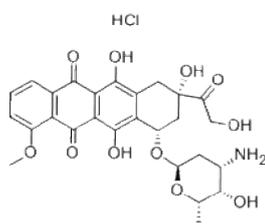


Figure 10 - Structure de l'adriamycine

Gref et coll. [48] ont décrit la synthèse de copolymères dextrane-g-poly(ϵ -caprolactone) (Dex-g-PCL) composés d'un squelette hydrophile de dextrane sur lequel sont greffés des PCL préformés en employant le carbonyldiimidazole comme agent de couplage [48][49][50]. Bien que ces copolymères soient insolubles dans les phases aqueuses et organiques classiques, ils peuvent être préalablement dispersés dans une phase organique et sont ensuite capables de migrer et se localiser aux interfaces eau/huile ; agissant alors comme stabilisant d'émulsion. Le dextrane migre préférentiellement à l'interface aqueuse alors que le PCL reste vers l'intérieur des gouttelettes. Lors de l'évaporation du solvant, le copolymère précipite en nanoparticules PCL entourées d'une couche de dextrane. La quantité de dextrane dans ces particules a été estimée à 70 % [49][51].

Quelques études ont porté sur la modification de polysaccharides par des groupes cholestérol. Le cholestérol est un lipide essentiel chez les être vivants : il participe à la formation des cellules membranaires et à la synthèse de vitamine D ou encore d'hormones stéroïdiennes. Conjuguer le cholestérol hydrophobe à des polysaccharides hydrophiles permet donc d'obtenir des copolymères amphiphiles qui peuvent s'auto-assembler en nanoparticules. Ainsi, Wang et coll. [52] ont modifié le chitosane par du cholestérol et ont observé que ces macromolécules peuvent s'auto-assembler en solution aqueuse et former des nanoparticules sphériques de diamètre moyen de 417 nm. De l'épirubicine (isomère de la doxorubicine) a été encapsulé dans ces nanoparticules avec une efficacité d'encapsulation variant de 8% à 14%. Akiyoshi et coll. [53] ont quant à eux modifié le pullulane par des groupes cholestérol. Quelle que soit la masse molaire des pullulanes de départ et leur degré de substitution, l'auto-assemblage des polymères finaux par association hydrophobe conduit à la formation, dans l'eau, d'agrégats monodisperses. La taille de ces agrégats est inversement proportionnelle au taux de greffage.

² Appelé aussi Doxorubicine (anti-cancer utilisé en chimiothérapie)

1.2.6. Nanoparticules à couronne dextrane

Nous venons de décrire, dans les pages précédentes, quelques exemples de formulations de nanoparticules hydrophobes stabilisées par une couronne de polysaccharides. Le LCPM a particulièrement œuvré à produire de telles nanoparticules. Pour cela, différents dérivés du dextrane ont été produits qui sont exposés dans ce qui suit.

1.2.6.1. Généralités sur le dextrane

Le dextrane est un polysaccharide produit par un grand nombre de microorganismes à partir du saccharose, majoritairement obtenu à partir de la fermentation de sucres de betterave. Selon les microorganismes qui sécrètent ce polysaccharide, le dextrane est constitué par 60% minimum d'unités glucose α -1,6 (Figure 11) et d'un nombre variable de liaisons α -1,2, α -1,3 et α -1,4. La bactérie *Leuconostoc mesenteroides* (souche B512-F) est la plus souvent employée pour la production commerciale du dextrane. Une enzyme, la dextrane-sucrase, est présente dans ces organismes. Elle se complexe avec le saccharose et conduit à la formation de fructose et d'un dextrane dit « natif ». Celui-ci possède une masse molaire élevée et une large distribution de masses molaires. Ce dextrane « natif » est ensuite partiellement hydrolysé ce qui conduit à l'obtention de macromolécules essentiellement linéaires qui possèdent un nombre réduit de courtes chaînes liées en α -1,3 à la chaîne principale. Leurs masses molaires sont variables, mais réduites par rapport à celle du dextrane « natif ».

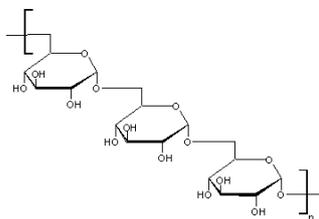


Figure 11 - structure linéaire du dextrane

Le dextrane possède un certain nombre de propriétés intéressantes qui permettent un usage polyvalent, essentiellement dans le domaine médical. C'est un polymère neutre et très hydrophile qui n'est soluble que dans l'eau et dans quelques solvants organiques polaires tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), la formamide, l'éthylène glycol ou le glycérol. En solution aqueuse, il adopte la conformation de pelote statistique et ne présente pas d'interactions intramoléculaires.

Le dextrane peut être ingéré oralement et est bien toléré par l'organisme. Son ingestion est suivie par une rapide augmentation du taux de sucre présent dans le sang et du glycogène dans le foie. Le dextrane est ainsi digestible. De nombreuses applications dans le domaine de la médecine (utilisation ophtalmologique, crèmes, substitut du plasma) ont montré que le dextrane est parfaitement biocompatible [54][55].

Dans l'organisme, ce polysaccharide est en majorité dégradé par la dextranase en sucres de faibles masses molaires, comme le glucose et l'isomaltose, eux-mêmes convertis par la suite en dioxyde de carbone et en eau. Cette enzyme est présente dans les tissus tels que le rein, le colon, la rate ou

encore le poumon, mais pas dans le sang [56]. Le dextrane est ainsi complètement biodégradable et donc bioéliminable, qualités indispensables pour une application *in vivo* [12].

1.2.6.2. Dérivés alkylés du dextrane

Parmi les nombreux travaux effectués sur la modification du dextrane, une partie concerne la fixation de groupements hydrophobes sur la chaîne macromoléculaire, ce qui a pour conséquence de rendre la macromolécule amphiphile. À partir d'un certain taux de modification, propre à chaque groupe hydrophobe introduit, la solubilité du polysaccharide est alors totalement modifiée. Au sein du laboratoire, de nombreux travaux ont porté sur la fixation de chaînes alkyle et de groupes phénoxy (Figure 12).

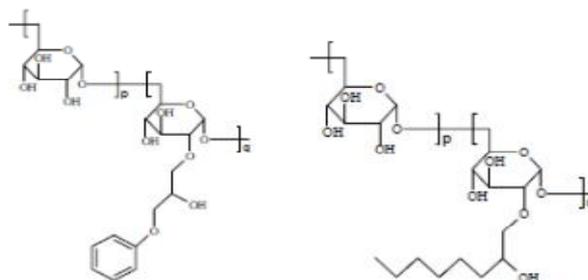


Figure 12 - Dextrane modifié par des groupements phénoxy et alkyle - (*p*: nombre d'unités non substituées et *q*: nombre d'unités substituées)

Cette fixation est réalisée sur les fonctions hydroxyle par l'intermédiaire d'une liaison éther. Cette réaction s'effectue en une seule étape, par réaction du dextrane en milieu basique sur des dérivés 1,2-époxy porteurs du motif hydrophobe désiré. La synthèse est présentée en Figure 13 en prenant l'exemple de la fixation de groupements phénoxy.

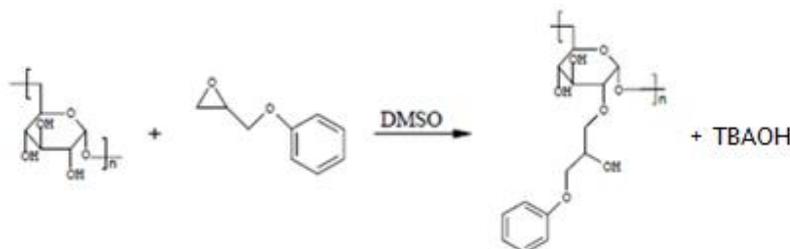


Figure 13 - Hydrophobisation du dextrane par des groupes phénoxy

Le degré de substitution du dextrane par les groupes hydrophobes (phénoxy par exemple) peut être déterminé par RMN ^1H . Il est exprimé en pourcentage indiquant le nombre de fonctions hydroxyle qui ont été modifiées pour 100 unités glucosidiques. Comme chaque unité glucose possède trois fonctions hydroxyle, il est en théorie possible de greffer jusqu'à trois groupements phénoxy par unité. Ainsi, le degré de substitution des dextrane modifiés peut varier de 0 à 300% [57]. Des études viscosimétriques [13] ont montré que les interactions hydrophobes intramolécules et intermolécules entre les

groupements phénoxy par exemple conduisent à des conformations plus ou moins "recroquevillées" en solution diluée de la chaîne macromoléculaire.

1.2.6.3. Les copolymères dextrane-g-acide polylactique

La synthèse de copolymères constitués d'une dorsale dextrane et de greffons polylactide a été effectuée au LCPM en trois étapes selon la stratégie du « grafting from », qui consiste à amorcer une polymérisation à partir des fonctions hydroxyle résiduelles, activées et réparties le long de la dorsale dextrane. Cette polymérisation se fait via l'ouverture de cycle du D,L-lactide (Figure 14) [12] [58]

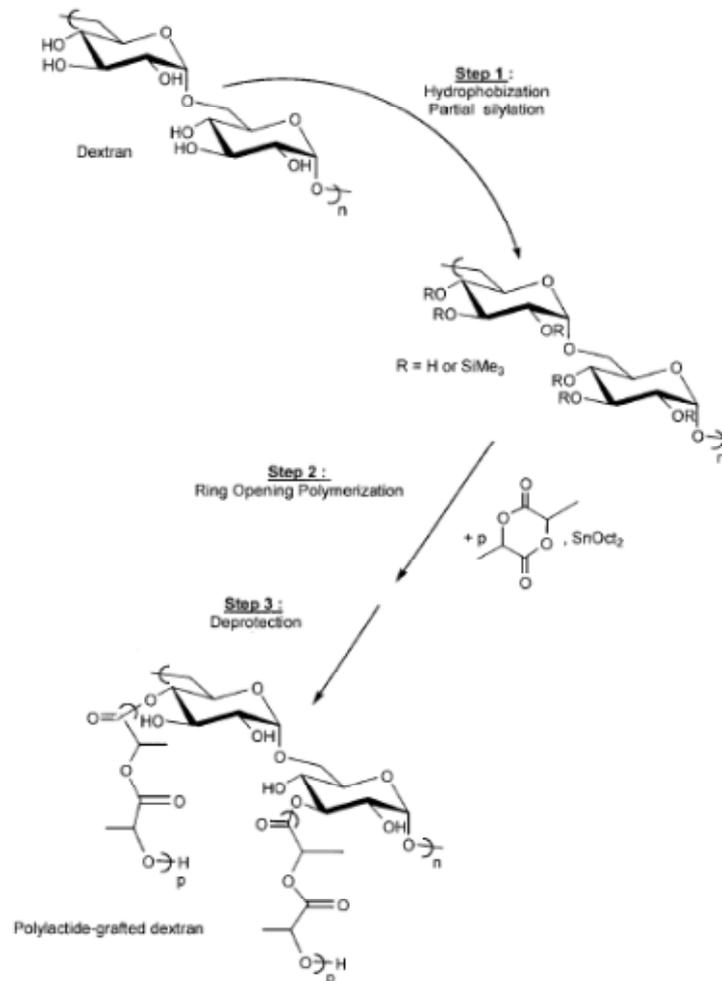


Figure 14 - Schéma de synthèse des copolymères dextrane-g-acide polylactique

Les trois étapes de cette synthèse sont les suivantes :

- La première étape consiste à protéger une partie des fonctions hydroxyle du dextrane par l'intermédiaire d'une silylation. Cette étape permet de contrôler le nombre de fonctions alcool résiduelles et par la suite le nombre de greffons PLA du copolymère final. La silylation partielle du dextrane permet également de l'hydrophobiser et de le rendre soluble dans des solvants organiques peu polaires.

Bibliographie

- Les fonctions hydroxyle résiduelles, non silylées, sont mises à profit pour amorcer la polymérisation par ouverture de cycle du lactide en milieu organique. L'amorçage est réalisé à l'aide d'un activateur, qui est le bis(2-éthylhexanoate d'étain) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), le triéthylaluminium (AlEt_3) ou le triisopropylate d'aluminium ($\text{Al}(\text{O-iPr})_3$). L'hydrophobisation du dextrane dans l'étape précédente permet de réaliser cette polymérisation en milieu homogène, ce qui contribue au contrôle de l'architecture macromoléculaire.
- Enfin, pour assurer un caractère amphiphile au copolymère greffé final, il est nécessaire de restituer au dextrane son caractère hydrophile lors d'une étape de clivage des groupements silyléther. Cette étape se fait dans des conditions opérationnelles douces, non destructrices du dextrane et des greffons PLA.

Une procédure de synthèse correctement contrôlée permet la préparation de ces copolymères dont le taux de greffage varie. Ils se distinguent par deux paramètres structurels :

- Le nombre de chaînes latérales polylactide attachées à la chaîne principale dextrane [12].
- La longueur des greffons, caractérisée par leur masse molaire moyenne en nombre.

En faisant varier ces deux paramètres, et ainsi en modulant le ratio PLA/dextrane, les copolymères sont soit très solubles dans l'eau, soit solubles dans des solvants organiques comme le triacétate de glycérol ou le dichlorométhane. Un aspect intéressant de cette stratégie est la possibilité de limiter le nombre de greffons tout en augmentant leur longueur. Il semblerait que ce soit une manière de maintenir une vitesse suffisante de dégradation enzymatique de ces dextrane-g-acide polylactique, tout en conservant leur solubilité dans les solvants organiques [17].

Un certain nombre d'études [12][18][59][60] menées sur les propriétés de ces copolymères dextrane-g-PLA aux interfaces et en solution ont montré leur capacité à s'organiser en solution, quelle que soit leur solubilité et à adopter un comportement tensio-actif. Ceci est en particulier dû au caractère amphiphile des macromolécules, conféré par la présence de zones dextrane hydrophiles et de zones PLA hydrophobes. Ces propriétés peuvent être particulièrement utiles dans de nombreuses applications respectueuses de l'environnement ou encore dans les applications biomédicales nécessitant une stabilisation interfaciale pendant leur mise en œuvre.

2. Lutte contre le VIH-1

2.1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1)

Le virus de l'immunodéficience humaine est un rétrovirus³ s'attaquant au système immunitaire de l'homme et qui induit à terme, le Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA). Certainement dû à une mauvaise information, certains pensent encore à tort que la salive, le toucher ou la transpiration sont des moyens de transmissions. Rappelons que le virus du SIDA ne se transmet que par les fluides corporels tels que le sang, les sécrétions vaginales, le sperme ou le lait maternel.

Le VIH fait partie du genre *Lentivirus*, ce qui signifie qu'il possède, entre autre, une longue période d'incubation. Aussi, une personne infectée par le VIH (séropositive) ne verra son système immunitaire nettement réduit (apparition du SIDA) qu'après plusieurs mois, voire plusieurs années.

2.1.1. Histoire de la découverte du VIH.

C'est en 1981 aux Etats-Unis (New York et San Francisco) que les premiers cas de SIDA ont été observés. Il n'était d'ailleurs pas encore question de SIDA, ni même de VIH, puisque le virus n'était pas encore identifié. A ses débuts, la maladie semblait affecter uniquement les homosexuels. C'était dans ce contexte que le nom de « gay syndrome » fut donné. On observait alors chez ces malades une disparition presque complète de certains globules blancs, les lymphocytes T [61]. Après enquête auprès des autorités de santé de l'état de Californie, on retrouva 5 patients hospitalisés à Los Angeles présentant un syndrome similaire. Le centre d'épidémiologie des CDC (Center of Disease Control) d'Atlanta publia une première alerte le 5 juin 1981 dans son bulletin hebdomadaire « Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) » [62]. D'autres malades furent signalés progressivement. Tous étaient des patients présentant souvent une pneumocystose⁴ grave. Très régulièrement, les malades étaient également atteints de candidoses⁵ d'infections à cytomégalovirus⁶. Les spécialistes américains déclarèrent : « toutes ces observations suggèrent la possibilité d'un dysfonctionnement de l'immunité cellulaire liée à une exposition commune qui prédispose les individus aux infections opportunistes, telles que la pneumocystose et la candidose ». Conjointement à New York, quelques cas de cette singulière immunodépression (ou immunodéficience) acquise furent observés chez de jeunes homosexuels qui présentaient épuisement, amaigrissement, poussées de fièvre et lente dégradation de l'état général sans signes spécifiques. Un patient qui mourut rapidement d'une infection cérébrale à toxoplasme, parasite sans danger pour l'homme (sauf pour le fœtus) et dont une espèce est responsable de la toxoplasmose, semble avoir induit chez plusieurs de ses partenaires une maladie tout à fait similaire, faisant suspecter un agent infectieux commun. On découvrit plus tard que certains patients étaient toxicomanes ou hémophile. Le terme de « gay syndrome » fut abandonné petit à petit.

³ Virus dont le génome est constitué d'ARN, souvent utilisé comme vecteur pour le transfert de gènes à visée thérapeutique.

⁴ Infection respiratoire grave, due à un parasite, pouvant être mortelle.

⁵ Infection fongique des muqueuses causée par des levures du genre *candida*.

⁶ Virus responsable d'infections passant le plus souvent inaperçues, mais qui deviennent pathogènes chez les patients dont les défences immunitaires sont faibles.

C'est en 1982 que Willy Rosenbaum vint chercher à l'Institut Pasteur l'aide nécessaire pour travailler sur cet étrange virus. L'équipe de Luc Montagnier, Jean-Claude Chermann et Françoise Barrée-Sinoussi répondit à l'appel. Ils menèrent ensemble leurs recherches au sein de l'unité d'oncologie virale sur les relations « rétrovirus-cancers ». Les patients atteints de cette maladie voyaient leur taux de lymphocytes CD4 diminuer brutalement ce qui laissait penser à l'époque que ces derniers étaient la cible du virus. Aussi, le siège de ces globules blancs, les ganglions, ont été étudiés avec attention. L'équipe de l'Institut Pasteur reçut en 1983 les premiers échantillons de biopsie ganglionnaire d'un patient atteint de « lymphadénopathie généralisée » (c'est-à-dire au stade de pré-sida). Une activité de transcriptase inverse fut alors observée, mais également une mort systématique des cellules mises en culture en présence du virus. Pour ne pas perdre le virus, il fut « nourri » de cellules saines de donneurs. Ainsi, l'activité du virus fut à nouveau et aussitôt observée, suivie par la mort cellulaire. L'effet cytopathogène du virus fut ensuite démontré. C'est en 1983 que la première publication contenant la description du virus du SIDA fut publiée [63], suivies de 2 autres, par la même équipe l'année suivante [64] [65].

En 1986, l'équipe de François Clavel a découvert une autre souche de VIH, le VIH-2, qui est présent dans certaines régions d'Afrique de l'Ouest [66]. Le VIH-2 partage environ 40 % d'identité de séquences identiques avec le VIH-1. Des données phylogéniques montrent que le VIH-1 proviendrait d'une transmission unique inter-espèce, du chimpanzé à l'homme, du virus SIVcpz (SIV : simian immunodeficiency virus) (Figure 15) [67]. En parallèle, les singes mangabey fuligineux ont transmis (transmissions multiples) le virus SIVsmm à l'homme, conduisant au VIH-2 (Figure 15)[67].

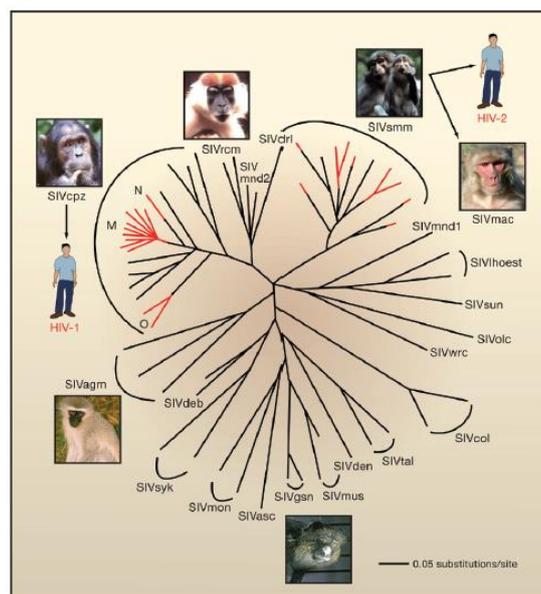
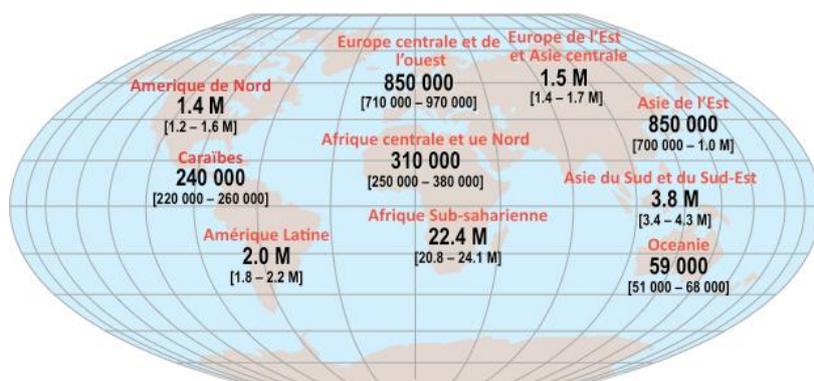


Figure 15. Relation entre les rétrovirus de l'immunodéficience chez les primates. Les relations phylogéniques des virus humains VIH-1 et VIH-2 sont indiquées par les lignes rouges. Les virus VIH-1 et VIH-2 ont pour origine une transmission à l'homme respectivement des virus simiens SIVcpz et SIVsmm. Le virus SIVcps est lui-même le produit de recombinaison entre SIVrcm et SIVgsn. Les trois groupes principaux M, N et O sont indiqués [67].

2.1.2. Le VIH dans le monde

Bien que le nombre de personnes décédées en 2009 (1,8 million) ait reculé par rapport à 2004 (2,1 millions), le SIDA reste l'un des problèmes majeurs de santé publique à l'échelle mondiale. En effet, en 2008, l'organisation ONUSIDA (Programme Commun des Nations Unies sur le SIDA) estimait à 33,4 millions (*Figure 16*) le nombre de personnes vivant avec le VIH, dont 22,4 millions en Afrique Sub-saharienne. 2,7 millions de personnes ont été nouvellement infectées au cours de l'année 2008, soit 7400 nouvelles personnes infectées par jour [68] (*Figure 17*). Néanmoins, de nombreuses personnes demeurent porteuses du virus sans le savoir. On avance ainsi le nombre de 40 000 personnes en France [69]. Bien que l'épidémie tende à se stabiliser depuis 2004 (*Figure 18*), environ 25 millions de personnes infectées par le VIH sont décédées depuis le début de la pandémie. Il n'existe aujourd'hui encore aucun traitement ni préventif ni curatif contre le virus du SIDA. C'est pourquoi, le développement de nouveaux médicaments est indispensable et reste donc une priorité à l'échelle mondiale.



Total : 33.4 millions (31.1 – 35.8 millions)

Figure 16. Données épidémiologiques ONUSIDA pour l'année 2008. Nombre d'adultes et d'enfants infectés par le VIH. (M : million) [68].

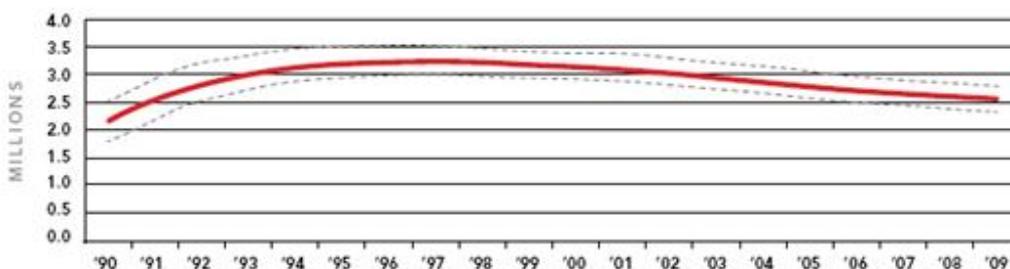


Figure 17 - Evolution du nombre des nouvelles infections dans le monde [68]

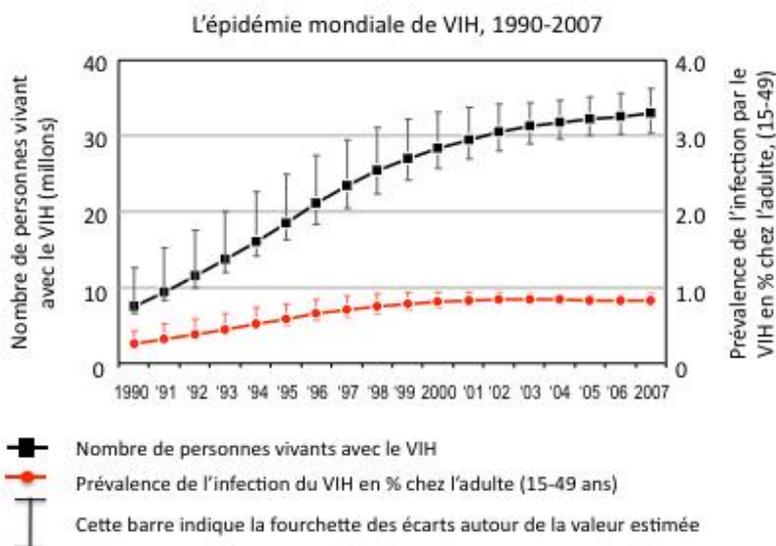


Figure 18 - Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH et de la prévalence de l'infection dans le monde [68]

2.1.3. Qu'est ce que le Syndrome de l'Immunodéficience Acquisée (SIDA) ?

Le SIDA est la dernière étape de l'infection par le VIH. En effet, le Virus de l'Immunodéficience Humaine s'attaque directement aux cellules du système immunitaire humain. Durant cette période de destruction cellulaire, aucun symptôme n'est visible sur l'individu. On dit que l'individu est séropositif. Puis, on observe l'évolution de l'infection par la numération décroissante des lymphocytes T CD4+. En deçà de 200 unités/mL (ou 14% des unités totales), l'individu est alors déclaré malade du SIDA. Le SIDA peut se déclarer jusqu'à 15 ans après l'infection par le VIH. A ce stade, le système immunitaire étant presque totalement détruit, le malade est vulnérable à toutes les infections dites « opportunistes ». Des infections banales pour des adultes sains deviennent très rapidement un lourd combat thérapeutique pour un malade du SIDA. C'est l'accumulation de ces maladies qui conduira au décès du patient.

2.1.4. Du VIH au SIDA

2.1.4.1. Structure du VIH-1

Le VIH est un virus sphérique d'environ 145 nm de diamètre [70] et composé d'une structure extérieure "épineuse" qui lui permet un ciblage efficace et une capture par les cellules telles que les lymphocytes et les macrophages. Cette structure externe nous permet d'assimiler le VIH-1 à une nanoparticule naturelle fonctionnalisée [71] (Figure 19). Chaque « épine » est en réalité un assemblage non covalent complexe de glycoprotéines, la protéine gp120 à l'extérieur et la protéine gp41 transmembranaire selon la nomenclature de Leis et al. [72]. L'enveloppe du virus est composée d'une membrane lipidique extérieure et d'une membrane cellulaire interne appelée Matrice.

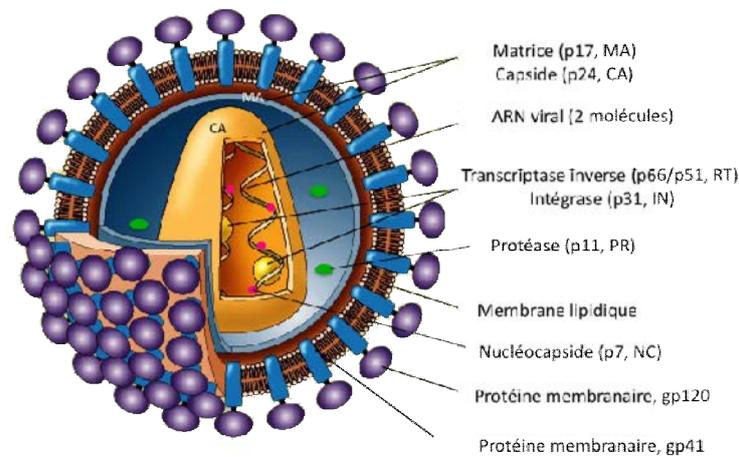


Figure 19 - Structure schématisée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). La nomenclature des protéines du VIH-1 est celle de Leis et al. 1988 [72]

A l'intérieur de cette structure, on retrouve la protéase du VIH-1 et la capside renfermant différentes enzymes (intégrases, transcriptases inverses), protéines (nucléocapsides) ainsi qu'un simple brin d'ARN génomique en double exemplaire. Les enzymes présentes dans la capside sont la cible des principaux traitements antirétroviraux car elles sont spécifiques à ce virus. [73]

Notre étude se limitera à l'étude des inhibiteurs de la protéase du VIH-1, et notamment à l'inhibition de la dimérisation de cette dernière.

2.1.4.2. Cycle cellulaire du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 est un processus complexe à plusieurs étapes qui commence par la pénétration du virus dans la cellule cible. Ceci se traduit par la fusion de l'enveloppe de la glycoprotéine du virus avec la membrane plasmique de la cellule (Figure 20)[74].

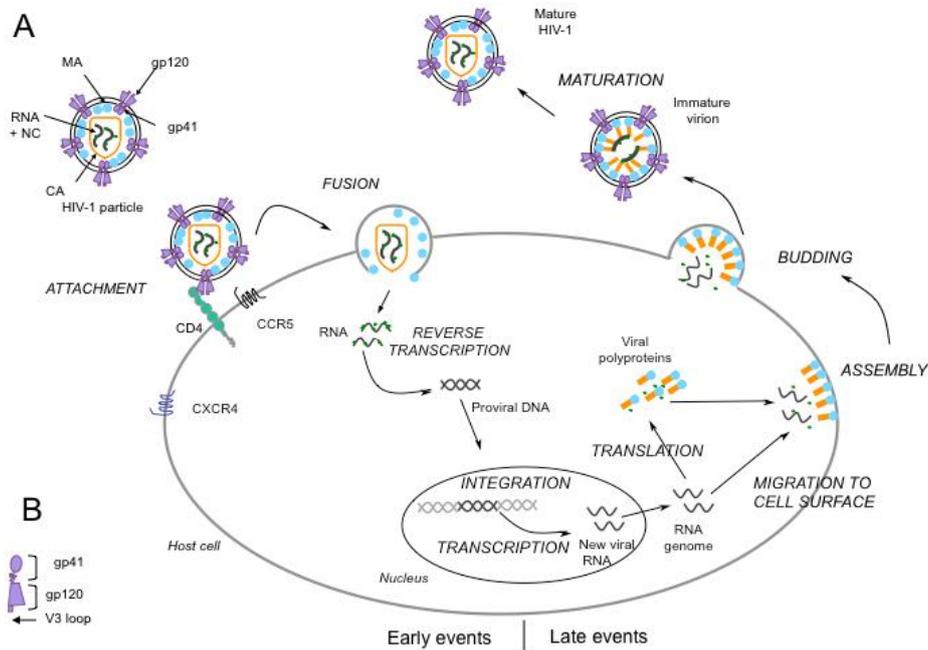


Figure 20. A. Résumé simplifié du cycle de réplication du VIH-1. B. Représentation schématique du complexe formé entre les protéines gp120 et gp4 [91][100].

Une fois les membranes cellulaire et virale fusionnées [75], le contenu du virus est libéré dans le cytoplasme de la cellule. La capside peut ensuite s'ouvrir et libérer le brin d'ARN qui est retranscrit en un double brin d'ADN viral par la transcriptase inverse présente au sein du virus. Ce double brin d'ADN est acheminé dans le noyau de la cellule infectée et intégré au génome de la cellule hôte à l'aide de l'intégrase. La cellule hôte produit alors de nouveaux brins d'ARN viraux qui d'une part seront traduits en polyprotéines, d'autre part constitueront le matériel génétique des nouveaux virus produits. Après migration à la membrane, polyprotéines et matériel génétique s'assemblent et bourgeonnent conduisant au détachement du virion immature, non infectieux. La maturation de celui-ci sous l'influence de la protéase virale permet la formation des protéines de structures et des enzymes virales : le virus mature est alors infectieux. En cas de mauvais clivage, le nouveau virus est soit non viable (cycle de réplication impossible), soit le virus reste viable mais dans ce cas il subit une mutation génétique.

2.1.5. Structure de la protéase du VIH-1

La protéase du VIH-1 est une protéase homodimérique à acides aspartiques de 22 kDa et composée de 2 monomères de 99 acides aminés chacun (Figure 21).

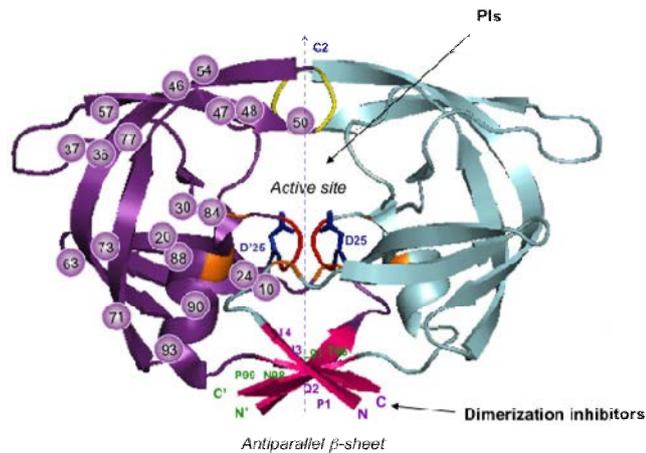


Figure 21 - Structure schématique du dimère de la protéase du VIH-1. Certaines mutations sont mises en évidence par des nombres (dans des sphères) sur l'un des monomères. D25, D25': aspartates catalytiques; C2, axe de symétrie; N and C extrémités : N- et C- terminales de l'un des monomères. Les « hot spots⁷ » ou zones de forte énergie d'interaction sont colorés en jaune, en rouge (triades des protéases à acides aspartiques), en orange (ponts salins intra- et intermonomères); en rose (feuillets B antiparallèles formés par l'interconnexion des N- et C- terminaux de chaque monomère). PIs, les inhibiteurs de protéase ciblant le site actif.[100]

Comme on peut le voir sur la Figure 21, le site actif est localisé à l'interface des deux monomères, chacun possédant un aspartate catalytique (D25 et D25'). Malheureusement, environ 47 mutations du virus ont été recensées qui sont localisées au niveau ou (essentiellement) à l'extérieur du site actif, ce qui réduit considérablement la sensibilité de la protéase par rapport à l'inhibiteur. Ceci conduit, à terme, à une faible activité ou à une inutilité des inhibiteurs du site actif sur la protéase mutée. De nouveaux traitements sont donc activement recherchés afin de pouvoir contourner ces résistances. Les inhibiteurs de la dimérisation de la protéase du VIH-1 constituent une voie prometteuse actuellement explorée.

⁷ Sites d'interactions fortes entre les deux monomères.

La protéase du VIH-1 joue un rôle crucial dans la maturation du virus (*Figure 22*) et l'inhibition de sa dimérisation, durant la maturation du virion, conduit à des virus non infectieux [110].

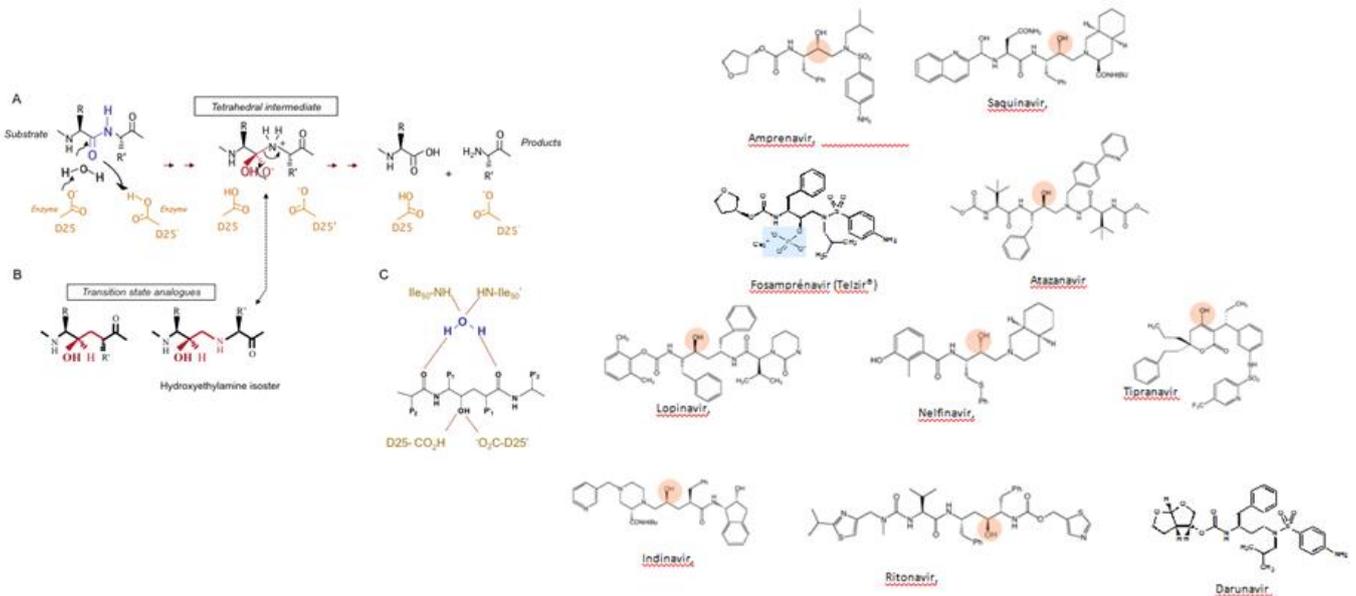


Figure 22. (gauche) Représentation des états de transition basés sur le mécanisme d'hydrolyse des liaisons peptidiques par catalyse de la protéase du VIH-1. A) mécanisme proposé pour l'hydrolyse d'un lien peptidique par la protéase du VIH-1. B) Motifs isostériques introduits dans la description des inhibiteurs, comme analogues de l'état de transition. C) Réseau de liaisons hydrogène pour la fixation d'un inhibiteur analogue de l'état de transition à l'intérieur du site actif de la protéase du VIH-1[100].

2.1.6. Les inhibiteurs de la dimérisation de la protéase du VIH-1 : une recherche prometteuse

La protéase du VIH-1 n'est active que sous sa forme homodimère, dans laquelle chaque monomère apporte un aspartate catalytique, D25 et D25' (*Figure 21*). Le dimère est alors stabilisé par interaction protéine-protéine. Les 4 brins du feuillet antiparallèle formé par l'interdigitation des extrémités N- et C- terminales de chaque monomère contribuent pour environ 75% de l'énergie totale de dimérisation de Gibbs et sont en majorité conservés dans le cas des différentes mutations du VIH-1. Dans ce contexte ce "hot spot" a été considéré comme cible privilégiée pour le développement de nouveaux inhibiteurs de la protéase du VIH-1 [76][77] (*Figure 24*). Le but des nouveaux inhibiteurs est de dissocier le dimère ou d'éviter sa formation en ciblant l'interface entre les deux protéases dans cette région « hot spot » relativement dénuée de toute mutation.

La formation du dimère de la protéase a tout d'abord été inhibée à l'aide des petits peptides de 4 à 8 acides aminés qui imitent les sequences des 4 ou 5 acides aminés des extrémités N- et C- terminales de chaque monomère. Ces peptides peuvent ainsi entrer en compétition avec la protéase et entraver la

formation du feuillet β du dimère. Ces peptides sont appelés *peptides d'interface* [78],[92],[93],[94] (Figure 23).

Des études ultérieures portant sur des variations structurales de mimes de l'extrémité C-terminale, meilleurs inhibiteurs que les mimes de l'extrémité N-terminale, [95] ont permis d'identifier la séquence consensuelle ISYEL ($K_{id} = 390 \text{ nM}$)⁸ [79]. Le Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle (LEMF) de l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC) a étudié la pénétration de ces inhibiteurs dans la cellule hôte. Plus particulièrement, ils se sont intéressés à l'addition d'une chaîne aliphatique hydrophobe à l'extrémité N-terminale de cette séquence peptidique [80]. Ceci a conduit aux *lipopeptides* qui se sont avérés être des inhibiteurs de la dimérisation très efficaces ($K_{id} = 11 \text{ nM}$) [81]. Par ailleurs, un groupe chargé (*groupe guanidinium bicyclique*) susceptible de réaliser une liaison ionique avec l'extrémité C-terminale de la protéase a également été introduit entre le peptide et la partie lipidique [96].

Une autre stratégie a consisté à reproduire le feuillet β -antiparallèle formé par l'interdigitation des extrémités N- et C-terminales d'un monomère de protéase en produisant des *pinces moléculaires antidimères*. Cette stratégie a été développée par le LEMF d'une part, en reliant deux bras peptidiques par un *espaceur rigide* ($K_{id}=560 \text{ nM}$)[86-88] et par le groupe de J. Chmielewski (Purdue University) d'autre part, qui a relié deux bras peptidiques par des *espaceurs flexible* [86][98] ou *semi flexible* [99].

⁸ Cette séquence ISYEL est caractérisée par une constante d'inhibition de la dimérisation très faible (K_{id}) égale à 390.10^{-9} M (mol/L). Il faut ainsi 390nM de cette séquence pour inhiber 50% de la dimérisation de la protéase.

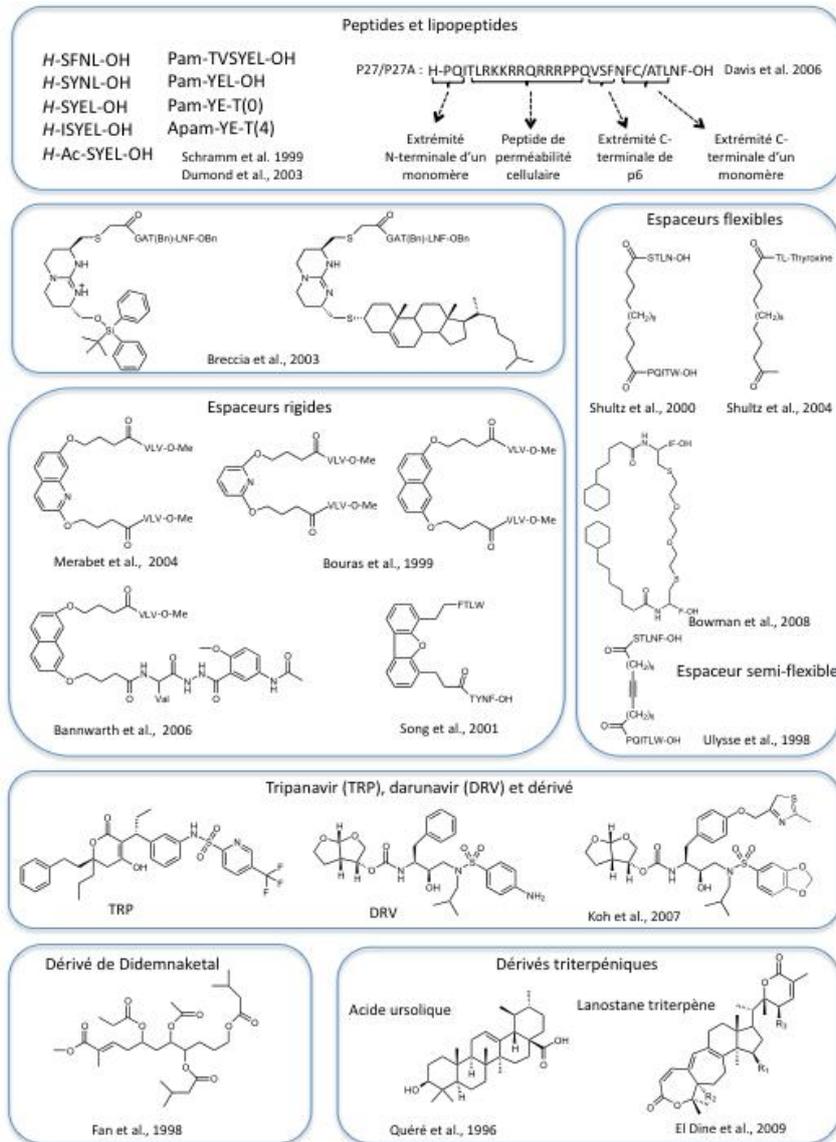


Figure 23. Historique des inhibiteurs de la dimérisation de la protéase du VIH-1[100].

Deux autres études menées par des groupes différents ont également conduit à des inhibiteurs de la dimérisation. Il s'agit des travaux de Park et Raines [101] qui ont greffé le peptide IVQVDAEGGC issu d'une sélection génétique sur un espaceur flexible bisulfonyle [-CH₂-S-(CH₂)₂-SO₂-(CH₂)₆-SO₂-(CH₂)₂-S-CH₂] et de ceux du groupe de Kiso qui a greffé sur l'acide 4-(2-aminoéthyl)-6-dibenzofunpropionique (ABFP, un espaceur rigide) les mimes de l'extrémité C- et N- terminales TYNF-OH et ITLW-H (K_{id} = 780 et 5400 nM, respectivement)[102]. Toutefois le pouvoir inhibiteur de ces composés est bien inférieur à ceux des composés développés au LEMF et synthétisés au LCPM.

Il a également été montré en 2006 par Davis et coll. que le peptide PQITLRKKRRQRRRPPQVSFNFC/ATLNF était un inhibiteur de la dimérisation de la protéase du VIH-1. Ces auteurs ont introduit ici une séquence favorisant la pénétration cellulaire afin d'augmenter la biodisponibilité de cet inhibiteur [103]. Encore plus récemment, Koh et coll. ont décrit des inhibiteurs

dans lesquels le tripanavir et le darunavir ciblent également le site actif de la protéase. Des résultats similaires ont également été observés en présence d'autres petites molécules, non peptidiques, inhibitrices de la dimérisation [104].

Le groupe de Schramm avait aussi montré que l'acide ursolique (un dérivé triterpénique) inhibe la dimérisation de la protéase. Cet acide agit selon un mécanisme mixte dont la composante inhibiteur de la dimérisation est plus favorable que la composante inhibiteur du site actif [105]. Plus récemment, El Dine et coll. ont montré qu'un lanostane triterpène inhibe exclusivement la dimérisation de la protéase [106]. Fan et coll. ont également identifié une molécule naturelle issue d'une ascidie marine inhibitrice de la dimérisation de la protéase du VIH-1 [107][108][109].

La structure de l'ensemble des molécules citées plus haut est présentée sur la *Figure 23*.

Les dernières générations d'inhibiteurs de la dimérisation de la protéase du VIH-1 sont présentées sur la *Figure 24*. Les lipopeptides sont d'une très grande efficacité quant à l'inhibition de la dimérisation de la protéase [80][81] avec une constante d'inhibition (K_{id}) de 0.3 nM pour le très récemment découvert palmitoyl-LEY (Pam-LEY) [82] (*Figure 24 B*). Des études d'ultracentrifugation [83] et de RMN [82] ont montré que ce lipopeptide palmitoyl-LEY empêche l'homodimérisation de l'enzyme par la formation d'un complexe monomère-inhibiteur.

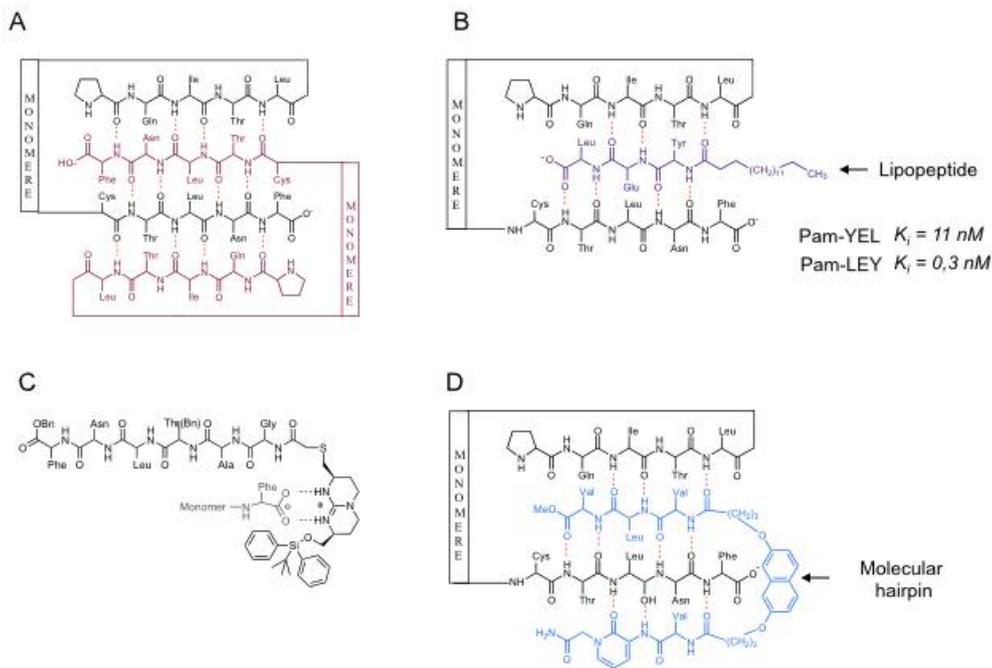


Figure 24. Stratégies pour le développement des inhibiteurs de dimérisation. A) Représentation de la zone d'interdigitation des extrémités N- et C- terminales des deux monomères de la protéase homodimérique (feuille B antiparallèle). B) Représentation d'un complexe monomère-inhibiteur formé avec les lipopeptides. C) Dérivés à base guanidinium, supposition d'une paire d'ions impliquant le carboxylate Phe99 et le guanidinium. D) Pince moléculaire peptidique. Pointillés : dans l'un des bras, un acide aminé a été remplacé par un motif organique qui imite potentiellement le réseau de liaisons hydrogène du feuillet B antiparallèle.

La stratégie antidimère a également conduit à la sélection de dérivés à base de guanidinium [84] (*Figure 24 C*) ainsi que des peptides reliés par des espaceurs flexibles [85][86] ou rigides [87][83]. Ces bras espaceurs rigides chargés sont introduits pour interagir avec l'extrémité C-terminale du monomère [88]. Pour améliorer la stabilité métabolique ainsi que la biodisponibilité des pinces moléculaires, le caractère peptidique a été réduit en remplaçant un ou plusieurs acides aminés par des groupements mimant leur fonction de liaisons hydrogène [89] (*Figure 24 D*).

Encore plus remarquable, tous ces inhibiteurs de dimérisation [90][91] et lipopeptides [83] se montrent aussi efficaces *in vitro* contre la protéase du VIH-1 et plusieurs protéases mutées. Pour plus de détails biologiques concernant cette partie, le lecteur est invité à consulter les travaux de l'équipe du Pr. Michèle Reboud de l'UPMC.

2.1.6.1. L'évolution des traitements

Rappelons que le VIH est un rétrovirus. Ces virus ont la particularité de ne pas attaquer (ou peu) de cellules spécifiques puisqu'ils utilisent les cellules saines de notre corps pour proliférer, comme les lymphocytes T CD4 dans le cas du VIH. Un ciblage thérapeutique de ces rétrovirus est donc impossible.

Une des plus grosses avancées dans la lutte contre le SIDA fut l'apparition en 1996 de la thérapie antirétrovirale ou HAART (High Activity Antiretroviral Therapy). Les antirétroviraux agissent directement sur le cycle de réplication du virus et limite son activité à un point précis du cycle (Inhibiteur de fusion, **inhibiteur de protéase**, inhibiteur de transcriptase inverse, etc). Les mutations génétiques étant très nombreuses dans les cas des rétrovirus, la HAART associe plusieurs antirétroviraux (de 3 à 4 molécules) pour une meilleure efficacité du traitement. On parle alors de tri- ou quadrithérapie. Le premier traitement par anti-rétroviraux [73] semble avoir été testé en 1993 [111] [112]. Néanmoins, ces traitement étant extrêmement lourds pour les patients, la recherche n'a cessé d'améliorer l'efficacité des molécules pour ainsi limiter le nombre de prises journalières [113] mais également les effets indésirables (tel que la lipodystrophie⁹) [114] encore bien trop nombreux [115].

De nos jours, les recherches ont permis d'élaborer beaucoup d'agents antirétroviraux [116] qui permettent de lutter contre les effets secondaires, les mutations du virus etc (*Tableau 2*). Cependant, un gros travail reste également à faire en ce qui concerne le traitement sur les enfants qui supportent beaucoup moins les effets indésirables et la combinaison des agents.

⁹ Dystrophie du tissu graisseux, en général, de la région sous cutanée.

Bibliographie

Tableau 2 - Différents agents antirétroviraux mis sur le marché [73].

Drug family	Drug	Commercial name (company)	FDA approval	Dosage forms	Adult dose	Pediatric dose
Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs)	Zidovudine (AZT)	Retrovir® (GlaxoSmithKline)	1987	Tablets (300 mg), capsules (100 mg), syrup (10 mg/mL).	600 mg/day (2 doses)	160 mg/m ² every 8 h
	Didanosine	Videx® (Bristol Myers Squibb)	1991	Capsules (125, 200, 250, 400 mg), oral solution (powder – 2 g), oral suspension (pediatric powder – 2 g), and tablets (25, 50, 100, 150 mg).	400 mg/day (1 dose)	120 mg/m ² twice daily
	Zalcitabine*	Hivid® (Hoffmann-La Roche)	1992	Tablets (0.375, 0.750 mg)	2.25 mg/day (3 doses)	Na
	Stavudine	Zerit® (Bristol Myers Squibb)	1994	Capsules (15, 20, 30, 40 mg) and oral solution (1 mg/mL).	80 mg/day (1 or 2 doses)	1 mg/kg/dose every 12 h
	Lamivudine	Epivir® (GlaxoSmithKline)	1995	Tablets (150, 300 mg) and oral solution (10 mg/mL).	300 mg/day (1 or 2 doses)	4 mg/kg twice daily (up to a maximum of 150 mg twice a day)
	Abacavir	Ziagen® ABC (GlaxoSmithKline)	1998	Tablets (300 mg) and oral solution (20 mg/mL).	600 mg/day (1 or 2 doses)	8 mg/kg twice daily (maximum of 300 mg twice daily)
Nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs)	Emtricitabine	Emtriva® (Gilead Sciences)	2003	Capsules (200 mg) and oral solution (10 mg/mL).	Capsule: 200 mg/day Oral solution: 240 mg/day (1 dose)	6 mg/kg, maximum of 240 mg (24 mL) once daily
	Tenofovir	Viread® (Gilead Sciences)	2001	Tablets (300 mg)	300 mg/day (1 dose)	Na
Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs)	Nevirapine	Viramune® (Boehringer Ingelheim)	1996	Tablets (200 mg) and oral suspension (10 mg/mL).	First 14 days: 200 mg/day Alter 14 days: 400 mg/day (2 doses)	150 mg/m ² once daily for 14 days followed by 150 mg/m ² twice daily
	Delavirdine	Rescriptor® Sustiva™, Stocrin™ (Pfizer)	1997	Tablets (100 mg)	1200 mg/day (3 doses)	Na
	Efavirenz*	Sustiva® (Boehringer Ingelheim)	1998	Capsules (50, 100, 200 mg), tablets (300, 600 mg) and oral solution (30 mg/mL)	600 mg/day (1 dose)	10 kg < 15 kg (200 mg), 15 kg < 20 kg (250 mg), 20 kg < 25 kg (300 mg), 25 kg < 32.5 kg (350 mg), 32.5 kg < 40 kg (400 mg), at least 40 kg (600 mg) once daily
Protease inhibitors (PIs)	Etravirine	Intelence® (Tibotec, J&J)	2008	Tablets (100 mg)	400 mg/day (2 doses)	Na
	Saquinavir	Invirase® (Hoffmann-La Roche)	1995	Capsules (200 mg) and tablets (500 mg).	2000 mg/day (2 doses)	Na
	Indinavir	Crixivan® (Merck & Co.)	1996	Capsules (100, 200, 300, 400 mg).	2400 mg/day (3 doses)	Na
	Ritonavir	Norvir® (Abbott Labs)	1996	Soft capsules (100 mg) and oral solution (600 mg/ 7.5 mL).	1200 mg/day (2 doses)	350 to 400 mg/m ² twice daily, not to exceed 600 mg twice daily
	Lopinavir	Aluviran® (Abbott Labs)	1997	Na	Na	Na
	Nelfinavir	Viracept® (Pfizer)	1997	Oral powder (50 mg/g) and tablets (250 and 625 mg)	2500 mg/day (2 or 3 doses)	45 to 55 mg/kg twice daily or 25 to 35 mg/kg three times daily
	Amprenavir	Agenerase® (GlaxoSmithKline)	1999	Capsules (50 mg) and oral solution (15 mg/mL)	2400 mg/day (2 doses – 24 capsules × dose)	20 mg/kg twice daily or 15 mg/kg 3 times daily (to a maximum daily dose of 2400 mg)
	Fosamprenavir	Lexiva® (GlaxoSmithKline)	2003	Tablets (700 mg) and oral suspension (50 mg/mL)	2800 mg/day (2 doses)	30 mg/kg twice daily, not to exceed the adult dose.
	Atazanavir	Reyataz® (Bristol Myers Squibb)	2003	Capsules (100, 150, 200, 300 mg)	400 mg/day (1 dose)	15 kg < 20 kg 8.5 mg/kg once daily
	Tipranavir	Aptivus® (Boehringer Ingelheim)	2005	Capsules (250 mg) and oral solution (100 mg/mL)	1000 mg/day (2 doses)	14 mg/kg twice daily, maximum dose 500 mg.
Darunavir	Prezista® (Tibotec, J&J)	2006	Tablets (75, 300, 400, 600 mg)	1200 mg/day (1 or 2 doses)	Na	
Viral fusion/entry inhibitors	Enfuvirtide**	Fuzeon® (Hoffmann-La Roche)	2003	Powder (lyophilized) for injectable solution (90 mg/mL)	180 mg/day (2 doses)	6 to 16 years of age, 2 mg/kg twice daily. Maximum dose 90 mg twice daily
	Maraviroc***	Selzentry® (Pfizer)	2007	Tablets (150, 300 mg)	1200 mg/day (2 doses)	Na
Integrase inhibitors	Vicriviroc***	Schering-Plough	Phase III	Tablets (30 mg)	30 mg/day	Na
	Raltegravir	Isentress® or MK-0518 (Merck & Co.)	2007	Tablets (400 mg)	800 mg/day (2 doses)	Na
Maturation inhibitor	Elvitegravir	Gilead Sciences	Phase III	Na	150 mg/day	Na
	Bevirimat	Panacos Pharmaceuticals	Phase II	Tablets and oral solution (concentration Na)	600 mg/day	Na

Bibliographie

Drug family	Drug	Commercial name (company)	FDA approval	Dosage forms	Adult dose	Pediatric dose
Fixed Dose Combinations (FDC)	Lamivudine/ zidovudine	Combivir® (GlaxoSmithKline)	1997	Tablets (150, 300 mg)	300 and 600 mg (2 doses)	****
	Abacavir/ lamivudine/ zidovudine	Trizivir® (GlaxoSmithKline)	2000	Tablets (150, 300 mg)	300 to 600 mg (2 doses)	****
	Lopinavir/ ritonavir	Kaletra® (Abbott Labs)	2000	Tablets (50, 200 mg), oral solution (80 mg/mL, 20 mg/mL)	200 to 800 mg (1 or 2 doses)	7 kg < 15 kg (12/3 mg/kg), 15 kg < 40 kg (10/2.5 mg/kg), < 40 kg (400/100 mg) twice daily
	Tenofovir/ emtricitabine	Truvada® (Gilead Sciences)	2004	Tablets (200, 300 mg)	200 to 300 mg (1 dose)	****

*Available in a named-patient program only in US.

**Fusion inhibitor. Binds gp41.

***Entry inhibitor. Binds the CCR5 co-receptor.

****A fixed-dose tablet cannot be dose adjusted for the pediatric population.

Na: not available.

Un des problèmes liés à la thérapie anti-SIDA est la présence de lieux particuliers considérés comme réservoirs de virus qui sont impossible à atteindre. Il s'agit du système nerveux central ou du foie [117]. Ajouté à cela, l'élimination des médicaments par l'organisme. Le tout s'oppose à une complète disparition du virus [118]. Les traitements par voie intraveineuse commencent à émerger et semblent être une intéressante alternative aux administrations orales. Cela pourrait permettre de diminuer le nombre de prises par jour, tout en maintenant un niveau constant de médicament dans le sang. Cependant, le problème majeur concerne la très pauvre solubilité des inhibiteurs de protéase dans le sang. Une encapsulation de ces agents antirétroviraux peut donc s'avérer d'un grand intérêt [119].

Idéalement, la cible des nanoparticules doit être uniquement les cellules infectées par le VIH-1. Cependant, le ciblage est difficile du fait de la très courte durée de vie des cellules infectées (demi-vie de 1-2 jours). De plus, le manque de marqueurs spécifiques aux cellules infectées complique la chose [120]. Le ciblage passif du système immunitaire est l'une des voies possibles. C'est celle-ci que nous avons envisagée.

2.2. Nanoparticules de 1^{ère} et 2^{ème} générations pour une vectorisation efficace contre le VIH-1

Les traitements de trithérapie restent de nos jours des traitements extrêmement lourds pour les patients. En effet, les quantités de médicaments peuvent être très importantes : 3 à 5 gélules par prise et ce jusque 5 fois par jour. De plus, ces traitements induisent pour la plupart du temps des effets indésirables tels que le vomissement ou la perte d'appétit. Par conséquent, les chercheurs ont tenté de trouver un moyen pour soulager le traitement de ces personnes et d'améliorer l'efficacité des traitements *via* une administration intraveineuse [121]. Outre ce mode d'administration, divers traitements ont été expérimentés tel que des patches ou des implants en céramique contenant le principe actif [122]. Cependant l'administration intraveineuse et l'utilisation de nanoparticules de 1^{ère} ou 2^{ème} générations permettraient un ciblage passif ou furtif des zones à traiter tels que les lymphocytes et les réservoirs de virus dans le cas du traitement comme le VIH-1 [123].

Les nanoparticules ont donc été une solution développée par les chercheurs. Des particules métalliques de 10 à 50 nm de diamètre ont été proposées, mais leur biocompatibilité est souvent contestée. L'équipe de Melander C. a étudié par exemple la conjugaison d'un fragment d'inhibiteur de HIV potentiel avec des nanoparticules d'or de 2 nm de diamètre. Le but de l'étude était de comparer l'efficacité des nanoparticules conjuguées au fragment d'inhibiteur à l'inhibiteur original dans la formulation complète [124]. Une approche similaire à récemment été étudiée par Penades et al. [125]. L'équipe de Kub propose quant à elle des nanoparticules de cuivre ou d'alliage argent/cuivre comme inactivateur du VIH. La toxicité limitée ainsi que la basse concentration en métal utile font de ce procédé une autre voie de recherche. [126]. Des nanoparticules polymères, de taille plus importante (100-400 nm), présentent des caractéristiques de biocompatibilité ou biodégradabilité [127][128]. L'émergence de nouveaux systèmes est toujours d'actualité mais implique souvent l'utilisation de molécules ou solvants nocifs pour le corps humain et difficiles à éliminer après formulation. Une recherche constante concernant l'utilisation de produits "propres" est menée [129].

Dans le cadre de ce doctorat, l'emploi de particules de 2^{ème} génération a été retenu dans le cadre d'une thérapie anti-SIDA potentielle. En effet, une bonne utilisation de l'inhibiteur retenu dans cette étude est avant tout son intégration à la cellule infectée par le VIH-1, notamment dans le cytoplasme, où la protéase est libérée après « synthèse par la cellule hôte ». Dans le cadre de cette application particulière, c'est principalement le système immunitaire qui est tout particulièrement visé, notamment les macrophages et lymphocytes-T. Il est donc important que les nanoparticules que nous produisons restent suffisamment longtemps dans l'organisme pour diffuser et être distribuées dans tout le corps. Elles doivent également être reconnues puis captées par le système immunitaire, ce qui adviendra même si ces particules sont qualifiées de « furtives » [130].

L'étude que nous avons menée dans ce cadre sera exposée dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

3. Lutte contre le cancer

3.1. Le cancer

Ce nom aurait été donné par Hippocrate [131], parce que le cancer « *a des veines étendues de tous côtés, de même que le crabe a des pieds* » [132]. La même source ajoute que « *son nom lui vient, selon quelques-uns, de ce que quand il s'est emparé d'un organe, il ne le lâche plus, de même que fait le crabe quand il s'est attaché à quelque chose* ». Le cancer reste la deuxième cause de mortalité chez l'homme, derrière les maladies cardio-vasculaires.

3.1.1. Qu'est ce qu'un cancer ?

Le cancer est une maladie due à la prolifération anarchique de cellules qui se multiplient indéfiniment. Ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant, de le détruire puis de migrer et coloniser d'autres tissus. On parle alors de métastases.

La prolifération des cellules cancéreuses est rendue possible, entre autres, par le fait qu'elles ne répondent plus au signal d'autodestruction (les facteurs pro-apoptotiques) reçu par la cellule par des "récepteurs de mort".

3.1.2. Les traitements classiques du cancer

3.1.2.1. La chirurgie

La chirurgie consiste à retirer les tissus infectés par les tumeurs. Cependant, c'est une technique lourde pour le patient, mais qui s'avère souvent utile pour les petites tumeurs localisées. Lors de cancers métastasés, les médecins feront néanmoins appel à d'autres techniques.

3.1.2.2. La radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayons ionisants émis par certains éléments radioactifs pour détruire les cellules anormales, ou du moins ralentir leur progression. Cette technique est souvent associée à la chirurgie et peut être employée pour des cancers "jeunes" mais également lors de traitement palliatifs, c'est à dire dont le but n'est plus de guérir mais tout simplement de soulager le patient quand le cancer est trop avancé.

Il n'est pas question ici d'introduire quelconques molécules ou médicaments. C'est uniquement l'action des rayons qui détruit les cellules. Il est donc nécessaire de localiser précisément la zone à traiter. Cette technique présente peu d'effets secondaires à faibles doses et a l'avantage de pouvoir être utilisée rapidement et sans hospitalisation.

3.1.2.3. La chimiothérapie

La chimiothérapie est l'usage de certaines substances chimiques pour traiter une maladie. C'est une technique de traitement à part entière, au même titre que la chirurgie. La première utilisation connue de la chimiothérapie remonte à l'usage de l'écorce de quinquina par les Indiens du Pérou, dans le traitement de fièvres telles que la malaria. La majorité des substances chimiothérapeutiques anticancéreuses fonctionnent par arrêt de la mitose (division du noyau des cellules), en ciblant efficacement les cellules se divisant trop rapidement. On qualifie ces substances d'antineoplasiques. Comme ces substances peuvent endommager même les cellules saines, elles sont dites « cytotoxiques ». Certaines de ces molécules provoquent un véritable « suicide cellulaire » : l'apoptose. La plupart des antineoplasiques utilisés aujourd'hui ne sont pas des médicaments récents ni à effet spécifique sur les cellules néoplasiques si bien qu'ils touchent également les cellules saines (elles sont dites cytotoxiques). Les progrès thérapeutiques observés viennent en partie des modalités d'administrations des médicaments et de leurs combinaisons.

À ce jour, les chercheurs ne sont malheureusement pas capables d'identifier la plupart des caractéristiques particulières des cellules malignes, qui permettraient de les cibler parfaitement. Cela implique que d'autres cellules à division rapide telles les cellules responsables de la pousse des cheveux ou de la régénération de l'épithélium intestinal, ou les cellules sanguines, sont également affectées par les substances chimiothérapeutiques. Ceci explique les effets secondaires couramment rencontrés, comme la perte des cheveux, les infections (destruction des globules blancs), anémies (destruction des globules rouges) et les hémorragies (destruction des plaquettes). Cela nécessite parfois des moyens pour lutter contre ces effets secondaires : mise en chambre stérile, transfusions sanguines, injections d'érythropoïétine (EPO)... Cependant, certaines molécules produisent moins d'effets secondaires que d'autres, autorisant les médecins à ajuster les régimes à l'avantage de certains patients, dans certains cas.

En conclusion, le gros inconvénient de ces deux dernières techniques reste la faible sélectivité des traitements qui touchent très souvent autant de cellules saines que malades.

3.1.2.4. La Thérapie Photodynamique Anticancéreuse

On peut résumer cette technique comme une combinaison de la radiothérapie et de la chimiothérapie. La PDT (*Figure 25*) antitumorale est une technique de traitement basée sur l'association de molécules photosensibilisantes (Ps) (formation d'oxygène singulet toxique) capables de se concentrer dans les cellules tumorales, et d'une lumière focalisée de longueur d'onde appropriée (dépendante du Ps). Ce sera la combinaison de ces deux facteurs qui permettra de cibler spécifiquement les tissus tumoraux et de les détruire. Cependant cette méthode présente tout de même un inconvénient de taille : seuls les cancers accessibles à la lumière peuvent être traités. La lumière rouge par exemple n'a qu'une pénétration d'environ 1 cm dans les tissus vivants.

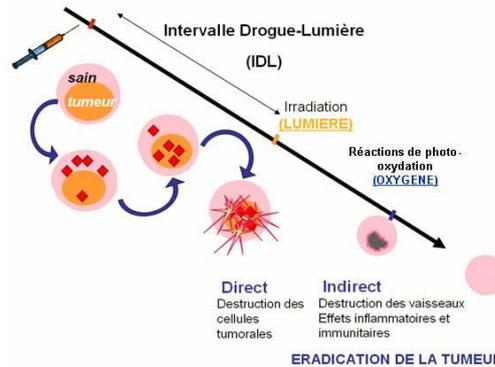


Figure 25 - Représentation du principe de thérapie photodynamique anticancéreuse

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis l'Antiquité. Les Egyptiens l'utilisaient déjà combinée à des substances naturelles pour traiter des maladies de peau. Le concept de photosensibilisation apparaît en 1898 quand Oscar Raab [133] décrit pour la première fois le phénomène phototoxique : l'association d'un colorant (l'acridine) et de lumière.

La PDT est donc un processus qui nécessite trois paramètres fondamentaux : une molécule photosensible appelée photosensibilisateur (PS), un rayonnement lumineux et de l'oxygène (*Figure 26*). La présence simultanée de ces trois composants permet d'engendrer des réactions de photo-oxydation entraînant la destruction des tissus biologiques. On parle alors d'effet phototoxique. Cela ouvre des champs de développement importants et notamment pour les traitements anticancéreux.

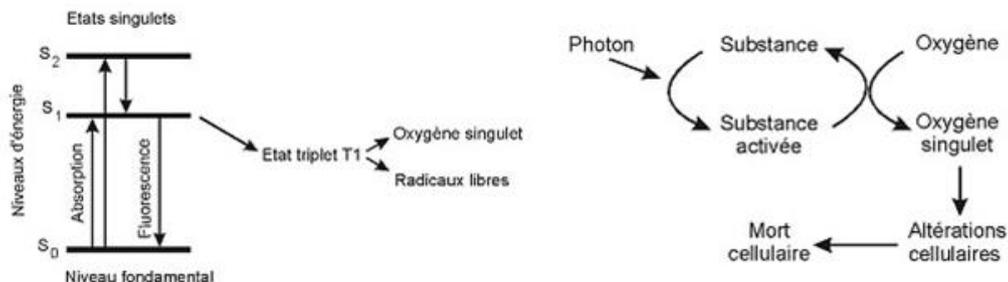


Figure 26 - Représentation des transitions entre les différents niveaux d'énergie électronique des substances

En effet la recherche se concentre de nos jours sur trois points important de la thérapie :

- 1) les photosensibilisateurs. Ils sont extrêmement difficiles à synthétiser et de ce fait coutent très cher. Cela rend les traitements par PDT très lourds financièrement et difficile à rentabiliser pour une entreprise pharmaceutique. Les chercheurs tendent donc à simplifier les synthèses tout en améliorant le pouvoir photosensible des molécules. Les effets indésirables sont aussi à prendre en considération.
- 2) Les vecteurs de PS. En effet une injection simple de PS n'est pas possible à cause du caractère très souvent hydrophobe des molécules utilisées. Il est donc primordial d'encapsuler ces molécules ou de les fixer sur des vecteurs à savoir des nanoparticules [5][134][135].
- 3) Les peptides de reconnaissances. Ces peptides permettent un ciblage actif des tumeurs et/ou des néovaisseaux [136].

3.1.3. Description du développement tumoral

L'apparition de cellules cancéreuses, appelée carcinogenèse, est un processus séquentiel qui fait intervenir l'accumulation progressive de mutations génétiques. Ces mutations surviennent après exposition à un (des) carcinogène(s) qui conduit (conduisent) à l'activation de certains oncogènes et/ou l'inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs (étapes d'initiation et de promotion du cancer)[137]. En parallèle à ces changements génétiques, les cellules cancéreuses induisent des changements profonds dans le tissu voisin normal (étape de progression). A ce stade, le cancer est infraclinique : c'est un ensemble de cellules qui survit dans l'organisme. L'environnement des cellules cancéreuses reste dans un premier temps non coopératif, ce qui signifie que la tumeur se suffit à elle même pour survivre avec un développement très lent ou nul. Cependant, si le tissu tumoral continu de se développer de façon significative, la tumeur aura besoin de nutriments extérieurs, notamment de l'oxygène, pour que son développement soit plus rapide que sa destruction. C'est à cette étape qu'intervient l'angiogenèse tumorale [138][139]. L'angiogenèse est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant. C'est un mécanisme indispensable et hautement régulé dans des conditions physiologiques [140]. Au début de la prolifération tumorale, la tumeur, d'une taille inférieure à 1 ou 2 mm³, est indépendante de l'angiogénèse et l'apport de l'oxygène et des nutriments aux cellules tumorales est assuré par simple diffusion à travers les tissus [138]. On parle de phase dormante ou avasculaire. Sous l'effet de l'accumulation des altérations génétiques, la prolifération des cellules tumorales devient plus active. La croissance tumorale ralentit, du fait d'un équilibre entre prolifération cellulaire et mortalité cellulaire. Lorsque la tumeur grossit au-delà des limites de diffusion simple de l'oxygène, un état hypoxique intratumoral est généré. L'angiogenèse va alors permettre la croissance de la tumeur en fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa prolifération, en sécrétant des facteurs qui, à leur tour, stimulent la croissance des cellules cancéreuses [139]. Les étapes de ce processus sont résumées dans la *Figure 27*.

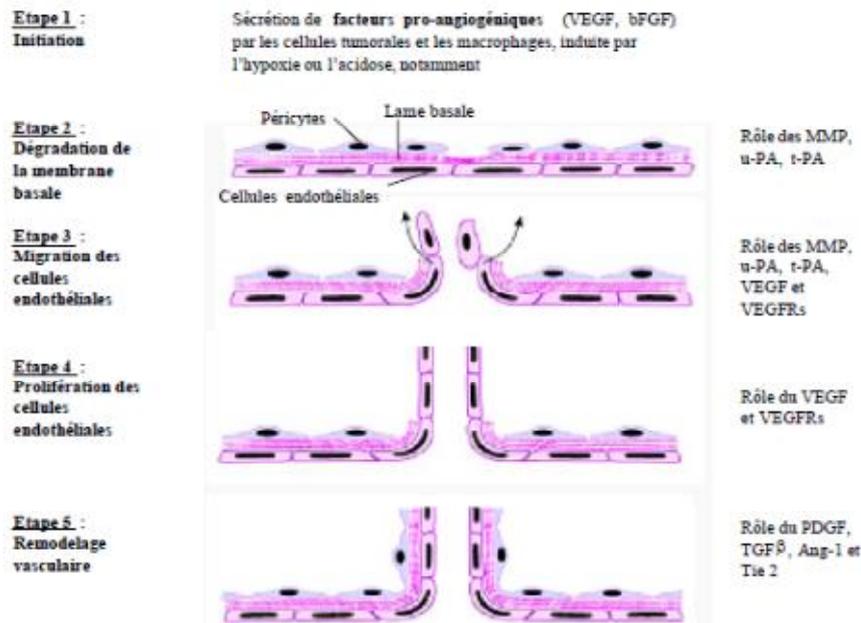


Figure 27 - Etapes de l'angiogenèse tumorale. 1) Activation des cellules endothéliales par le VEGF sur-exprimé par les cellules tumorales. 2) Détachement des péricytes et dégradation de la membrane basale. 3) Migration des cellules endothéliales vers la tumeur. 4) Prolifération des cellules endothéliales. 5) Formation de néovaisseaux, recrutement des composants de la paroi vasculaire par les cellules endothéliales (tirée de la thèse de Lorraine Tirand, 2007) [141].

Les mécanismes cellulaires et moléculaires du processus angiogénique sont induits par l'action coordonnée de facteurs pro-angiogéniques. Parmi les régulateurs clés de l'angiogenèse figurent les facteurs de croissance d'angiogenèse vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factors - VEGF) et leurs récepteurs. Les 43 intégrines¹⁰ jouent aussi un rôle considérable dans ce processus, en contrôlant l'adhésion et la migration des cellules endothéliales grâce aux interactions avec la matrice extracellulaire.

3.1.3.1. Les facteurs angiogéniques

- Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Le VEGF est surexprimé par les cellules tumorales, mais il est également présent à la surface des cellules endothéliales, des macrophages, des lymphocytes T, des cellules musculaires lisses, des ostéoblastes et de divers autres types cellulaires [142], [143-146]. L'expression du VEGF est régulée par une variété de stimuli, dont le plus important est l'hypoxie survenant lors du développement de la tumeur [147-149]. Le VEGF est probablement le régulateur le plus important de l'angiogenèse dans des conditions aussi bien physiologiques que pathologiques.

¹⁰ Protéines transmembranaires jouant le rôle de récepteurs d'adhésion cellulaire.

- Les neuropilines

Les neuropilines (NRP-1 et NRP-2) sont des glycoprotéines transmembranaires qui jouent un rôle clef dans le développement des systèmes neuronaux et vasculaires mais aussi dans celui des récepteurs de la famille du VEGF.

Par ailleurs, des études ont montré que l'expression de la NRP-1 au niveau des cellules cancéreuses favorisait l'angiogenèse tumorale [150][151].

3.2. Les particules de 3^{ème} génération au secours de la thérapie anticancéreuse

Comme nous l'avons mentionné, la lutte contre le cancer utilise des moyens comme la chimiothérapie ou la thérapie photodynamique qui font appel à des molécules destinées à détruire les cellules cancéreuses. Cependant, si ces molécules ne sont pas distribuées sur ces cellules cibles, de nombreuses cellules saines seront également détruites. C'est d'ailleurs en grande partie la raison pour laquelle beaucoup de personnes perdent leurs cheveux lors de traitement par chimiothérapie. Il est donc primordial, pour le confort du patient, d'atteindre une efficacité médicamenteuse grandissante. Pour cela, des recherches sont menées. Elles portent à la fois sur des molécules plus adaptées mais également sur des ciblage thérapeutiques beaucoup plus précis. C'est dans ce contexte que les particules de troisième génération peuvent être employées.

3.2.1. Particules de troisième génération

Nous avons vu qu'afin de reconnaître sélectivement les cellules cancéreuses cibles, les nanovecteurs doivent être fonctionnalisés en surface pour être ensuite employés dans les traitements anticancéreux [152]. De nombreuses publications concernent la fonctionnalisation de particules métalliques ou minérales à base d'or [153][154][155], de fer [156], ou encore des particules de silice [157] ou magnétiques [158][159]. Qiao et al., ont par exemple élaboré des nanoparticules de silice de 150 nm à forte porosité et fonctionnalisées à la surface avec de la poly-L-lysine. Cette couche surfacique permet alors aux nanoparticules de transporter des oligo ADN-Cy3 sur les cellules Hela. Une grande capacité à transporter des gènes au niveau de ces cellules cancéreuses a été observée et semble prometteuse [160].

Nous focaliserons cette étude bibliographique sur les travaux concernant la fonctionnalisation de particules de polymère.

S. Acharya et al. ont formulé des nanoparticules de PLGA recouvertes de PVA par la méthode de double émulsion/évaporation de solvant et y ont encapsulé un principe anticancéreux (rapamycine¹¹) (Tableau 3). Ces particules ont été fonctionnalisées en surface par un anticorps ciblant le récepteur de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et sont destinées à être utilisées pour le traitement du cancer du sein. Pour ancrer de manière covalente l'anticorps monoclonal EGFR à la surface de ces nanoparticules, des agents de couplage classiques tels que l'hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et la N-hydroxysuccinimide (NHS) ont été employés. Pour

¹¹ La Rapamycine est un immunosuppresseur également appelé Sirolimus

cela, les nanoparticules recouvertes de PVA ont été mises en contact avec l'EDC et la NHS dans un tampon PBS (pH 7,4). Après 4h de réaction, les particules sont lavées par centrifugation puis rediluées au tampon PBS pour réagir avec l'anticorps, pendant une nuit, à froid. Après caractérisation de ces nano-objets, les auteurs ont pu montrer que le principe actif avait été efficacement encapsulé et des tests *in vitro* ont mis en évidence l'efficacité du greffage de l'anticorps et donc du traitement ciblé [161].

Tableau 3: Quelques exemples des nanoparticules formées

Auteurs	Type de particule	Méthode de préparation (des nanoparticules)	Caractérisation	
			Diamètre hydrodynamique	Potentiel Zeta
S. Acharya, F. Dilnawaz, S. K. Sahoo	PLGA conjuguée à un anti-EGFR	Emulsion/ évaporation	274±1.6nm	13.8 ± 5.1 mV
U. Toti, B. Guru, A. Grill, J. Panyam	PLGA fonctionnalisée par un peptide de reconnaissance	Emulsion/ centrifugation	Dynamic light scattering (DLS): 208 nm	-29.12 ± 0.82 mV

U. Toti et al. ont quant à eux fonctionnalisé des nanoparticules de PLGA (Tableau 3) avec un peptide de reconnaissance des intégrines $\alpha_v\beta_3$, surexprimées au niveau de la vascularisation de certaines tumeurs. Ces auteurs ont préparé ces nanoparticules encapsulant de la coumarine par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant en utilisant du PVA comme stabilisant interfacial (Figure 28). A ce stabilisant est ajouté un copolymère dibloc PLA-PEG porteur d'une fonction maléimide terminale (PLA-PEG-MAL) qui se localise également à l'interface eau/huile. Ces groupes maléimide sont ensuite mis à profit pour conjuguer un peptide cRGD à la surface des nanoparticules. Les nanoparticules conjuguées au peptide cRGD sont alors préparées par réaction entre les nanoparticules fonctionnalisées par des groupes maléimide et le peptide présentant un groupe thioacétyl ester. Les tests *in vitro* mettent en évidence une accumulation de ces nanoparticules dotées d'un peptide cRGD dans les cellules tumorales et donc l'efficacité de la fonctionnalisation [162].

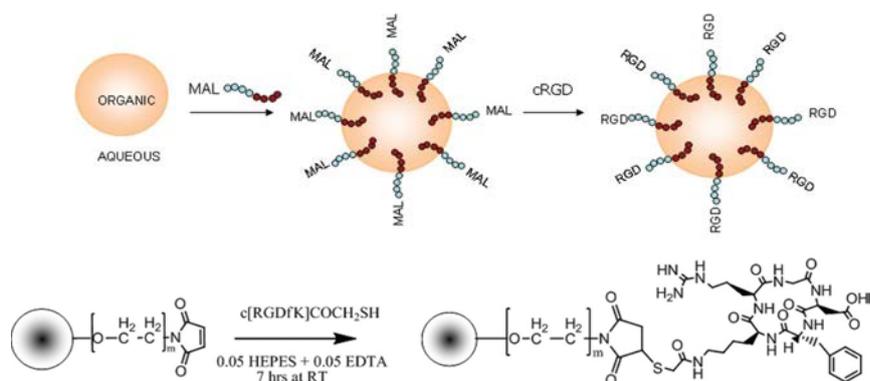


Figure 28: Illustration des travaux de Toli et al. [162].

Ne pouvant décrire la totalité des particules fonctionnalisées en surface, destinées à un traitement anti-cancer et décrites dans la littérature, nous nous focaliserons, dans le cadre des travaux menés au cours de ce doctorat, à la fonctionnalisation de nanoparticules par Chimie-click. L'intérêt de cette méthode de couplage réside dans l'utilisation de conditions de réactions douces et dans l'extrême sélectivité de la réaction, ce qui permet d'éviter la formation de produits secondaires.

3.2.1.1. Réactions de Chimie-click pour fonctionnaliser une particule

Les réactions de « click chemistry » (ou Chimie-click) sont des réactions très spécifiques, présentant de hauts rendements, utilisant des solvants non toxiques et réalisables dans des conditions de pression et de température classiques. Parmi les différentes réactions pouvant intégrer ce concept (Thiol-yne / Thiol-ène / Diels-Alder), nous mettrons en œuvre la cycloaddition dipolaire 1,3 de Huisgen entre un alcyne terminal et un azide catalysée par Cu(I) (Figure 29).

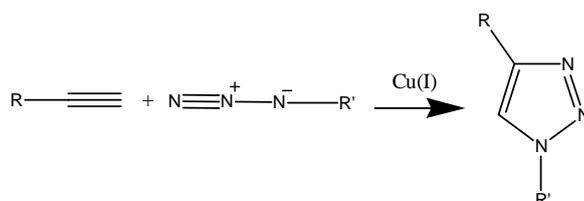


Figure 29: Cycloaddition dipolaire 1,3 de Huisgen

Lallana et al. proposent une revue décrivant l'utilisation de la Chimie-click depuis son introduction il y a une dizaine d'années par Sharpless et al [163] jusqu'à son emploi dans le cadre de l'élaboration de nano-objets destinés à être employés comme vecteurs de principes actifs [164].

3.2.1.1.1. Fonctionnalisation par Chimie-click de type Thiol - yne / Thiol - ène

Bowman et al font une revue intéressante des différentes possibilités de réaction des fonctions thiol sur différents types d'alcyne et résumant ainsi les avantages de l'utilisation d'une Chimie-click Thiol-yne [165]. C'est une réaction pouvant être réalisée à température ambiante, en présence d'oxygène ou d'eau et ne demandant pas de catalyseur toxique tel que le cuivre par exemple. Bowman et al nous présentent également dans cette revue les différentes synthèses utilisant la chimie-click thiol-ène et un certain nombre d'applications tels que le recouvrement de surface ou la fonctionnalisation de polymères et/ou particules [166]. Ils indiquent cependant qu'une des limitations de ces réactions tient du fait que certaines applications nécessitent une quantité limitée de soufre, notamment dans le domaine de l'optique où la présence de soufre peut modifier l'indice de réfraction.

Patton et al. [167] apportent quant à lui des exemples sur la modification de surface par la réaction Thiol-yne. La Chimie-click Thiol-yne est également possible par irradiation U.V.. La simple utilisation d'un masque permet ainsi une fonctionnalisation sélective des surfaces [167]. Chen et al. [168] ont ainsi préparé un substrat recouvert de polymère fonctionnalisé par un groupe alcène ou alcyne, sur lequel ils greffent un PEG fonctionnalisé par des fonctions terminales thiol (*Figure 30*).

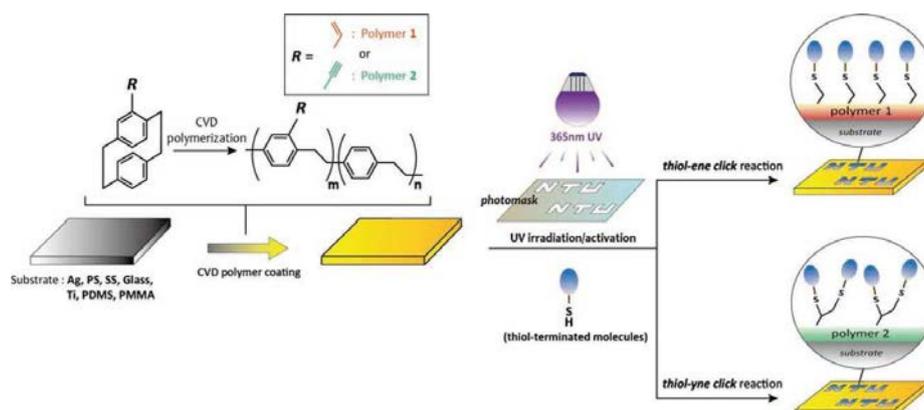


Figure 30 - Illustration de la réaction de chimie-click de type Thiol-ène et Thiol-yne [168]

Une étude récente sur la glycosylation par chimie-click thiol-yne a également été étudiée en créant des radicaux libres par irradiation (*Figure 31*).

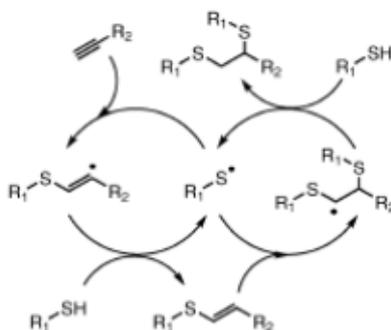


Figure 31 - Mécanisme de couplage thiol-yne utilisant des radicaux libres photo-induits

Stenzel et al. ont quant à eux synthétisés des polymères contenant des fonctions pendantes vinyle ou acétylène (PHEMA et POEGMEMA) en utilisant la polymérisation RAFT. Ces polymères sont ensuite dotés de fonctions carboxylate en présence d'acide thioglycolique (thiol - ène) ou d'acide 2-mercaptosuccinique (Thiol - yne). Les carboxylates sont ensuite conjugués au cis platine. Il apparaît que seules les macromolécules préparées à base de POEGMEMA sont capables de s'organiser en micelles de par leur caractère amphiphile [169].

Xu et al, proposent la construction d'une membrane microporeuse de polypropylène à surface glycosylée en utilisant la réaction de chimie-click Thiol-yne [170]. Cette membrane est destinée à reconnaître spécifiquement la lectine (*Figure 32*).

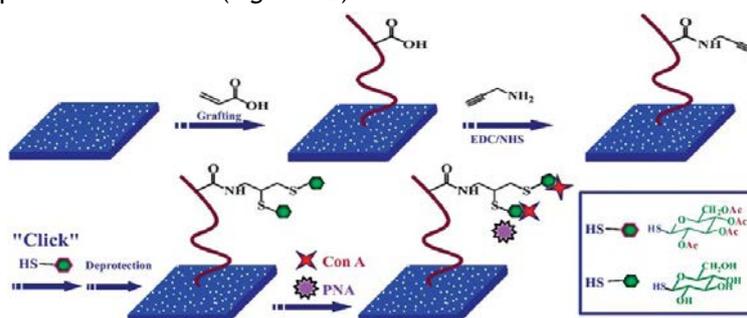


Figure 32 - Application de la réaction de Thiol-yne pour la modification de surface par Xu et al. [170]

Marra et Dondoni présentent une revue des différentes applications de la réaction de couplage Thiol-ène catalysée par la lumière visible (*Figure 33*). Cette revue est focalisée sur la glycosylation de polymères par la méthode de chimie-click thiol-ène [171].

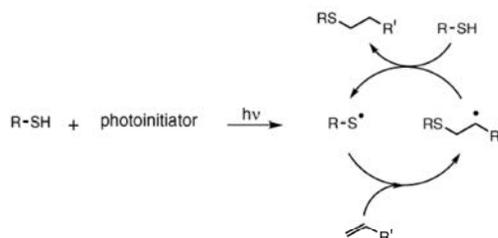


Figure 33 - Mécanisme de la réaction de couplage Thiol-ène photocatalysée

Shi et al ont de leur côté utilisé une double réaction de chimie-click thiol-ène pour créer des molécules photo-réactives capables de se polymériser sous rayons U.V.. Placées en surface d'un matériau, ces molécules ont la capacité de se polymériser et ainsi de protéger la surface du matériau du vieillissement induit par les rayons Ultra Violets [172]

Andrew b. Lowe a édité une revue regroupant les dernières applications de la réaction de chimie-click thiol-ène. Il décrit notamment la synthèse de nanoparticules de latex élaborées par le procédé de polymérisation en miniémulsion et post-fonctionnalisées en provoquant une réaction de chimie-click thiol-ène en surface des particules (*Figure 34*) [173].

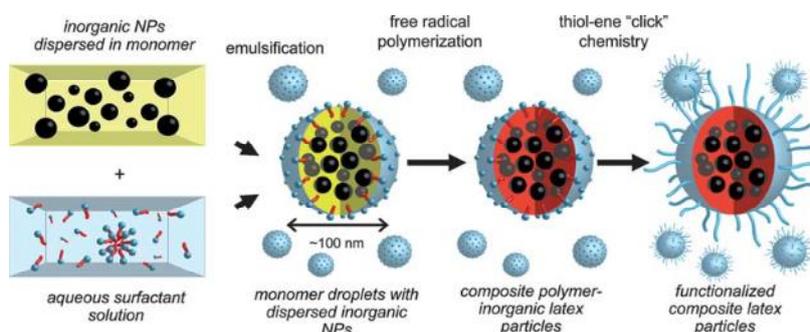


Figure 34 - Elaboration de nanoparticules multimodales de latex

3.2.1.1.2. Fonctionnalisation par Chimie-click de type Diels-Alder

Une autre réaction dite de chimie-click est la réaction de Diels-Alder qui a la capacité d'être réversible (Figure 35). M. A. Tasdelen propose une récente revue de cette réaction [174]. Dove et al. proposent quant à eux l'emploi des réactions de chimie-click Diels-Alder et thiol-ène conjuguées pour une synthèse et une post-fonctionnalisation de polymères contenant des dérivés maléimide [175].

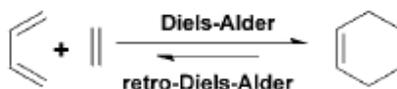


Figure 35 - Mécanisme général des réactions de Diels-Alder et rétro Diels-Alder d'un diénophile et d'un diène [174]

3.2.1.1.3. Fonctionnalisation par cycloaddition dipolaire 1,3 de Huisgen

Des nanoparticules inorganiques ont été fonctionnalisées via la cycloaddition dipolaire de Huisgen pour des applications biomédicales (libération de principes actifs, diagnostique médical) mais aussi en catalyse. Ainsi, A. Barras et al. ont fonctionné des nanoparticules commerciales de diamant présentant des groupes $-NH_2$ à leur surface. Ces fonctions sont modifiées en fonctions azide (Figure 36) puis différents composés porteurs de fonction alcyne y sont liés de manière covalente [176].

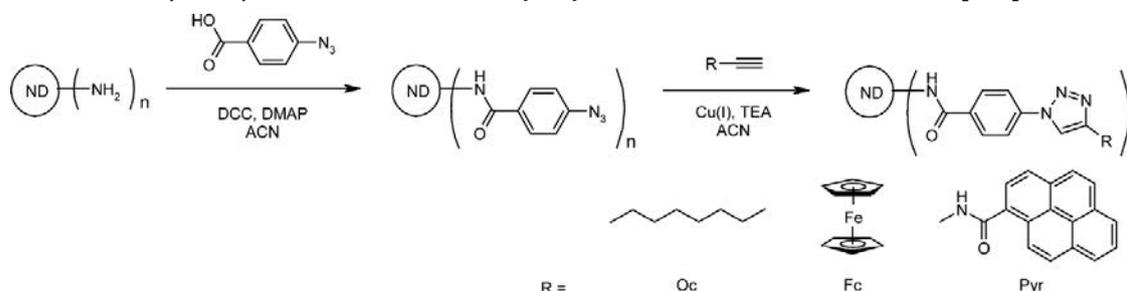


Figure 36: Fonctionnalisation en surface de nanoparticules de diamant par Barras et al. [176]

De manière similaire, des nanoparticules d'or ont été fonctionnalisées en surface par Fleming et al. Cette étude montre qu'il est possible de fonctionnaliser des particules d'or recouvertes d'une monocouche contenant des ligands $-CH_3$ et des ligands dotés de fonctions Br qui peuvent ensuite être substitués par des groupes azide (Figure 37). La réaction de Chimie-click se fait ensuite soit dans le dioxane, soit dans un mélange d'hexane et de dioxane. La multiplicité des composés fixés sur les nanoparticules démontre l'efficacité de la méthode utilisée. Fleming et al. ont également réalisé une multi-fonctionnalisation en utilisant diverses petites molécules acétyléniques dans la même expérience (Figure 38)[177].

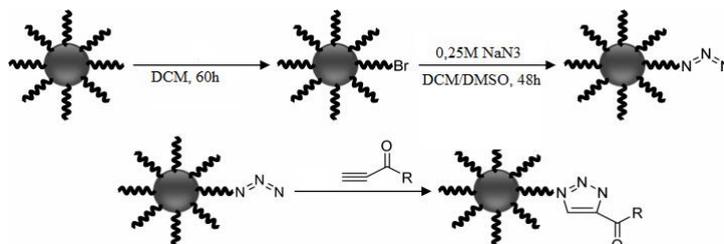


Figure 37: Fonctionnalisation en surface par chimie clic de particules d'or, par Fleming et al.

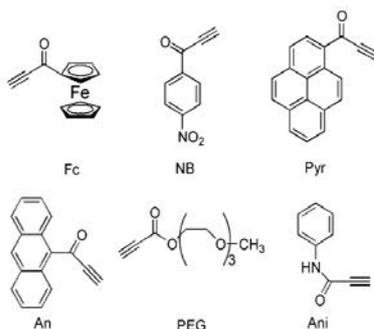


Figure 38: Composés fixés aux nanoparticules d'or

Des nanoparticules de polystyrène ont été élaborées en couplant la réaction de Chimie-click de Huisgen à une réaction de polymérisation radicalaire en émulsion par transfert d'atome [178]. S'ensuivront ensuite les travaux de Van der Ende V. et al sur l'utilisation des deux Chimie-click Alcyne/Azide ou Thiol-ène pour l'élaboration de nanoparticules polyester. Ces travaux démontrent l'efficacité des réactions de Chimie-click sur différentes sortes de polyester [179]. Plus tard, l'équipe de Valérie Langlois synthétisera avec succès des copolymères amphiphiles greffés à base de poly(3-hydroxyalkanoate) et de poly(éthylène glycol) (PHA-g-PEG)[180].

Les premiers travaux réalisés sur la modification de polysaccharides ont portés sur la cellulose, laquelle a été fonctionnalisée par des groupes azide [181]. Plus tard, la modification du dextrane par Chimie-click sera étudiée en milieu aqueux [182]. Xu et al. reportent la synthèse de poly(ϵ -caprolactone) fonctionnalisée à une extrémité par un saccharide. Pour cela, la PCL ω -alcyne réagit avec différents saccharides dotés d'une fonction azide terminale [183].

Des nanoparticules de poly(fluorure de vinylidène) (PVDF) ont été conjuguées à leur surface par un cyclopeptide (Figure 39) destiné à cibler l'angiogenèse (néovascularisation) de certaines tumeurs car il se lie spécifiquement aux récepteurs VEGF (rôle de ligand) (Figure 40). Pour cela, les particules de

PVDF recouvertes d'acide polyacrylique (PAA) ont été préparées par polymérisation en émulsion. Pour mettre en place des fonctions azide à la surface de ces particules, une amine azidée est couplée aux fonctions carboxylique de la couche PAA. La réaction de Chimie-click avec le peptide ou la molécule modèle fluorescente a alors lieu à 40 °C, pendant 24h. Le Cu(I) nécessaire est amené sous forme sulfate de cuivre (Cu(II)) en présence d'ascorbate de sodium (réducteur). Les nanoparticules sont lavées par une solution aqueuse d'EDTA puis filtrées afin d'éliminer le cuivre. Les nanoparticules obtenues sont stables, de taille inférieure à 150 nm. Il a ensuite été prouvé que ces particules ciblent des cellules surexprimant le VEGF et donc que le couplage entre les particules et le peptide n'affecte pas les performances de reconnaissance du cyclopeptide [184].

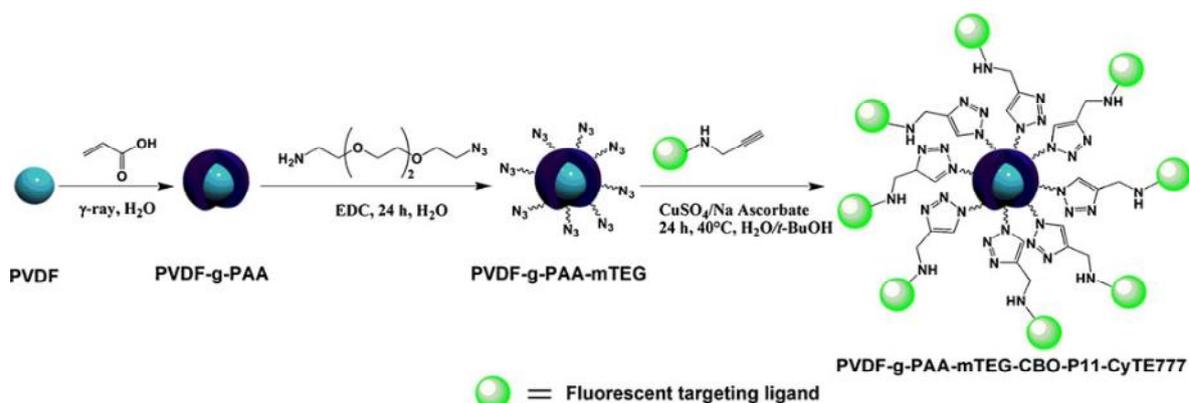


Figure 39: Fonctionnalisation de nanoparticules de poly(vinylidène fluorure) par Deshayes et al.[184]

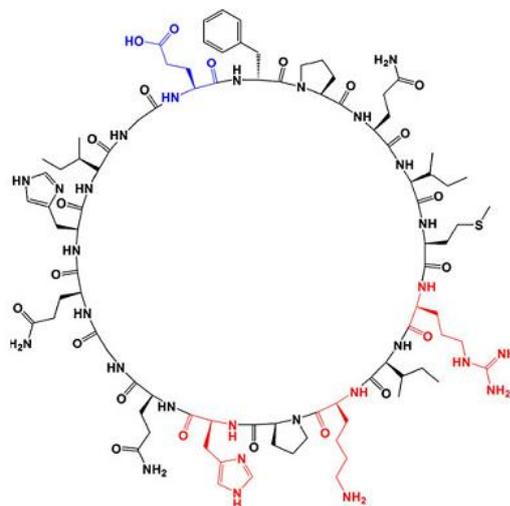


Figure 40: Cyclopeptide utilisé par Deshayes et al.[184]

D'autres types de particules peuvent être fonctionnalisés par Chimie-click. Ainsi, P. S. Banerjee et al. ont montré que les adénovirus peuvent être marqués sélectivement par un processus en deux étapes. Leur marquage métabolique avec des sucres présentant des fonctions azide, ici le N-azidoacetylglucosamine (GlcNAz), donne des particules adénovirales dotées de sites spécifiques comportant des groupes azide chimiquement accessibles, et ce, sans diminution ni de la production virale ni de l'infektivité. Cette modification chimique d'adénovirus permet ensuite leur fonctionnalisation par diverses fonctions, que ce soit par des peptides (tel que le DYKDDDDK), des

fluorophores ou des petites molécules ciblantes (*Figure 41*). [185] Cette approche présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre, d'être spécifique et de ne pas perturber le système de départ. Elle ne se limite pas seulement aux adénovirus mais pourrait s'appliquer à une grande variété de virus avec des glycoprotéines périphériques, comprenant divers vecteurs oncolytiques actuellement en développement (rétrovirus, lentivirus, virus de l'herpès, etc.) [185].

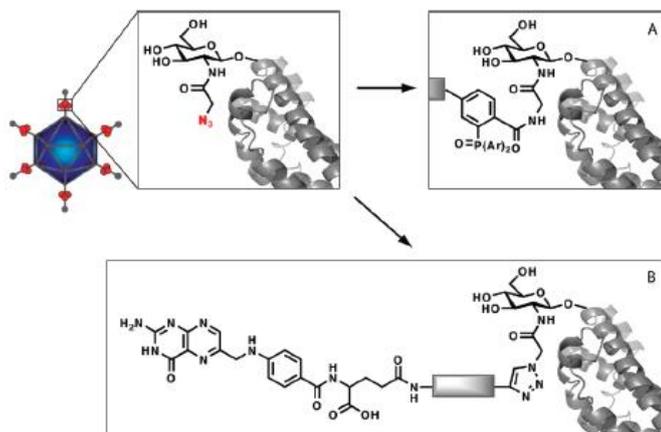


Figure 41: Modification d'adénovirus

Dans le cadre de la vectorisation ciblée de gènes (pDNA), H. Yu et al. ont étudié la conjugaison régiospécifique d'un facteur de croissance épidermique (EGF) greffé sur une chaîne de PEG par Chimie-click avec un dendron poly(amido amine) (PAMAM) (*Figure 42*). [186]

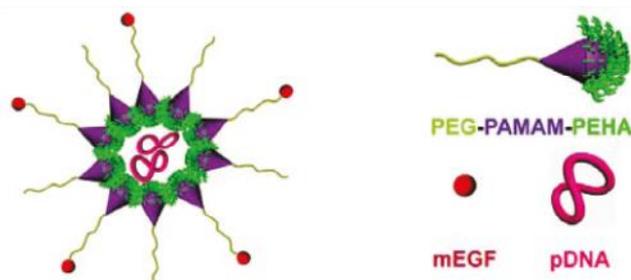


Figure 42: Polyplexe formulé par H. Yu et al.

Pour cela, ils ont tout d'abord obtenus des dendrons PAMAM à cœur d'amine propargylique comportant des groupes ester terminaux. Le cœur du dendron est quant à lui doté d'une fonction alcyne. Les extrémités ester ont ensuite été modifiées par différentes oligoamines (*Figure 43*) dont certaines biocompatibles. Parmi les différents dendrons modifiés, les « polyplexes » comportant des dendrons PAMAM-pentaéthylènehexamine (PEHA) ont présenté la meilleure capacité de transfert de gène.

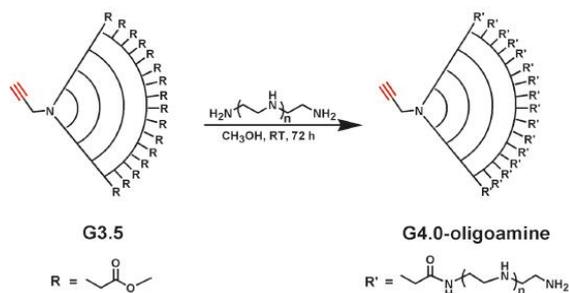


Figure 43: Modification du dendron propargyl-PAMAM par une oligoamine en terminaison de chaîne.

La conjugaison du dendron PAMAM-PEHA avec un espaceur PEG est conduite par réaction de Chimie-click. Pour cela, la fonction azide est portée par le PEG et le Cu(I) est apporté sous forme de bromure de cuivre (CuBr). Le schéma de synthèse est décrit dans la Figure 44. Le copolymère résultant PEG-PAMAM-PEHA est ensuite couplé avec un ligand EGF. Les particules formées (polyplexes) passent d'une taille de 200 nm environ à 340 nm après couplage avec l'EGF. Il a été montré que les transfections en pADN dans les cellules (surexprimant l'EGFR) sont dix fois plus efficaces pour les polyplexes contenant l'EGF que pour ceux ne contenant aucun ligand. Ceci démontre bien l'efficacité du ciblage. H. Yu et al. suggèrent néanmoins que des modifications doivent être faites pour optimiser l'efficacité de la transfection des polyplexes PAMAM fonctionnalisés par l'EGF [186].

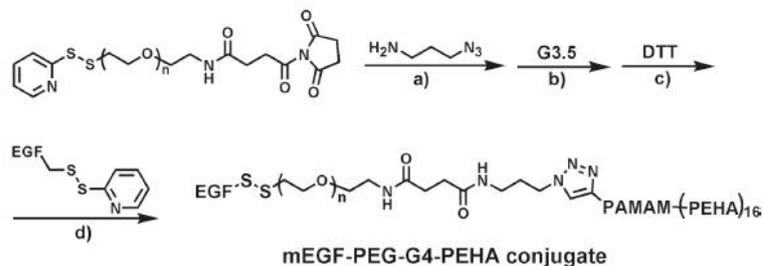


Figure 44: Schéma de synthèse du dendron PAMAM-PEHA fonctionnalisé par Chimie-click. [186]

Abeylath et al proposent quant à eux différentes méthodes pour élaborer des nanoparticules polymères recouvertes d'une couronne hydrophile de PEG destinées à un ciblage actif des tumeurs. Parmi ces méthodes se trouve la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par le cuivre (Figure 45) [187].

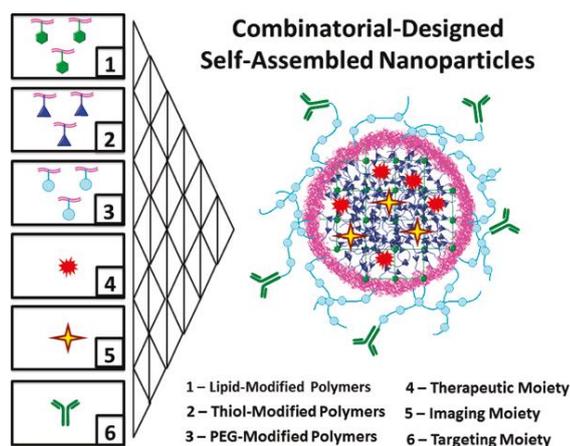


Figure 45 - Nano-objets proposé pour le ciblage actif de tumeurs cancéreuses [187]

J. Zou et son équipe proposent d'obtenir des nanoparticules de PLA (Figure 46) par mini-émulsion et qui contiendraient du paclitaxel. Pour cela, du paclitaxel modifié par 2 fonctions azide, solubilisé dans la phase dispersée avec le PLA porteur de groupes alcyne est employée. La réaction de Chimie-click azide/alkyne est catalysée par le cuivre en utilisant l'ascorbate de sodium solubilisé dans la phase aqueuse. Ici le paclitaxel n'est pas greffé à la surface des nanoparticules mais incorporé dans la particule durant l'élaboration. Il se retrouve alors lié par des liaisons covalentes à la matrice [188].

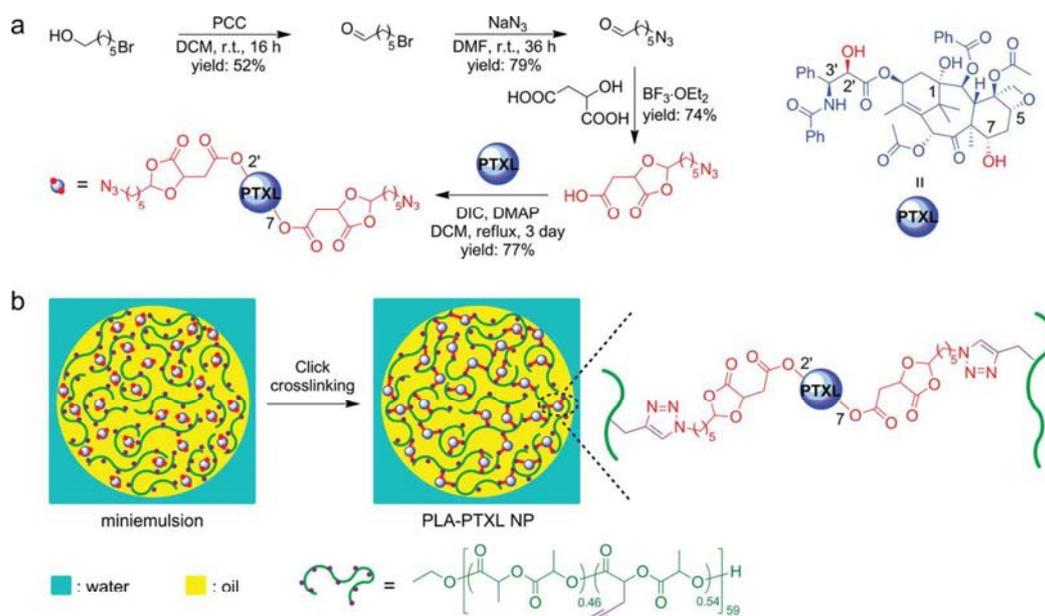


Figure 46 - a) Synthèse du paclitaxel modifié par les fonctions azide en bout de chaînes. b) représentation graphique de l'élaboration par miniémulsion des nanoparticules de PLA fonctionnalisées par du Paclitaxel [188].

L'utilisation de cuivre constitue cependant une limitation majeure de cette réaction notamment pour les applications biomédicales. En effet, le cuivre est primordial pour la réaction de Cycloaddition dipolaire 1,3- de Huisgen mais est toxique pour l'organisme [189]. Des travaux consistent à développer

in fine des méthodes d'élimination usuelles du cuivre pour ce type d'application, telles que l'utilisation de complexants, la purification par lavage ou par séparation par colonne de chromatographie à base de silice modifiée [190][191] mais ces dernières sont difficiles à mettre en œuvre dans le cas des nanoparticules.

Une autre solution réside dans l'emploi d'une réaction de Chimie-click « Copper-free » ou encore de s'affranchir de la réactivité du Cu(I) en utilisant par exemple un ligand stable du Cu(I) (tris(benzyltriazolyméthyl)-amine). Les chercheurs observent ainsi une plus grande efficacité de la catalyse et aucune dégradation sur les molécules fonctionnalisées [192]. L'équipe de C.J. Hawker propose une nouvelle méthode de catalyser la réaction de cycloaddition par le cuivre en utilisant des nanoparticules de cuivre commerciales, restant stables en présence d'oxygène et pouvant être "facilement" éliminées et réutilisées [193].

3.2.1.1.4. Fonctionnalisation par Chimie-click en absence de cuivre

Comme nous venons de le mentionner, le cuivre constitue une des limitations de l'utilisation de la Chimie-click pour des applications biomédicales car il entraînerait une oxydation des phospholipides insaturés. Différentes méthodes ont donc été mises en place pour éviter son utilisation en tant que catalyseur de la cycloaddition dipolaire de Huisgen.

Trois réactions bioorthogonales avec les azides ont été comparées par N. J. Agard et al. : la Chimie-click catalysée par Cu(I), la réaction de Staudinger et la cycloaddition « strain-promoted » (Figure 47). Après études des cinétiques, il s'avère que la réaction de Staudinger et la cycloaddition « strain-promoted » ont des constantes de vitesses similaires alors la réaction de Chimie-click catalysée par Cu(I) reste plus rapide. Néanmoins, même si elles sont plus lentes, elles se réalisent sans présence de Cu(I) [194].

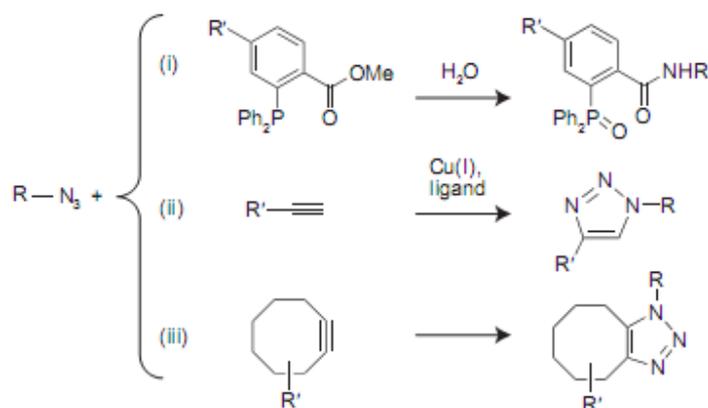


Figure 47: Réactions bioorthogonales avec les azides. (i) Réaction de Staudinger, (ii) Chimie-click, (iii) strain-promoted cycloaddition. R' représentant n'importe quelles chaînes carbonées.

R. I. Jølk et al. ont quant à eux développé une méthode permettant de post-fonctionnaliser par Chimie-click des liposomes à base de PEG [162]. Ils ont d'abord synthétisé les précurseurs, c'est-à-dire la sonde fluorescente couplée à un peptide et dotée d'une fonction N₃ d'une part et les phospholipides

pegylés terminés par une fonction alcyne d'autre part. (Figure 48). Deux types de liposomes A et B sont formulés. (Tableau 4).

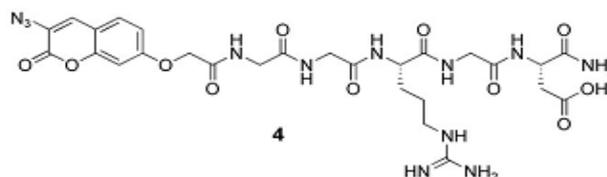


Figure 48: Peptide RGD fonctionnalisé par un groupe 3-azidocoumarine [162]

Tableau 4: Caractérisation des liposomes A et B

Liposome	Diamètre hydrodynamique (DLS) (en nm)	Potentiel Zeta (mV)
Liposome A	129±1,7	-14,68±0,50
Liposome B	118,9±0,7	-12,22±0,81

Le liposome A, porteur de fonctions alcyne, est fonctionnalisé par la cycloaddition dipolaire de Huisgen catalysée par Cu(I) (Figure 49), amené sous forme sulfate de cuivre (Cu(II)) en présence d'ascorbate de sodium (réducteur). La cinétique de greffage de la sonde à la surface est mesurée par fluorescence. Les auteurs constatent alors que la formation du cycle triazole se fait rapidement pendant la première heure. Néanmoins, après avoir atteint la conversion totale, une diminution de la fluorescence due à un quenching par Cu(II) formé est observée.

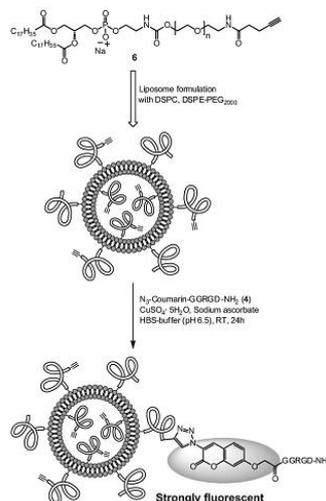


Figure 49: Formation et fonctionnalisation du liposome A en présence de cuivre

Pour éviter ce problème, R. I. Jølk et al. se placent en absence de cuivre en utilisant des fonctions alcyne cycliques contraintes présentes à la surface du liposome B. Un bon « ciblage » est observé (par fluorescence en fonction du temps) bien que cette réaction de click « strain-promoted » soit plus lente que celle catalysée par Cu(I) puisque le maximum de greffage est obtenu après 8,5h [195].

Baker Jr et al. ont récemment publié une synthèse rapide de dendrimères multifonctionnels de PAMAM sans utilisation de cuivre (Figure 50). Le G5-PAMAM est acétylé puis couplé à des ligands cyclooctyne via une liaison amine pour une chimie-click sans cuivre. L'équipe a investigué la conjugaison de plusieurs groupes fonctionnels (modifiés par des fonctions azide) [196].

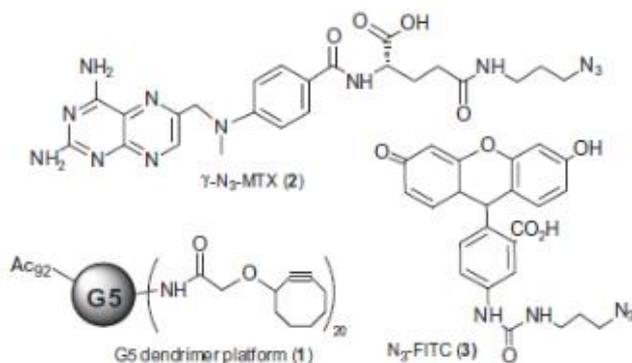


Figure 50 - Précurseurs modifiés en N_3 pour une réaction de chimie-click sur le G5-PAMAM

Huang et al. ont quant à eux proposé une méthode de synthèse basée sur l'utilisation d'un réacteur à micro-onde à 120°C (Figure 51). Un dérivé dialcynes d'acide aspartique, un monomère diazide, un PEG fonctionnalisé en bout de chaîne par une fonction alcyne ou dialcynes sont ainsi utilisés conjointement pour la réaction de chimie-click sans catalyseur chimique. Les molécules obtenues sont ensuite fixées sur une microsphère de polystyrène possédant des esters activés à la surface. Le tout est utilisé comme adsorbants de l'Endotoxine des solutions de BSA (Bovin Serum Albumin) [197].

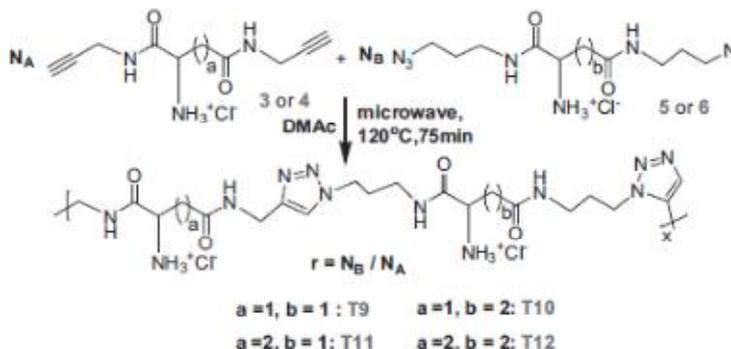


Figure 51 - Réaction de Chimie-Click activée thermiquement par micro-ondes

L'équipe de Landfester K., propose quant à elle l'utilisation d'une réaction sans cuivre pour l'élaboration de nanocapsules élaborées par le procédé de polymérisation en miniémulsion. Les nano-objets étudiés sont constitués d'une couronne de polytriazole et d'un cœur liquide composé d'une solution aqueuse de chlorure de sodium isotonique (Figure 52) [198].

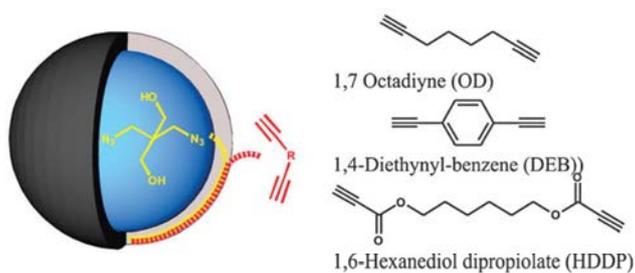


Figure 52 - Représentation de la polymérisation par Chimie-click à l'interface de la gouttelette et des structures chimiques des monomères utilisés [198].

Le monomère diazide utilisé est le 2,2-bis(azidométhylène)-1,3-propanediol (BAP). Les avantages d'une telle réaction sont la non-utilisation du cuivre et la possibilité d'utiliser les produits obtenus dans le domaine biologique, mais également le fait qu'aucune atmosphère inerte n'est requise, cette atmosphère étant généralement nécessaire pour la protection du catalyseur Cu(I) lorsque celui-ci est employé [198].

4. Conclusion

Les applications biologiques auxquelles nous nous sommes intéressés au cours de ce doctorat nous ont orienté vers l'étude de nanoparticules biocompatibles et biodégradables. Ces nanos-objets devront être capables d'encapsuler un principe actif, mais également, pour certains d'entre eux, de cibler des cellules spécifiques après injection intraveineuse.

Après avoir évoqué le concept et les intérêts de la vectorisation de principes actifs dans l'organisme, les premières méthodes d'élaboration de nanoparticules qui ont été présentées sont focalisées plus particulièrement sur les deux procédés que nous mettrons en œuvre dans les chapitres suivants : émulsion/évaporation de solvant et nanoprécipitation, avec un intérêt tout particulier concernant la préparation de particules à couronne de dextrane (particules à ciblage non spécifique). Le dextrane peut être ancré à la surface des particules soit par adsorption physique de dextrane, soit par fixation covalente.

Ce chapitre bibliographie se clôt en présentant tout particulièrement les recherches actuelles décrivant les chimie-click susceptibles d'être utilisées pour la préparation de particules de 2^{ème} et 3^{ème} génération après fixation d'un ligand spécifique à la surface de ces nanoparticules. La cycloaddition dipolaire 1,3 de Huisgen est toutefois particulièrement décrite car c'est celle que nous emploierons pour valider notre stratégie.

Les dextrans utilisés pour l'élaboration de ces nanoparticules seront présentés dans le chapitre 2. Il s'agit de dextrane sur lesquels ont été fixées soit des chaînes alkyle en C₆, soit des greffons PLA différents en nombre et en longueur.

Par la suite, deux types de nanoparticules ont été synthétisés dans les chapitres 3 et 4. Les premiers l'ont été pour un ciblage passif de la protéase du VIH-1. Elles sont obtenues par adsorption physique d'un dextrane amphiphile à la surface de nanoparticules de PLA.

Après avoir retracé l'historique de VIH-1 et des recherches menées pour la combattre, notre bibliographie s'est plus particulièrement orientée vers les inhibiteurs de la dimérisation de la protéase du VIH-1, dont certains sont commercialisés dans le cadre des trithérapies. C'est dans ce cadre que le LCPM a synthétisé un tripeptide modifié, le Palmitoyl-LEY (Pam-LEY), qui s'est avéré être très efficace pour inhiber la dimérisation de cette protéase ; et ce sans que son efficacité chute brutalement près mutation du virus, ce qui est observé pour les inhibiteurs commerciaux. Le Pam-LEY étant très hydrophobe, nous avons proposé son encapsulation au sein de nanoparticules de 2^{ème} génération cœur PLA/couronne dextrane. Bien que réputées « furtives », de telles nanoparticules devraient être reconnues et captées par le système immunitaire.

Dans le chapitre 4, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de particules destinées à la lutte contre le cancer. Après un rappel de cette maladie et des différents traitements qu'un patient peut subir, nous avons orienté notre bibliographie vers l'obtention de nanoparticules de 3^{ème} génération destinées à faire partie de l'arsenal pouvant être employé contre le cancer, avec un intérêt tout particulier pour l'utilisation de la Chimie Click. Dans ce cas, le dextrane est lié au PLA par liaison covalente, les particules présentent une stabilité accrue.

Bibliographie

Comme le lecteur le découvrira dans les pages qui suivent, la réaction de Chimie-click nous permettra d'une part de greffer un peptide de reconnaissance à la surface des nanoparticules. Ainsi que précédemment décrit, la stratégie utilisée permettra également de lier la couronne hydrophile au cœur de la particule de façon covalente de manière à obtenir une stabilité accrue de la couronne dans les fluides biologiques.

Enfin, pour conclure, tous les matériels et méthodes utilisés dans le cadre de ce travail seront décrits dans le chapitre 5.

5. Bibliographie

- [1] Wu, M. Synthèse de nanoparticules à propriétés de surface contrôlées par polymérisation en miniémulsion pour la vectorisation de molécules actives. Thèse. Nancy: Institut National Polytechnique de Lorraine, (2007)
- [2] Vauthier, C et Couvreur, P. Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic. Techniques de l'Ingénieur Doc NM 4010-1 (2008)
- [3] Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie, DGE, Technologies clés 2010, *Chiffres clés et documentation* - www.industrie.gouv.fr, (2010)
- [4] P.R. Ehrlich, Himmelweit M., Marquardt H.H. Dale, The collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, London, 1906
- [5] D. K. Chatterjee, L. S. Fong, Y. Zhang, Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 60 (2008) p. 1627-1637
- [6] Gunaseelan S., Gunaseelan K., Deshmukh M., Zhang X., Sinko P.J., Surface modifications of nanocarriers for effective intracellular delivery of anti-VIH drugs, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 62 (2010) p. 518-531
- [7] Singh Y., Palombo M., Sinko P.J., Recent trends in targeting anticancer prodrug and conjugate design, *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) p. 1802-1826
- [8] Kinman L., Bui T., Larsen K., Tsai C.C., Anderson D., Morton W.R., Hu S.L., Ho R.J.Y., Optimization of lipid-indinavir complexes for localization in lymphoid tissues of HIV-infected macaques, *SAIDS - J. Acq. Imm. Def.* 42 (2006) p. 155-161
- [9] S. Zhang, H. Uludag, Nanoparticulate Systems for growth factor delivery, *Pharm. Res.*, 26:7 (2009) p. 1561-1580
- [10] Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C., long circulating and target specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.*, 53 (2001) p. 283-318
- [11] Roser M., Fisher D., Kissel T., surface modified biodegradable albumin nano- and microsphere. II : effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46 (1998) p. 255-63
- [12] Nouvel C., Synthèse contrôlée de copolymères dextrane-g-poly lactide : de leur utilisation comme surfactifs biodégradables à la mise en oeuvre des systèmes de vectorisation particuliers, Thèse Institut Polytechnique de Lorraine (INPL), 2002
- [13] Aumelas A., Systèmes nanoparticulaires à base de dextrane pour l'encapsulation de principes actifs, DEA Institut Polytechnique de Lorraine (INPL), 2005
- [14] Pinto Reis C., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomed. Nanotechnol.*, 2 (2006) p. 8-21
- [15] M.J. Santander-Ortega, T. Stauner, B. Loretz, J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, G. Wenz, U.F. Schaefer, C.M. Lehr, Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery, *J. Control. Release* 141(2010) p. 85-92
- [16] Zille H., Paquet J., Henrionnet C., Scala-vertola J., Leonard M., Six J.L., Deschamps F., Netter P., Verges J., Gillet P., Grossin L., Evaluation of intra-articular delivery of hyaluronic acid functionalized biopolymeric nanoparticles in healthy rat knees, *Bio-med. Mater. Eng.* 20 :3-4 (2010) p. 235-242
- [17] Nouvel C., Raynaud J., Marie E., Dellacherie E., Six J.L., Durand A., Biodegradable nanoparticles made from polylactide-grafted dextran copolymers, *J. Colloid. Interf. Sci.*, 330 (2009) p. 337-343

- [18] Raynaud J., Choquet B., Marie E., Dellacherie E., Nouvel C., Six J.L., Durand A., Emulsifying Properties of Biodegradable Polylactide-Grafted Dextran Copolymers, *Biomacromolecules*, 9 (2008) p. 1014-1021
- [19] Rouzes C., Nanosphères à coeur de poly(acide lactique) et couronne de dextrane: élaboration, propriétés et applications biomédicales, Thèse Institut Polytechnique de Lorraine (INPL), 2001
- [20] Choi S.W., Kwon H.Y., Kim W.S., Kim J.H., Thermodynamic parameters on poly(D,L-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process, *Colloid Surface A.*, 201 (2002) p. 283-289
- [21] Quaglia, F, et al. Nanoscopic core-shell drug carriers made of amphiphilic triblock and star-diblock copolymers. *Int. J. Pharmaceut.* 324:1(2006) p. 56-66
- [22] Long, J, Osmond, D et Vincent, B. The equilibrium aspects of weak flocculation. *J. Colloid. Interf. Sci.* 42:33 (1973) p. 545-553
- [23] Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Muller, R.H., Verbavatz, J.M., Langer, R., The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 16 (1995) p. 215-223
- [24] Bazile, D., Prud'Homme, C., Bassoulet, M.T., Marlard, M., Spenlehauer, G., Veillard, M., Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) p. 493-498
- [25] A. Beletsi, Z. Panagi, K. Avgoustakis, Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers, *Int. J. Pharmaceut.* 298 (2005) 233-241
- [26] Lemarchand C., Gref R., Couvreur P., Polysaccharide-decorated nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 58 (2004) p. 327-341
- [27] Jiang S., Fang X., Yu Q., Deng J., Yang W., New route to monodispersed amphiphilic core-shell polymer nanoparticles : polymerization of styrene from α -methylstyrene- containing macroinitiator, *J. Appl. Polym. Sci.*, 124 :5 (2012) p. 4121-4126
- [28] Beija, M; Marty, JD; Destarac, M; RAFT/MADIX polymers for the preparation of polymer/inorganic nanohybrids, *Prog. Polym. Sci.* 36,7 (2011) p. 845-886
- [29] Brinks, MK; Studer, A; Polymer Brushes by Nitroxide-Mediated Polymerization, *Macromol. Rapid Comm.*, 30,13 (2009) p. 1043-1057
- [30] Juel Fristrup C., Jankova K., Hvilsted S., Surface-initiated atom transfer radical polymerization - a technique to develop biofunctional coatings, *Soft Matter*, 5 (2009) p. 4623-4634
- [31] Rigoberto A., Polymer brushes by anionic and cationic Surface-Initiated Polymerization (SIP), *Adv. Polym. Sci.*, 197 (2006) p. 107-136
- [32] Elsabahy M., Wooley KL., Strategies toward well-defined polymer nanoparticles inspired by nature: chemistry versus versatility, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 50 (2012) p. 1869-1880
- [33] Zdyrko B., Luzinov I., Polymer brushes by the « Grafting to » Method, *Macromol. Rapid Commun*, 32 (2011) p. 859-869
- [34] Pargen S., Willems C., Keul H., Pich A., Moeller M., Surfactant-free synthesis of polystyrene nanoparticles using oligoglycidol macromonomers, *Macromolecules*, 45 (2012) p. 1230-1240
- [35] Chemtob A., Héroguez V., Gnanou Y., Dispersion Ring-Opening Metathesis Polymerization of Norbornene using PEO-based Stabilizers, *Macromolecules* 35 (2002) p. 9262-9269
- [36] Ladaviere C., Averlant-petit MC., Fabre O., Durand A., Dellacherie E., Marie E., Preparation of polysaccharide-coated nanoparticles by emulsion polymerization of styrene, *Colloid. Polym. Sci.* 285 (2007) p. 621-630
- [37] Yang S.C., Ge H.X., Hu Y., Jiang X.Q., Yang C.Z., Formation of positively charged poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilized with chitosan, *Colloid Polym. Sci.*, 278 (2000) p. 285-292

- [38] Bertholon I., Lesieur S., Labarre D., Besnard M., Vauthier C., Characterization of dextran-poly(isobutylcyanoacrylate) copolymers obtained by redox radical and anionic emulsion polymerization, *Macromolecules* 39 :10 (2006) p. 3559-3567
- [39] Chognot D., Six JL., Leonard M., Bonneaux F., Vigneron C., Dellacherie E., Physicochemical evaluation of PLA nanoparticles stabilized by water-soluble MPEO-PLA block copolymers, *J. Colloid. Interf. Sci.*, 268 (2003) p. 441-447
- [40] Ma, W, et al. Evaluation of blood circulation of polysaccharide surface-decorated PLA nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 72:1 (2008) p. 75-81
- [41] Gu, M, et al. Surface biofunctionalization of PLA nanoparticles through amphiphilic polysaccharide coating and ligand coupling: Evaluation of biofunctionalization and drug releasing behavior. *Carbohydr. Polym.* 67:3 (2007) p. 417-426
- [42] Vauthier C., Persson B., Lindner P., Cabane B., Protein adsorption and complement activation for di-block copolymer nanoparticles, *Biomaterials* 32 (2011) p. 1646-1656
- [43] Vila A., Sanchez A., Tobio M., Calvo P., Alonso M.J., Design of biodegradable particles for protein delivery, *J. Control. Release*, 78 (2002) p. 15-24.
- [44] Patil, Y, et al. Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials*. 30:5 (2009) p. 859-866
- [45] Zhang H., Gao F., Liu L., Li X., Zhou Z., Yang X., Zhang Q., Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy, *Colloid Surface B*, 71(2009) p. 19-26
- [46] Park K.H., Song H.C., Na K., Bom H.S., Lee K.H., Kim S., Kang D., Lee D.H., Ionic strength-sensitive pullulan acetate nanoparticles (PAN) for intratumoral administration of radioisotope: Ionic strength-dependant aggregation behavior and 99mTechnetium retention property, *Colloid Surface B*, 59 (2007) p. 16-23
- [47] Jeong Y., Na H.S., Oh J.S., Choi K.C., Song C.E., Lee H.C., Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly(DL-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan, *Int. J. Pharmaceut.*, 322 (2006) p. 154-160
- [48] Gref R., Rodrigues J.S., Couvreur P., Polysaccharide grafted with polyesters: novel amphiphilic copolymers for biomedical applications, *Macromolecules*, 35 (2003) p.9861-9867
- [49] Rodrigues J.S., Santos-Magalhaes N.S., Coelho L.C.B.B., Couvreur P., Ponchel G., Gref R., Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins, *J. Control. Release*, 92 (2003) 103-112
- [50] Lemarchand C., Couvreur P., Vauthier C., Costantini D., Gref R., Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyser Turbiscan, *Int. J. Pharmaceut.*, 254 (2003) p. 77-82
- [51] Lemarchand C., Gref R., Lesieur S., Hommel H., Vacher B., Besheer A., Maeder K., Couvreur P., Physico-chemical characterization of polysaccharide-coated nanoparticles, *J. Control. Release*, 108 (2005) p. 97-111
- [52] Wang Y.S., Liu L.R., Jiang Q., Zhang Q.Q., Self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified chitosan conjugate as a novel carrier of epirubicin, *Eu. Polym.*, 43 (2007) p. 43-51
- [53] Akiyoshi K., Degushi S., Tajima H., Nishikawa T., Sunamoto J., Microscopic structure and thermoresponsiveness of a hydrogel nanoparticle of hydrophobized polysaccharides, *JACS*, 11 (1996), p. 6110-6115
- [54] Barsbay M., Guener A., Miscibility of dextran and poly(ethylene glycol) in solid state : Effect of the solvent choice, *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) p.214-223

- [55] Schatz C., Louuet S., Le Meins JF., Lecommandoux S., Polysaccharide-block-polypeptide copolymer vesicles: towards synthetic Viral Capsids, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) p. 2572-2575
- [56] Kaewprapan K., Inprakhon P., Marie E., Durand A., Enzymatically degradable nanoparticles of dextran esters as potential drug delivery systems, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) p. 875-881
- [57] Aumelas A., Serrero A., Durand A., Dellacherie E., Leonard M., Nanoparticles of hydrophobically modified dextrans as potential drug carrier systems, *Colloid Surface B*, 59 (2007) p. 74-80
- [58] Nouvel, C; Dubois, P; Dellacherie, E; Six, JL ; Controlled synthesis of amphiphilic biodegradable polylactide-grafted dextran copolymers, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 42, 11 (2004) p. 2577-2588
- [59] Nouvel C., Frochot C., Sadtler V., Dubois P., Dellacherie E., Six J.L., Polylactide- Grafted Dextrans: Synthesis and Properties at Interfaces and in Solution, *Macromolecules*, 37 (2004) p. 4981-4988
- [60] Nouvel C., Dubois P., Dellacherie E., Six J.L., Controlled Synthesis of Amphiphilic Biodegradable Polylactide-Grafted Dextran Copolymers, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, 42 (2004) p. 2577-2588
- [61] Une histoire de microbes, Patrick Berche, Ed. John Libbey Eurotext, 2007, ISBN 978-2742006748
- [62] CDC. *Pneumocystis pneumonia*---Los Angeles. *MMWR* 1981;30:250--2
- [63] Barre-Sinoussi F., Chermann JC., Rey F., Nugeyre MT., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L., *Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)*, *Science* , 220 (1983) p. 868- 871
- [64] Vilmer E., Barre-Sinoussi F., Rouzioux C., Gazengel C., Vezinet Brun F., Dauguet C., Fischer A., Manigne P., Chermann J.C., Griscelli C., Montagnier L., *Isolation of new lymphotropic retrovirus from two siblings with haemophilia B, one with AIDS*, *The Lancet*, 323 (1984) p. 753-757
- [65] Montagnier L., Dauguet C., Axler C., Chamaret S., Gruest J., Nugeyre M.T., Rey F., Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., *A new type of retrovirus isolated from patients presenting with lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndrome: Structural and antigenic relatedness with equine infectious anaemia virus*, *Ann. Virol.(Inst. Pasteur)*, 135 (1984), p. 119-134
- [66] Clavel F., Guétard D., Brun-Vézinet F., Chamaret S., Rey M., Santos-Ferreira M.O., Laurent,A.G., Dauguet C., Katlama C., Rouzioux C., Klatzmann D., Champalimaud J.L., Montagnier L., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*, *Science*, 233: 4761 (1986) p. 343-346
- [67] Ho David D., Bieniasz Paul D., *HIV-1 at 25*, *Cell*, 133:4, (2008), p. 561-565
- [68] rapport OMS et ONUSIDA, décembre 2009 - www.unaids.org
- [69] FOCUS - HAS Actualités & Pratiques - N° 18 - Avril 2010
- [70] Briggs, J.A., M.N. Simon, I. Gross, H.G. Krausslich, S.D. Fuller, V.M. Vogt, and M.C. Johnson. *The stoichiometry of Gag protein in HIV-1*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11(2004) p. 672-6755.
- [71] Gunaseelan S., Gunaseelan K., Deshmukh M., Zhang X., Sinko P.J., Surface modifications of nanocarriers for effective intracellular delivery of anti-VIH drugs, *Adv. Drug Deliver Rev.* 62 (2010) p. 518-531
- [72] Leis J., Baltimore D., Bishop J.M., Coffin J., Fleissner E., Goff S.P., Oroszlan S., Robinson H., Skalka A.M., Temin H.M., Vogt V., Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses, *J. Virol.*, 62:5 (1988), p. 1808-1809
- [73] Sosnik A., Chiappetta D.A., Carcaboso A.M., *Drug delivery system in HIV pharmacotherapy : what has been done and the challenge standing ahead*, *J. Control. Release*, 138:1 (2009), p. 2-15

- [74] Adamson, C.S., and E.O. Freed., *Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation*. *Adv. Pharmacol.* 55 (2007) p. 347-87.
- [75] D.R. Littman, *Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis ?*, *Cell* 93 (1998) p. 677-680
- [76] Boggetto, N., and M. Reboud-Ravaux. Dimerization inhibitors of HIV-1 protease. *Biol Chem.* 383 (2002) p. 1321-1324.
- [77] Bannwarth, L., and M. Reboud-Ravaux. An alternative strategy for inhibiting multidrugresistant mutants of the dimeric HIV-1 protease by targeting the subunit interface. *Biochem. Soc. T.* 35 (2007) p. 551-554.
- [78] Franciskovich, J., Houseman, K., Mueller, R., Chmielewski, J. *A systematic evaluation of the inhibition of HIV-1 protease by its C- and N-terminal peptides*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3 (1993) p. 765-768
- [79] Schramm, H.J., J. Boetzel, J. Buttner, E. Fritsche, W. Gohring, E. Jaeger, S. Konig, O. Thumfart, T. Wenger, N.E. Nagel, and W. Schramm. *The inhibition of human immunodeficiency virus proteases by 'interface peptides'*. *Antivir. Res.* 30 (1996) p. 155-170.
- [80] Schramm, H.J., E. de Rosny, M. Reboud-Ravaux, J. Buttner, A. Dick, and W. Schramm. *Lipopeptides as dimerization inhibitors of HIV-1 protease*. *J. Biol. Chem.* 380 (1999) p. 593-596.
- [81] Dumond, J., N. Boggetto, H.J. Schramm, W. Schramm, M. Takahashi, and M. Reboud-Ravaux. *Thyroxine-derivatives of lipopeptides: bifunctional dimerization inhibitors of human immunodeficiency virus-1 protease*. *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) p. 1097-1102.
- [82] Frutos, S., R.A. Rodriguez-Mias, S. Madurga, B. Collinet, M. Reboud-Ravaux, D. Ludevid, and E. Giralt. Disruption of the HIV-1 protease dimer with interface peptides: structural studies using NMR spectroscopy combined with [2-(13)C]-Trp selective labeling. *Biopolymers.* 88 (2007) p. 164-173.
- [83] Bannwarth, L., T. Rose, L. Dufau, R. Vanderesse, J. Dumond, B. Jamart-Gregoire, C. Pannecouque, E. De Clercq, and M. Reboud-Ravaux. Dimer disruption and monomer sequestration by alkyl tripeptides are successful strategies for inhibiting wild-type and multidrug-resistant mutated HIV-1 proteases. *Biochemistry.* 48 (2009) p. 379-387.
- [84] Breccia, P., N. Boggetto, R. Perez-Fernandez, M. Van Gool, M. Takahashi, L. Rene, P. Prados, B. Badet, M. Reboud-Ravaux, and J. de Mendoza. Dimerization inhibitors of HIV-1 protease based on a bicyclic guanidinium subunit. *J. Med. Chem.* 46 (2003) p. 5196-5207.
- [85] Shultz, M.D., Y.W. Ham, S.G. Lee, D.A. Davis, C. Brown, and J. Chmielewski. Small molecule dimerization inhibitors of wild-type and mutant HIV protease: a focused library approach. *JACS,* 126 (2004) p. 9886-9887.
- [86] Bowman, M.J., and J. Chmielewski. *Sidechain-linked inhibitors of HIV-1 protease dimerization*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2009) p. 967-976.
- [87] Bouras, A., N. Boggetto, Z. Benatalah, E. de Rosny, S. Sicsic, and M. Reboud-Ravaux. Design, synthesis, and evaluation of conformationally constrained tongs, new inhibitors of HIV-1 protease dimerization. *J. Med. Chem.* 42 (1999) p. 957-962.
- [88] Merabet, N., J. Dumond, B. Collinet, L. Van Baelinghem, N. Boggetto, S. Ongeri, F. Ressay, M. Reboud-Ravaux, and S. Sicsic. *New constrained "molecular tongs" designed to dissociate HIV-1 protease dimer*. *Journal of Medicinal Chemistry.* 47 (2004) p. 6392-6400.
- [89] Adamson, C.S., K. Waki, S.D. Ablan, K. Salzwedel, and E.O. Freed. Impact of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors on evolution of resistance to the maturation inhibitor bevirimat (PA-457). *J. Virol.* 83 (2009) p. 4884-4894.

- [90] Bannwarth, L., A. Kessler, S. Pethe, B. Collinet, N. Merabet, N. Boggetto, S. Sicsic, M. Reboud-Ravaux, and S. Ongeri. *Molecular tongs containing amino acid mimetic fragments: new inhibitors of wild-type and mutated HIV-1 protease dimerization*. *J. Med. Chem.* 49 (2006) p. 4657-4664.
- [91] Vidu, A., L. Dufau, L. Bannwarth, J.L. Soulier, S. Sicsic, U. Piarulli, M. Reboud-Ravaux, and S. Ongeri. *Toward the First Nonpeptidic Molecular Tong Inhibitor of Wild-Type and Mutated HIV-1 Protease Dimerization*. *ChemMedChem*. 5:11 (2010) p. 1899-1906
- [92] Schramm, H.J., H. Nakashima, W. Schramm, H. Wakayama, and N. Yamamoto. *HIV-1 reproduction is inhibited by peptides derived from the N- and C-termini of HIV-1 protease*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179 (1991) p. 847-51.
- [93] Zhang, Z.Y., R.A. Poorman, L.L. Maggiora, R.L. Heinrikson, and F.J. Kezdy. *Dissociative inhibition of dimeric enzymes. Kinetic characterization of the inhibition of HIV-1 protease by its COOH-terminal tetrapeptide*. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) p. 15591-15594.
- [94] Babe, L.M., J. Rose, and C.S. Craik. *Synthetic "interface" peptides alter dimeric assembly of the HIV 1 and 2 proteases*. *Protein Sci.* 1 (1992) p. 1244-1253.
- [95] Schramm, H.J., A. Billich, E. Jaeger, K.P. Rucknagel, G. Arnold, and W. Schramm. *The inhibition of HIV-1 protease by interface peptides*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194 (1993) p. 595-600.
- [96] Breccia, P., N. Boggetto, R. Perez-Fernandez, M. Van Gool, M. Takahashi, L. Rene, P. Prados, B. Badet, M. Reboud-Ravaux, and J. de Mendoza. *Dimerization inhibitors of HIV-1 protease based on a bicyclic guanidinium subunit*. *J. Med. Chem.* 46 (2003) p. 5196-5207.
- [97] Bouras, A., N. Boggetto, Z. Benatalah, E. de Rosny, S. Sicsic, and M. Reboud-Ravaux. *Design, synthesis, and evaluation of conformationally constrained tongs, new inhibitors of HIV-1 protease dimerization*. *J. Med. Chem.* 42 (1999) p. 957-962.
- [98] Bowman, M.J., and J. Chmielewski. *Crucial amides for dimerization inhibitors of HIV-1 protease*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) p. 1395-1398
- [99] Ulysse, L.G., and J. Chmielewski. *Restricting the flexibility of crosslinked, interfacial peptide inhibitors of HIV-1 protease*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) p. 3281-3286.
- [100] Laure Dufau, Développement de nouvelles générations d'inhibiteurs de la dimérisation de la protéase du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1): approches structurales, mécanistiques et fonctionnelles; vectorisation, Thèse de doctorat de l'UPMC - Sorbonne universités, 2011
- [101] Park, S.H., and R.T. Raines. *Genetic selection for dissociative inhibitors of designated protein-protein interactions*. *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) p. 847-851.
- [102] Song, M., S. Rajesh, Y. Hayashi, and Y. Kiso. *Design and synthesis of new inhibitors of HIV-1 protease dimerization with conformationally constrained templates*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) p. 2465-2468.
- [103] Davis, D.A., C.A. Brown, K.E. Singer, V. Wang, J. Kaufman, S.J. Stahl, P. Wingfield, K. Maeda, S. Harada, K. Yoshimura, P. Kosalaraksa, H. Mitsuya, and R. Yarchoan. *Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease*. *Antivir. Res.* 72 (2006) p. 89-99.
- [104] Koh, Y., S. Matsumi, D. Das, M. Amano, D.A. Davis, J. Li, S. Leschenko, A. Baldrige, T. Shioda, R. Yarchoan, A.K. Ghosh, and H. Mitsuya. *Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization*. *Biological chemistry*. 282 (2007) p. 28709-28720.

- [105] Quere, L., T. Wenger, and H.J. Schramm. *riterpenes as potential dimerization inhibitors of HIV-1 protease*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 227 (1996) p. 484-488.
- [106] El Dine, R.S., A.M. El Halawany, C.M. Ma, and M. Hattori. *Inhibition of the dimerization and active site of HIV-1 protease by secondary metabolites from the Vietnamese mushroom Ganoderma colossum*. *J. Nat. Prod.* 72 (2009) p. 2019-23.
- [107] Fan, X., Flentke, G.R., Rich, D.H. *Inhibition of HIV-1 protease by a subunit of didemnaketol A*. *JACS.* 120 (1998) p. 8893-8894
- [108] Tomasselli, A.G., and R.L. Heinrikson. *Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective*. *Biochimica Biophysica Acta.* 1477 (2000) p. 189-214.
- [109] Wensing, A.M., N.M. van Maarseveen, and M. Nijhuis. *Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance*. *Antivir. Res.* 85:1 (2010) p. 59-74
- [110] Debouck, C. *The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS*. *AIDS Res Hum Retrov.* 8 (1992) p. 153-164.
- [111] H. Mirchandani, Y.W. Chien, *Drug delivery approaches for anti-HIV drugs*, *Int. J. Pharm.* 95 (1993) p. 1-21.
- [112] *Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) p. 697-710
- [113] L. Baert, L. Schueller, Y. Tardy, D. Macbride, G. van't Klooster, H. Borghys, E. Clessens, G. Van Den Mooter, E. Van Gyseghem, P. Van Remoortere, P. Wigerinck, J. Rosier, *Development of an implantable infusion pump for sustained anti-HIV drug administration*, *Int. J. Pharm.* 355 (2008) p. 38-44
- [114] *Inhibiteurs de la protéase du VIH : relations avec la lipodystrophie et les troubles métaboliques*, *Virologie. Numéro spécial*, 5 (2001) p. 42-50
- [115] H. Mirchandani, Y.W. Chien, *Drug delivery approaches for anti-HIV drugs*, *Int. J. Pharm.* 95 (1993) p. 1-21
- [116] D. Wamke, J. Barreta, Z. Temesgen, *Antiretroviral drugs*, *J. Clin. Pharmacol.* 47 (2007) p. 1570-1579
- [117] S.P. Vyas, R. Subhedar, S. Jain, *Development and characterization of emulsomes for sustained and targeted delivery of an antiviral agent to liver*, *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) p. 321-326
- [118] S.A. Thomas, *anti-HIV drug distribution to the central nervous system*, *Curr. Pharm. Des.* 10:12 (2004) p. 1313-1324
- [119] V. Schafer, H. von Briesen, R. Andreesen, A.M. Steffan, C. Royer, S. Troster, J. Kreuter, H. Rubsamen-Waigmann, *Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting*, *Pharm. Res.* 9 (1992) p. 541-546
- [120] Gunaseelan S., Gunaseelan K., Deshmukh M., Zhang X., Sinko P.J., *Surface modifications of nanocarriers for effective intracellular delivery of anti-VIH drugs*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) p. 518-531
- [121] Sosnik A., Chiappetta D.A., Carcabosso A.M., *Drug delivery systems in HIV pharmacotherapy : What has been done and the challenges standing ahead*, *J. Control. Release*, 138 (2009) p. 2-15
- [122] Ojewole E. Mackraj I., Naidoo P., Govender T., *Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70(2008) p. 697-710
- [123] Ramana L. N., Sethuraman SA., Ranga U., Krishnan U. M., *Development of a liposomal nanodelivery system for nevirapine*, *J. Biomed. Sci.*, 17:57 (2010)

- [124] Bowman, MC; Ballard, TE; Ackerson, CJ; Feldheim, DL; Margolis, DM; Melander, C., Inhibition of HIV Fusion with Multivalent Gold Nanoparticles, *JACS*, 130 (2008) p. 6896-6897
- [125] Arnáiz B., Martínez-Ávila O., Falcon-Perez JM., Penadés Soledad, Cellular Uptake of Gold Nanoparticles Bearing HIV gp120 Oligomannosides, *Bioconjugate Chem.*, 23 (2012) p. 814-825
- [126] Mastro MA., Hardy AW., Boasso A., Shearer GM., Eddy CR., Kub FJ., Non-toxic inhibition of HIV-1 replication with silver-copper nanoparticles, *Med. Chem. Res.*, 19 (2010) p. 1074-1081
- [127] Bender A., Schaefer V., Steffan A.M., Royer C., Kreuter J., Ruebsamen-Waigmann H., von Briesen H., Inhibition of HIV in vitro by antiviral drug-targeting using nanoparicles, *Res. Virol.* 145 (1994) p.215-220
- [128] Lipa K. Shah, Mansoor M. Amiji, Intracellular Delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS, *Pharm. Res.*, 23, 11(2006) p. 2638-2645
- [129] Alhenn D., Lamprecht A., Microsphere preparation using the un toxic solvent glycofurl, *Pharm. Res.* 28 (2011) p. 563-571
- [130] P. Couvreur, R. Gref, K. Andrieux, C. Malvy, Nanotechnologies for drug delivery: Application to cancer and autoimmune diseases, *Progr. Solid State Ch.* 34 (2006) p. 231-235
- [131] Ralph W. Moss, Galen on Cancer: How Ancient Physicians Viewed Malignant Disease, 1989, citant Michael Shimkin, *Contrary to Nature*, DHEW Publication No. (NIH) 79-720, Superintendent of Documents, Washington, DC, p. 35, lui-même citant Paul d'Égine, *Le Livre de la chirurgie*, VIII siècle.
- [132] Bonnet, C. S.; Walsh, D. A., Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 44:1 (2005) p. 7-16
- [133] Raab, O., Uber die wirkung fluorescierender stoffe auf infusoria. *Zoo Biol*, 39 (1900) p. 524-530
- [134] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M-L., Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents, *Trends Biotechnol.* 26:11 (2008) p. 612-621
- [135] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, Nanoparticles incancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) p.631-651
- [136] D. Bechet, L. Tirand, B. Faive, F. Plénat, C. Bonnet, T. Bastogne, C. Frochot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Neuropilin-1 targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release, *Pharm. Res.*, 27:3 (2009) p. 468-479
- [137] Pitot, H. C.; Dragan, Y. P., Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB*, 5:9, (1991) p. 2280-2286.
- [138] Folkman, J., What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl Cancer I.* 82:1 (1990) p. 4-6
- [139] Folkman, J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995, 1:1 (1995) p. 27-31.
- [140] Risau, W., Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386:6626 (1997) p. 671-674
- [141] Gabrilovich, D.; Ishida, T.; Oyama, T.; Ran, S.; Kravtsov, V.; Nadaf, S.; Carbone, D. P., Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92 :11 (1998) p. 4150-4166
- [142] Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C. A.; Susan Harvey, V.; Dvorak, H. F., Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219:4587 (1983) p. 983-985

- [143] Berse, B.; Brown, L. F.; Van de Water, L.; Dvorak, H. F.; Senger, D. R., Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol. Biol. Cell*, 3:2 (1992) p. 211-220
- [144] Ferrara, N.; Davis-Smyth, T., The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18:1 (1997) p. 4-25
- [145] Freeman, M. R.; Schneck, F. X.; Gagnon, M. L.; Corless, C.; Soker, S.; Niknejad, K.; Peoples, G. E.; Klagsbrun, M., Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: A potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res.*, 55:18 (1995) p. 4140-4145
- [146] Melter, M.; Reinders, M. E. J.; Sho, M.; Pal, S.; Geehan, C.; Denton, M. D.; Mukhopadhyay, D.; Briscoe, D. M., Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood*, 96:12 (2000) p. 3801-3808
- [147] Brogi, E.; Wu, T.; Namiki, A.; Isner, J. M., Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*, 90:2 (1994) p. 649-652
- [148] Goldberg, M. A.; Schneider, T. J., Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J. Biol. Chem.*, 269:6 (1994) p. 4355-4359
- [149] Shweiki, D.; Itin, A.; Soffer, D.; Keshet, E., Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359:6398 (1992) p. 843-845
- [150] Gagnon, M. L.; Bielenberg, D. R.; Gechtman, Z.; Miao, H. Q.; Takashima, S.; Soker, S.; Klagsbrun, M., Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *P. Natl Acad Sci USA*, 97:6 (2000) p. 2573-2578
- [151] Parikh, A. A.; Fan, F.; Liu, W. B.; Ahmad, S. A.; Stoeltzing, O.; Reinmuth, N.; Bielenberg, D.; Bucana, C. D.; Klagsbrun, M.; Ellis, L. M., Neuropilin-1 in human colon cancer: Expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 164:6 (2004) p. 2139-2151
- [152] Wang M., Thanou M., Targeting nanoparticles to cancer, *Pharmacol. Res.*, 62 (2010) p. 90-99
- [153] Pissuwan D., Cortie C.H., Valenzuela S.M., Cortie M.B., Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria, *Trends Biotechnol.*, 28,4 (2010) p. 207-213
- [154] Zhou J., Ralston J., Sedev R., Beattie D.A., Functionalized gold nanoparticles : Synthesis, structure and colloid stability, *J. Colloid Interf. Sci.*, 331 (2009) p. 251-262
- [155] Glomm W.R., Functionalized Gold Nanoparticles for Applications in Bionanotechnology, *J. Disper. Sci. Technol.*, 26 (2005) p. 389-414
- [156] Amstad E., Textor M., Reimhult E., Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Nanoscale*, 3 (2011) p. 2819-2843
- [157] Trewyn B.G., Slowing I.I., Giri S., Chen H-T., Lin V. S-Y., Synthesis and functionalization of a mesoporous Silica nanoparticles Based on the Sol-Gel Process and applications in controlled release, *Accounts Chem. Res.*, 40 (2007) p. 846-853
- [158] Hao R., Xing R., Xu Z., Hou Y., Gao S., Sun S., Synthesis, functionalization, and Biomedical Application of Multifunctional Magnetic Nanoparticles, *Adv. Mater.*, 22 (2010) p. 2729 - 2742
- [159] Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T., Medical Application of functionalized Magnetic Nanoparticles, *J. Biosci. and Bioengi.*, 100:1 (2005) p. 1-11

- [160] Hartono SB., Gu W., Kleitz F., Liu J., He L., Middelberg APJ., Yu C., Lu GQ., Qiao SZ., Poly-L-lysine functionalized large pore cubic mesostructured silica nanoparticles as biocompatible carriers for gene delivery, *ACS Nano*, 6 :3 (2012) p. 2104-2117
- [161] S. Acharya, F. Dilnawaz, S.K. Sahoo. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials*. 30 (2009) p. 5737-5750
- [162] U. S. Toti, B. R. Guru, A.E. Grill et J. Panyam. Interfacial Activity Assisted Surface Functionalization: a novel approach to incorporate maleimide functional groups and cRDG peptide on polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Mol. Pharmaceut.* 7: 4 (2010) p.1108-1117
- [163] Rostovtsev VV., Green LG., Fokin VV., Sharpless KB., A stepwise Huisgen cycloaddition process : copper(I)-catalysed regioselective « ligation » of azides and terminal alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 :14 (2002) p. 2596-2599
- [164] Lallana E., Sousa-Herves A., Fernandez-Trillo F., Riguera R., Fernandez-Legia E., Click Chemistry for drug delivery nanosystems, *Pharm. Res.* 29 :1 (2012) p. 1-34
- [165] Lowe A.B., Hoyle C.E., Bowman C.N., Thiol-yne click chemistry : A powerful and versatile methodology for materials synthesis, *J. Mater. Chem.*, 20 (2010) p. 4745-4750
- [166] Hoyle C.E., Bowman C.N., Thiol-Ene Click Chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (2010) p. 1540-1573
- [167] Hensarling R.M., Doughty V.A., Chan J.W., Patton D.L., “Clicking” polymer brushes with Thiol-yne chemistry: Indoors and Out, *JACS*, 131 (2009) p. 14673-14675
- [168] Wu J.T., Huang C.H., Liang W.C., Wu Y.L., Yu J., Chen H.Y., Reactive polymer coating : A General route to Thiol-ene and Thiol-yne Click Reactions, *Macromol. Rapid Commun.*, 33 (2012) p. 922-927
- [169] Huynh VT., Chen G., de Souza P., Stenzel MH., Thiol-yne and Thiol-ene « click » Chemistry as a Tool for a variety of Platinum Drug delivery carriers, from statistical copolymers to crosslinked Micelles, *Biomacromolecules*, 12 (2011) p. 1738-1751
- [170] Wang C., Ren PF, Huang XJ., Wu J., Xu ZK., Surface glycosylation of polymer membrane by Thiol-yne click chemistry for affinity adsorption of lectin, *Chem. Commun.*, 47 (2011) p. 3930-3932
- [171] Dondoni A., Marra A., Recent applications of thiol-ene coupling as a click process for glycoconjugation, *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2012) p. 573-586
- [172] Xie H., Hu L., Zhang Y., Shi W., Sulfur-containing hyperbranched polymeric photoinitiator end-capped with benzophenone and tertiary amine moieties prepared via simultaneous double thiol-ene click reactions used for UV curing coatings, *Prog. Org. Coat.* 72 (2011) p. 572-578
- [173] Lowe A.B., Thiol-ene « click » reactions and recent applications in polymer and materials synthesis, *Polym. Chem.*, 1 (2010) p. 17-36
- [174] Tasdelen M.A., Diels-Alder « click » reactions : recent applications in polymer and material science, *Polym. Chem.*, 2 (2011) p. 2133
- [175] Hall D.J., Van Den Berghe H.M., Dove A.P., Synthesis and post-polymerization modification of maleimide-containing polymers by « thiol-ene » click and Diels-Alder chemistries, *Polym. Int.*, 60:8 (2011) p. 1149-1157
- [176] A. Barras, S. Szunerits, L. Marcon, N. Monfiliette-Dupont, R. Boukherroub. Functionalization of Diamond Nanoparticles Using “Click” Chemistry. *Langmuir*. 26 (2010) p. 13168-13172

- [177] D.A. Fleming, C.J. Thode, M. E Williams. Triazole Cycloaddition as a General Route for Functionalization of Au Nanoparticles. *Chem. Mater.* 18: 9 (2006) p. 2327-2334
- [178] Xu LQ., Yao F., Fu GD., Simultaneous click chemistry and atom transfer radical emulsion polymerisation and prepared well-defined cross-linked nanoparticles, *Macromolecules*, 42 (2009) p. 6385-6392
- [179] Van der Ende AE., Harrell J., Sathiyakumar V., Meschievitz M., Katz J., Adcock K., Harth E., « click » reactions : Novel Chemistries for forming well-defined polyester nanoparticles, *Macromolecules* 43 (2010) p. 5665-5671
- [180] Babinot J., Renard E., Langlois V., Preparation of clickable poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) : Application to poly(ethylene glycol) (PEG) graft copolymers synthesis, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) p. 619-624
- [181] Liebert T., Hänsch C., Heinze T., Click Chemistry with polysaccharides, *Macromol. Rapid Commun.* 27(2006) p. 208-213
- [182] Pahimanolis N., Vesterinen AH., Rich J., Seppala J., Modification of dextran using click chemistry approche in aqueous media, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) p. 78-82
- [183] Xu N., Zhu F., Du FS., Li ZC., Synthesis of saccharide-terminated poly(ϵ -caprolactone) via michael addition and click chemistry, *Macromol. Chem. Phys.* 208 (2007) p. 730-738
- [184] S. Deshayes, V. Maurizot, M.-C. Clochard, C. Baudin, T. Berthelot, S. Esnouf, D. Lairez, M. Moenner, G. Déléris. « Click » Conjugation of Peptide on the surface of Polymeric Nanoparticles for Targetins tumor Angiogenesis. *Pharm. Res.* 28:7 (2011) p. 1631-1642
- [185] P. S. Banerjee, P. Ostapchuk, P. Hearing, I. Carrico. Chemoslective Attachment of Small Molecule Effector Functionality to Human Adenoviruses Facilitates Gene Delivery to Cancer Cells. *JACS.* 132 (2010) p. 13615-13617
- [186] H. Yu, Y. Nie, C. Dohmen, Y. Li, E. Wagner. Epidermal Growth Factor-PEG Functionalized PAMAM-Pentaethylenehexamine Dendron for Targeted Gene Delivery Produced by Click Chemistry. *Biomacromolecules.* 12 (2011) p. 2039-2047
- [187] Abeylath SC., Ganta S., Iyer AK., Amiji M., Combinatorial-designed Multifunctional polymeric nanosystems for tumor-targeted therapeutic delivery, *Accounts Chem. Res.*, 44 :10 (2011) p. 1009-1017
- [188] Zou J., Yu Y., Yu L., Li Y., Chen CK., Cheng C., Well-defined drug-conjugated biodegradable nanoparticles by azide-alkyne click crosslinking in miniémulsion, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* 50 (2012) p.142-148
- [189] Soares EV., Hebbelinck K., Soares HMVM., Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* : a comparative study, *Can. J. Microbiol.* 49 (2009) p. 336-343
- [190] Singhon R., Husson J., Knorr M., Euvrard M., Preparation of Silica-supported Biosorbents for Copper (II) Removal, *J. Disper. Sci. Technol.*, 32 (2011) p. 1735-1741
- [191] Megia-Fernandez, A ; Ortega-Munoz, M; Lopez-Jaramillo, J; Hernandez-Mateo, F; Santoyo-Gonzalez, F ;, Non-Magnetic and Magnetic Supported Copper(I) Chelating Adsorbents as Efficient Heterogeneous Catalysts and Copper Scavengers for Click Chemistry, *Adv. Synth. Catal.*, 352 :18 (2010) p. 3306-3320
- [192] Gierlich J., Burley GA., Gramlich PME., Hammond DM>, Carell T., Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA, *Org. Lett.*, 8 :17 (2006) p. 3639-3642

Bibliographie

- [193] Pressly ED., Amir RJ., Hawker CJ., Rapid Synthesis of block and cyclic copolymers via click chemistry in the presence of copper nanoparticles, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 49 (2011) p. 814-819
- [194] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* 1:10 (2006) p. 644-648
- [195] R. I. Jølk, H. Sun, R. H. Berg, T. L. Andresen. Catalyst-Free Conjugation and In Situ Quantification of Nanoparticle Ligand Surface Density Using Fluorogenic Cu-Free Chemistry. *Chem. - Eur. J.* 17 (2011) p. 3326-3331
- [196] Huang B., Kukowska-Latallo J.F., Tang S., Zong H., Johnson K.B., Desai A., Gordon C.L., Leroueil P.R., Baker Jr. J.R., The facile synthesis of multifunctional PAMAM dendrimer conjugates through copper-free click chemistry, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22 (2012) p. 3152-3156
- [197] Guo J., Meng F., Li X., Wang M., Wu Y., Jing X., Huang Y., PEGylated Click Polypeptides Synthesized by Copper-Free Microwave-Assisted Thermal Click Polymerization for Selective Endotoxin Removal From Protein Solutions, *Macromol. Biosci.*, 12 (2012) p. 533-546
- [198] Siebert J.M., Baier G., Musyanovych A., Landfester K., Towards copper-free nanocapsules obtained by orthogonal interfacial "click" polymerization in miniemulsion, *Chem. Commun.*, 48 (2012) p. 5470-5472

Bibliographie

SYNTHESE DES DERIVES AMPHIPHILES DU DEXTRANE

Bien que l'utilisation de dérivés amphiphiles du dextrane pour la formulation de nanoparticules cœur hydrophobe/couronne polysaccharide hydrophile ait déjà été étudiée au laboratoire, il demeure certaines questions. En effet, des dextrans modifiés par des chaînes alkyle de longueur variable ou des groupes aromatiques ont été produits et se sont avérés suffisamment tensioactifs pour stabiliser une émulsion [1] et se retrouver ensuite localisés à la surface des nanoparticules à cœur PLA par exemple [2][3]. Néanmoins, dans certains cas la stabilité de cette couronne hydrophile adsorbée à la surface n'est pas suffisante. C'est par exemple le cas, lorsque les particules sont confrontées à un tensioactif ionique puissant (dodécylsulfate de sodium -SDS) ou à certaines protéines circulantes dans le système sanguin (la BSA a été utilisée comme protéine modèle) [2].

Pour limiter cet inconvénient nous nous sommes proposés de comparer un recouvrement obtenu par les dérivés amphiphiles DexC₆ à un recouvrement réalisé avec des composés à base de dextrane et de PLA. Ce dernier type de recouvrement devrait apporter une stabilité supplémentaire à la couronne hydrophile localisée à la surface des nanoparticules.

1. Les dérivés amphiphiles DexC₆

Dans un premier temps, nous avons repris les travaux réalisés par Céline Rouzes[4] pour obtenir des dérivés hydrophobisés du dextrane (que nous appellerons DexC₆) présentant différents taux de substitution. Dans un deuxième temps, nous avons essayé d'appréhender l'influence de certains paramètres expérimentaux sur leur taux de substitution.

Alors que des dérivés de dextrane porteurs de groupes phénoxy peuvent être obtenus directement à partir du dextrane en phase aqueuse basique, C. Rouzes avait montré qu'il était préférable d'effectuer la synthèse des DexC₆ en milieu homogène dans le DMSO et en présence d'une base. Le taux maximum alors obtenu, à l'époque, n'était que de 15% (15 chaînes alkyle pour 100 unités glucosidiques).

Le mécanisme de synthèse est décrit sur le Schéma 1. Le dextrane T40, solubilisé dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), est déprotoné par une base faible (hydroxyde de tétrabutylammonium - TBAOH) puis réagit avec une quantité adéquate de 1,2-époxyoctane. Une série de purification par dialyse permet d'obtenir un dérivé amphiphile du dextrane que nous nommerons DexC₆ (et plus précisément DexC₆-n avec (n) le taux de substitution défini comme le nombre de chaînes aliphatiques greffées sur 100 unités glucosidiques)

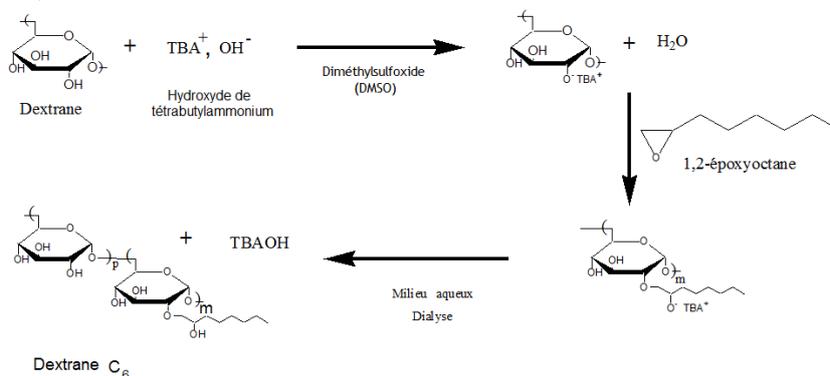


Schéma 1 - Réaction du dextrane T40 avec le 1,2-époxyoctane en présence de TBAOH.

1.1. Estimation du taux de modification par RMN ¹H

Le taux de substitution des divers DexC₆ obtenus est évalué par RMN ¹H dans le DMSO-d₆ (Figure 53). Sur cette figure nous pouvons identifier clairement les protons (d,e) de la chaîne alkyle au nombre de 13, ainsi que le proton anomère (a) de chaque unité glucosidique du dextrane (4,7ppm). Les protons (b,c) de la chaîne alkyle, ainsi que le proton OH (1) résonnent sous le massif correspondant aux protons glucosidiques (3-4ppm). Les pics situés à 4,4 , 4,8 et 4,9ppm correspondent respectivement aux 3 protons hydroxyle (2,3,4) des unités glucosidiques [5].

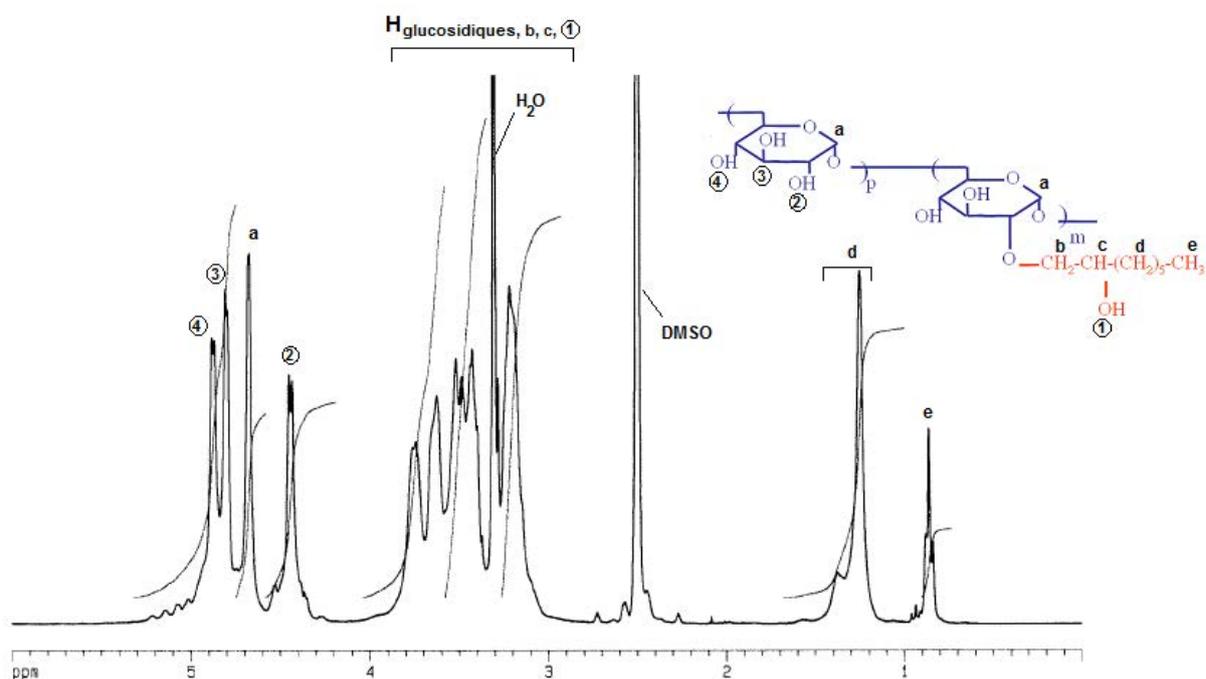


Figure 53 - Spectre RMN ¹H dans le DMSO-d₆ du DexC₆-14

Il est alors facile de calculer le taux de substitution (n) selon l'équation :

$$n = \frac{\left(\frac{A_{CH_2} + A_{CH_3}}{13} \right)}{A_{H_{anomérique}}} \times 100$$

Où A_{CH₂}, A_{CH₃} et A_{anomère} correspondent aux intégrales des pics attribués aux protons (d), (e) et (a) respectivement (Figure 1).

1.2. Influence des conditions opératoires sur le taux de modification obtenu

Pour étudier l'influence du taux de substitution des DexC₆ sur la stabilité des nanoparticules finales et sur leurs caractéristiques, différents dérivés ont été synthétisés selon des conditions opératoires variées: à savoir la quantité introduite d'époxyde ou de TBAOH ainsi que la concentration en dextrane dans le milieu réactionnel.

1.2.1. Effet de la quantité de 1,2-époxyoctane

Le premier paramètre à avoir été étudié est le ratio de la quantité d'époxyde introduite par unité glucosidique. Bien que toutes ces premières expériences aient été menées à 0,1 g/mL de dextrane T40 dans le DMSO et en utilisant 0,5 équivalents de TBAOH par unité glucosidique, un comportement différent a pu être observé lors de l'étape de dialyse. En effet, certains dérivés obtenus demeurent solubles en phase aqueuse, alors qu'une séparation de phase sol/gel peut être observée dans d'autres cas.

Pour la même équivalence de TBAOH, le *Tableau 5* nous indique que le taux de modification est proportionnel à la quantité d'époxyde introduite dans le milieu réactionnel. Néanmoins, alors que les DexC₆-10 et DexC₆-24 sont parfaitement solubles dans l'eau à faible taux de substitution, une séparation sol/gel est observée pendant la dialyse lors de l'expérience menée avec 1 équivalent d'époxyde par unité glucosidique. Les dérivés alors présents dans ces deux phases ne possèdent pas le même taux de modification. Pour de faibles quantités d'époxydes utilisées, on peut synthétiser des DexC₆ qui demeurent solubles en phase aqueuse. Cependant, au-delà de 30% de substitution, les dérivés DexC₆ obtenus ne sont plus correctement solubles dans l'eau. Une fraction des chaînes demeure soluble en phase aqueuse, alors que les plus modifiées se séparent de la solution en formant un gel. Des observations similaires avaient été relatées par Élise Rotureau [6] qui avait alors étudié en détail l'évolution de la conformation des chaînes de DexC₆ en solution aqueuse en fonction du taux de modification par étude de la diffusion de lumière dynamique.

Tableau 5 - Evolution du taux de modification des DexC₆ en fonction du nombre d'équivalent de 1,2-époxyoctane introduit dans le mélange réactionnel. a) Fraction soluble, b) Fraction gel.

Dextrane natif dans le DMSO (g/mL)	TBAOH (eq/unité glucosidique)	1,2 époxyoctane (eq/unité glucosidique)	taux de substitution déterminé par RMN ¹ H (%)
0.1	0.5	0.2	10
		0.5	24
		1	51 ^a + 60 ^b

Il avait alors été démontré que pour un faible taux de modification, la chaîne de DexC₆ adopte une conformation similaire à celle du dextrane natif. À partir de 21% de modification, la conformation de la chaîne est plus compacte. Ce repliement de la chaîne est lié à la présence d'interactions hydrophobes principalement intrachânes qui s'établissent entre les groupements alkyle fixés au dextrane. Au fur et à mesure de l'augmentation du taux de substitution, les interactions hydrophobes interchaînes deviennent

majoritaires et conduisent à la formation d'agrégats regroupant plusieurs chaînes DexC₆ et donc à l'apparition de gel (Figure 54) [7].

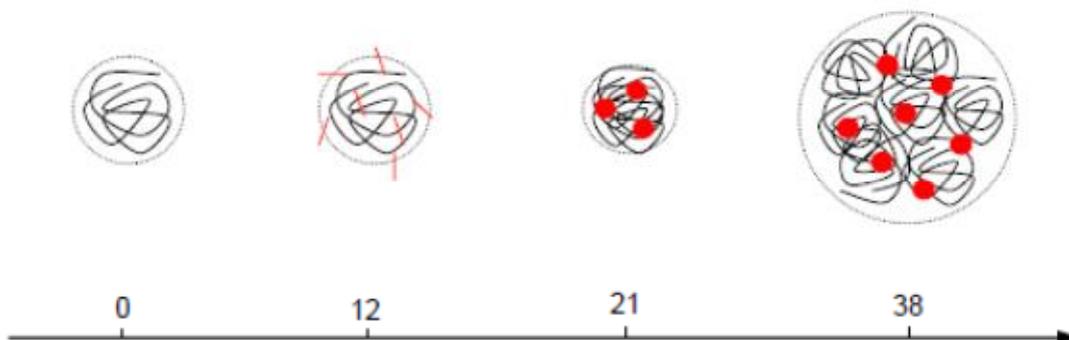


Figure 54 - Représentation de l'effet du taux de modification en chaînes C₆ sur la conformation et l'agrégation schématique de dérivés du dextrane en solution aqueuse diluée [6].

Les résultats rassemblés dans le Tableau 5 et sous la Figure 55 semblent indiquer un taux de modification maximal, que le composé demeure ou non soluble dans l'eau dans les conditions expérimentales testées. A taux élevé, proche de 30%, le DexC₆ se trouve principalement sous forme de gel. Pour la même expérience, des chaînes moins substituées, en plus faible quantité, demeurent solubles dans l'eau.

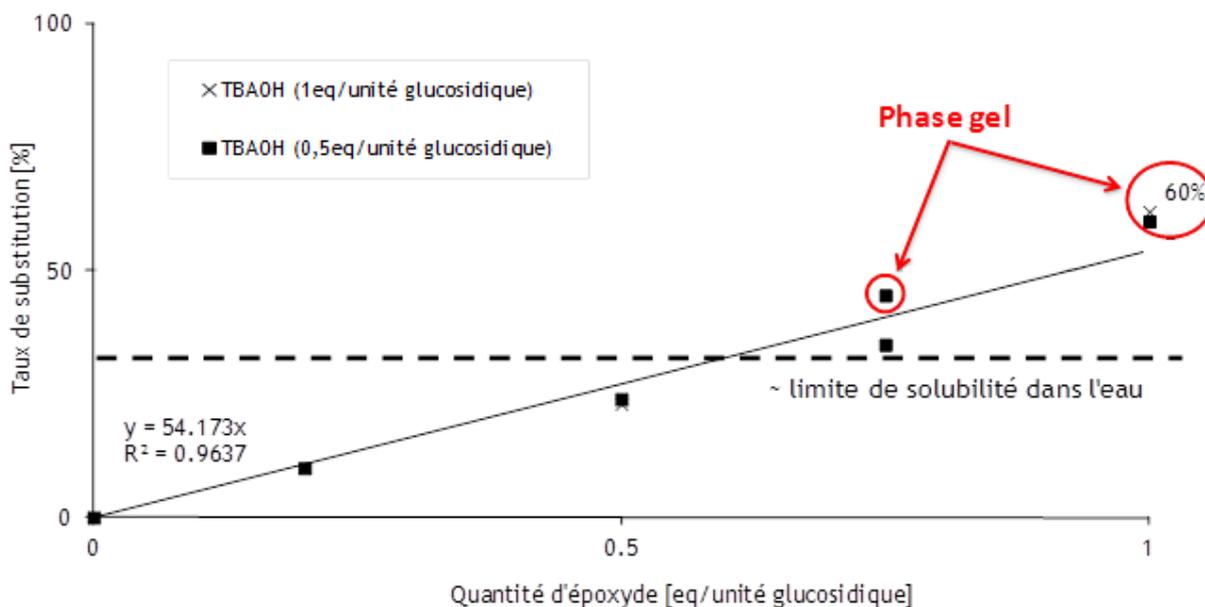


Figure 55 - Taux de modification des DexC₆ en fonction de la quantité de 1,2-époxyoctane introduite pour 0,5 et 1 équivalent de TBAOH par unité glucose. Concentration du Dextrane T40 dans le DMSO fixée à 0.1 g/mL.

1.2.2. Effet de la quantité d'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAOH)

D'après le mécanisme de la réaction (Schéma 1), le TBAOH déprotone les fonctions hydroxyle du dextrane, ce qui permet alors une attaque aisée de l'époxyde. Il a effectivement été vérifié que cet époxyde ne réagit pas facilement avec le dextrane natif. On peut alors penser qu'augmenter la quantité de TBAOH introduite devrait améliorer le taux de modification. Pour étudier cette influence, la quantité de 1,2-époxyoctane introduite a été arbitrairement fixée à 0,5 équivalent par unité glucosidique. Avec une telle quantité d'époxyde, les taux de substitution demeurent faibles et conduisent à des DexC₆ hydrosolubles quelle que soit la quantité de TBAOH introduite. Néanmoins, on remarque sur la *Figure 56* qu'une quantité supérieure à 0.5 équivalent de TBAOH ne permet pas d'accroître le rendement de modification. Cette quantité représente cependant la quantité minimale à introduire. En effet, si 0,25 équivalent de TBAOH est utilisé, le taux de modification dans ces conditions n'est alors que de 7%.

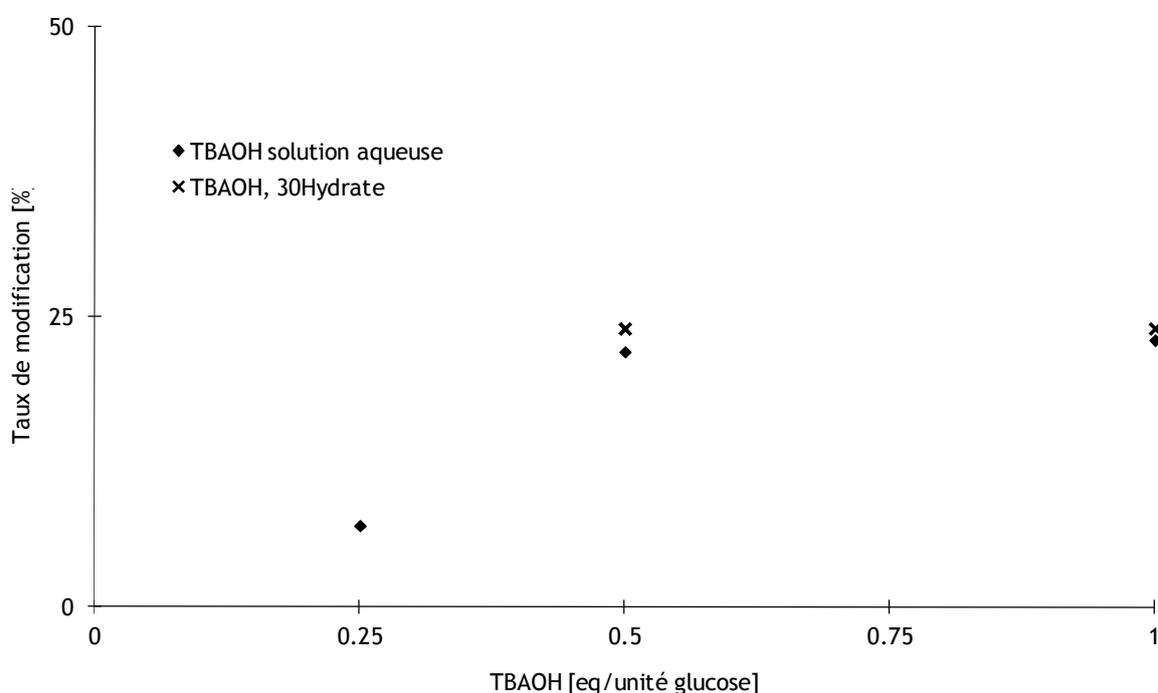


Figure 56 - Taux de modification des DexC₆ en fonction de la quantité de TBAOH introduite dans le mélange réactionnel. Le 1,2-époxyoctane est fixé à 0.5 Eq. Concentration du dextrane T40 fixée à 0,1 g/mL dans le DMSO.

Le *Tableau 6* nous indique également que, pour les mêmes conditions de réaction, la forme utilisée du TBAOH n'influence pas le taux de substitution. Ainsi, qu'une solution aqueuse de TBAOH (1 mol/L) soit utilisée ou que le TBAOH, 30Hydrate solide soit employé, un taux de modification d'environ 25% est toujours observé. Ceci peut être expliqué par le fait qu'un TBAOH 30Hydrate, possède 30 molécules d'eau par TBAOH, soit 67,6% massique d'eau et que la solution aqueuse 1mol/L correspond à ~74% massique en eau, ce qui ne fait qu'une faible différence sur la quantité d'eau introduite dans le milieu réactionnel.

Tableau 6 - Effet du TBAOH utilisé lors de la réaction

Dextrane natif dans le DMSO (g/mL)	TBAOH (eq/unité glucosidique)	1,2 époxyoctane (eq/unité glucosidique)	Taux de substitution déterminé par RMN ^1H (%)
0.1	0.5 TBAOH 30Hydrate (solide)	0.5	25
0.1	0.5 TBAOH solution aqueuse (1 mol/L)	0.5	24

1.2.3. Influence de la concentration initiale en dextrane

Pour des conditions expérimentales similaires (quantités utilisées d'époxyde et de TBAOH par unité glucosidique), on remarque sur la *Figure 57* qu'à faible concentration initiale de dextrane, les taux de modifications restent très faibles et augmentent linéairement avec la concentration en dextrane lorsque 0,5 équivalent de TBAOH est employé. L'amélioration du taux de modification avec la concentration en dextrane est toujours observée lorsque 1 équivalent de TBAOH est utilisé ; mais il ne semble plus proportionnel à la quantité de dextrane.

Néanmoins, l'effet de la quantité du TBAOH devient visible pour les faibles dilutions en dextrane puisque le taux de modification double avec la quantité de TBAOH lorsque le dextrane est solubilisé dans le DMSO à 0,02 g/mL. Lorsque le dextrane est solubilisé à 0,1 g/mL dans le DMSO, on retrouve des taux de modifications similaires, quelle que soit la quantité de TBAOH employée.

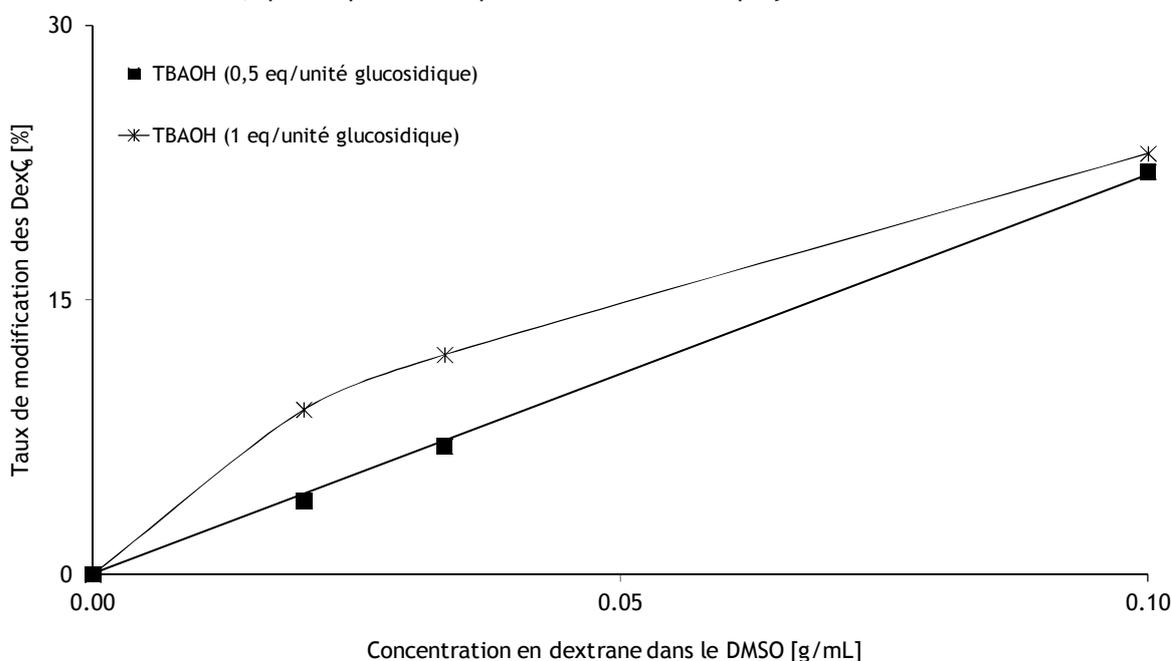


Figure 57 - Evolution du taux de modification du DexC₆ en fonction de la concentration initiale en dextrane dans le DMSO. On fixe le 1,2-époxyoctane à 0,5 eq/unité glucosidique

1.2.4. Influence de la température du milieu réactionnel

Un ultime paramètre important à étudier est la température à laquelle est menée la réaction. En effet, un apport d'énergie lors d'une réaction conduit souvent à une augmentation de la réactivité ou, dans les cas extrêmes, à une dénaturation des chaînes de polysaccharide. Nous avons tout d'abord fixé de manière arbitraire une température de 25 °C et nous avons souhaité voir si l'impact de ce paramètre pouvait être négligeable. Ainsi une réaction a été menée à 40 °C.

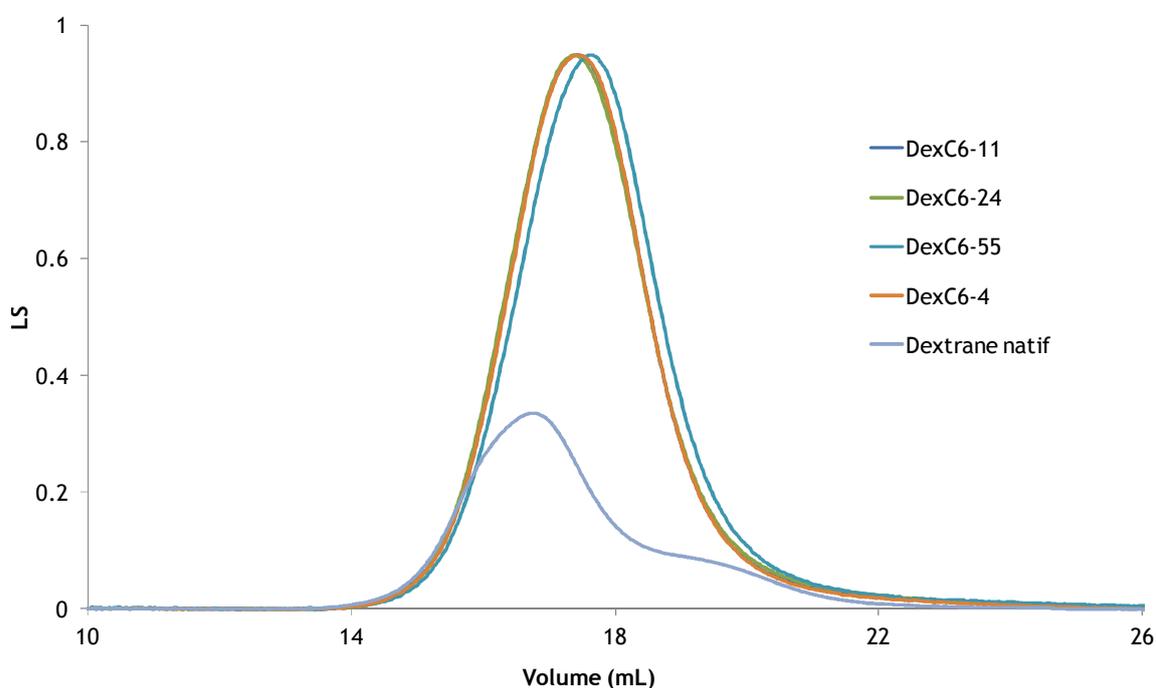
Dans le *Tableau 7* nous pouvons voir que le taux de modification a augmenté avec la température du milieu. Pour les mêmes conditions opératoires, lorsque la réaction est menée à 25°C, un DexC₆-22 parfaitement soluble dans l'eau est obtenu. Lorsque le milieu réactionnel est chauffé à 40°C, le produit obtenu se divise en deux phases lors de l'étape de purification par dialyse : la phase soluble contient du DexC₆-30, alors que la phase gel est composée de DexC₆-34.

Tableau 7 - Effet de la température du milieu réactionnel sur le taux de modification du DexC₆. a) Fraction soluble, b) fraction gel.

Dextrane natif dans le DMSO (g/mL)	TBAOH (eq/unité glucosidique)	1,2-époxyoctane (eq/unité glucosidique)	Température de réaction (°C)	Taux de substitution déterminé par RMN ¹ H (%)
0.1	0.5	0.5	40	30 ^a + 34 ^b
			25	22

1.2.5. Caractérisation des DexC₆ par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Des études préliminaires ont déjà été réalisées au sein du laboratoire sur les dérivés amphiphiles du dextrane. La synthèse alors décrite utilisait la soude comme base [8], ce qui avait tendance à couper les chaînes de dextrane. Cela entraînait alors une réduction de la masse molaire des chaînes obtenues. Dans le cadre de cette thèse, la soude a été remplacée par du TBAOH comme nous venons d'en discuter. L'évaluation d'une éventuelle dégradation du dextrane lors de sa modification a été vérifiée par SEC.



Comme on peut le remarquer sur la *Figure 58*, les volumes d'élution des divers DexC₆ sont comparables à celui du dextrane natif. Le taux de modification étant cependant faible, nous pouvons supposer que la masse molaire apportée par les chaînes alkyle reste négligeable par rapport à la masse molaire de la dorsale de dextrane. On peut néanmoins conclure qu'aucune dégradation significative de la chaîne dextrane n'est observée lorsque le TBAOH est utilisé comme base. Cette stabilité de la chaîne dextrane est observée jusqu'à des taux de modification de 70% et pour des équivalents de TBAOH introduits de 1 équivalent par unité glucose.

1.3. Propriétés tensioactives des DexC₆

La propriété première recherchée pour que des dérivés DexC₆ puissent être utilisés comme stabilisants d'émulsion est leur caractère tensioactif. En effet, ces DexC₆ seront utilisés plus tard pour réaliser des particules par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant notamment et se retrouveront localisés à la surface des nanoparticules obtenues dotant alors ces objets d'une couronne polysaccharide hydrophile. Le caractère tensioactif d'une molécule caractérise sa capacité à diminuer la tension superficielle air/eau ou encore la tension interfaciale entre une phase aqueuse et un solvant organique. Dans notre cas, seule l'évolution de la tension superficielle air/eau a été étudiée.

Aux faibles concentrations en DexC₆ en solution aqueuse, le nombre de chaînes polymères n'est pas suffisant pour recouvrir et saturer totalement l'interface eau/air. La tension superficielle diminue alors très lentement (*Figure 59*). À partir d'une certaine concentration, propre à chaque tensioactif, l'interface eau/air devient saturée. La quantité de tensioactif en solution est alors suffisante pour stabiliser une interface d'aire plus élevée. Plus cette concentration augmente et plus le travail à fournir pour augmenter la surface du système diminue. La tension superficielle varie alors de façon linéaire avec le logarithme de la concentration selon la relation de Gibbs :

$$\partial\sigma = 2,303.R.T \times \Gamma_{\max} \partial \log C$$

Où Γ_{\max} est le taux de recouvrement maximal de la surface en tensioactif.

Au-delà d'une certaine concentration, on peut observer que la tension interfaciale n'évolue plus et reste constante. La concentration micellaire critique (CMC) a alors été atteinte. La concentration en tensioactif isolé dans la phase aqueuse n'évolue plus. Aussi le travail à fournir pour augmenter la surface du système ne peut plus être diminué lorsque la concentration en tensioactif dépasse la CMC. Notons que dans le cas de polymères amphiphiles présentant plusieurs groupes hydrophobes distribués statistiquement le long de la chaîne hydrophile, on parle plutôt de concentration critique (C_{crit}) plutôt que de CMC.

Les tensioactifs qui ne stabilisent pas l'interface s'auto-organisent en solution sous forme d'agrégats, dont le nombre augmente avec la concentration. Notons toutefois que ce système est moins dynamique qu'un système composé d'un tensioactif classique qui, isolé en phase aqueuse peut s'échanger très rapidement avec un tensioactif localisé à l'interface eau/air ou dans une micelle.

Comme on peut le voir sur la *Figure 59*, plus le taux de substitution des DexC₆ croit, plus l'abaissement de la tension superficielle est important. À concentration en chaînes C₆ équivalentes, le DexC₆-25 possède donc un caractère tensioactif plus important que les deux autres composés amphiphiles.

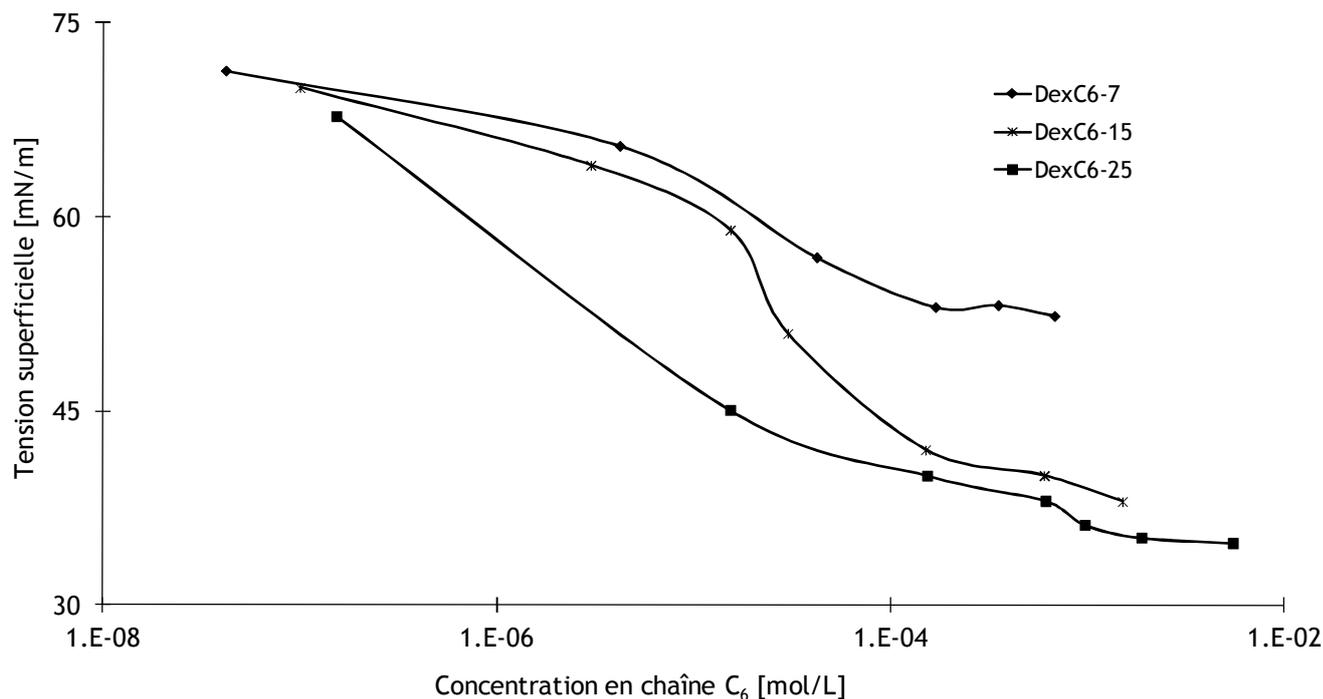


Figure 59 - Tension superficielle eau/air de trois DexC₆ différents. Mesure à 25°C.

2. Les dérivés amphiphiles Dex-g-PLA

Comme nous l'avons déjà mentionné, la présence de DexC₆ à la surface des nanoparticules peut être suffisante pour assurer leur stabilité en milieu salin. Mais cette couronne hydrophile peut également s'avérer non suffisamment ancrée lorsque les particules sont au contact de certaines protéines ou de tensioactifs comme le SDS par exemple.

Pour améliorer ce point, nous nous sommes proposés ultérieurement de recouvrir la surface des nanoparticules non pas par du DexC₆ mais par un copolymère greffé à dorsale dextrane modifiée par des greffons PLA. Ce copolymère sera nommé Dex-g-PLA ou plus souvent Dex-g-PLA-g-N₃ selon leur contenu en fonctions azide. Les nanoparticules de PLA recouvertes d'une couronne dextrane seront réalisées de deux manières différentes : l'émulsion/évaporation de solvant et la nanoprécipitation (voir chapitre 3). Selon la nature du Dex-g-PLA, il pourra également être soit élaboré avant la formulation de la nanoparticule soit pendant l'étape de formulation (voir chapitre 4).

Dans les pages qui suivent, nous décrivons la synthèse préalable des Dex-g-PLA en mettant en œuvre une étape de Chimie-click.

2.1. Synthèse des précurseurs à la chimie-click

La Chimie-click que nous avons choisi de mettre en oeuvre est une cycloaddition dipolaire 1,3 de Huisgen, catalysée par le cuivre. Pour obtenir un tel Dex-g-PLA nous devons tout d'abord synthétiser un dextrane possédant une fonction alcyne ou azide accessible. Dans notre cas, nous avons choisi de doter le dextrane d'une fonction azide. Le PLA que nous grefferons sera quant à lui porteur d'une fonction antagoniste alcyne.

2.1.1. DexN₃

Dans notre travail, le dextrane a été fonctionnalisé par une chaîne linéaire hydrophobe à 6 carbones dotée d'une fonction azide terminale qui permettra la fixation ultérieure du PLA fonctionnalisé par un groupement alcyne. Ce dérivé de dextrane est noté DexN₃ (ou DexN₃-n avec n est le taux de modification représentant n fonctions N₃ sur 100 cycles glucosidiques). Cette chaîne à 6 carbones dotée d'une fonction azide terminale est greffée sur le dextrane au niveau de certaines fonctions hydroxyle du cycle glucosidique, en utilisant une réaction d'estérification à l'aide d'un acide activé (Schéma 2).

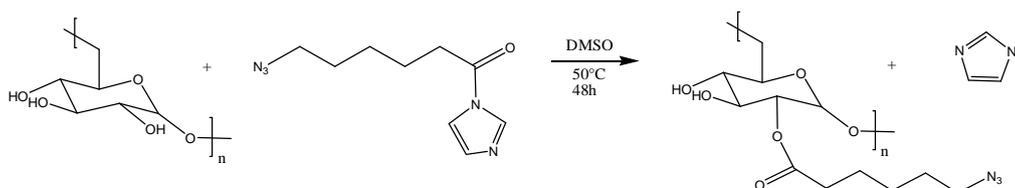


Schéma 2 - Formation du DexN₃

L'utilisation d'un acide activé par la CDI, dont la synthèse est décrite dans le chapitre « matériels et méthodes » permet de travailler sans ajout de catalyseur supplémentaire et donc dans des conditions douces. Le bras espaceur constitué d'une chaîne hydrophobe a été volontairement sélectionné pour préserver la réactivité de la fonction azide lors de la réaction de Chimie-click.

2.1.1.1. Caractérisation par RMN ¹H

Pour chaque DexN₃ obtenu, un spectre RMN ¹H a été réalisé dans le DMSO-d₆ (Figure 60). On note l'apparition de pics correspondants aux protons de la chaîne alkyle greffée aux faibles déplacements chimiques (entre 1,3 et 2,5 ppm), ce qui atteste du bon déroulement de la réaction. Les protons (f) proches de la fonction N₃ terminale résonnent quant à eux au milieu du massif correspondant aux protons glucosidiques du dextrane.

A l'aide du spectre (Figure 60), on peut facilement déterminer un degré de substitution (DS) du dextrane. Le degré de substitution correspond au nombre de fonctions hydroxyle modifiées pour 100 cycles glucosidiques. Chaque cycle comporte trois fonctions hydroxyle, aussi le degré de substitution peut être compris entre 0 et 300%. On le détermine en utilisant l'intégration globale des pics correspondant aux protons (c), (d), (e) pour la chaîne alkyle, et celle du pic (a) pour le proton anomère, valant respectivement 6 et 1 protons, selon l'équation :

$$DS = \frac{A_c + A_d + A_e}{A_a} \times 100$$

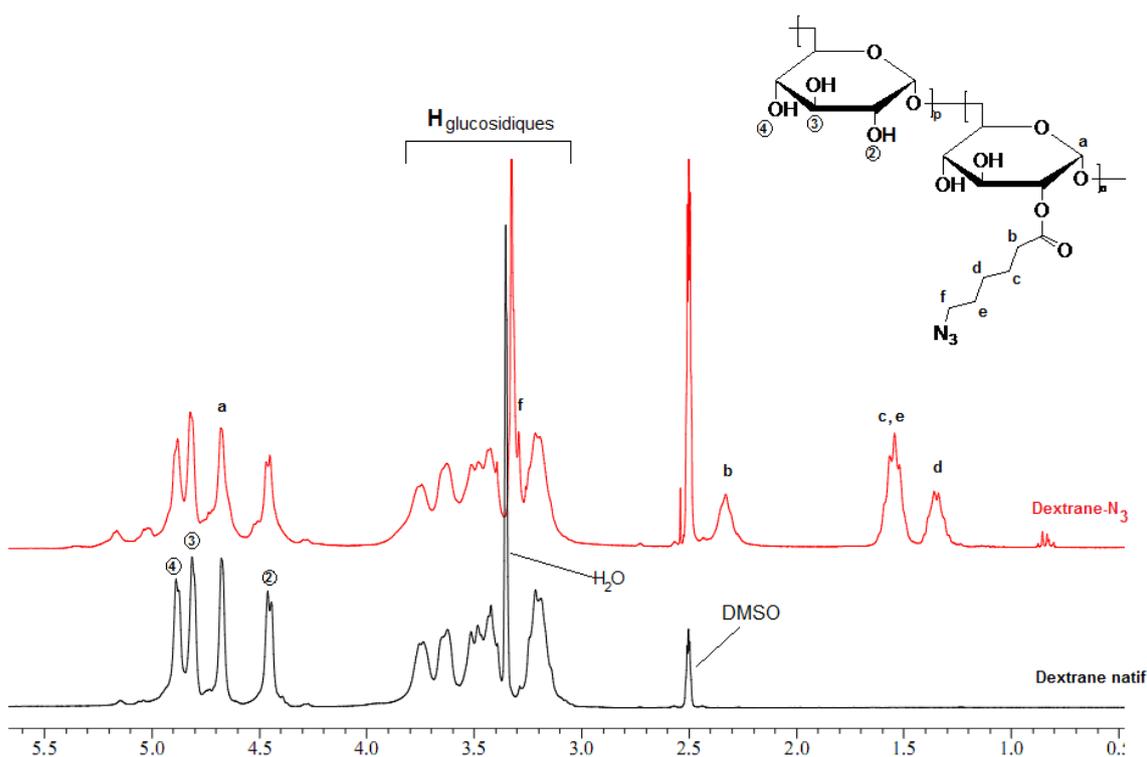


Figure 60: Spectres RMN ^1H dans le DMSO-d_6 du dextrane natif et du dextrane- N_3 après purification

Les divers dérivés de dextrane obtenus sont listés dans le *Tableau 8*. Sur la *Figure 61* on peut observer une parfaite proportionnalité entre les quantités d'acide activé introduites et le taux de modification mesuré par RMN ^1H . Le rendement de cette modification est proche de 90%.

Tableau 8 - Caractéristiques des DexN₃.

Quantité d'acide activé utilisée par unité glucosidique (%)	DS ⁽¹⁾ (%)	Nom
5	4,2	DexN ₃ -4,2
10	9,65	DexN ₃ -9,65
18	15	DexN ₃ -15
25	24	DexN ₃ -24
30	27	DexN ₃ -27
50	42	DexN ₃ -42
100	82	DexN ₃ -82

(1) DS est le degré de substitution en fonction azide estimé par RMN ¹H

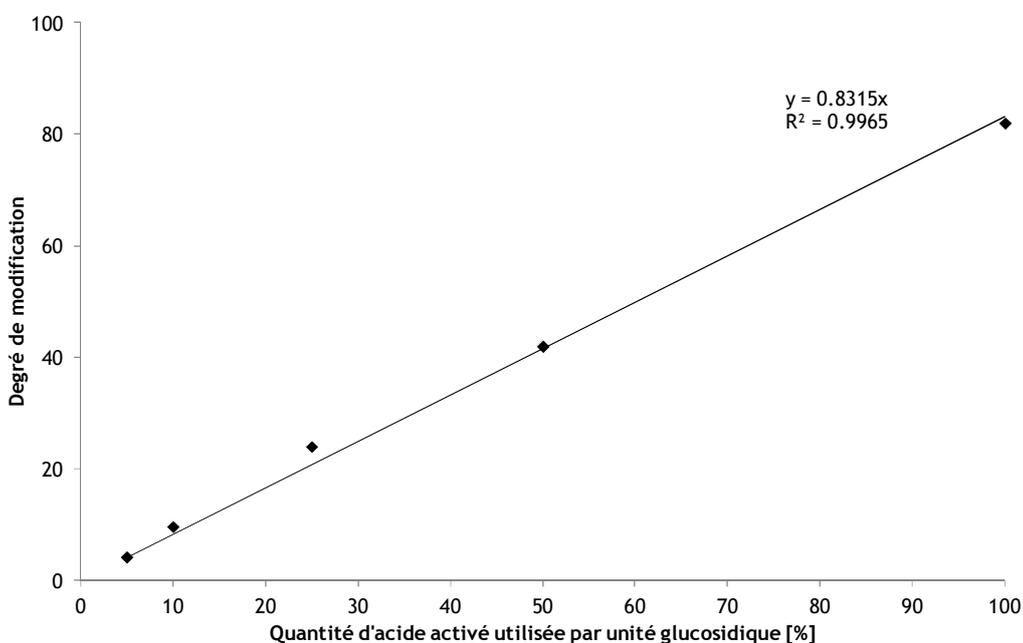


Figure 61 - Relation entre la quantité d'acide activé et le taux de modification des DexN₃ obtenu mesuré par RMN ¹H.

Quelle que soit l'expérience menée, le dextrane modifié présente alors suffisamment de fonctions azide pour pouvoir être modifié par du PLA α -alcyne. Néanmoins, pour que les DexN₃ demeurent solubles dans l'eau et puissent présenter des propriétés tensioactives pour stabiliser les émulsions et se retrouver localisés à la surface des nanoparticules, nous nous intéresserons plus en détail aux DexN₃ présentant des taux de modification inférieurs à 30%, sur la base des résultats observés dans le cas des DexC₆.

2.1.1.2. Caractérisation par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

Une étude par Chromatographie d'Exclusion Stérique nous permet d'estimer l'impact de la synthèse mise en oeuvre sur les caractéristiques de la chaîne macromoléculaire. L'éluant utilisé ici est le DMF auquel le LiCl est ajouté pour permettre de solubiliser plus facilement nos molécules amphiphiles et d'écranter les interactions hydrophobes.

Comme on peut le voir sur la *Figure 62*, si on considère que la présence d'un faible nombre de chaînes alkyle sur le dextrane ne modifie pas fortement sa conformation et donc son volume hydrodynamique, on peut considérer qu'il n'y a pas eu de dégradation significative du dextrane par greffage de l'époxyde ou lors de l'introduction des fonctions N_3 . On observe également que les systèmes de purifications que nous avons employés ont été efficaces car aucun pic supplémentaire ou épaulement n'est observé à fort volume d'élution.

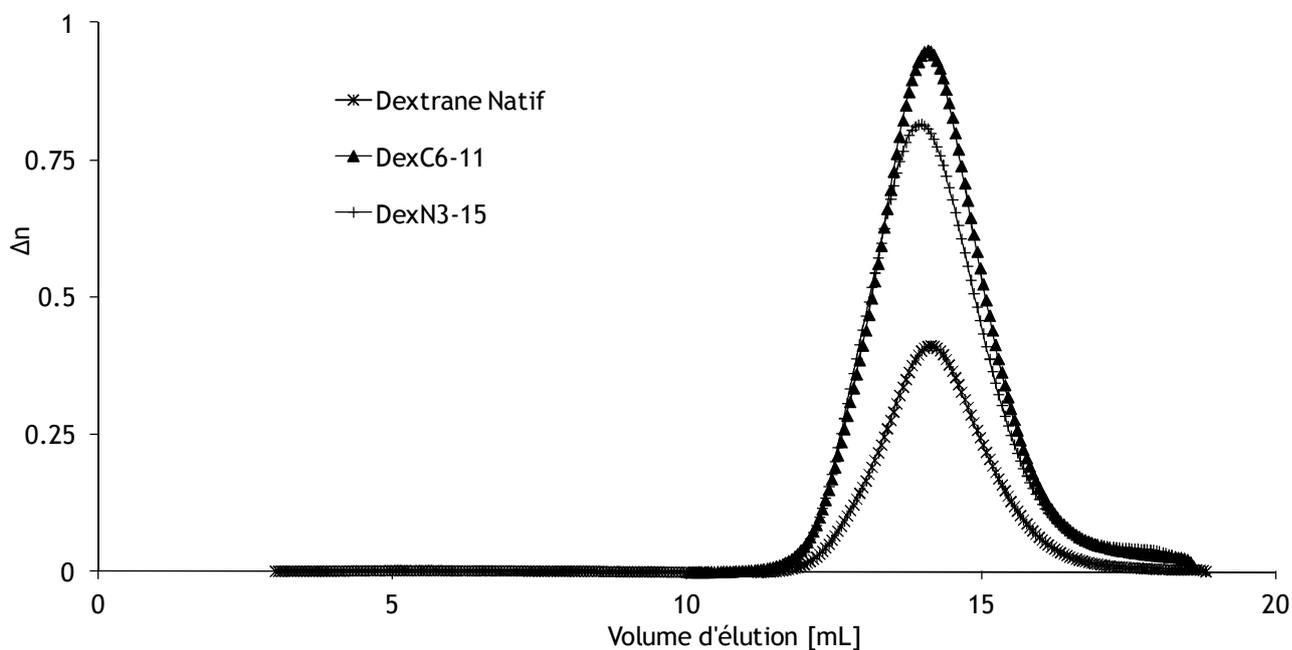


Figure 62 - SEC dans le DMF-LiCl de différents composés amphiphiles du dextrane, comparé au dextrane natif. Détection en RI.

2.1.1.3. Etude de la tension superficielle

Comme on peut le remarquer *Figure 60*, ces DexN₃ présentent des chaînes alkyle en C₆ et terminées par des fonctions azide et peuvent ainsi s'apparenter aux DexC₆ précédents. Leurs propriétés tensioactives ont été étudiées et comparées avec celles des DexC₆ obtenus dans les paragraphes précédents. Selon leur propriété tensioactive, les DexN₃ pourront être utilisés directement lors de la formulation de nanoparticules par émulsion-évaporation. Des mesures de tension superficielle ont donc été réalisées sur les DexN₃ suivants :

Nom	DS (%)
DexN ₃ -4,2	4,2
DexN ₃ -9,65	9,65
DexN ₃ -15	15
DexN ₃ -24	24

Tableau 9 - DexN₃ étudiés par tensiométrie.

La *Figure 63* nous donne les courbes de tension superficielle en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes des solutions aqueuses de DexN₃.

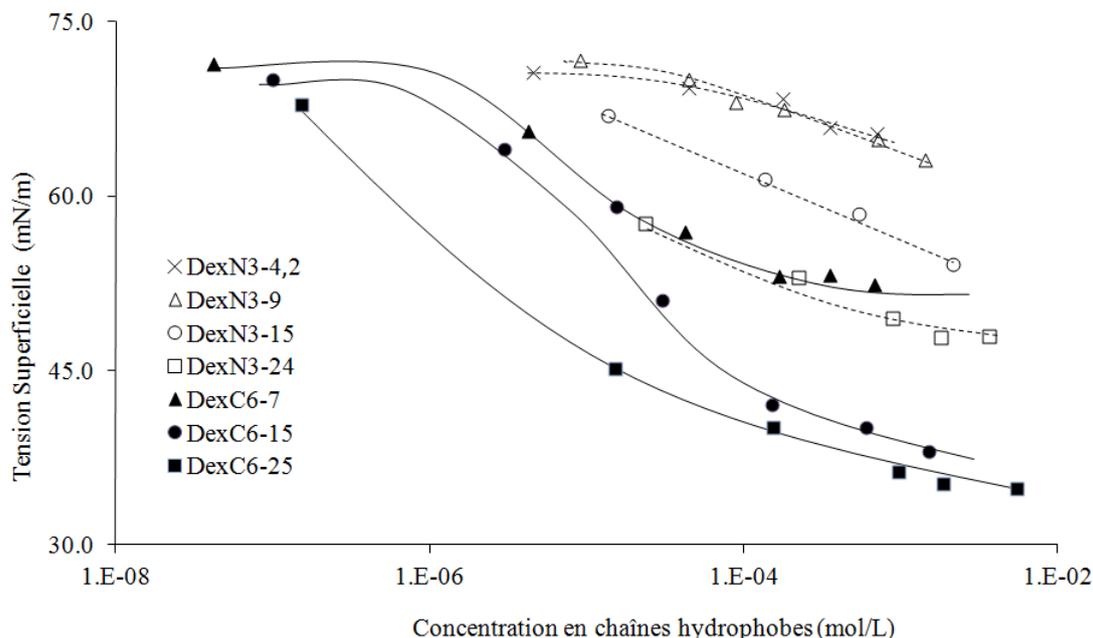


Figure 63 - Evolution de la tension superficielle des dextrans amphiphiles en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes.

Alors que le dextrane natif ne possède aucune propriété tensioactive suffisante pour abaisser la tension superficielle de la phase aqueuse (tension superficielle stable à 70 nN/m), nous constatons que la fonctionnalisation du dextrane par des chaînes alkyle dotées de N₃ entraîne une diminution de la tension de surface d'autant plus marquée que la concentration en DexN₃ croît et que le taux de substitution

augmente. Ce résultat est tout à fait cohérent car la chaîne aliphatique-N₃ greffée est globalement hydrophobe.

Ainsi, plus le DexN₃ est fonctionnalisé, plus le rapport molaire hydrophobie/hydrophilie augmente (de 3,5% à 17,1% pour les composés étudiés) et avec lui les propriétés tensioactives. Cependant, il ne faut pas dépasser une limite de fonctionnalisation auquel cas le DexN₃ devient insoluble dans l'eau, tout comme nous l'avons observé dans le cas des DexC₆.

On peut également remarquer que pour un même degré de modification, les DexN₃ semblent posséder un caractère tensioactif moins puissant que les DexC₆. En effet, on peut voir sur la *Figure 63* que le DexN₃-24 possède un caractère tensioactif similaire au DexC₆-7. Cependant, le DexN₃ semble atteindre son palier (au-delà de la concentration micellaire critique) pour des concentrations plus élevées.

Les DexN₃ sont en réalité des DexC₆-N₃, la fonction azide étant fixée sur une chaîne alkyle greffée à la chaîne polysaccharide qui est responsable de ce caractère tensioactif. Cependant, la fonction azide est polarisée et très hydrophile. Ceci explique vraisemblablement la différence du potentiel à diminuer la tension superficielle entre les DexC₆ et les DexN₃, pour un même taux de modification.

2.1.2. PLA α -alcyne

Afin d'assurer le greffage de chaînes de PLA sur la dorsale des DexN₃ par chimie-click, celles-ci doivent être fonctionnalisées à leur extrémité par une fonction alcyne. Ceci est obtenu par polymérisation par ouverture de cycle (POC) du D,L-Lactide amorcée par l'alcool propargylique et catalysée par l'octoate d'étain (Schéma 3). Le rapport molaire octoate d'étain/amorceur utilisé (R= 0,03) est volontairement faible pour éviter les réactions de transestérification et ainsi obtenir un meilleur contrôle de la polymérisation.

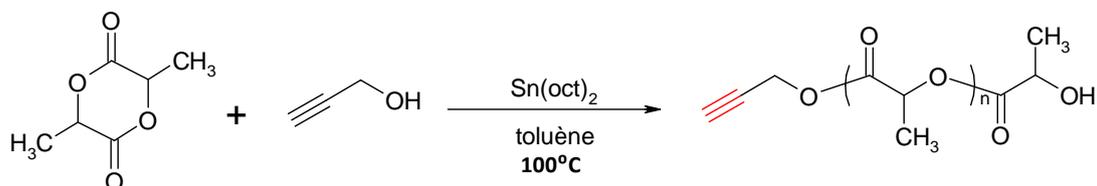


Schéma 3 - Polymérisation par ouverture de cycle du lactide

Après avoir mené cette polymérisation, un spectre ¹H RMN dans le CDCl₃ du milieu réactionnel brut est réalisé pour déterminer le taux de conversion de la réaction en comparant le pic du lactide résiduel (4,9ppm) et celui du proton méthyne de l'unité lactidyle (5,3ppm). Pour chaque polymérisation, le taux de conversion obtenu est supérieur à 97%.

L'introduction de la fonction alcyne à l'extrémité de la chaîne est confirmée par la présence des pics C (-CH₂-O) et D (CH≡CH-), respectivement à 4,7 ppm et 2,5 ppm, sur le spectre RMN ¹H du polymère purifié par précipitation (*Figure 64*).

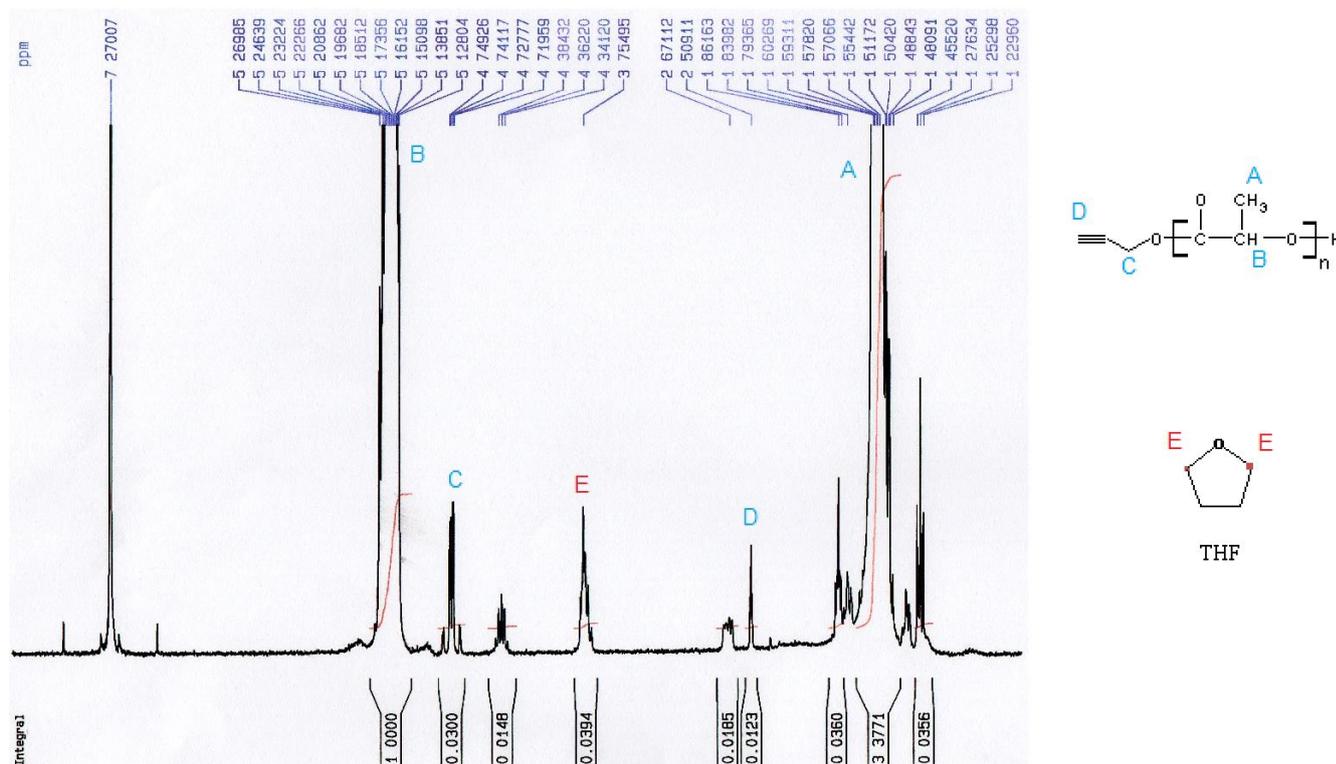


Figure 64 : Spectre RMN ^1H dans le CDCl_3 du PLA α -alcyne purifié (4950 g/mol)

La détermination du degré de polymérisation des polymères synthésés est effectuée grâce au spectre RMN ^1H du PLA purifié (Figure 64) à partir du pic correspondant au CH_2 de l'extrémité (pic C) et celui des protons méthyne (B) du PLA. Le rapport entre l'intégration du pic B et celle du pic C divisée par 2 donne le DPn:
$$DPn = \frac{B}{C/2}$$

La comparaison des spectres RMN ^1H avant et après purification montre que la précipitation a été efficace et qu'il ne subsiste que de faibles traces de THF. En effet, l'intégration du pic E (correspondant à 4 protons du THF) est très faible. Ainsi, le rapport entre les pics correspondant au CH de la chaîne polymère (pic B) et aux protons E du THF permet de déterminer la pureté du PLA fonctionnalisé obtenu. Dans le cas de la Figure 64, le PLA est pur à 99% massique.

L'ensemble des PLA α -alcyne synthésés au cours de ce doctorat est résumé dans le Tableau 10.

Tableau 10 - PLA α -alcyne fonctionnalisés disponibles.

PLA α -alcyne	Masse molaire moyenne en nombre (g/mol) ⁽¹⁾	DP _n ⁽¹⁾
PLA ₈₄₀₀	8410	116
PLA ₈₀₀₀	8000	110
PLA ₅₂₀₀	5200	72
PLA ₅₀₀₀	4950	68
PLA ₁₆₀₀	1600	21
PLA ₁₀₀₀	1000	13

(1) \overline{M}_n et \overline{DP}_n sont obtenus par RMN ¹H

2.2. Synthèse des copolymères Dex-g-PLA-g-N₃

Ces copolymères sont préparés selon la réaction de chimie-click décrite sur le schéma 4. Cette réaction permet, à priori, de moduler les proportions en dextrane et en PLA dans les copolymères finaux et ainsi d'obtenir des composés solubles ou non dans l'eau. Par ailleurs, ils ont été préparés de manière à ce que certaines chaînes dextrane présentent des extrémités azide résiduelles permettant une fonctionnalisation ultérieure du copolymère. Néanmoins, par manque de temps, nous avons volontairement choisi d'obtenir principalement des copolymères solubles dans les solvants organiques et non dans l'eau. Ils ont alors été synthétisés de façon à présenter de fortes proportions massiques de PLA (au-delà de 74%) pour assurer leur solubilité dans les solvants organiques tels que l'acétone. Ces copolymères seront par la suite utilisés lors de la formulation de nanoparticules par nanopréciipitation (Chapitre 4).

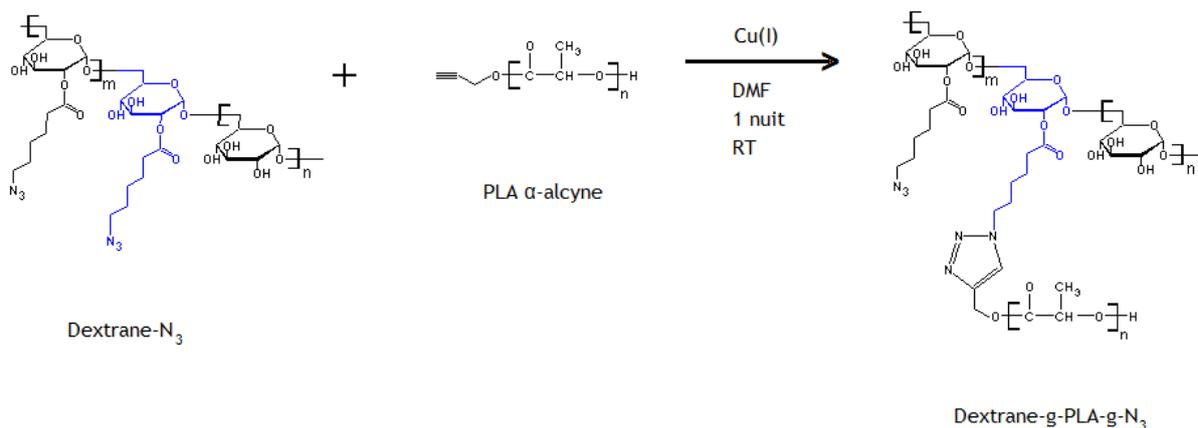


Schéma 4 - Greffage des greffons PLA sur le dextrane par Chimie-click

Pour pouvoir évaluer les différences de comportement de ces copolymères non hydrosolubles, certains ont volontairement été synthétisés pour présenter une fraction massique de PLA identique, mais des longueurs de greffons et par conséquent un nombre de greffons différents. Les copolymères que nous avons obtenus présentent donc tous une proportion théorique de PLA voisine de 75-80% avec cependant des structures différentes. Ainsi plus les greffons PLA sont courts, plus ils sont nombreux. La *Figure 65* donne une idée de la différence de structure des copolymères qui seront par la suite utilisés lors de la formulation des nanoparticules. Le but, dans ce cas, était d'étudier l'influence de l'architecture sur la taille et la stabilité des particules obtenues.

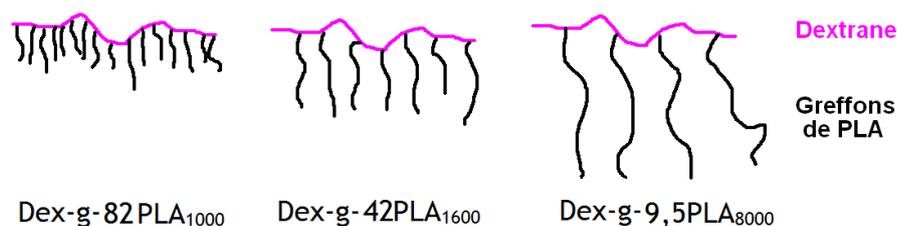


Figure 65 - Structure de quelques copolymères synthétisés.

De plus, dans le cadre des travaux menés, la présence de fonctions azide résiduelles sur la chaîne de ces copolymères nous est parue nécessaire pour permettre la post-fonctionnalisation de la surface des nanoparticules par chimie-click. Pour cette raison, les copolymères seront nommés Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ avec m la masse molaire moyenne en nombre des greffons PLA. x et y représentent le nombre de greffons et de N₃ pour 100 unités glucosidiques.

Huit copolymères ont donc été élaborés en faisant varier la longueur et le nombre d'équivalent (x) de PLA α-alcyne par rapport au nombre de fonctions N₃ présentes sur le DexN₃ employé (*Tableau 11*).

Tableau 11 - Caractéristiques théoriques des copolymères visés

Nom du copolymère ⁽¹⁾	Dextrane-N ₃		PLA α-alcyne			χ ⁽³⁾	Proportion massique théorique de PLA dans le copolymère (%)
	DS (%) ⁽²⁾	Masse (g)	Mn	DPn	Masse (g)		
Dex-g-9,5PLA ₈₄₀₀ -g-17,5N ₃	0.27	0.61	8410	116	2.41	0.35	80
Dex-g-16PLA ₅₀₀₀ -g-11N ₃	0.27	0.61	4950	68	2.4	0.58	80
Dex-g-5PLA ₈₄₀₀ -g-10N ₃	0.15	0.61	8410	116	1.39	0.33	70
Dex-g-6,6PLA ₈₄₀₀ -g-8,4N ₃	0.15	0.5	8410	116	1.51	0.44	75
Dex-g-9,5PLA ₈₀₀₀	0.095	0,26	8000	110	1,15	1	81
Dex-g-14PLA ₅₂₀₀ -g-10N ₃	0.24	0,50	5200	72	1,93	0.6	79
Dex-g-42PLA ₁₆₀₀	0.42	0,50	1600	21	1,50	1	75
Dex-g-82PLA ₁₀₀₀	0.82	0,51	1000	13	1,47	1	75

(1) Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ avec x et y le nombre théorique de greffons PLA et de fonctions N₃ pour 100 unités glucosidiques. m est la masse molaire moyenne en nombre des greffons PLA.

(2) DS : Degré de substitution du dextrane-N₃

(3) X : Nombre d'équivalents de fonctions alcynes introduites dans le milieu réactionnel par rapport aux fonctions azide

La proportion massique théorique de PLA dans chaque copolymère est calculée comme suit (on suppose ici que toutes les chaînes de PLA ajoutées dans le milieu réactionnel se greffent au DexN₃) :

$$\rho_{PLA} = \frac{X * DS * M_{PLA}}{X * DS * M_{PLA} + DS * 301 + (100 - DS) * 162} * 100$$

- X correspond au nombre d'équivalents de fonctions alcyne introduites par rapport aux fonctions azide
- 162g/mol correspond à la masse molaire du cycle glucosidique du dextrane natif.
- 301g/mol correspond à la masse molaire du cycle glucosidique du DexN₃ fonctionnalisé par une seule chaîne alkyle-N₃.

2.2.1. Caractérisation des Dex-g-PLA-g-N₃

2.2.1.1. Caractérisation par RMN ¹H

La superposition des spectres RMN ¹H (DMSO-d₆) du copolymère et du dextrane-N₃ (*Figure 66*) met en évidence les pics caractéristiques de la chaîne polysaccharide et l'apparition des pics (C) et (D) correspondant aux protons CH et CH₃ des greffons PLA (5,2 et 1,4 ppm). Par ailleurs, on peut également noter l'apparition du pic B résonnant à 8,15 ppm correspondant au proton du cycle triazole. Ceci atteste que le PLA s'est bien greffé sur le dextrane via la formation de ce cycle par la cycloaddition dipolaire 1,3 de Huisgen.

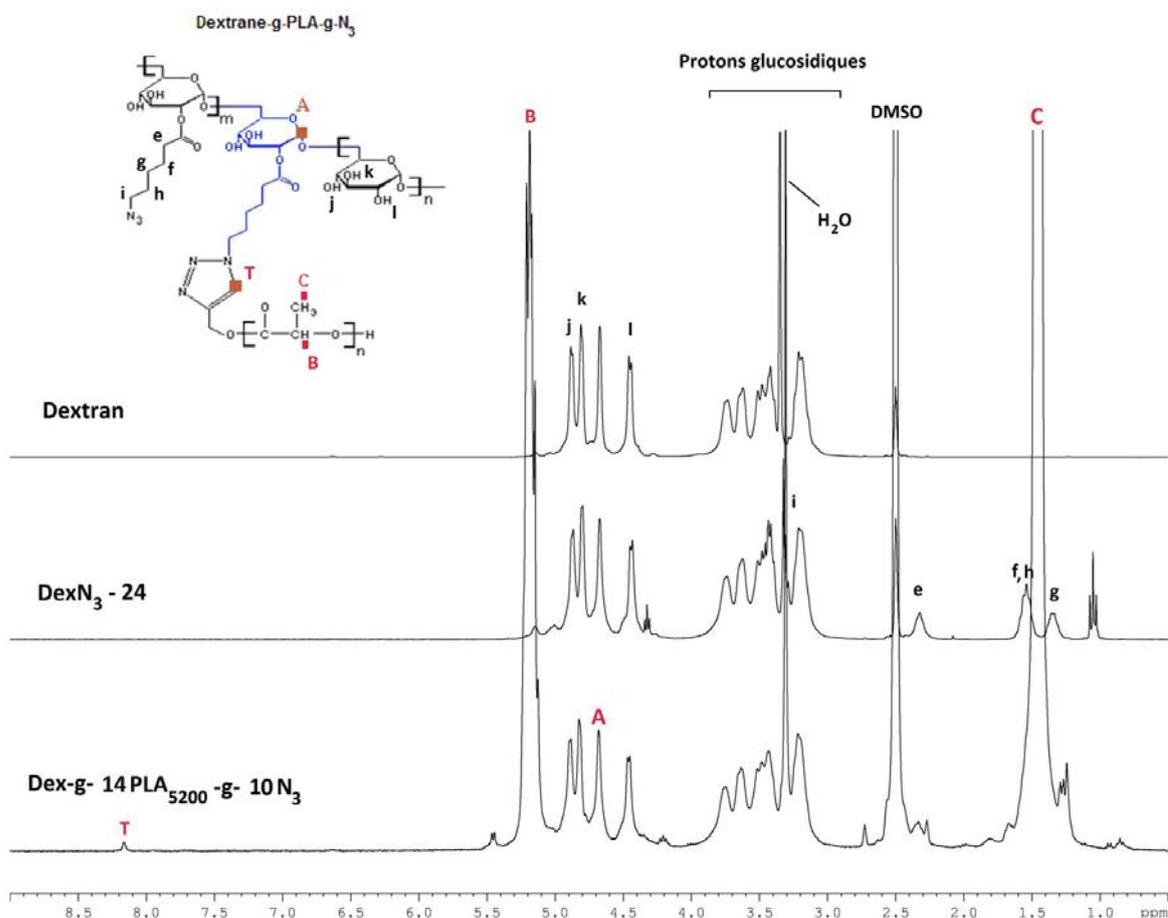


Figure 66 : Spectre RMN ¹H dans le DMSO-d₆ du copolymère Dex-g-14PLA₅₂₀₀-g-10N₃

Le nombre de N₃ résiduels est obtenu par différence entre le nombre de DexN₃ initial et le nombre de chaîne PLA greffées. De plus, le spectre RMN ¹H réalisé après purification permet de déterminer le degré de substitution de la chaîne dextrane par les greffons PLA (noté x dans la nomenclature). Le rapport entre l'intégration du pic B et celle du pic A (proton anomère) donne la quantité de greffons PLA fixés réellement sur 100 unités glucosidiques selon la formule:

$$x = 100 \frac{A}{B}$$

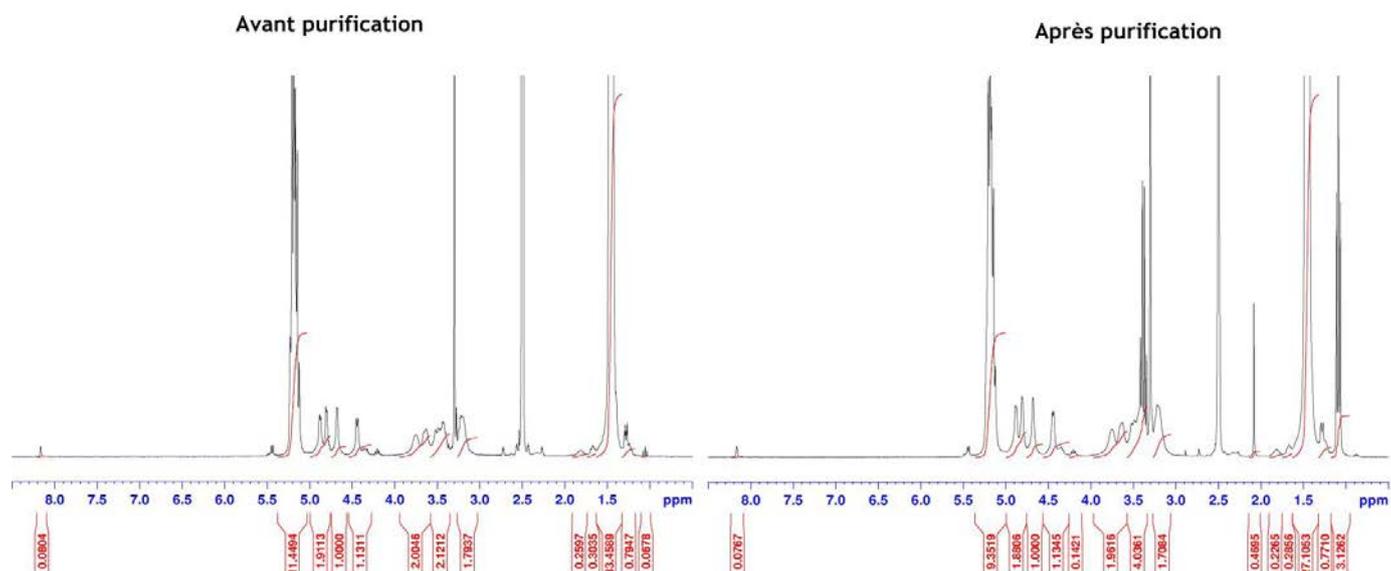


Figure 67 - Spectre ^1H RMN du Dex-g-9,5PLA₈₀₀₀ dans le DMSO d_6 , avant et après purification

Par comparaison des spectres RMN ^1H des Dex-g-PLA-g-N₃ avant et après purification par précipitation dans une solution aqueuse d'EDTA (Figure 67), on peut observer que des chaînes PLA n'ayant pas réagi et donc non fixées ont pu être éliminées. En effet, le rapport (moyennant le DPn des greffons) entre le pic du CH provenant du cycle triazole (8,1ppm) et celui des protons méthyne CH des greffons PLA (5,2ppm) permet d'évaluer la quantité des chaînes PLA présentes dans le tube RMN. Ce rapport est théoriquement égal à 1. Cependant, avant purification, ce rapport est proche de 0,8 ce qui indique un excès de chaînes PLA par rapport au cycle triazole. Après lavage et élimination des chaînes PLA non fixées, les valeurs obtenues sont effectivement proches de 1. Aux erreurs de la RMN, on peut donc considérer que le lavage est bien efficace, comme le montre le paragraphe suivant par Chromatographie d'Exclusion Stérique.

2.2.1.2. Caractérisation par Chromatographie d'Exclusion Stérique

L'efficacité de notre purification a été confirmée par SEC (solvant utilisé : DMF-LiCl). Pour le prouver, la Figure 68 montre une superposition des courbes SEC du copolymère Dex-g-15PLA₈₀₀₀ purifié ou non et des précurseurs DexN₃ et PLA α -alcyne. Comme on peut le voir, les pics du copolymère purifié et non purifié sont déplacés vers les faibles volumes d'éluion, par rapport au pic correspondant au DexN₃. Ceci témoigne d'une augmentation du volume hydrodynamique et de la masse molaire moyenne due au greffage des chaînes PLA (même si nous sommes conscients que les comportements en solution du Dex-g-PLA et du DexN₃ dans l'éluant ne sont sans doute pas les mêmes).

Dans le cas du copolymère non purifié, on peut observer un épaulement dans les faibles masses qui correspond aux chaînes PLA non fixées au dextrane. La faible intensité de cet épaulement témoigne néanmoins de la bonne efficacité de la réaction de greffage. Cet épaulement disparaît sur le

chromatogramme du copolymère purifié, ce qui traduit l'efficacité de la précipitation permettant d'éliminer les chaînes PLA libres.

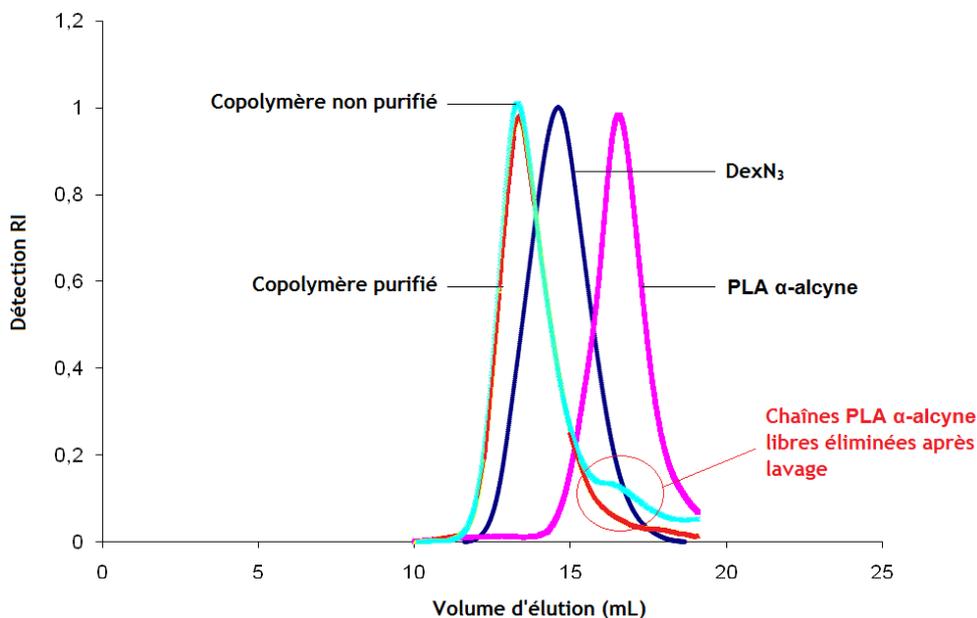


Figure 68 - Chromatographes SEC du copolymère Dex-g-9,5PLA₈₀₀₀ purifié et non purifié, et des dérivés DexN₃ et PLA α-alcyne (éluant : DMF-LiCl). Détection RI.

Nous voyons sur la Figure 69 les pics de 4 copolymères Dex-g-PLA-g-N₃ purifiés. L'obtention de pics monomodaux nous permet de conclure que ces copolymères sont purs. La superposition des pics nous permet également de prétendre que ceux-ci présentent des volumes hydrodynamiques semblables. Rappelons que nous avons visé des copolymères avec un nombre et une longueur de greffons différents, pour obtenir des proportions PLA/dextrane très proches dans ces 4 copolymères.

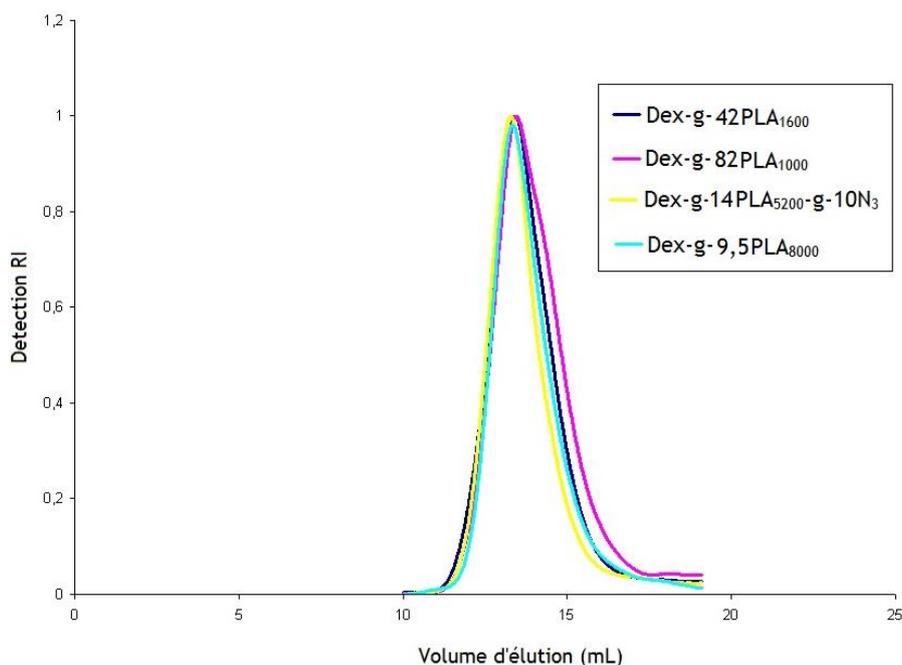


Figure 69 -Chromatographes SEC de quelques copolymères purifiés (éluant : DMF-LiCl).

Outre la distribution des masses molaires, la chromatographie SEC permet également d'évaluer les masses molaires moyennes en nombre et en masse expérimentales que nous pouvons comparer aux masses molaires moyennes théoriques. Pour chaque copolymère, nous avons donc préalablement estimé la valeur du dn/dc avant l'analyse SEC.

Connaissant le nombre de greffons PLA greffés (déterminé par étude RMN ¹H), il est possible de calculer la masse molaire moyenne théorique de nos copolymères à partir des masses molaires moyennes du dextrane natif et du PLA α -alcyne utilisés:

$$Mn_{théorique} = M_{dextrane} + \frac{M_{dextrane}}{162} * DS * (Mn_{PLA} * X + 139)$$

Avec X le nombre de greffons PLA réellement greffés pour 100 unités glucosidiques estimés par RMN ¹H après purification du copolymère et $M_{dextrane} = 34\,000$ g/mol.

A partir de $Mn_{expérimentale}$ nous pouvons également estimer le nombre moyen de greffons de PLA sur une chaîne entière de copolymère, $N_{greffons\ moyen}$. Ce simple calcul nous permet de voir que les copolymères préparés ont bien des structures différentes. Ce nombre évolue de 11 pour Dex-g-5PLA₈₄₀₀-g-10N₃ à 133 pour Dex-g-82PLA₁₀₀₀.

$$N_{greffons\ moyen} = \frac{Mn_{expérimentale} - M_{dextrane}}{Mn_{PLA} + 139}$$

Les caractéristiques réelles des copolymères Dex-g-PLA synthétisés sont résumées dans le *Tableau 12*.

Tableau 12 - Caractérisation par SEC des copolymères Dex-g-PLA-g-N₃

Copolymère	Mn _{théorique}	dn/dC	SEC			N _{greffons moyen}
			Mn _{expérimentale}	Mw	Ip	
Dex-g-9,5PLA ₈₀₀₀	196300	0,0351	152300	197000	1,29	15
Dex-g-14PLA ₅₂₀₀ -g-10N ₃	198200	0,0290	229600	293400	1,28	36
Dex-g-42PLA ₁₆₀₀	187300	0,0392	196500	275500	1,40	95
Dex-g-82PLA ₁₀₀₀	230000	0,0364	184200	275100	1,49	133
Dex-g-9,5PLA ₈₄₀₀ -g-17,5N ₃	208700	0,029	267200	372700	1,3	20
Dex-g-16PLA ₅₀₀₀ -g-11N ₃	204600	0,036	243800	368600	1,5	34
Dex-g-5PLA ₈₄₀₀ -g-10N ₃	125700	0,033	161800	214100	1,3	11
Dex-g-6,6PLA ₈₄₀₀ -g-8,4N ₃	154900	0,033	180400	232000	1,3	14

En tenant compte de la précision que l'on peut atteindre avec la SEC et la RMN¹H, on peut dire que les Mn expérimentales sont assez proches des Mn théoriques.

2.2.1.3. Etude de la tension superficielle

Un seul copolymère Dex-g-PLA hydrosoluble a été synthétisé afin de montrer qu'il possède bien un caractère tensioactif pouvant être mis à profit pour élaborer des nanoparticules par le procédé d'émulsion/évaporation (que nous n'avons pas exploité par manque de temps).

Nous avons comparé les propriétés tensioactives de ce copolymère hydrosoluble Dex-g-4,2PLA₁₀₀₀ (préparé par chimie-click à partir d'un DexN₃-4,2 et d'un PLA de masse molaire moyenne 1000g/mol) à divers DexN₃. Sur la *Figure 70* est également ajoutée la courbe obtenue pour un copolymère Dex_{29K}-g-13,5PLA₂₀₀ synthétisé au LCPM par la stratégie « grafting from » [9] qui présente une fraction hydrophobe/hydrophile de 15%.

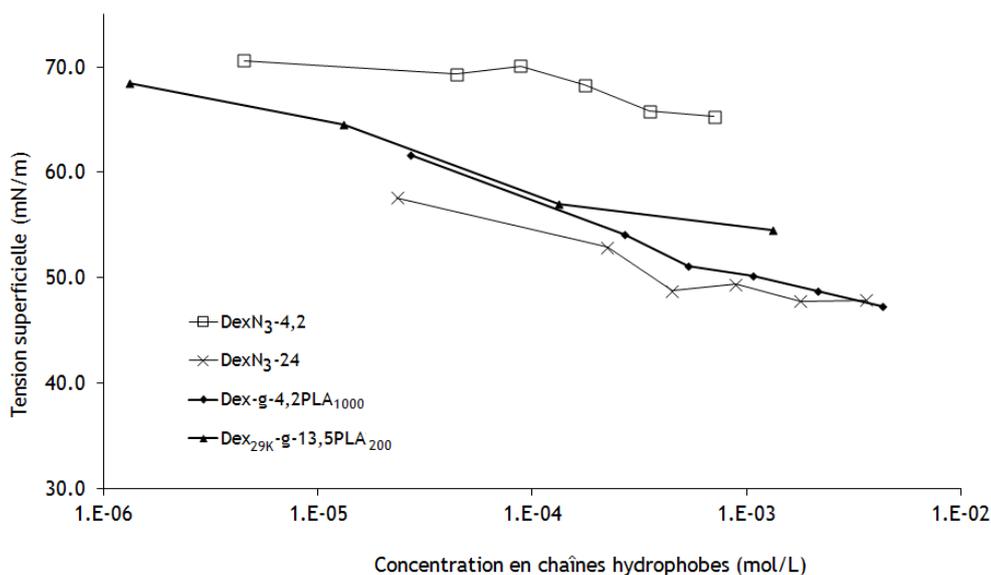


Figure 70 - Propriétés tensioactives de divers Dex-g-PLA et DexN₃

Comme nous pouvons le voir sur la *Figure 70*, l'augmentation de la fraction hydrophobe/hydrophile entraîne des meilleures propriétés tensioactives alors que le dextrane natif ou le DexN₃-4,2 ne présentent pas de pouvoir tensioactif suffisant pour abaisser la tension superficielle. Nous voyons également que le Dex-g-4,2PLA₁₀₀₀ et le Dex_{29K}-g-13,5PLA₂₀₀ abaissent bien plus la tension superficielle de la solution aqueuse que le DexN₃-4,2. Pour obtenir une efficacité similaire à l'interface eau/air, il faut alors employer un DexN₃ fonctionnalisé à 24% ce qui est sans doute dû à la présence des fonctions N₃ à l'extrémité des chaînes alkyle. L'efficacité est cependant un peu plus faible dans le cas du Dex_{29K}-g-14PLA₂₀₀ que dans le cas Dex-g-4,2PLA₁₀₀₀. La faible différence d'hydrophobie (15% contre 17,5% respectivement) ainsi que la différence de structure (nombre et longueur des greffons) peuvent induire une différence de comportement tensioactif. Ainsi, peu de chaînes de PLA mais de plus grande taille semble provoquer un caractère tensioactif plus prononcé (cas Dex-g-4,2PLA₁₀₀₀) (*Figure 70*). On peut également supposer que la présence du cycle triazole (cas Dex-g-4,2PLA₁₀₀₀) peut influencer légèrement les propriétés tensioactives des copolymères (comparaison avec Dex_{29K}-g-14PLA₂₀₀ qui n'a pas de cycle triazole).

3. Conclusion et perspectives

La synthèse des DexC₆ a été réalisée et l'influence des paramètres expérimentaux sur les degrés de modification obtenus a été étudiée. Nous avons également vérifié que ces DexC₆ possèdent de bonnes propriétés tensioactives dont nous tirerons profit lors de l'élaboration de nanoparticules par les procédés d'émulsion/évaporation et de nanopréciipitation dans le prochain chapitre.

De nouveaux dérivés amphiphiles hydrosolubles du dextrane, les DexN₃, ont été obtenus avec différents taux de modification. Leurs propriétés tensioactives ont été évaluées et comparées à celles des DexC₆. Pour un même taux de modification, les DexN₃ s'avèrent moins tensioactifs que les DexC₆ ce qui est dû à la présence des fonctions azide à l'extrémité des chaînes alkyle.

Dans le chapitre 3, les DexC₆ seront utilisés pour l'élaboration de nanoparticules soit par émulsion/évaporation, soit par nanopréciipitation. Le procédé utilisé sera optimisé en vue de l'encapsulation d'un inhibiteur de la dimérisation de la protéase du VIH-1.

Bien que leurs propriétés tensioactives soient faibles, les DexN₃ seront néanmoins employés comme tensioactifs lors de la formulation des nanoparticules par le procédé d'émulsion/évaporation puis utilisé dans la plupart des cas pour réaliser une réaction de Chimie-click *in situ* avec des PLA α -alcyne pendant l'étape d'émulsification (Chapitre 4).

Par ailleurs, disposant à la fois de DexN₃ et de PLA α -alcyne, des copolymères Dex-g-PLA-g-N₃ ont été obtenus avec succès. Ces copolymères présentent différents ratio PLA/Dextrane mais également des longueurs et nombres de greffons PLA variables. Certains d'entre eux possèdent également des fonctions N₃ résiduelles. Ces Dex-g-PLA-g-N₃ se sont avérés tensioactifs. La présence de fonctions azide résiduelles à la surface des nanoparticules alors obtenues nous permettra d'imaginer une post-fonctionnalisation de ces objets en vue d'applications dans le domaine de la thérapie anticancéreuse.

4. Bibliographie

- [1] E. Rotureau, M. Léonard, E. Marie, E. Dellacherie, T.A. Casano, A. Durand. From polymeric surfactants to colloidal systems (1): Amphiphilic dextrans for emulsion preparation. *Colloid Surface* 288 (2006) p. 131-137.
- [2] C. Rouzes, M. Léonard, A. Durand, E. Dellacherie. Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres. *Colloid Surface* 32 :2 (2003) p. 125-135.
- [3] C. Rouzes, R. Gref, M. Léonard, A. de Sousa Delgado, E. Dellacherie. Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique. *J. Biomed. Mater. Res.* 50 :4 (2000) p. 557-565.
- [4] Céline Rouzes, « Nanosphères à cœur de poly(acide lactique) et couronne de dextrane : élaboration, propriétés et applications biomédicales ». Doctorat de l'Institut Polytechnique Nationale de Lorraine. (2001)
- [5] E. Rotureau, E. Marie, E. Dellacherie, A. Durand, From polymeric surfactants to colloidal system (3): Neutral and anionic polymeric surfactants derived from dextran. *Colloid Surface A*, 301 (2007) p. 229-238
- [6] Elise Rotureau, « Dextranes amphiphiles : adsorption aux interfaces liquide/liquide et application à la stabilisation d'émulsion ». Doctorat de l'Institut Polytechnique Nationale de Lorraine. 18/03/2005.
- [7] E. Rotureau, C. Chassenieux, E. Dellacherie, A. Durand. Neutral Polymeric Surfactants Derived from Dextran, a study of their aqueous solution Behaviour. *Macromol. Chem. Phys.* 206 (2005) p. 2038-2046
- [8] Rudy Covis. "Synthèse de polysaccharides amphiphiles à partir de dextrane et application à la stabilisation d'émulsions directs et inversées ». Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine. 04/02/2011
- [9] Cécile Nouvel, Céline Frochot, Véronique Sadtler, Philippe Dubois, Edith Dellacherie, Jean-Luc Six, *Macromolecules* 37 (2004) p. 4981-4988

**ELABORATION DE NANOPARTICULES
POUR L'ENCAPSULATION D'UN
INHIBITEUR DE LA DIMERISATION DE
LA PROTEASE DU VIH-1
(Objectif 1)**

Dans la lutte contre le SIDA, de nombreux traitements sont développés afin de trouver le meilleur moyen d'éradiquer ce mal. Parmi ces traitements, on trouve les antiprotéases du VIH-1 commercialisés notamment dans le cadre des trithérapies. La très grande capacité de mutation du VIH-1 diminue malheureusement l'efficacité des anti-protéases commerciales au cours du temps et rend ainsi les traitements lourds et de plus en plus complexes.

Des études précédentes, menées en collaboration entre Nancy-Université et l'Université Pierre et Marie Curie (Paris), portaient sur certains inhibiteurs peptidiques ciblant le feuillet β antiparallèle formé par l'interdigitation des extrémités N- et C- terminales des deux monomères de la protéase du VIH-1 [1]. Parmi les dérivés étudiés, le Pam-LEY (*Figure 71*) s'est avéré particulièrement efficace. Hélas, le Pam-LEY présente une forte hydrophobie et est insoluble dans l'eau, ce qui complique son administration intraveineuse et son emploi dans une thérapie anti-sidéenne. D'où l'idée d'encapsuler cet inhibiteur peptidique au sein des nanoparticules que nous nous proposons d'élaborer, soit via le procédé d'émulsion/évaporation de solvant soit par nanopréciipitation [2,3].

1. Les composés et procédés employés

1.1. Pam-LEY, le lipopeptide utilisé

Comme nous venons de le mentionner, le Pam-LEY (*Figure 71*) s'est avéré très efficace et exhibe une capacité d'inhibition comparable aux anti-protéases commercialisées. Il présente de plus l'avantage de ne subir qu'une très faible altération de son efficacité vis-à-vis des protéases mutées ou multi-mutées étudiées. Ce résultat s'explique par le mode d'action du Pam-LEY qui inhibe le phénomène de dimérisation, contrairement aux antiprotéases commerciales qui ciblent généralement le site actif. Le Ritonavir par exemple présente une constante d'ihibition de $K_{id}^{12}=0,1$ nM vis-à-vis d'un virus non muté (Wild Type) alors que le Pam-YEL (produit avant le Pam-LEY) avait une K_{id} de 11 nM. Cependant le Ritonavir divise son efficacité d'un rapport de 78 000 après mutation de la protéase (cas ANAM-11¹³), alors que ce rapport n'est que de 7,4 pour le Pam-YEL et pour les mêmes mutations.

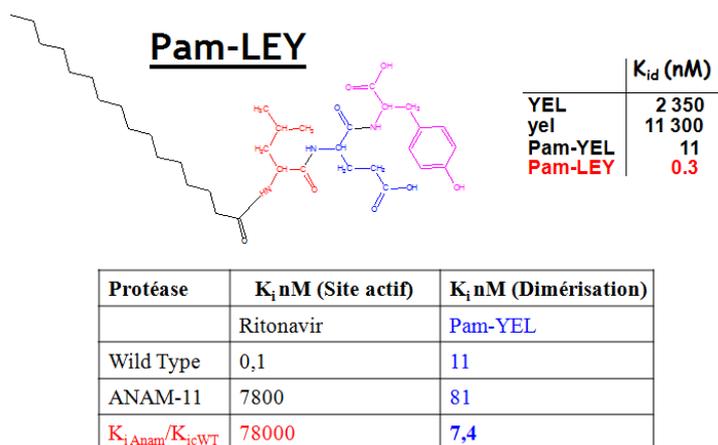


Figure 71 - Formule du Pam-LEY ($K_{id}=0,3$ nM) - Tableau des constantes d'inhibition des différents peptides synthétisés et testé sur la protéase du VIH-1, de YEL, yel, Pam-YEL et Pam-LEY.

¹² K_{id} : Constante d'inhhibition. Concentration pour inhiber 50% de la dimérisation de la protéase du VIH-1

¹³ La protéase ANAM-11 correspond à une protéase mutante possédant 11 mutations. 10 à l'extérieur du site actif et 1 dans le site actif.

Après ces études préliminaires, il s'est avéré que le Pam-LEY possédait une capacité d'inhibition de la protéase du virus non muté plus importante que le Pam-YEL (K_{id} plus faible, 0,3 nM). Il a été démontré que cette molécule demeure active contre les protéases mutées [1].

1.2. Polymères mis en jeu pour élaborer ces nanoparticules

Les polymères traditionnellement utilisés dans l'élaboration de vecteurs particuliers peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Cependant, dans les 2 cas, ils doivent être biocompatibles, non toxiques, non immunogènes, non cancérogènes. Ils doivent également pouvoir être (bio)dégradés dans l'organisme et leurs produits de dégradation tolérés par celui-ci. S'ils ne peuvent pas être (bio)dégradés, ils doivent alors, après solubilisation dans les fluides biologiques, pouvoir être éliminés par les voies naturelles. On dit alors qu'ils sont bioéliminables.

Parmi les polymères naturels employés dans la littérature, on peut citer les protéines comme la gélatine ou l'albumine et les polysaccharides. Les polymères de synthèse les plus couramment testés sont le poly(D,L-lactide) (poly(acide lactique)-PLA), les copolymères poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), la poly(ϵ -caprolactone) (PCL) et les poly(cyanoacrylates d'alkyle) [4].

Dans le cadre des nanoparticules destinées à lutter contre le SIDA, le PLA sera employé pour former le cœur hydrophobe des nanoparticules. Les propriétés de surface de ces particules seront modifiées par adsorption de dérivés amphiphiles du dextrane ($DexC_6$), de manière à conférer à ces nano-objets une surface hydrophile compatible avec les fluides biologiques circulants et limiter en particulier leur capture par le système immunitaire [5] [6].

1.3. Procédé d'émulsion/évaporation de solvant

Ce type de procédé requiert une phase aqueuse contenant un tensioactif assurant la stabilité de l'interface liquide/liquide et une phase organique contenant un polymère qui composera le cœur hydrophobe de la particule finale. Dans le cas précis de l'encapsulation du Pam-LEY, la phase aqueuse contient un dérivé amphiphile hydrosoluble du dextrane : le $DexC_6$. La phase organique est composée quant à elle de dichlorométhane (ou d'acétate d'éthyle) contenant du PLA. Cette phase organique peut également contenir un principe actif (PA) hydrophobe le cas échéant. L'encapsulation d'un PA hydrophile nécessite, quant à elle, d'avoir recours à une double émulsion eau/huile/eau. La formulation des particules par simple émulsion/évaporation de solvant se déroule en 3 étapes : une phase de mélange grossier de ces deux phases par vortex manuel, une phase de sonication pour créer une émulsion huile/eau plus fine (*Figure 72*), puis une phase d'évaporation du solvant organique.

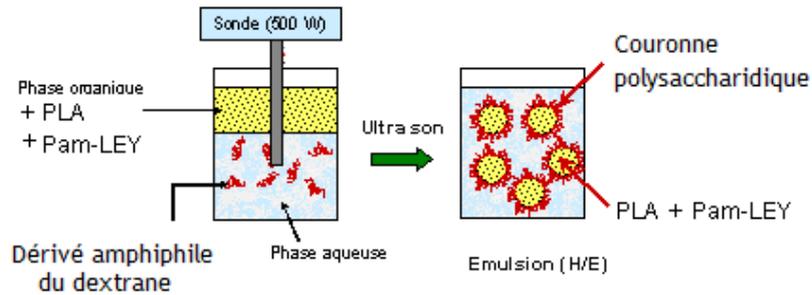


Figure 72 - Principe d'élaboration de l'émulsion huile/eau

Après formation de l'émulsion huile dans eau (H/E) stabilisée par le DexC₆ et évaporation du solvant organique, le PLA précipite sous forme de nanoparticules en renfermant le PA hydrophobe. Le DexC₆ se retrouve localisé à la surface des particules obtenues, formant ainsi une couronne surfacique hydrophile.

1.4. Procédé de nanoprecipitation par injection

Une deuxième technique d'élaboration des nanoparticules que nous emploierons consiste à nanoprecipiter un polymère hydrophobe (qui constituera le cœur de la nanoparticule) par injection dans un non-solvant dudit polymère. Pour cela, le polymère hydrophobe (dans notre cas le PLA) et éventuellement le PA seront dissous dans un solvant organique miscible à l'eau (DMSO, Acétone). Cette solution sera ajoutée goutte à goutte et sous très forte agitation dans la phase aqueuse contenant ou non un tensioactif (nous utiliserons un dérivé amphiphile du dextrane, le DexC₆) comme indiqué dans la Figure 73.

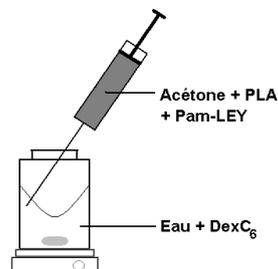


Figure 73 - Principe de la nanoprecipitation par injection

Dès l'ajout de la goutte de solution organique dans le non-solvant, on observe une diffusion du solvant organique dans la phase aqueuse alors que l'eau diffuse également dans la goutte (Figure 74). L'acétone a ici été choisie comme solvant organique pour une meilleure diffusion dans la phase aqueuse mais également pour une évaporation (après nanoprecipitation) plus aisée. De plus, le Pam-LEY est totalement soluble dans l'acétone.

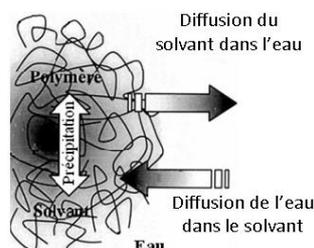


Figure 74 - Représentation de l'interdiffusion des solvants et co-solvant lors de la précipitation [7]

2. Optimisation des nanoparticules

Les nanoparticules destinées à l'encapsulation du Pam-LEY devraient être administrée par voie intraveineuse. Aussi il est primordial que leur taille soit de l'ordre de la centaine de nanomètres. En effet, les plus petits capillaires humains ont un diamètre proche du micromètre. L'utilisation de microparticules par cette voie d'administration pourrait provoquer l'obstruction de certains capillaires avec des effets secondaires dramatiques. Aussi, le paramètre de référence concernant l'optimisation de nos procédés sera donc la taille des particules, que nous tenterons de limiter à environ 200 nm de diamètre.

L'optimisation des procédés de préparation des nanoparticules a été réalisée sans ajout de principe actif.

Les mesures de taille des nanoparticules sont réalisées en utilisant deux appareils différents, un granulomètre (Mastersizer) et un appareil de rétrodiffusion de la lumière (HPPS). Le premier appareil (Mastersizer), basé sur la diffraction de la lumière, est utilisé pour étudier la taille des particules sur une large échelle allant du nanomètre à la centaine de micromètres. Cet appareil donne la taille des particules sous forme $d(0,1)$, $d(0,5)$ et $d(0,9)$ où $d(x)$ est le diamètre en dessous duquel se trouve 100x % du volume de l'échantillon; ainsi que la distribution en volume des tailles de particules. Cependant, une grande quantité de matière est nécessaire pour une mesure précise. Le second appareil (HPPS) sera utilisé uniquement pour une mesure précise du diamètre appelé « Z-average » pour des tailles inférieure à environ 1 μm . Cet appareil ne donne qu'une mesure de taille moyenne et ne peut en aucun cas donner une valeur correcte dans le cas de particules polydisperses. Le diamètre « Z-average » correspond à la taille moyenne de particules en intensité de lumière diffusée. L'indice de polydispersité (PDI) indiqué par cet appareil doit être inférieur à 0,5 pour considérer la mesure conforme. Pour plus de précision, le lecteur est invité à se rendre au Chapitre « matériels et méthodes ».

2.1. Procédé d'émulsion/évaporation de solvant

Des études préliminaires ont été menées au laboratoire [8][9] pour élaborer des nanoparticules par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant organique. À partir d'elles, une « recette » peut être retenue :

- Préparer 1 mL de solution organique (CH_2Cl_2) contenant 25 g/L de PLA.
- Préparer 10 mL de solution aqueuse contenant de 1 à 10 g/L de dextrane modifié DexC₆.
- Emulsionner ces deux phases par 1 minute de sonication en mode pulsé.

2.1.1. Effet du taux de substitution des DexC₆

Nous nous sommes tout d'abord attachés à affiner et mieux optimiser les paramètres de ce procédé d'élaboration pour obtenir des diamètres adéquats de nanoparticules. Dans un premier temps, nous avons arbitrairement fixé la concentration en DexC₆ dans la phase aqueuse à 5 g/L. Différents DexC₆ ont été employés et l'influence de leur taux de modification sur le diamètre des particules a été étudiée. Rappelons que les DexC₆ obtenus sont hydrosolubles jusqu'à un maximum de 28% de substitution.

La Figure 75 nous montre qu'un diamètre « Z-Average » proche de 100 nm est obtenu tant que le DexC₆ utilisé présente un taux de substitution inférieur à 28%. On peut également remarquer qu'un diamètre un peu plus élevé est obtenu pour les plus faibles taux de substitution en C₆. Céline Rouzes [10] évoquait une agrégation des particules pour des DexC₆ dont les taux de modification étaient inférieurs à 10%. Cette aggrégation provenait d'un recouvrement inhomogène et pas suffisamment irréversible de la surface des particules. Cependant, avec l'utilisation du DexC₆-30 par exemple, une rapide augmentation du « Z-Average » peut également être observée. La limite de solubilité des DexC₆ dans la phase aqueuse étant atteinte, cette augmentation du diamètre moyen est sans doute liée à la présence d'interactions hydrophobes entre les chaînes alkyle des DexC₆ à la surface de plusieurs nanogouttes (avant évaporation du solvant organique).

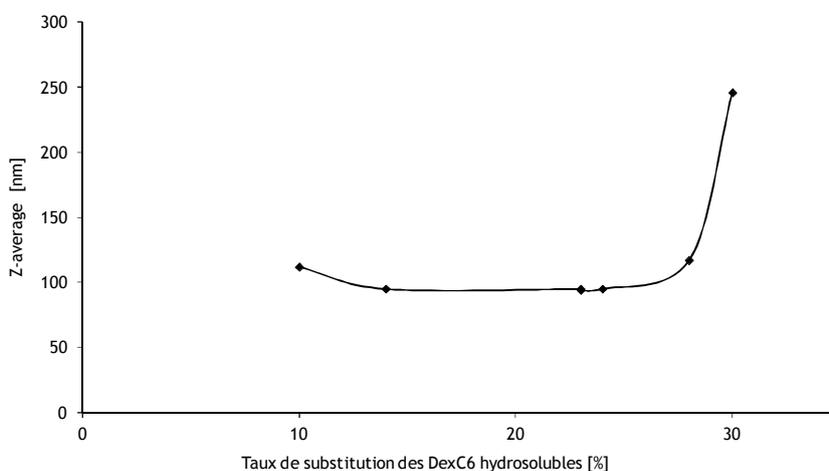


Figure 75 - Evolution du « Z-average » des particules en fonction du taux de substitution des DexC₆ utilisés (1 mL CH_2Cl_2 + 25 g/L PLA) + (10 mL H_2O + 5 g/L DexC₆) - Sonication : 50% d'amplitude pendant 1 min. Evaporation : 2h30 sous agitation à 37°C

En conclusion, des nanoparticules de diamètre inférieur à 200 nm peuvent être facilement obtenues dans les conditions standard sans que le taux de modification des DexC₆ n'ait d'influence ; tant que ces DexC₆ demeurent parfaitement solubles en phase aqueuse (taux de substitution < 30%).

2.1.2. Influence de la sonication

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de l'amplitude des ultrasons délivrés par la sonde lors de l'étape de sonication pendant une période donnée (2 minutes) ; puis l'effet de la durée de sonication à différentes amplitudes.

Pendant une durée de 2 minutes de sonication, nous pouvons voir sur la *Figure 76* que des tailles et PDI semblables sont obtenus pour des amplitudes de sonication de 35 ou 50%. Mais, à faible amplitude des ultrasons, la puissance délivrée par la sonde ne semble pas suffisante pour créer une émulsion, et par la suite des nanoparticules, de taille avoisinant 200 nm. De plus, dans ce cas, la valeur des PDI donnés par l'HPPS nous indique une très faible homogénéité des résultats, ce qui peut témoigner de la présence de plusieurs populations en taille. En effet, les données constructeur de cet appareillage nous indiquent qu'un PDI supérieur à 0,5 est le témoin d'une diversité importante des tailles d'objets mesurés par l'appareil.

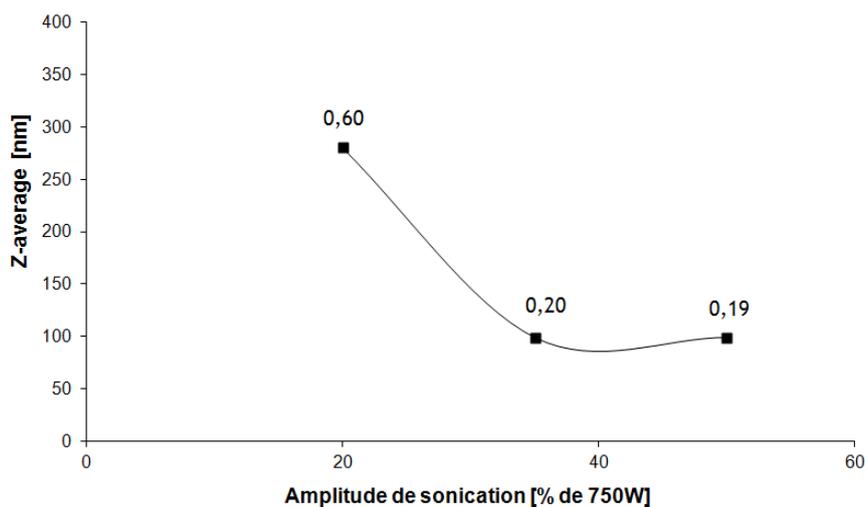


Figure 76 - Evolution du diamètre moyen des nanoparticules en fonction de l'amplitude de sonication employées. (1 mL CH₂Cl₂ + 25 g/L PLA) + (10 mL H₂O + DexC₆-23 5 g/L). 2 minutes de sonication puis 5h d'évaporation sous agitation magnétique à 37C. Sur le graphique, les PDI mesurés par l'HPPS ont été indiqués.

L'utilisation du granulomètre nous permet rapidement de valider notre conclusion. La *Figure 77* représente la distribution des tailles des particules obtenues avec un DexC₆-23 dans 4 conditions : sonication à 50%, 40%, 30% ou à 20% d'amplitude. Aux plus fortes amplitudes, les particules obtenues ont une taille proche de 130 nm et répartie de façon monodisperse. Une trop faible amplitude de sonication (20%) ne permet donc pas d'obtenir des particules suffisamment petites et surtout avec une

répartition homogène. Des microparticules de taille supérieure à 1 μm sont aussi observées dans ces conditions de sonication.

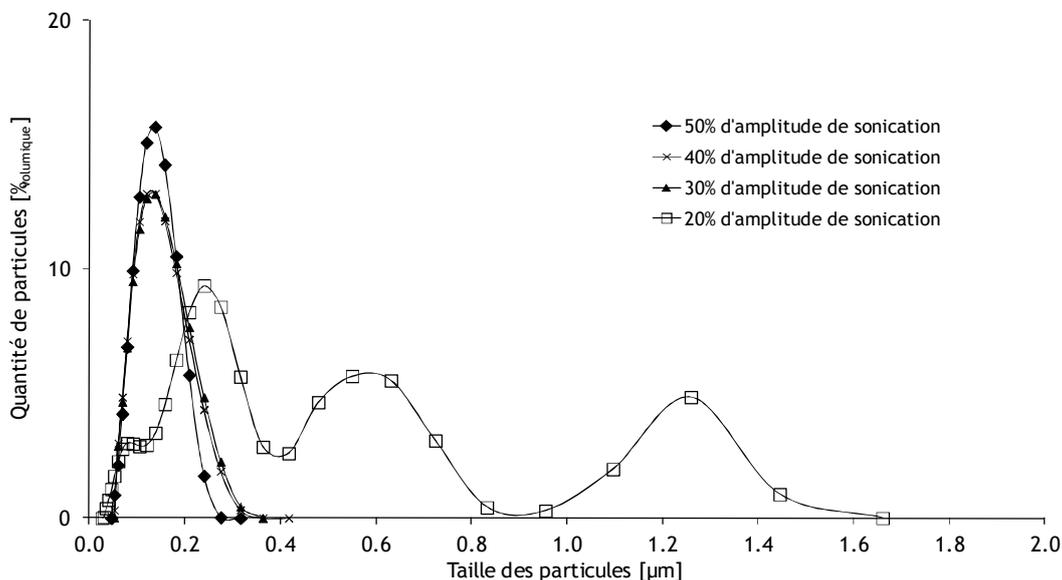


Figure 77 - Evolution de la taille des particules déterminée par granulométrie en fonction de l'amplitude de sonication - (1 mL CH_2Cl_2 + 25 g/L PLA) + (10 mL H_2O + Dex C_6 -23 à 5 g/L)

Nous venons d'étudier l'amplitude de la sonication sur le diamètre moyen des nanoparticules, mais quid de la durée totale de sonication ? Pour étudier cette influence, des expériences ont été réalisées en utilisant des sonications à 35% d'amplitude pendant 30 secondes, 1 ou 2 minutes. Deux Dex C_6 ont été employés : le Dex C_6 -10 et le Dex C_6 -23. Cette amplitude de sonication a été sélectionnée pour atteindre des particules de diamètre « acceptable » et monodisperse.

La Figure 78 montre qu'en dessous de 1 min de sonication (30 secondes de pulse et 30 seconde sans pulse par intervalle de 1 seconde), les tailles de particules augmentent significativement et ce quel que soit le taux de modification des Dex C_6 utilisés comme tensioactifs. On peut remarquer qu'accroître la durée de sonication n'influence pas le diamètre moyen des particules puisque celui-ci n'évolue pas de façon significative (~ 200 nm).

Le diamètre des nanoparticules stabilisées par le Dex C_6 -10 est légèrement plus élevé que celui des nanoparticules obtenues à partir du Dex C_6 -23, confirmant ce qui a pu être déjà observé (Figure 75).

Pour éviter une potentielle détérioration du principe actif lors de son encapsulation au sein des nanoparticules, nous fixerons par la suite le temps de sonication à 1min.

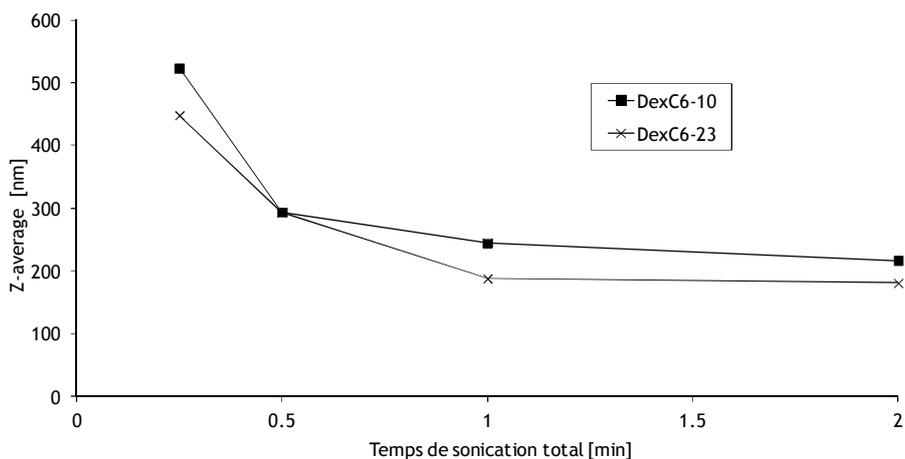


Figure 78 - Evolution de la taille des particules en fonction du temps de sonication total appliqué à la solution durant l'émulsion. Quantité de DexC₆ dans la phase aqueuse fixée à 5mg/mL et amplitude de sonication de 35%.

2.1.3. Influence de la concentration en tensioactif

Dans un troisième temps, l'influence de la concentration du DexC₆ a été étudiée. En utilisant par exemple le DexC₆-23 à 2,5 ou 5 g/L dans le CH₂Cl₂, l'influence de la concentration est très nette lorsqu'on réitère les expériences à amplitude de sonication variable (Figure 79). On observe facilement que l'augmentation de la quantité de tensioactif employée, dans le domaine étudié, permet de réduire légèrement le diamètre moyen des nano-objets formulés.

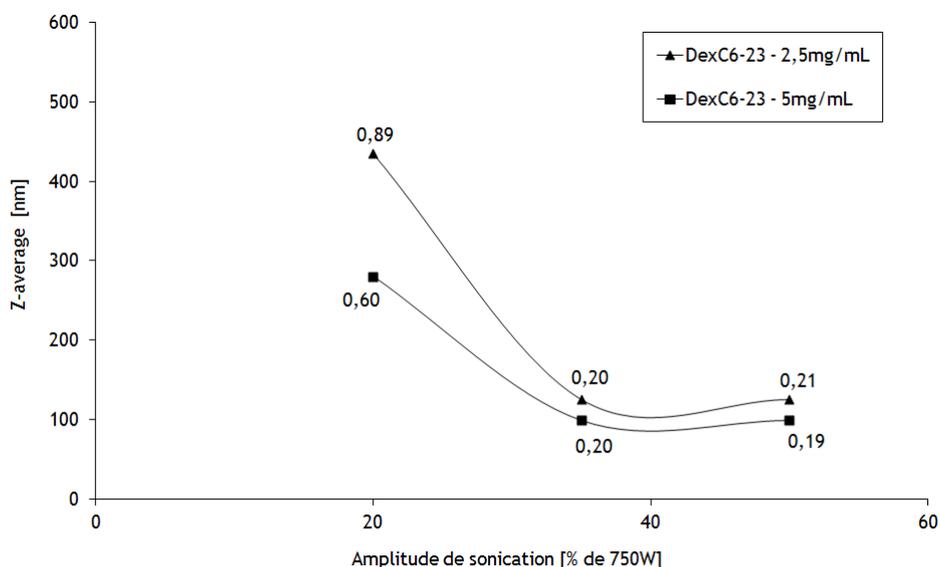


Figure 79 - Evolution du diamètre moyen des nanoparticules en fonction de l'amplitude de sonication employées et de la concentration en DexC₆-23. (1 mL CH₂Cl₂ + 25 g/L PLA) + (10 mL H₂O + DexC₆-23 à 2,5 ou 5 g/L). 2 minutes de sonication puis 5h d'évaporation sous agitation magnétique à 37°C. Sur le graphique, les PDI mesurés par l'HPPS sont indiqués.

La quantité optimale de tensioactif DexC₆ dans la phase aqueuse à employer a été étudiée plus précisément en réalisant diverses expériences en appliquant 1 minute de sonication à 50% d'amplitude. La Figure 80 nous montre l'évolution des diamètres d(0,5) de particules mesurés à l'aide du granulomètre. On observe une réduction nette du diamètre jusqu'à une stabilisation vers 150 nm au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en DexC₆-15 dans la phase aqueuse.

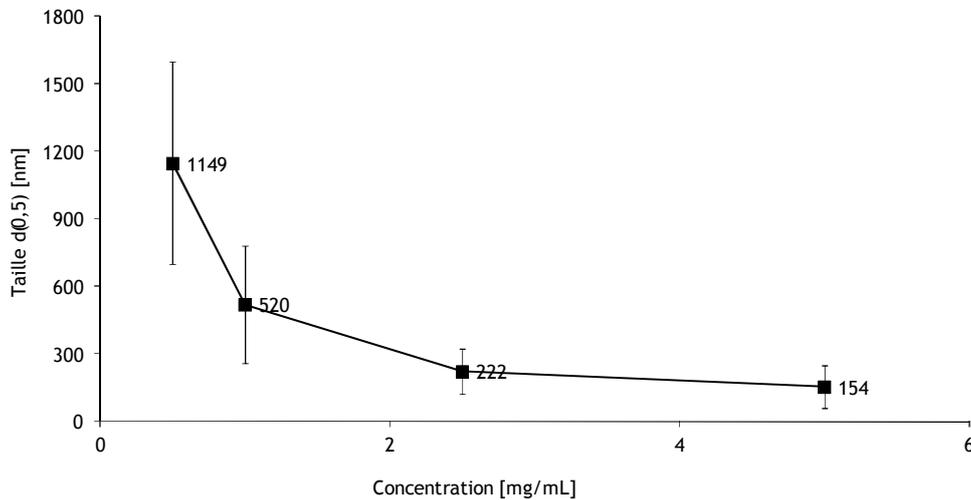


Figure 80 - Diamètre des particules en fonction de la concentration en DexC₆-15 dans la phase aqueuse de l'émulsion. (1 mL Acétate d'Ethyle + 25 g/L PLA) + (10 mL H₂O + DexC₆-15). 1 minute de sonication à 50% d'amplitude (Amplitude max = 750W) - 5h d'évaporation sous agitation magnétique à 37C. Les barres d'erreurs représentent les écarts à la moyenne entre les différentes mesures pour chaque concentration.

La Figure 81 représente la répartition en taille des particules obtenues en fonction de la quantité de tensioactif solubilisé dans la phase aqueuse. Elle montre clairement que la distribution des diamètres est homogène lorsque les DexC₆ sont solubilisés à 5 g/L en phase aqueuse. Lorsque la concentration des DexC₆ est réduite, une répartition hétérogène des diamètres est alors observée. Des diamètres moyens proches du micromètre, puis supérieurs sont obtenus lorsque la concentration décroît de 2,5 à 0,5 g/L en phase aqueuse.

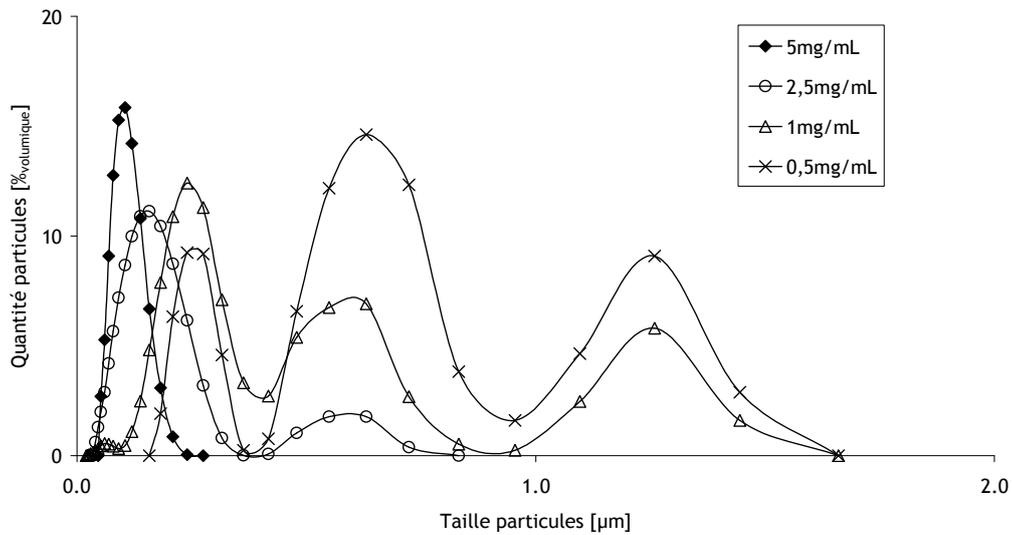


Figure 81 - Taille des particules mesurée par le granulomètre en fonction de la quantité de DexC₆-28 dans la phase aqueuse (Solvant organique : Dichlorométhane). 1 minute de sonication à 50% d'amplitude (Amplitude max = 750W) - 5h d'évaporation sous agitation magnétique à 37C.

La répartition en diamètre est également confirmée par une analyse des solutions par Microscope Electronique à Balayage (MEB). Une goutte de suspension est déposée sur un plot préalablement recouvert d'une membrane poreuse (taille des pores inférieure à la cinquantaine de nanomètre). Les plots sont ensuite laissés à l'abri de la poussière pendant 48h de manière à observer l'évaporation totale de l'eau. Ils sont ensuite métallisés pour l'analyse au MEB. Sur la partie gauche de la Figure 82 on peut observer une répartition des tailles de particules peu homogène alors qu'une forte monodispersité des tailles est observée lorsqu'une solution aqueuse concentrée (5 g/L) en Dex₆ est employée.

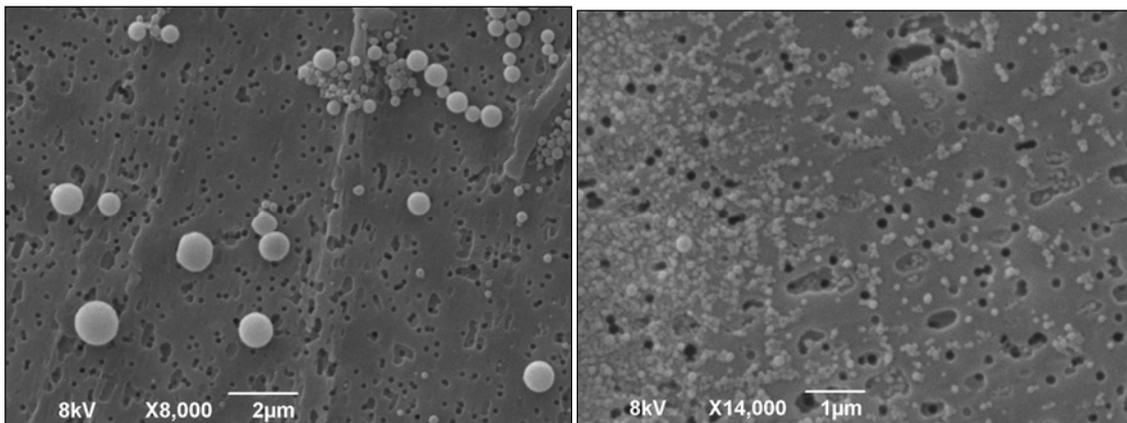


Figure 82 - Photo MEB de suspension de nanoparticules obtenues par émulsion/évaporation de solvant avec 0,5 mg/mL (à gauche) et 5 mg/mL (à droite) de DexC₆-22 dans la phase aqueuse. 1 minute de sonication à 50% d'amplitude (Amplitude max = 750W) - 5h d'évaporation sous agitation magnétique à 37C.

Aux faibles concentrations en tensioactif, le nombre de DexC₆ en solution n'est donc pas suffisant pour saturer complètement la surface des nanogouttelettes organiques dans la phase aqueuse. La quantité de tensioactif dans ces cas ne permet pas de réduire de manière significative la surface et donc la taille des gouttelettes. Aux plus fortes concentrations en DexC₆, la surface des particules de PLA est saturée et le volume des gouttes diminue.

2.1.4. Effet du solvant organique employé

Les différentes tendances précédemment décrites sont également vérifiées, quel que soit le solvant organique utilisé lors de l'émulsification du système (Dichlorométhane ou Acétate d'éthyle saturé en eau), et quel que soit le taux de substitution du DexC₆ utilisé dans la phase aqueuse (Figure 83). On peut voir qu'effectivement, à 5 g/L de DexC₆, l'influence du taux de modification n'est pas perceptible sur le diamètre des nanoparticules. Néanmoins, à plus faible concentration en DexC₆ dans la phase aqueuse, les plus faibles diamètres des particules sont obtenus dans le dichlorométhane.

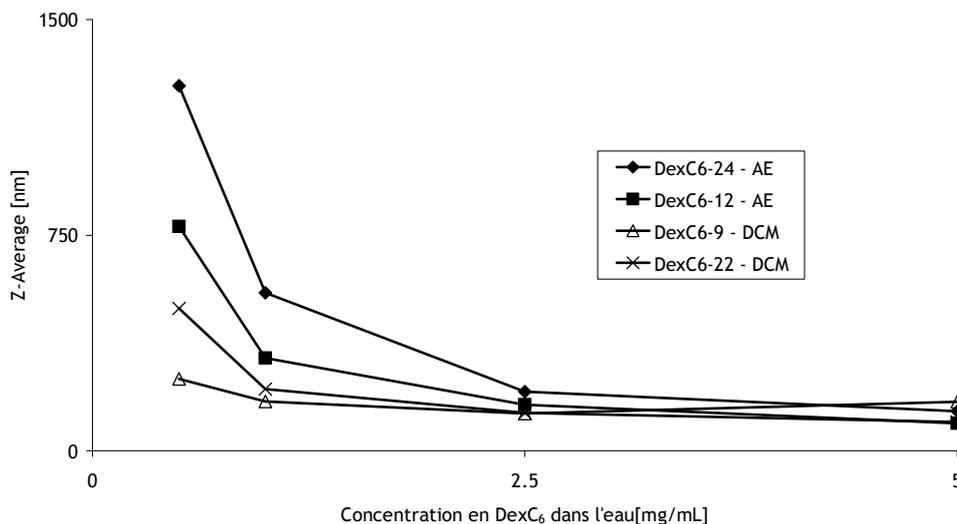


Figure 83 - Diamètre des particules en fonction de la concentration en DexC₆-15 dans la phase aqueuse de l'émulsion. Comparaison des solvants organiques utilisés lors de l'élaboration par émulsion (1 mL CH₂Cl₂ ou Acétate d'éthyle + 25 g/L PLA) + (10 mL H₂O + DexC₆ à 5 g/L). 1 minute de sonication à 50% d'amplitude (Amplitude max = 750W)

Ceci peut s'expliquer par la solubilité du solvant organique dans l'eau. En effet, le dichlorométhane possède une solubilité dans l'eau environ 6 fois plus faible (13 g/L) que l'acétate d'éthyle (83 g/L). Par conséquent, l'émulsion sera plus efficace dans le cas du solvant le moins miscible à la phase aqueuse. Les gouttes seront en effet plus stables et la coalescence de ces dernières à faible concentration en DexC₆ sera moins rapide d'où un diamètre «Z-Average» plus faible.

2.1.5. Conclusion

A partir des différentes expériences menées, nous avons pu établir des conditions opératoires permettant d'obtenir aisément des nanoparticules de diamètre inférieur à 200nm. Pour cela, il suffit d'émulsionner 10 mL de solution aqueuse contenant 5 g/L de dérivé DexC₆ (quel que soit le taux de modification situé entre 10% et 30%) à 1 mL de CH₂Cl₂ dans lequel est solubilisé 25 g/L de PLA qui constituera le cœur du futur nano-objet. L'étape de sonication est réalisée pendant 1 minute minimum à une amplitude de 35% minimum.

2.2. Procédé de nanoprécipitation

Des nanoparticules biodégradables de type cœur/couronne ont été récemment élaborées au LCPM en utilisant le procédé de nanoprécipitation [11]. Cette technique peut-elle également être employée pour formuler des nanoparticules à partir des DexC₆ que nous avons obtenus ? C'est à cette question que nous nous sommes attachés de répondre.

Les études précédentes portant sur l'élaboration de nanoparticules par la technique d'émulsion/évaporation du solvant organique nous a permis de conclure qu'une concentration de 5 mg/mL de DexC₆ en phase aqueuse était nécessaire pour obtenir des nanoparticules ayant une répartition de taille monodisperse et un diamètre inférieur à 200 nm ; quel que soit le taux de modification du dérivé DexC₆ (dans le domaine des taux de substitution étudié). Fort de cette constatation, la concentration du DexC₆ dans la phase aqueuse précipitante a été fixée à 5 g/L pour les différents tests d'élaboration de nanoparticules par nanoprécipitation.

Afin de limiter les paramètres d'influence du procédé de nanoprécipitation sur la taille des particules obtenues, les mêmes types de piluliers contenant la phase aqueuse précipitante et de barreau magnétique ont été employés. Néanmoins, la vitesse d'agitation du barreau aimanté ne dépassera pas les 750 tr/min afin d'éviter la création de mousse à la surface de la phase aqueuse. De même, l'aiguille de la seringue Hamilton de 500 µL servant à l'injection de la phase organique dans la phase aqueuse n'est pas modifiée. Il s'agit d'une aiguille droite de 51mm et de gauge 22 (ga 22/51mm/pst 3). Cette aiguille est directement introduite dans la phase aqueuse au plus près possible de la paroi du pilulier et du barreau magnétique. Cela permettra une diffusion des solvants plus rapide dans toute la solution en évitant une concentration de solvant organique dans le vortex créé par l'agitation. Le débit d'injection n'ayant pas énormément d'importance avec la seringue utilisée, nous le fixerons à 0,3 mL/min.

En effet, si les conditions ci-dessus ne sont pas respectées, les suspensions obtenues sont constituées d'agrégats dont la taille est de l'ordre de grandeur du millimètre. Par exemple, si le diamètre de l'aiguille employée est plus important, les gouttes seront plus grosses, ainsi que les particules finales. De plus, si la goutte de solvant organique contenant le PLA est introduite avec l'aiguille située à l'extérieur de la phase aqueuse, la goutte ne gardera pas sa forme lors de la collision avec la surface de l'eau et la précipitation se fera de manière inhomogène créant des fils et des agrégats. De la même manière, si la solution organique est introduite au centre du vortex créé par l'agitation du barreau magnétique, les nanogouttelettes se concentreront au centre de celui-ci. La nanoprécipitation se fera plus lentement (augmentation de la concentration en acétone au centre du vortex) et la probabilité de

collision entre les particules préformées sera plus importante. Les particules n'étant pas totalement stables avant l'évaporation (collantes / visqueuses dû à la présence de solvant organique), celles-ci interagiront entre elles pour former des agrégats.

Le rapport volumique de la phase organique introduite dans la phase aqueuse a été étudiée pour différents dérivés DexC₆. Les concentrations en tensioactif DexC₆ et PLA étant fixées, ce rapport volumique phase organique/phase aqueuse permet d'étudier en fait la quantité de DexC₆ nécessaire pour recouvrir correctement l'interface liquide/liquide et obtenir *in fine* des particules de tailles homogènes, de façon reproductible.

Des DexC₆ modifiés de 4 à 24% ont ainsi été testés. Il apparaît que pour de faible rapport volumique acétone/eau (1/10 ou 1/5), ce taux de modification n'influence pas la taille des particules de façon significative. Néanmoins, lorsque le volume de la phase acétone ajoutée représente la moitié de celui de la phase aqueuse, une variation du diamètre moyen des particules commence à être perçue dans le cas où le taux de modification du dextrane est très faible.

Tableau 13 - Elaboration des nanoparticules par nanoprécipitation. Taille des particules mesurées par le granulomètre en fonction de la quantité d'acétone injectée dans 10mL de solution aqueuse de DexC₆ (5 g/L) - Concentration en PLA dans l'acétone fixée à 5 g/L.

Tensioactif utilisé	Rapport Acétone / Eau Volume final: 15 mL	Taille des particules* (nm) d(0,5)
DexC ₆ -24	1/10	165
	1/5	150
	1/2	160
DexC ₆ -12	1/10	155
	1/5	160
	1/2	155
DexC ₆ -4	1/10	155
	1/5	155
	1/2	190

*Obtenue par granulométrie.

Il apparaît dans le *Tableau 13* que des rapports massiques PLA/DexC₆ (25mg de PLA / 50 mg de DexC₆) similaires à ceux utilisés dans le cadre de l'élaboration par émulsion/évaporation peuvent être employés dans le cadre de la nanoprécipitation et permettent d'obtenir des particules de diamètre comparables. Pour cela, il suffit d'employer un rapport acétone/eau ½ dans les conditions testées. Des tailles similaires sont également obtenues lorsque le rapport massique DexC₆/PLA augmente.

Cependant, pour des raisons de facilité de récupération nous fixerons par la suite les mêmes quantités de PLA/DexC₆ pour les deux procédés d'élaboration. Ainsi, le *Tableau 14* résume les différents paramètres d'élaboration des nanoparticules que nous utiliserons dans la suite du manuscrit.

Tableau 14 - Récapitulatif des paramètres d'élaboration des nanoparticules pour l'émulsion/évaporation et pour la nanoprécipitation

	Emulsion	Nanoprecipitation
PLA (mg)	25	
DexC ₆ (mg)	50	
Eau (mL)	10	
Solvant organique (mL)	1	5
Vortex manuel (min)	1	-
Amplitude de sonication (% de 750W)	50	-
Temps de sonication (min _{totale})	1	-
Vitesse d'agitation (tr/min)	-	750
Débit d'injection de la phase organique (mL/min)	-	1

Ayant optimisé et fixé les paramètres d'élaboration des nanoparticules, nous nous sommes attachés à les caractériser de manière à sélectionner le meilleur nano-objet à la fois pour une encapsulation efficace du Pam-LEY et une utilisation biologique sans risque pour le patient.

Le conditionnement des nanoparticules après élaboration, leur stabilité colloïdale ou encore leurs caractéristiques de surface ont été alors évaluées.

2.3. Récupération et conditionnement final des nanoparticules

Après élaboration, les nanoparticules sont lavées par centrifugation afin d'éliminer le tensioactif DexC₆ non adsorbé à la surface des nanoparticules. La technique consiste à centrifuger les particules, remplacer le surnageant par une solution de lavage, puis à les redisperser. L'opération est réalisée plusieurs fois. Cependant, il arrive très souvent que les particules s'agrègent pendant ces opérations. Dans notre cas, nous avons déterminé, pour les deux principes d'élaboration, qu'il était nécessaire de centrifuger à 8500 tr/min pendant 1h15 à 15°C. En effet, pour une durée donnée, à des vitesses de centrifugation plus faibles, toutes les particules ne s'accumulent pas dans le fond du tube et nous perdons une partie des particules lors de l'élimination du surnageant. Une vitesse plus élevée agrège les particules au fond du tube et leur redispersion s'avère difficile sans l'apparition d'agrégats.

Enfin, leur conditionnement final a été évalué. En effet, la conservation de suspensions aqueuses de nanoparticules renfermant le principe actif est difficilement envisageable par suite des risques importants de diffusion de la molécule active dans le surnageant. Une congélation lente ou rapide (azote liquide) des nanoparticules ne permet pas de les redisperser ultérieurement : on observe une agrégation des particules. En effet, dans un premier temps, nous avons tenté de congeler la suspension de particules pour conservation. La congélation lente consiste à mettre les tubes contenant les suspensions directement au congélateur pendant 48h. La congélation rapide des suspensions est effectuée directement par l'azote liquide. Les deux suspensions sont ensuite décongelées. Dans tous les cas, on observe de gros agrégats impossibles à disperser malgré l'utilisation de bain à ultrasons.

La conservation des nanoparticules après leur lyophilisation a également été testée et nous avons alors montré qu'il était nécessaire d'ajouter un cryoprotectant tel que le tréhalose (10mg/mL de

suspension) avant lyophilisation pour observer une redispersion parfaite. La *Figure 84* représente par exemple des nanoparticules (recouvertes de DexC₆-14) élaborées par nanoprécipitation, lavées puis lyophilisées en présence ou en l'absence de cryoprotectant. Le lyophilisat obtenu a ensuite été redissout dans l'eau et déposé sur un plot pour l'analyse MEB (*Figure 84*).

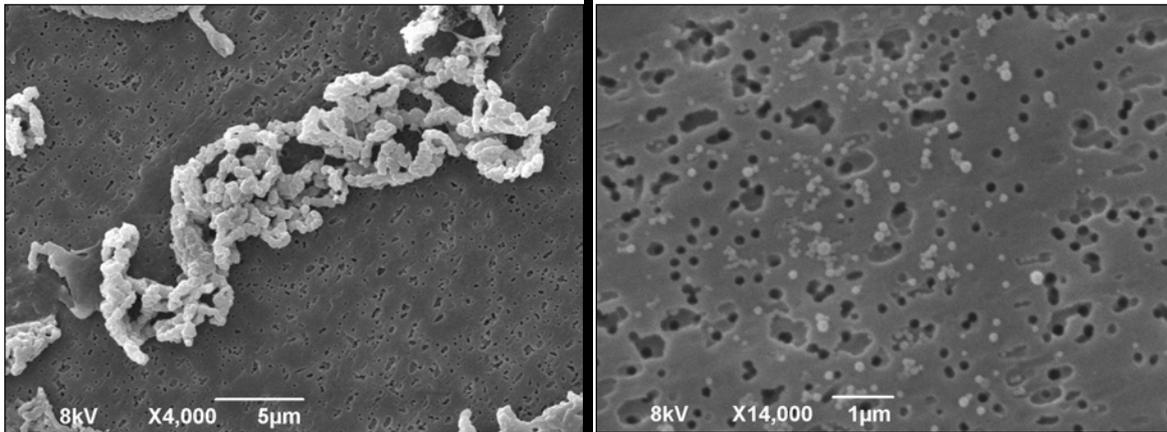


Figure 84 - Nanoparticules élaborées par nanoprécipitation, lavées puis lyophilisées sans cryoprotecteur (à gauche) et avec cryoprotecteur (à droite).

On observe ainsi une agrégation nette et non réversible des particules dans le cas où la lyophilisation est effectuée sans ajout préalable de cryoprotecteur. Cet effet peut-être expliqué par le fait que, pendant la congélation brutale de la solution aqueuse par l'azote liquide, l'eau se cristallise brusquement en poussant les particules à se « réunir » dans la zone non cristallisée. La concentration en particules y augmente au fur et à mesure de la congélation jusqu'à agrégation des particules. Le cryoprotecteur utilisé forme de nombreuses liaisons hydrogène avec l'eau, aux dépens des liaisons hydrogène avec la matrice PLA et l'eau. Ces interactions entre le sucre et l'eau conduisent à une phase amorphe congelée facilement redispersable dans l'eau. De plus, il a été montré que le dextrane n'a pas, ou pas assez, d'efficacité cryoprotectrice [12].

3. Caractérisation des nanoparticules obtenues

3.1. Potentiel Zêta

3.1.1. Principe

La présence de groupes chargés à la surface d'une particule affecte la distribution ionique dans la région interfaciale entre la particule et le liquide. Il en résulte une augmentation de la concentration en contre-ions près de la surface de la particule, qui peut être modélisée sous la forme d'une double couche électrostatique (*Figure 85*).

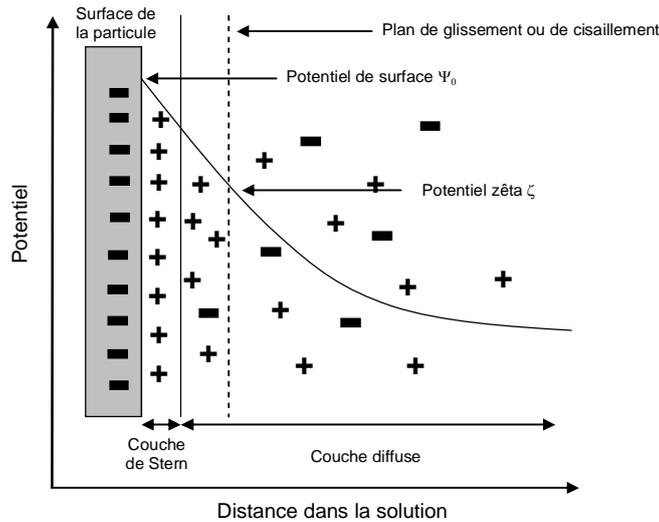


Figure 85 - Représentation de la double couche électrostatique à la surface d'une particule

Quand un champ électrique est appliqué à travers un électrolyte, les particules en suspension qui possèdent une charge électrique sont attirées vers l'électrode de charge opposée, alors que la force de frottement subie par les particules s'oppose à ce mouvement. Lorsque l'équilibre entre ces deux forces est atteint, les particules se déplacent à vitesse constante. Leur vitesse dépend donc du champ électrique, du milieu et de la charge de la particule. Sous l'effet des forces de frottement, la couche d'ions diffuse est arrachée jusqu'à un certain plan appelé plan de cisaillement. Le potentiel mesuré au niveau de ce plan de cisaillement est appelé potentiel zêta (ζ).

Pour une particule donnée dans un champ électrique donné, quelle que soit la composition ionique du milieu, la distance de la surface au plan de cisaillement ne varie pas. En pratique, le potentiel ζ que nous avons évalué n'est pas celui mesuré par l'appareil (calculé en utilisant l'approximation de Smoluchowsky), mais est recalculé à partir de la mobilité électrophorétique μ_E (exprimée en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) des particules, selon l'équation modifiée de Booth :

$$\zeta(mV) = 25,7 \frac{E}{f_1} \left[\frac{C_3 \left(\frac{E}{f_1} \right)^3 + C_4 \left(\frac{E}{f_1} \right)^4}{f_1 + 3C_3 \left(\frac{E}{f_1} \right)^2 + 4C_4 \left(\frac{E}{f_1} \right)^3} \right]$$

où $E = 7520 \mu_E$ et f_1 est le facteur de correction de Henry qui tient compte de la déformation du champ électrique autour des particules. Les effets de relaxation sont pris en compte par les coefficients C_3 et C_4 . Une méthode permettant de déterminer f_1 , C_3 , C_4 et de calculer le potentiel ζ à partir de la taille, de la mobilité électrophorétique μ_E des particules, et de la concentration saline du milieu a été décrite par Deshiikan et Papadopoulos [13]. Cependant, lorsqu'une particule chargée est recouverte d'un polymère neutre et que la couche de polymère est supérieure à l'épaisseur du plan de cisaillement x , il y a déplacement de ce plan de cisaillement, de la distance x à

une distance de la surface notée Δ_{PZ} . On observe alors une diminution du potentiel ζ , qui tend vers zéro au fur et à mesure que la quantité de polymère déposé et que l'épaisseur Δ_{PZ} de la couche interfaciale augmentent. Gouy et Chapman ont alors proposé une relation exprimant l'évolution du potentiel ζ en fonction du paramètre de Debye-Hückel k_H (m^{-1}) et de l'épaisseur Δ_{PZ} de la couche polymère surfacique [14] :

$$\ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \zeta}{4 k_B T} \right) \right] = \ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \psi_0}{4 k_B T} \right) \right] - k_H \times \Delta_{PZ}$$

Avec :

- ψ_0 le potentiel de la surface du cœur de la particule.
- Z valence de la solution saline en présence
- e : Charge élémentaire de l'électron : $1,602176565 \cdot 10^{-19}C$
- k_B : Constante de Boltzmann : $1,381 \cdot 10^{-23} J.K^{-1}$
- T : Température absolue du milieu : 298K

L'épaisseur de la couche diffuse quant à elle, est égale à l'inverse du paramètre k_H et dépend de la force ionique du milieu.

$$k_H (nm^{-1}) = 10^9 \left[\frac{1000 \cdot e^2 \cdot N_A \cdot \sum_i (C_i \cdot Z_i)^2}{\epsilon \cdot k_B \cdot T} \right]^{1/2}$$

Avec C_i et Z_i , les concentration et valence des ions en présence dans le milieu.

En mesurant le potentiel Zêta à différentes force ioniques (C_i) et en reportant $\ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \zeta}{4 k_B T} \right) \right]$ en fonction de k_H , on obtient une courbe dont la pente à faible valeur de k_H est égale à Δ_{PZ} , la distance de la surface au plan de cisaillement (*Figure 86*). Δ_{PZ} peut être assimilée dans notre cas à l'épaisseur de la couronne de dextrane en surface des particules.

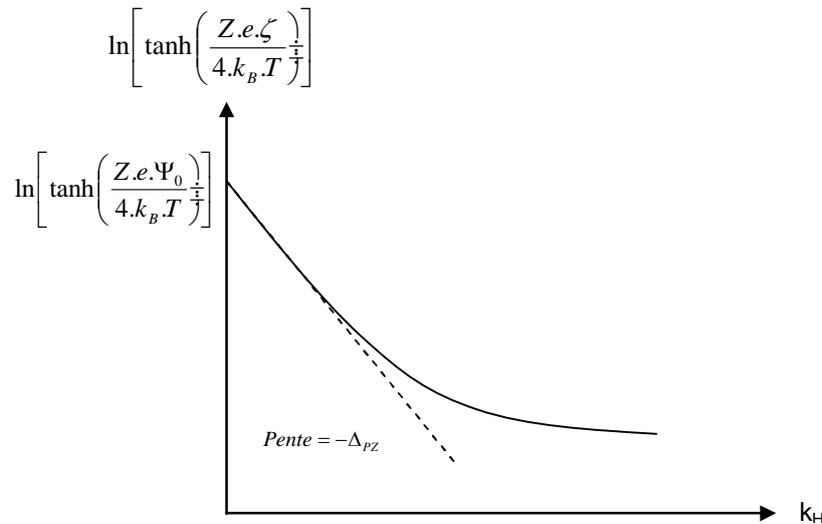


Figure 86 - Détermination de Δ_{Pz} , d'après la mesure de potentiel ζ au niveau du plan de cisaillement des particules, calculé par la relation de Gouy-Chapman, et en fonction du paramètre de Debye-Hückel k_H .

Ceci est effectivement vrai pour de faibles forces ioniques, c'est-à-dire lorsque l'épaisseur ΔP_z est inférieure à celle de la couche diffuse ($1/k_H$). Par contre, lorsque ΔP_z est supérieure à ($1/k_H$) la courbe s'incurve et les valeurs tendent vers zéro (Figure 86). L'épaisseur ΔP_z ne peut donc plus être déterminée à partir des valeurs du potentiel Zêta mesurées à des forces ioniques plus élevées.

3.1.2. Mise en évidence d'un recouvrement par le dextrane

Le potentiel Zêta est donc un très bon indicateur de l'interaction entre les objets et donc de la stabilité de ces colloïdes. Il permet également de mettre en évidence de façon indirecte, la présence d'une couche hydrophile à la surface des particules. En effet, dans le cas de nanoparticules PLA préparées en utilisant du cholate de sodium dans la phase aqueuse, en lieu et place du DexC₆, on peut obtenir après lavage des particules de PLA « nues ». Brièvement, 60mg de Cholate de Sodium pour 25 mg de PLA sont utilisés lors du procédé émulsion/évaporation de solvant. Les particules sont ensuite lavées et on mesure un diamètre moyen d'environ 175 nm [10]. Le potentiel Zêta de ces particules « nues » a été mesuré dans des solutions de chlorure de sodium à différentes concentrations, c'est-à-dire à différentes forces ioniques. Celui-ci reste nettement négatif quelque soit la force ionique de la suspension [10][11] (Figure 87).

Dans le cas des nanoparticules recouvertes d'une couche de DexC₆, préparées par la technique d'émulsion/évaporation de solvant, le potentiel Zêta approche la neutralité dès que ces particules sont placées dans une solution aqueuse de NaCl de concentration supérieure à 10^{-2} mol/L (Figure 87). En recouvrant les particules de PLA par des DexC₆, le plan de cisaillement au milieu duquel est effectuée la mesure du potentiel Zêta est éloigné de la surface de la particule, proportionnellement à l'épaisseur de la couche de polymère déposée, ce qui permet d'obtenir des potentiels plus faibles que ceux des particules de PLA « nues ». Ceci est vrai quel que soit le taux de modification du DexC₆ employé.

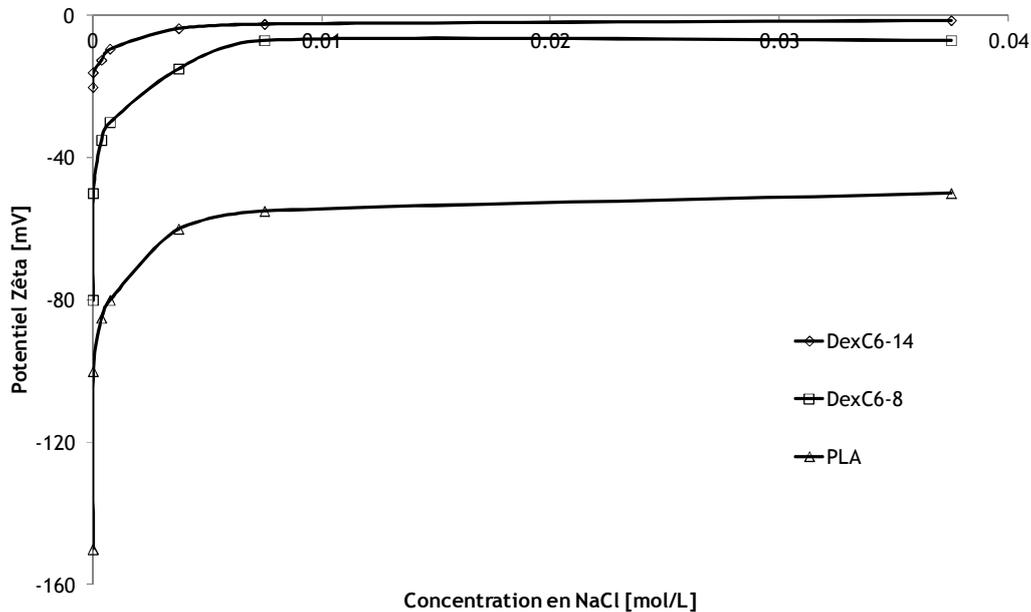


Figure 87 - Potentiel Zêta d'une suspension de nanoparticules « nues » et recouvertes de DexC₆-14 et DexC₆-8 ; élaborées par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant.

Sur la Figure 87, on peut également observer une différence de potentiel zêta selon le taux de modification des DexC₆ employés. Les nanoparticules recouvertes d'une couche DexC₆-14 possèdent un potentiel plus proche de zéro, ce qui pourrait s'expliquer par une couche surfacique de DexC₆-14 plus dense à la surface des particules ou bien à une plus grande épaisseur de couche que dans le cas de la couche DexC₆-8. Un taux de substitution du dextrane plus élevé (dans la limite de solubilité aqueuse des DexC₆) permettrait donc une augmentation de la densité et/ou de l'épaisseur de couche hydrophile de nos particules.

Le sang possède une force ionique avoisinant les 0,15. Aussi, on peut aisément extrapoler la valeur du potentiel zêta à la surface de nos particules lorsque celles-ci seront injectées par voie intraveineuse. Aucune force électrostatique attractive ni répulsive entre particules ne sera présente. Il est donc possible d'envisager que les particules posséderont une bonne stabilité dans ce milieu physiologique. Les dérivés amphiphiles de dextrane (DexC₆) nous permettent donc d'augmenter de manière significative le potentiel zêta à la surface des particules et d'assurer alors leur stabilité colloïdale (Figure 87).

La Figure 88 nous indique également qu'aucune différence significative sur la valeur du potentiel Zêta n'est observable entre les deux procédés d'élaboration des particules. La concentration du DexC₆-14 à la surface des particules semble donc similaire malgré la différence de formulation.

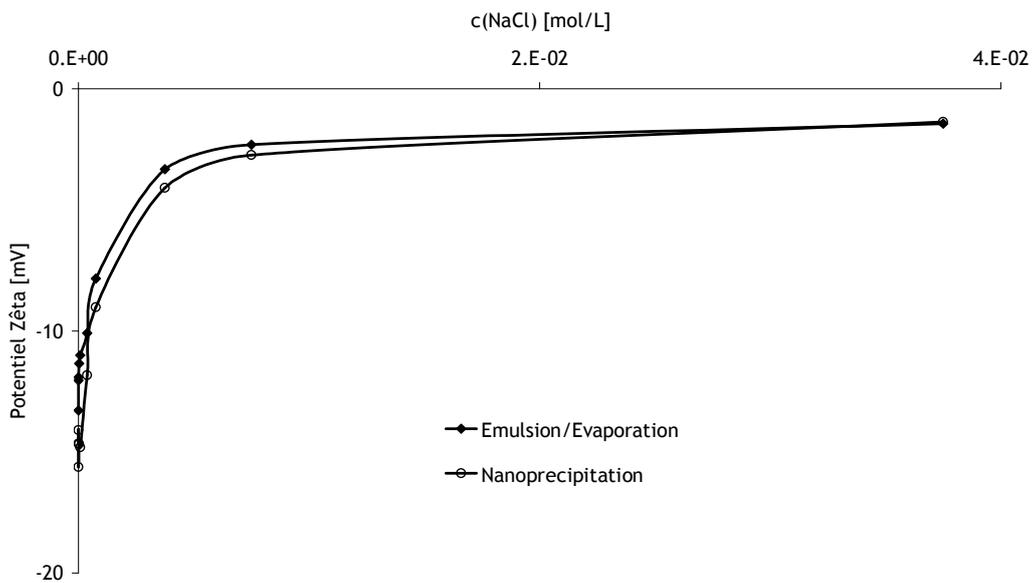


Figure 88 - Potentiel Zêta de suspensions de nanoparticules de PLA recouvertes de DexC₆-14 et élaborées par les procédés d'émulsion/ évaporation et nanoprécipitation.

3.1.3. Epaisseur de couche hydrophile

Comme indiqué plus haut, les régressions linéaires de $\ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \zeta}{4 k_B T} \right) \right] = f(k_H)$ nous permettent d'évaluer l'épaisseur de la couche hydrophile localisée à la surface des nanoparticules grâce à la détermination préalable du potentiel Zêta. Dans le cas d'un DexC₆-14, une épaisseur de couche de 11 à 12 nm a été évaluée à la surface des particules, quel que soit le procédé d'élaboration utilisé (Figure 89). Ces valeurs concordent avec l'épaisseur de couche estimée en employant du DexC₆-15 dans des travaux précédents [10]. Dans la Figure 89, l'évolution du potentiel Zêta en fonction du mode de préparation des particules ne montre qu'une très faible différence entre les caractéristiques des couches de dextrane adsorbées à la surface des particules.

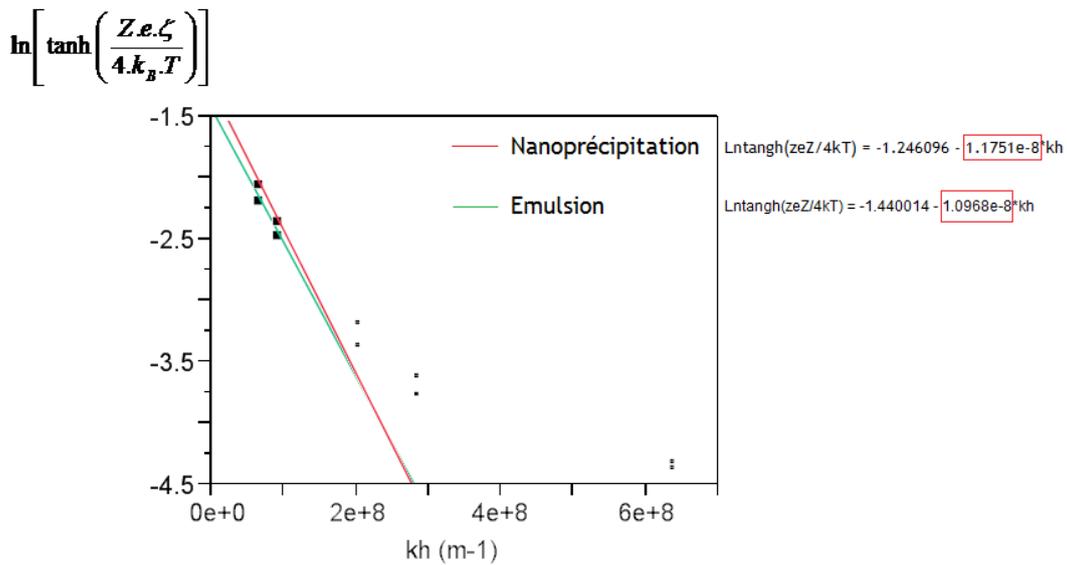


Figure 89 - Représentation graphique de l'utilisation de l'équation de Booth modifiée dans le cas de DexC₆-14 - Epaisseur de couche estimée à 11nm pour les deux procédés.

3.2. Stabilité colloïdale des particules

Les particules colloïdales présentes dans un milieu de dispersion sont toujours sujettes à un mouvement brownien et les collisions entre les particules qui en résultent sont fréquentes. La stabilité colloïdale des dispersions est une caractéristique importante pour l'application que l'on vise. Effectivement, une dispersion doit être stable au stockage, mais aussi lors de l'injection intraveineuse. En effet, l'augmentation de la taille des particules par agglomération ou agrégation pourrait entraîner des conséquences sur l'élimination de celles-ci, sur la cinétique de libération des principes actifs après injection ou encore plus dramatiques si les agrégats venaient à boucher un capillaire sanguin. Cette stabilité colloïdale est liée à l'état de surface de la particule et à la concentration en sel dans le milieu. Elle résulte des forces attractives de Van der Waals et des forces répulsives existant entre les particules lorsque celles-ci rapprochent. Quand les forces attractives dominent, les particules adhèrent les unes aux autres et la dispersion flocule. Par contre, le système se maintient à l'état dispersé si les forces répulsives sont suffisamment importantes. Alors que les forces de Van der Waals sont toujours attractives entre particules de même composition, la répulsion entre particules est générée par 2 effets : répulsion électrostatique pour les particules de charge identique et répulsion stérique lorsqu'une couche de polymère est présente à la surface des particules [15]. Pour que cette stabilisation stérique soit effective, la couche surfacique doit être suffisamment épaisse pour « écranter » les charges en surface des particules.

Les particules que nous avons élaborées sont destinées à des applications médicales et à être injectées dans le sang dont la force ionique avoisine 0.15. Les particules ne doivent donc pas floculer en présence de sel (équivalent à 0.15M NaCl) sous peine de créer des agrégats pouvant conduire à terme à des phénomènes d'embolie. De plus, les tests biologiques ayant été réalisés dans NaCl à 1mol/L (dans le cas de l'anti protéase du VIH-1), les particules doivent être stables dans ces conditions.

3.2.1. Théorie DLVO

La théorie DLVO ou encore l'étude de la turbidité du système permet d'expliquer et d'étudier les phénomènes d'agrégation des suspensions colloïdales. Elle a été développée dans les années 1940 par Derjaguin et Landau (1941) et Verwey et Owerbeek (1948)[16]. Elle stipule que la stabilité d'un système colloïdal est déterminée par la somme des forces de Van der Waals et des forces de répulsion électrostatique existant entre les particules lorsqu'elles se rapprochent comme nous l'avons déjà mentionné. Par conséquent, la somme des énergies (E_{tot}) contribuant à la stabilité des suspensions colloïdales peut s'écrire :

$$E_{tot} = E_{vdW} + E_{elect}$$

Où E_{vdW} est l'énergie attractive négative de Van Der Waals et E_{elect} est l'énergie électrostatique répulsive (positive). Des forces de répulsion stérique sont aussi à considérer entre certaines particules comme on le verra dans ce qui suit. Pour des particules sphériques de même taille, l'énergie de Van der Waals s'exprime par [17]:

$$E_{vdW} = -\frac{A}{6} \left[\frac{2r^2}{h^2 + 4rh} + \frac{2r^2}{h^2 + 4rh + 4r^2} + \ln \left(\frac{h^2 + 4rh}{h^2 + 4rh + 4r^2} \right) \right]$$

Où A est la constante de Hamaker, r est le rayon des particules et h est la distance séparant les surfaces de deux particules.

Enfin, dans le cas d'une densité de charge faible et homogène à la surface des particules, l'énergie électrostatique s'écrit [18]:

$$E_{elect} = 2\pi\epsilon r \left(\frac{4k_B \cdot T \cdot \gamma^2}{Z \cdot e} \right) \exp(-k_H \cdot h)$$

Avec $\gamma = \tanh \left(\frac{Z \cdot e \cdot \psi_s}{4k_B \cdot T} \right)$ et $k_H = \left[\frac{1000 \cdot e^2 \cdot Na \cdot \sum_i (C_i \cdot Z_i)^2}{\epsilon \cdot k_B \cdot T} \right]^{1/2}$ la constante de Debye-Hückel qui

dépend de la force ionique du milieu.

Où :

- $\epsilon = \epsilon_R \cdot \epsilon_0$ (avec ϵ_R la constante diélectrique du milieu et ϵ_0 la permittivité du vide)
- e, la charge élémentaire de l'électron
- Na, le nombre d'Avogadro
- k_B la constante de Boltzmann à la température absolue T du milieu
- ψ_s le potentiel de Stern des particules
- C_i est la concentration de l'ion considéré dans le milieu et Z_i sa valence.

Les forces répulsives empêchent les particules de rentrer en contact (*Figure 90*) alors que les forces attractives les attirent et les maintiennent en contact. La résultante de ces deux types de force donne l'état d'équilibre du système. Un apport d'énergie peut ainsi faire basculer le système d'un état dispersé à un état agrégé ou l'inverse. L'apport minimal d'énergie est appelé barrière énergétique.

Pour qu'une dispersion résiste à l'agrégation ou à la floculation, la force de répulsion (électrostatique ou stérique) doit l'emporter face aux forces d'attraction. Si la répulsion est faible, des phénomènes d'agrégation ou de floculation peuvent être observés après un certain temps.

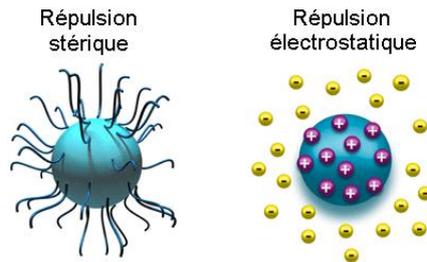


Figure 90 - Répulsions stérique et électrostatique.

Un troisième groupe de forces susceptibles de modifier l'état d'équilibre d'une suspension colloïdale est donc lié à la présence de polymère dans la solution. Ces forces varient avec les interactions entre les trois constituants de système : le polymère, le solvant et la surface des particules.

La stabilisation stérique d'un système colloïdal intervient en général lorsque toute la particule est recouverte d'une couche de polymère d'épaisseur Δ suffisante (*Figure 91*). Ainsi, lorsque deux particules s'approchent l'une de l'autre à une distance inférieure à deux fois l'épaisseur Δ de la couche, les interactions entre les couches de polymère génèrent alors des forces répulsives. La contribution osmotique E_{osm} [19] apparaît dès que la distance entre les deux surfaces des deux particules est inférieure à 2Δ . On considère alors que les couches adsorbées peuvent s'interpénétrer et créer une région d'enchevêtrement qui présente une importante densité en polymère. Du fait de l'importance de la pression osmotique s'exerçant sur la région d'enchevêtrement comparée à celle qui s'exerce sur le reste de la surface, un flux de solvant est spontanément généré en direction de cette région, séparant ainsi les particules l'une de l'autre. La contribution osmotique (E_{osm}) est donnée par :

$$E_{osm} = \frac{4\pi r}{v_1} (\Phi_2)^2 \left(\frac{1}{2} - \chi \right) \left(\Delta - \frac{h}{2} \right)^2$$

Avec :

- v_1 le volume molaire du solvant
- ϕ_2 la fraction volumique de polymère dans la couche adsorbée
- χ le paramètre de solubilité de Flory-Huggins.

Pour un bon solvant ($\chi \ll 1/2$), l'énergie mise en jeu est positive et donc la force inter-particulaire générée sera répulsive. Lorsque les deux particules continuent à s'approcher l'une de l'autre à une distance inférieure à Δ , alors les chaînes de polymère sont comprimées. Cette compression élastique correspond à une perte d'entropie, qui génère une nouvelle énergie répulsive notée E_{elast} et implique une modification de la contribution osmotique :

$$E_{osm} = \frac{4\pi r}{v_1} (\Phi_2)^2 \left(\frac{1}{2} - \chi \right) \Delta^2 \left[\frac{h}{2\Delta} - \frac{1}{4} - \ln \left(\frac{h}{\Delta} \right) \right]$$

$$E_{elast} = \left(\frac{2\pi r}{M_w} \cdot \phi_2 \cdot \Delta^2 \cdot \rho_2 \right) \left[\frac{h}{\Delta} \ln \left(\frac{h}{\Delta} \left(\frac{3 - \frac{h}{\Delta}}{2} \right)^2 \right) - 6 \ln \left(\frac{3 - \frac{h}{\Delta}}{2} \right) + 3 \left(1 - \frac{h}{\Delta} \right) \right] \text{ où } \rho_2 \text{ est la densité du polymère.}$$

L'énergie totale d'interaction entre deux particules recouvertes de polymère, est couramment calculée comme étant la somme de toutes les énergies attractives et répulsives :

$$E_{tot} = E_{vdW} + E_{elect} + E_{osm} + E_{elast}$$

Cependant, le principe de cette additivité a souvent été discuté, notamment sur le fait que les différentes énergies mises en jeu ne sont pas totalement indépendantes [20].

Pour conclure, les conditions nécessaires pour parvenir à la stabilisation stérique des particules recouvertes d'une couche de polymère sont les suivantes :

- un taux de recouvrement élevé
- une grande énergie d'interaction entre la surface et les segments directement adsorbés, pour un ancrage ferme du polymère à l'interface.
- Des segments en boucles et en queue étendus dans la solution, soit $\chi \ll 1/2$.

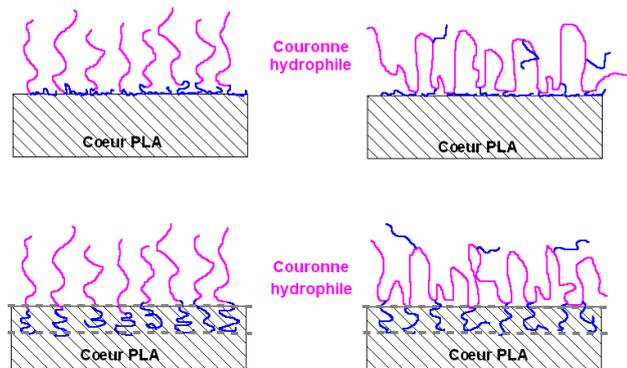


Figure 91 - Adsorption de la couronne de dextrane à la surface des nanoparticules de PLA. Les deux schémas de gauche représentent le cas de polymères amphiphiles diblocs alors que les deux de droite représentent les polymères amphiphiles greffés. La zone de pénétration des chaînes hydrophobes dans le cœur PLA représente la zone d'enchevêtrement et dépend de la nature du bloc hydrophobe.

3.2.2. Etude de la stabilité colloïdale des particules cœur/couronne formulées

Comme nous l'avons mentionné, les particules de PLA « nues » sont hydrophobes et chargées négativement en surface. La charge négative permet aux forces de répulsion électrostatique de maintenir ces particules séparées dans un milieu neutre. Mais, lorsque la force ionique du milieu augmente, les charges dans le milieu écrantent les charges en surface et donc la force répulsive. Gavory et al. [11] a récemment démontré que des nanoparticules de PLA « nues » flocculaient à une concentration en NaCl de 10^{-3} M, alors que les mêmes particules recouvertes d'une couronne hydrophile restaient stables dans ces conditions.

Dans notre cas, la stabilité des nanoparticules formulées est due au dérivé amphiphile du dextrane présent à leur surface. Une force de répulsion stérique vient alors s'ajouter à la force de répulsion électrostatique. Si l'épaisseur de la couche de dextrane à la surface est assez importante, la répulsion stérique permet de garder les particules séparées, même dans un milieu de force ionique importante. Dans le travail présenté ci-après, toutes les mesures de floculation ont été réalisées par turbidimétrie. En effet, l'instabilité du système se manifeste par une augmentation soudaine de la turbidité τ de la dispersion. Quand le rayon des particules est inférieur à $\lambda/5$, la théorie de Rayleigh est applicable et la turbidité de la suspension est donnée par [18]:

$$\tau = B.n_0.V^2$$

Où :

- B est une constante optique
- n_0 est le nombre initial de particules
- V est le volume des particules

De plus, la valeur de la turbidité peut-être obtenue à partir de la densité optique DO de la suspension selon la relation :

$$\tau = 2,303DO/l$$

Avec l l'épaisseur de l'échantillon.

Sachant que la formation d'agrégats de particules conduit à une augmentation de la turbidité de la dispersion, la méthode directe de turbidimétrie consiste à mesurer la densité optique de la suspension, dans le domaine visible à l'aide d'un spectrophotomètre. Il est ainsi possible d'observer l'évolution d'un système colloïdal au cours du temps et/ou en fonction de la température. L'évolution de la turbidité en fonction du temps est donnée par la relation [21]:

$$\tau = B.n_0.V^2(1 + 2.k.n_0.t)$$

Avec k la constante de vitesse de floculation.

En réalité, les courbes expérimentales $\tau=f(t)$ s'incurvent rapidement car la diffusion de Rayleigh n'est plus applicable dès que les agrégats sont constitués de plus de deux particules. Long et coll. [22] ont alors imaginé une méthode permettant de détecter de faibles degrés de floculation pour les dispersions colloïdales. Cette technique est basée sur la mesure de la turbidité dans une plage adaptée de longueurs d'onde (400 - 600 nm), et le calcul de la pente des droites ($\log DO$) en fonction de ($\log \lambda$). La valeur absolue $|n|$ de cette pente est environ égale à 4 pour une diffusion de Rayleigh, en absence de diffusion multiple. Au fur et à mesure que la taille des particules augmente, la valeur de $|n|$ diminue, du moins tant que les agrégats présentent une taille intermédiaire entre les domaines d'application de la diffusion de Rayleigh et de la théorie de Mie. Enfin, il est important de souligner qu'en l'absence de diffusion multiple la valeur de $|n|$ ne dépend pas de la concentration en latex de la dispersion colloïdale, dans les conditions utilisées [23].

Une chute de la courbe $|n|=f(\text{force ionique})$ correspondant à une augmentation de la turbidité et donc à une floculation de la suspension. Plus le facteur $|n|$ est grand et plus la taille des particules présentes dans la suspension est faible. La Figure 92 représente le facteur $|n|$, indicateur d'une floculation de la suspension, en fonction de la concentration en NaCl dans le milieu dans le cas de nanoparticules recouvertes de DexC₆-14 préparées par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant.

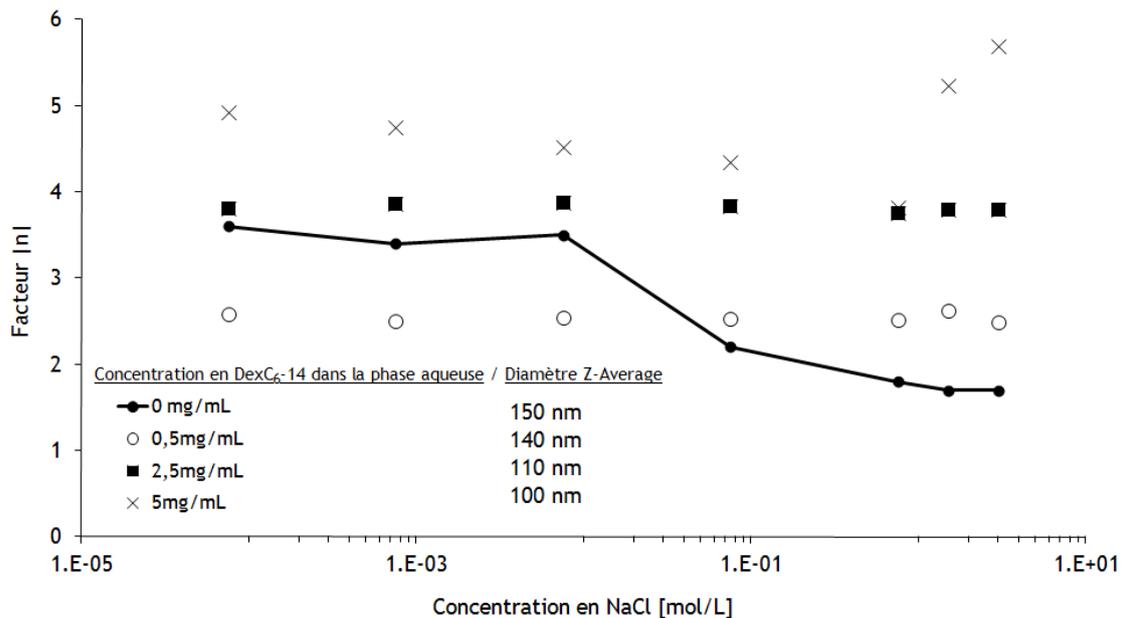


Figure 92 - Représentation de la stabilité colloïdale des suspensions de particules de PLA nues (point+ligne) et recouvertes de DexC₆-14 (points) obtenues par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant. Le dichlorométhane est utilisé comme solvant organique.

Sur la Figure 92 on note que quelle que soit la quantité de DexC₆ dans la phase aqueuse lors de l'émulsion, la suspension de particule reste stable, et ce jusqu'à 4M en NaCl, exception faite du PLA natif qui flocule à des concentrations en NaCl proche de 10⁻²M. On peut observer une augmentation brutale de $|n|$ dans le cas où le DexC₆-14 est solubilisé à 5mg/mL dans la phase aqueuse lors de l'élaboration des particules.

Une tendance similaire est observée avec les particules élaborées par nanoprécipitation (Figure 93). Cependant, dans ce dernier cas, les facteurs $|n|$ sont équivalents, confirmant l'impact négligeable de la concentration en DexC₆ utilisée dans ce procédé sur la taille mesurée des nanoparticules (voir précédemment).

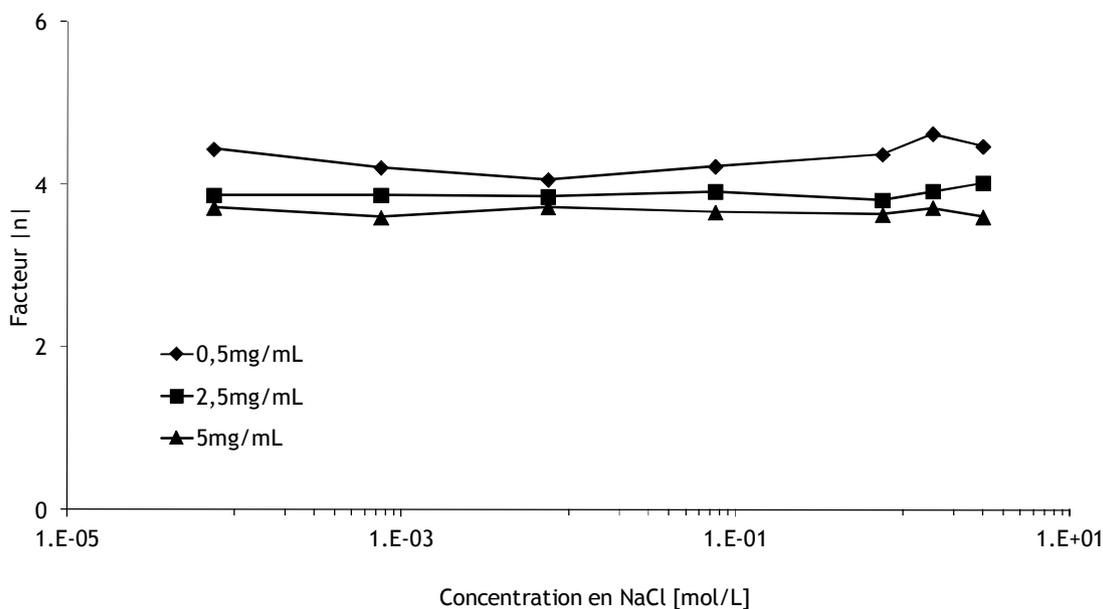


Figure 93 - Représentation de la stabilité colloïdale des suspensions de particules recouvertes de DexC₆-14 obtenues par le procédé de nanoprécipitation.

Néanmoins, cette stabilité est-elle observée quel que soit le taux de modification des DexC₆ employé pour la formulation des particules? Pour étudier l'influence de ce paramètre, la stabilité des particules a été étudiée en comparant des nano-objets préparés par les 2 procédés et à l'aide de divers DexC₆.

Nous avons tout d'abord évalué la stabilité colloïdale de nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation de solvant en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant organique (Figure 94).

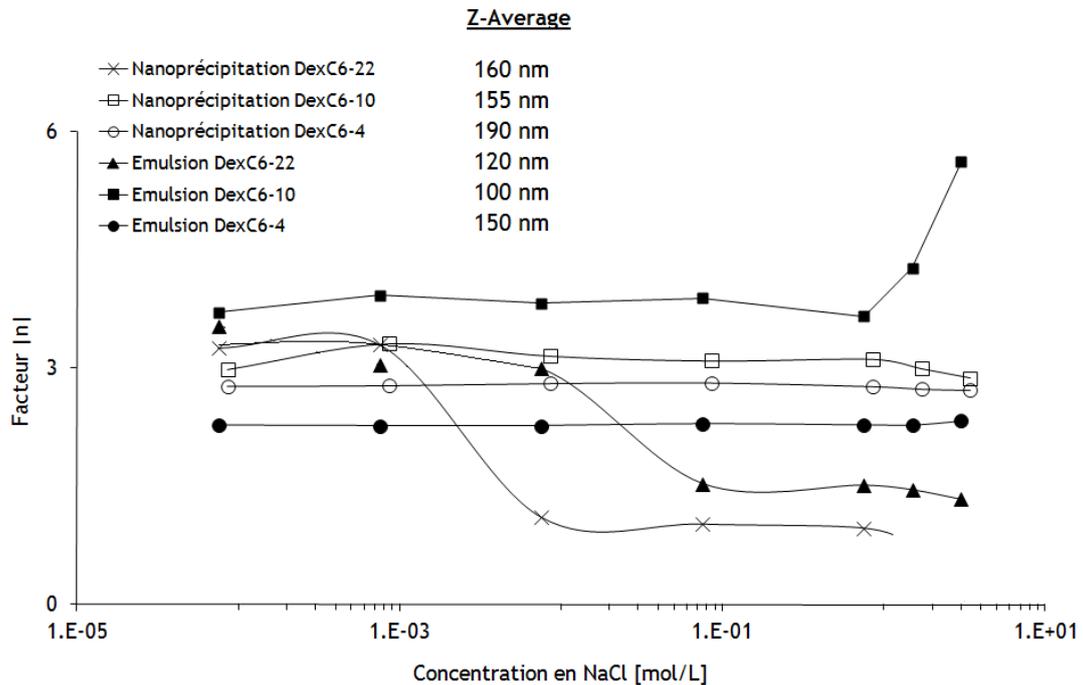


Figure 94 - Stabilité colloïdale des particules obtenues par émulsion/évaporation de solvant en utilisant l'acétate d'éthyle et par nanoprécipitation en utilisant le CH_2Cl_2 en fonction du taux de substitution des DexC_6 employés lors de leur formulation. La concentration en DexC_6 dans la phase aqueuse est de 5mg/mL dans les deux procédés.

Sur la Figure 94 il apparaît nettement une chute du facteur $|n|$ lorsque les particules sont élaborées à l'aide de DexC_6 à fort taux de substitution. Lorsque les taux de modification des DexC_6 restent faibles ($\text{DS} < 15\%$) les particules restent stables jusqu'à 4M en NaCl et ce quel que soit le procédé d'élaboration employé. Cependant, lorsque le taux de modification du dextrane dépasse les 15%, on observe une floculation des particules. En effet, un taux de modification des DexC_6 plus élevé implique certes une meilleure adsorption du DexC_6 sur le cœur de la particule mais aussi une plus grande quantité de chaînes alkyle non adsorbées à la surface de la particule qui favorisent des interactions hydrophobes inter-particules et conduisent à une agrégation de la suspension.

Les tests biologiques pouvant durer jusqu'à plusieurs jours, il était également important de contrôler la stabilité des particules en milieu salin sur une telle durée. Les suspensions salines de particules sont donc laissées sous agitation magnétique et la turbidité de la suspension est mesurée tous les jours. La Figure 95 représente 3 séries de données au début, au milieu et à la fin de l'étude.

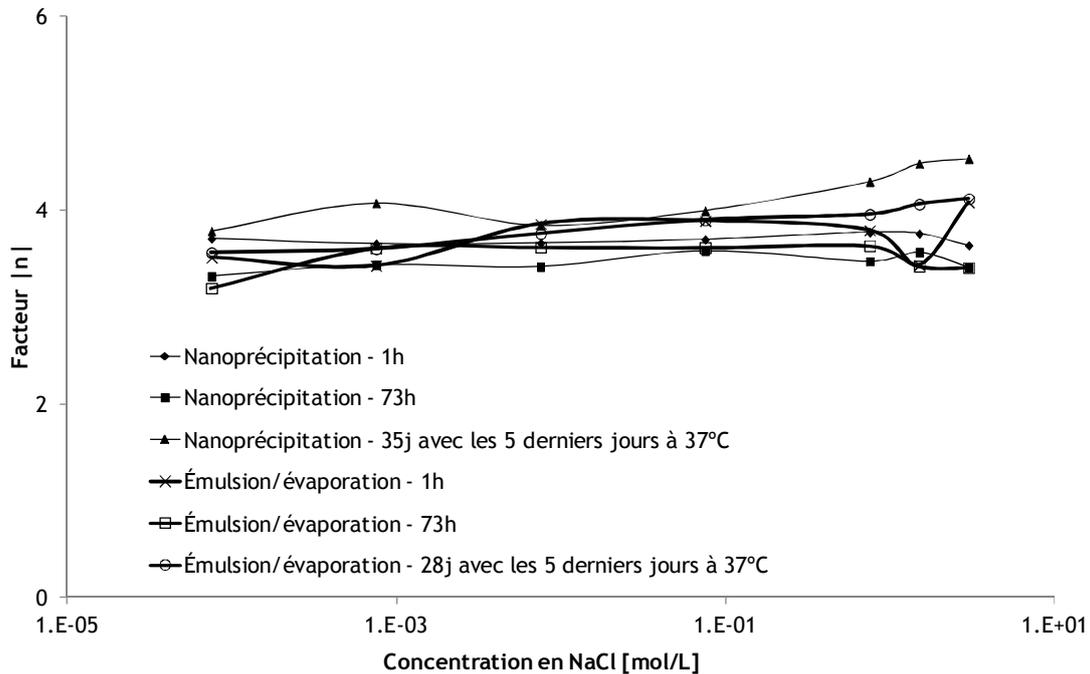


Figure 95 - Stabilité colloïdale des nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation et par nanoprécipitation avec DexC₆-14

Comme nous pouvons clairement le voir, aucune floculation n'a eu lieu durant les 28 jours de tests dans le cas des particules élaborées par émulsion/évaporation. Des résultats identiques ont été observés avec des suspensions de particules élaborées par nanoprécipitation.

3.3. Etude du taux de recouvrement

Après avoir étudié les paramètres expérimentaux influençant le diamètre moyen des nanoparticules et leur stabilité colloïdale, il nous a paru pertinent d'étudier le taux de recouvrement de ces nano-objets par la couronne hydrophile dextrane. Nous exprimerons tout d'abord ce taux par le rapport massique entre le DexC₆ et le PLA présent dans une particule.

Alors que ce taux de recouvrement était auparavant évalué par dosage direct ou indirect par l'anthrone, nous avons opté pour un dosage direct par RMN ¹H. Le dosage par anthrone était basé sur une réaction de l'anthrone avec les motifs glucoses du dextrane en milieu acide, ce qui conduit à la formation d'un complexe vert quantifiable par spectrométrie UV-visible [10]. Un dosage indirect consistait à évaluer la quantité de DexC₆ dans les solutions de lavage n'ayant pas participé au recouvrement des particules et restant solubilisé dans la phase aqueuse. Parallèlement les particules cœur PLA/couronne polysaccharide étaient détruites par une solution de soude avant le dosage par anthrone du DexC₆ alors libéré (dosage direct).

Le dosage RMN ^1H consiste quant à lui à dissoudre les particules cœur PLA/couronne DexC₆ dans le DMSO-d₆, solvant commun à ces deux composés. Sur le spectre RMN ^1H obtenu il nous est possible d'identifier indépendamment les pics relatifs aux protons du PLA et du DexC₆ (Figure 96) et ainsi nous pouvons facilement quantifier la quantité de DexC₆ par rapport à la quantité de PLA présente. En utilisant les masses molaires des unités monomères de chacun de ces composés, il est ainsi possible d'évaluer la masse de DexC₆ présent à la surface des particules par gramme de PLA.

Le pic caractéristique du proton anomère (4,67 ppm) est connu et repéré (Figure 96), ainsi que les protons correspondant à la chaîne alkyle en C₆ (0,9 - 1,2 et 1,5 ppm). De la même façon, les protons relatifs au PLA sont parfaitement identifiés. En effectuant le rapport des aires des pics correspondants, on peut par exemple vérifier que le DexC₆ conserve son taux de modification lors de la formulation des nanoparticules. Puis, la masse de DexC₆ par gramme de PLA est évaluée par l'équation suivante :

$$\frac{A_{H_{\text{anomérique}}} \cdot \text{MasseMolaire}_{\text{DexC}_6}}{A_{H_{\text{PLA}}} \cdot \text{MasseMolaire}_{\text{PLA}}} = \text{DexC}_6 (\text{mg} / \text{g}_{\text{PLA}})$$

Où :

$A_{\text{Hanomère}}$: Aire du pic à 4.67 ppm correspondant aux protons anomères du DexC₆

A_{CHPLA} : Aire du pic à 5.20 ppm correspondant aux protons méthyne du PLA

Masse Molaire de l'unité monomère du DexC₆-DS (185 g/mol pour un DS=14%) calculée par la formule $M_{\text{DexC}_6\text{-DS}} = \text{DS} \times M_{\text{DexC}_6\text{-100}} + (100 - \text{DS}) \times M_{\text{Dextrane}}$ avec DS le taux de modification du dextrane.

Masse Molaire de l'unité monomère du PLA = 72 g/mol

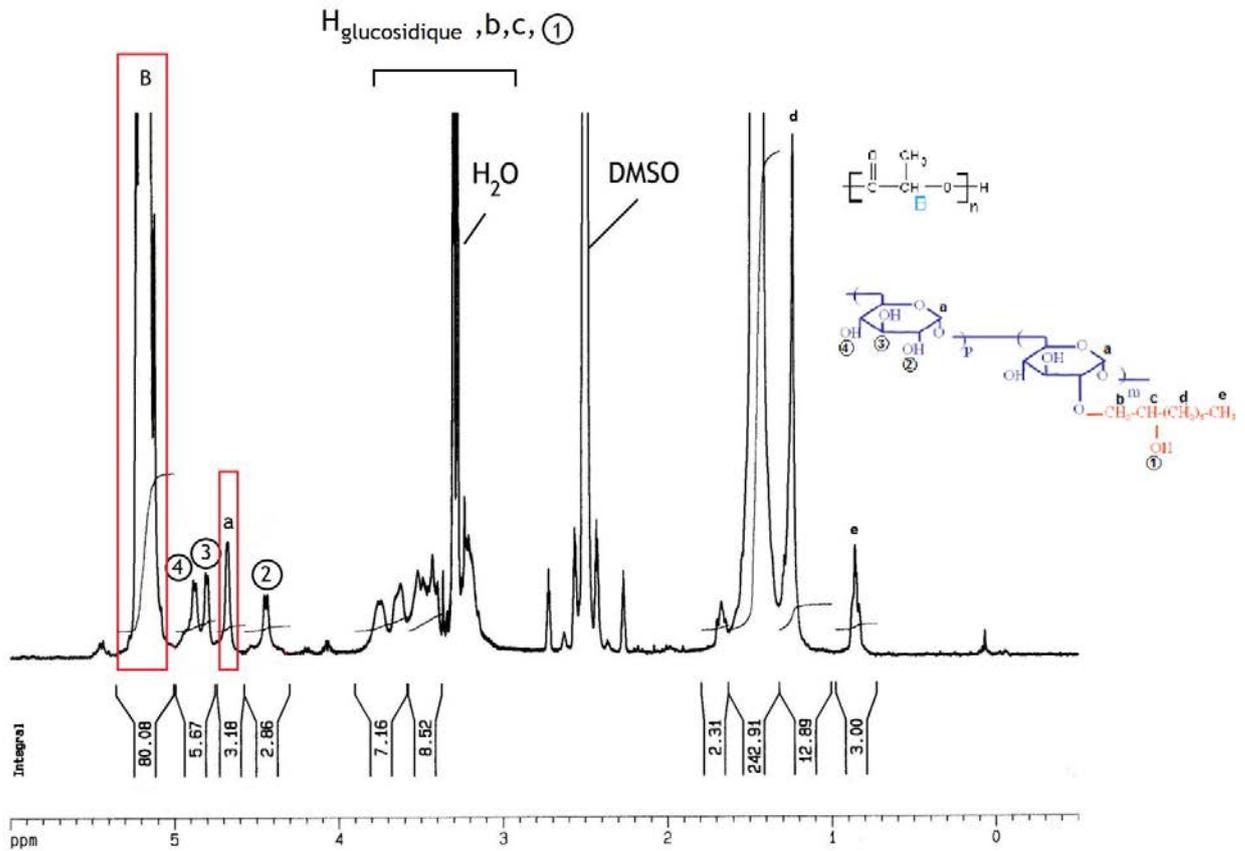


Figure 96 - Spectre RMN ¹H des particules de PLA recouvertes de DexC₆ après lavage et redissoutes dans le DMSO-d₆

En utilisant un calcul similaire, on peut également estimer la quantité de dextrans par gramme de PLA. Cette méthode nous permet alors de nous affranchir de la masse de la chaîne alkyle (et permettra des comparaisons ultérieures entre différents systèmes).

$$\frac{A_{H_{\text{anomérique}}} \cdot \text{MasseMolaire}_{\text{Dextrans}}}{A_{H_{\text{PLA}}} \cdot \text{MasseMolaire}_{\text{PLA}}} = \text{Dextrans}(\text{mg} / \text{g}_{\text{PLA}})$$

Où :

Masse Molaire de l'unité monomère du Dextrans natif = 162 g/mol

Masse Molaire de l'unité monomère du PLA = 72 g/mol

Des nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation de solvant (d'un diamètre approximatif de 120 nm) et par nanopréciipitation (d'un diamètre approximatif de 155 nm) en employant le DexC₆-14 comme tensioactif ont ainsi été caractérisées. Les valeurs mesurées par RMN ¹H nous indiquent que les nanoparticules élaborées par nanopréciipitation présentent deux fois moins de DexC₆ (ou de dextrans) par gramme de PLA que les nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation de solvant (Tableau 15).

Tableau 15 - Quantité de DexC₆-14 (ou de dextrane) présent sur les particules (avec initialement une concentration en DexC₆-14 de 5mg/mL dans la phase aqueuse) analysées par RMN ¹H

	Emulsion/évaporation de solvant	Nanoprécipitation
mg de DexC ₆ -14/g dePLA (± 5%) Mesuré par RMN ¹ H	240	105
mg de Dextrane/g dePLA (± 5%) Mesuré par RMN ¹ H	216	94
Epaisseur de couche (nm)	11	12

Si on confronte ces données avec les résultats que nous avons obtenus sur l'épaisseur de la couche polysaccharide, estimée par les mesures de potentiels Zêta (lesquelles sont similaires quel que soit le procédé de formulation), on peut prétendre que la couche de DexC₆-14 est plus dense à la surface des particules élaborées par émulsion / évaporation de solvant.

En corrélant ces données aux mesures de tailles moyennes pour chaque type de particules, nous pouvons exprimer de façon plus rigoureuse le taux de recouvrement en mg de DexC₆ par m² et par gramme de PLA (Tableau 16).

Tableau 16 - Calcul du taux de recouvrement des nanoparticules de PLA par le DexC₆-14

	Nanoprécipitation	Emulsion/Evaporation
Diamètre d'une particule (nm)	155	120
Epaisseur de couche par Potentiel Zêta (nm)	12	11
Surface d'une particule de PLA (m ²)	5.4E-14	3.0E-14
Surface effective totale pour 1g de PLA (m ² /g PLA)	36.4	48.6
Quantité de DexC ₆ -14/g de PLA par RMN (mg DexC ₆ /g PLA)	105	240
Taux de recouvrement pour 1g de PLA (mg DexC ₆ /m ²)	2.9	4.9

Avec :

$$\text{Surface d'une particule : } S = 4\pi r^2 \text{ et } r = \left[\frac{\text{Diamètre}_{\text{particule}}}{2} \right] - \text{Epaisseur}_{\text{Zêta}}$$

Surface effective totale pour 1 g de PLA = Nombre de particules dans 1 g de PLA multiplié par la surface d'une particule.

$$\text{Nombre de particules dans 1 g de PLA} = \frac{\frac{m_{\text{PLA}}}{d_{\text{PLA}}}}{\frac{4}{3} \pi \left(\frac{\text{Diamètre}_{\text{particule}}}{2} - \text{Epaisseur}_{\text{Zêta}} \right)^3}$$

Notons qu'un taux de recouvrement similaire à ceux indiqués dans le Tableau 4 avait été estimé par la méthode de l'antrone par Céline Rouzes [10] dans le cas de nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation en présence de DexC₆-15.

En se basant sur les quantités de DexC₆ par gramme de PLA calculées par RMN ¹H, le *Tableau 16* nous indique que le procédé d'émulsion/évaporation de solvant permet d'obtenir une couche surfacique 1,8 fois plus dense que celle obtenue lorsque la nanoprécipitation est employée. L'ancrage des chaînes alkyle de DexC₆ à la surface des particules n'est sans doute pas identique selon le procédé employé. Il semblerait donc que le procédé d'émulsion/évaporation de solvant permette une plus forte adsorption des chaînes alkyle du DexC₆ dans le cœur PLA durant le procédé. Le procédé de nanoprécipitation est quant à lui beaucoup moins efficace et la couche de dextrane adsorbée est vraisemblablement moins dense.

Cependant quels que soient la densité de cette couche et le procédé employé, les analyses de stabilité colloïdale effectuées avaient révélé que les particules obtenues présentaient une stabilité colloïdale comparable dans des milieux salins jusqu'à 4M, et ce même sur une longue période.

3.4. Stabilité colloïdale des nanoparticules en présence de Sodium Dodécyle Sulfate (SDS)

Après injection intraveineuse, les nanoparticules recouvertes d'une couche hydrophile sont sujettes à l'adsorption potentielle de protéines circulantes. En utilisant l'Albumine de Sérum Bovin (BSA) comme protéine modèle, Céline Rouzès [10] avait démontré que la couche surfacique en DexC₆ prévenait l'adhésion de cette protéine à la surface des particules ce qui laisse supposer que ces particules ont bien un caractère « furtif ». Cette couche DexC₆ était donc « suffisamment ancrée » au cœur PLA puisqu'aucune désorption de la couche de surface n'avait été observé pendant la phase de contact avec la BSA (Concentration en BSA jusqu'à 700mg/L).

Afin d'évaluer la « force » de l'ancrage de la couronne polysaccharide sur le cœur PLA, la stabilité colloïdale des particules en présence de tensioactif ionique (SDS) a été étudiée. Le SDS a déjà été reporté dans la littérature pour désorber des couches polymère de surface [24][25][26][27]. Les études menées précédemment au LCPM sur les particules cœur PLA/couronne DexC₆, élaborées par émulsion/évaporation de solvant, avaient montré que la totalité de la couronne DexC₆ se désorbait totalement en présence de SDS à 1 g/L dans la phase aqueuse de la suspension.

Après élaboration des particules et lavages, 1% massique de SDS est donc ajouté aux suspensions aqueuses de nanoparticules que nous avons formulées par les 2 procédés. Les suspensions sont laissées sous agitation pendant 24h, puis lavées et lyophilisées. Un spectre RMN ¹H du produit est alors réalisé dans le DMSO-d₆. On observe sur la *Figure 97* et dans le *Tableau 17* une disparition totale du DexC₆ pour les nanoparticules ayant été mises en présence de SDS. Ce comportement est observé quel que soit le mode d'élaboration des nano-objets. Il semble donc que les molécules de SDS, en raison de leur grande affinité pour la surface hydrophobe [28] déplacent les chaînes de DexC₆-14 par adsorption compétitive et/ou en déstructurant la surface de PLA.

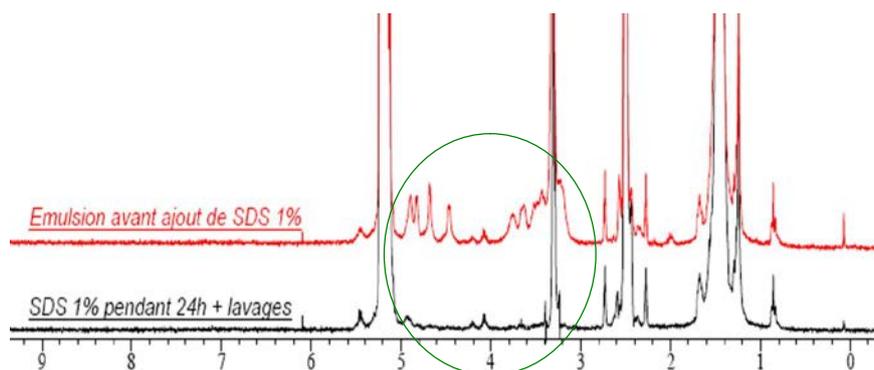


Figure 97 - spectre RMN ^1H dans le DMSO-d_6 des nanoparticules réalisées par émulsion/évaporation de solvant avant et après contact avec le SDS. En vert les pics caractéristiques des protons OH et glucosidiques du $\text{DexC}_6\text{-14}$.

Tableau 17 - Quantité de $\text{DexC}_6\text{-14}$ et de dextrane avant et après ajout de SDS dans la solution aqueuse. Comparaison des deux procédés.

	Avant ajout de SDS		Après ajout de SDS	
	mg de $\text{DexC}_6\text{-14/g}$ dePLA	mg de Dextrane/g dePLA	mg de $\text{DexC}_6\text{-14/g}$ dePLA	mg de Dextrane/g dePLA
Emulsion/évaporation de solvant	240	216	0	0
Nanoprécipitation	105	94	0	0

Dans les deux cas, les molécules de $\text{DexC}_6\text{-14}$ sont donc très faiblement ancrées à la surface des nanoparticules de PLA et on peut supposer qu'en présence de fluides biologiques, les couronnes de DexC_6 auront le même comportement.

En raison de la faible stabilité de la couronne de DexC_6 , il nous a donc semblé nécessaire de fixer directement la surface polysaccharide au cœur PLA de particules par liaison covalente par exemple. C'est ce que nous entreprendrons dans le prochain chapitre de ce manuscrit.

4. Etude de l'encapsulation du Pam-LEY

4.1. Solubilité du Pam-LEY

Pour vérifier la faisabilité de l'encapsulation du Pam-LEY au sein des nanoparticules, nous avons tout d'abord étudié la solubilité du peptide dans différents solvants susceptibles d'être employés lors de l'élaboration des nanoparticules. Il s'agissait de trouver un bon solvant du peptide pour empêcher sa précipitation lors de l'élaboration des nanoparticules. Les solvants organiques employés dans le procédé d'émulsion/évaporation de solvants sont le dichlorométhane ou l'acétate d'éthyle [29]. Quant au procédé de nanoprecipitation, nous aurons recours à l'acétone.

Pour cela, nous avons dissout 1 mg/mL de Pam-LEY dans différents milieux représentatifs de ceux qui seront progressivement rencontrés lors des procédés d'élaboration des particules. Les solutions sont laissées sous agitation durant 24h. Elles sont ensuite centrifugées à grande vitesse de façon à précipiter le peptide non dissout dans le culot du tube de centrifugation. Le surnageant est prélevé et injecté dans une colonne HPLC. Le peptide est analysé par U.V. à 280 nm (protocole dans le chapitre Matériels et Méthodes). La Figure 98 représente la solubilité du peptide dans les milieux analysés.

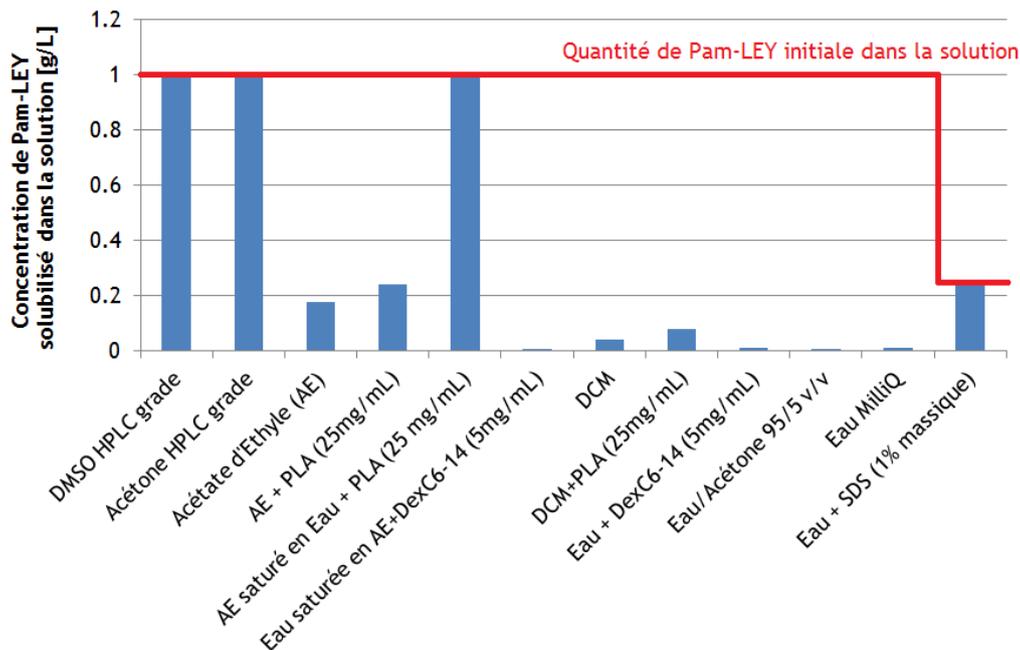


Figure 98 - Solubilité du Pam-LEY dans différents milieux rencontrés lors de l'élaboration des nanoparticules de PLA recouvertes de DexC₆-14.

L'acétone et le DMSO s'avèrent être de très bons solvants pour le peptide (solubilité supérieure à 1mg/mL). L'encapsulation du Pam-LEY par le procédé de nanoprecipitation sera donc possible. Le DMSO quant à lui nous permettra de doser le Pam-LEY encapsulé dans la particule.

L'acétate d'éthyle est lui aussi un très bon solvant (solubilité supérieure à 1mg/mL) lorsqu'il est saturé en eau. Une explication provient du fait que le peptide possède 3 acides aminés et une chaîne carbonée en C₁₆. Il doit donc se comporter comme une molécule amphiphile et nécessiter un peu d'eau pour se solubiliser dans l'acétate d'éthyle. On peut aussi penser que le DMSO et l'acétone étant très hygroscopiques, la faible quantité d'eau présente dans ces solvants doit permettre une dissolution aisée du peptide.

Le dichlorométhane étant très peu polaire, il ne permet pas de solubiliser suffisamment le Pam-LEY. En conclusion, nous allons donc devoir utiliser l'acétate d'éthyle saturé en eau comme phase organique lors du procédé d'émulsion/évaporation de solvant pour encapsuler le Pam-LEY.

La solution eau+DexC₆-14 solubilise le peptide en moindre quantité comparé aux solvants organiques (acétone ou acétate d'éthyle) que nous avons sélectionnés. Par conséquent, nous supposons que le peptide sera présent en quantité bien plus grande dans nos phases organiques durant les deux procédés d'élaboration, et donc au cœur de la particule finale.

L'eau étant un très mauvais solvant du Pam-LEY, les lavages des particules à l'eau seront possibles et aucune perte de peptide ne devrait être observée durant ces procédés de lavage. Par contre il est très difficile d'imaginer une libération ultérieure du Pam-LEY dans de l'eau. Le peptide étant totalement non soluble en phase aqueuse, sa libération hors des particules sera lente et ne s'effectuera que par dégradation de celles-ci et très peu par diffusion hors de la particule. Nous avons alors entrepris d'étudier la libération du Pam-LEY dans une solution aqueuse contenant du SDS. Aussi, une étude de la solubilité du Pam-LEY a également été réalisée avec une solution aqueuse de SDS à 1% massique en y solubilisant le Pam-LEY à 0,25 mg/mL. Une étude de libération en présence de BSA n'est pas possible car la protéine interfère beaucoup avec la méthode de dosage utilisée.

4.2. Encapsulation du Pam-LEY

Le taux d'encapsulation du Pam-LEY dans nos particules réalisées par les deux procédés de formulation a été mesuré par U.V.. Pour chaque lot de particules, nous avons les solutions suivantes :

- Dans le cas de l'élaboration par émulsion/évaporation de solvant: (25 mg de PLA + 1 mg de Pam-LEY + 1 mL d'acétate d'éthyle saturée en eau) et (50 mg de DexC₆-14 + 10 mL d'eau).
- Dans le cas de l'élaboration par nanopréciipitation : (25 mg de PLA + 1 mg de Pam-LEY + 5 mL d'acétone) et (50 mg de DexC₆-14 + 10 mL d'eau).

Une fois lavées, les nanoparticules sont lyophilisées sans tréhalose puis dissoutes dans du DMSO. On mesure ensuite l'absorbance de la solution et on obtient la concentration en Pam-LEY dans la cuve à l'aide des courbes de calibrations préalablement définies. Ainsi, nous avons vérifié qu'aucun des solvants utilisés pour réaliser les dosages direct et indirect en U.V. n'absorbe à la même longueur d'onde que le peptide, à 280 nm. On trouve ainsi que le procédé d'émulsion/évaporation de solvant permet d'encapsuler 40% du Pam-LEY introduit. 30% de Pam-LEY est encapsulé lorsque les nanoparticules sont formulées par le procédé de nanopréciipitation. Comme nous l'avons montré *Figure 98*, l'acétone est un excellent solvant du Pam-LEY. Or lors du procédé de nanopréciipitation, après injection de la phase organique dans la phase précipitante et avant évaporation du solvant, la suspension de nanoparticules est alors en présence d'un mélange 10 mL d'eau pour 5 mL d'acétone. Il est possible que cette quantité d'acétone dans la phase aqueuse permette une solubilisation du peptide dans la phase liquide, lequel sera alors ensuite éliminé lors des lavages.

4.3. Etude de la libération du Pam-LEY

Afin d'étudier la cinétique de libération du Pam-LEY hors des particules cœur PLA/couronne DexC₆, celles-ci sont tout d'abord lyophilisées puis redispersées dans une solution aqueuse à 1% massique de SDS. La suspension des particules dans cette solution aqueuse de SDS est agitée magnétiquement à 37°C. Pour chaque mesure, on prélève 3mL de cette suspension (particules+H₂O+SDS) que l'on centrifuge à 40 000 tr/min pendant 20min. 1.5mL de surnageant est prélevé pour le dosage U.V.. On dose alors le peptide présent dans ce surnageant et donc libéré (dosage direct). Le culot, séché sous vide dynamique pendant 1 nuit est ensuite redissout dans 1.5mL de DMSO et dosé par U.V.. On mesure alors le peptide contenu dans cette solution et donc encore contenu dans les particules, non libéré (dosage indirect).

Remarque : Les mesures sont réalisées jusqu'à épuisement total de la phase dispersante (H₂O + SDS). Aucun ajout de solution aqueuse de SDS n'est réalisé après chaque prélèvement.

La Figure 99 représente les spectres en U.V. du DMSO, d'une solution aqueuse de SDS ainsi que d'une solution aqueuse de DexC₆-14. Ici la référence utilisée pour la calibration de l'appareil est l'eau MilliQ.

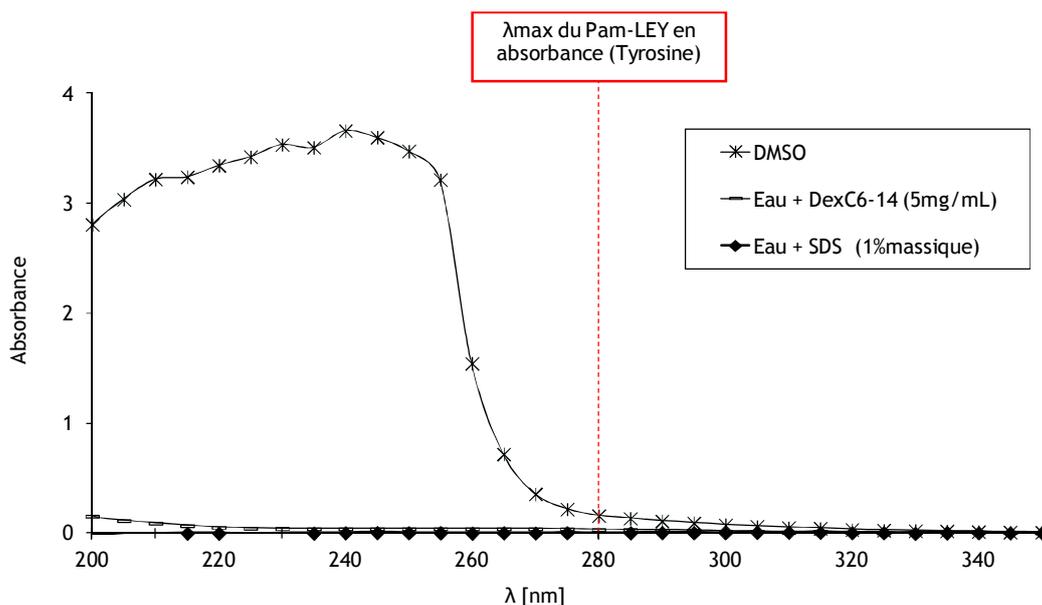


Figure 99 - Spectre U.V. des différentes solutions présentes lors du dosage du Pam-LEY. Référence utilisée: eau MilliQ.

Le peptide se caractérise quant à lui en U.V. par une absorbance à 280 nm due à la présence du cycle aromatique de la Tyrosine.

La concentration du peptide dans le surnageant, ou encore contenu dans les particules, est estimée à partir de courbes de calibration réalisées dans le SDS (1% massique) et dans le DMSO, respectivement (Figure 100).

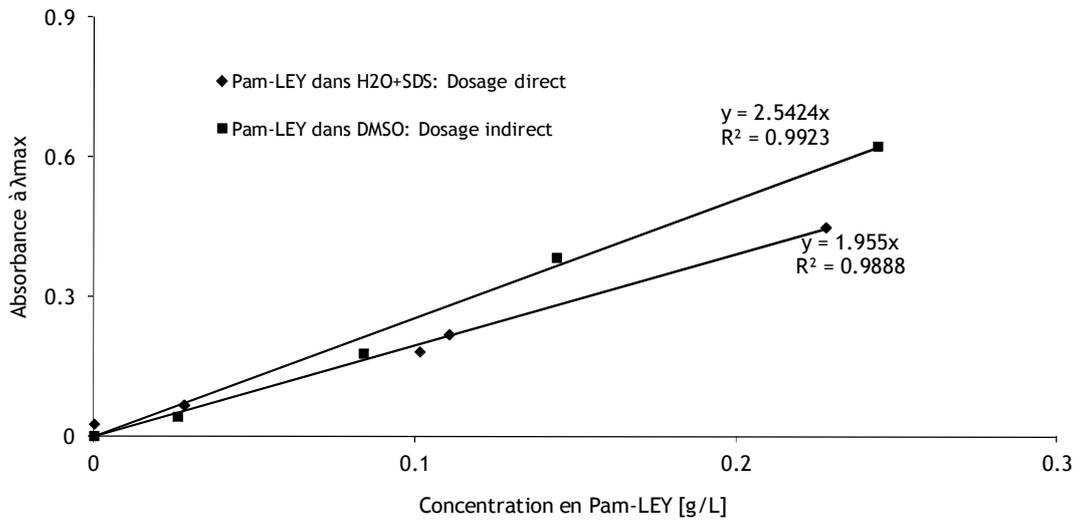


Figure 100 - Courbe de Calibration du Pam-LEY dans une solution aqueuse de SDS (losanges) et dans le DMSO (Carrés)

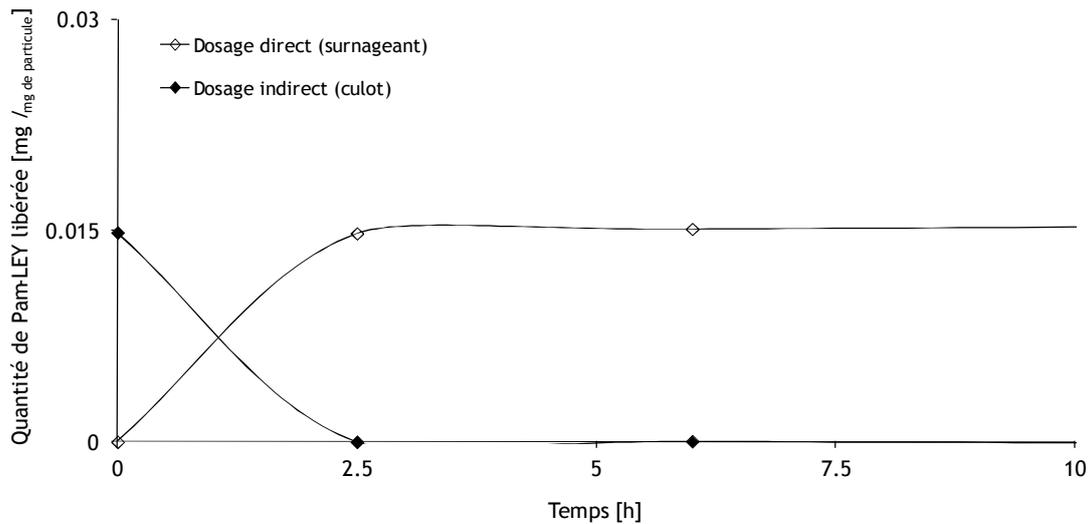


Figure 101 - Dosage de la quantité de Pam-LEY libérée. Cas des nanoparticules élaborées par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant avec de l'acétate d'éthyle saturée en eau.

La Figure 101 représente la courbe de libération du Pam-LEY encapsulé dans des nanoparticules formulées par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant (solvant organique : acétate d'éthyle) et libéré dans une solution aqueuse de SDS 1%. Très rapidement, après seulement 2h30, un palier de libération est obtenu. Si l'on calcule la quantité de peptide libéré par rapport à celle encapsulée dans les particules (0,4 mg/25 mg de PLA, soit 0,016 mg de peptide par mg de particules) on peut conclure que tout le peptide encapsulé est libéré.

Comme on peut le remarquer sur la *Figure 102* qui compare les deux procédés d'encapsulation testés, nous obtenons une courbe de libération comparable. Par conséquent, pour une même masse de particules, quel que soit le procédé d'élaboration, nous observons une cinétique équivalente. Notons que la quantité de peptide libéré des particules préparées par nanoprécipitation est légèrement supérieure à la quantité de peptide encapsulé. Ceci est vraisemblablement lié à une faible imprécision dans les mesures effectuées, liée au grand nombre d'étapes nécessaires à la préparation des différentes solutions.

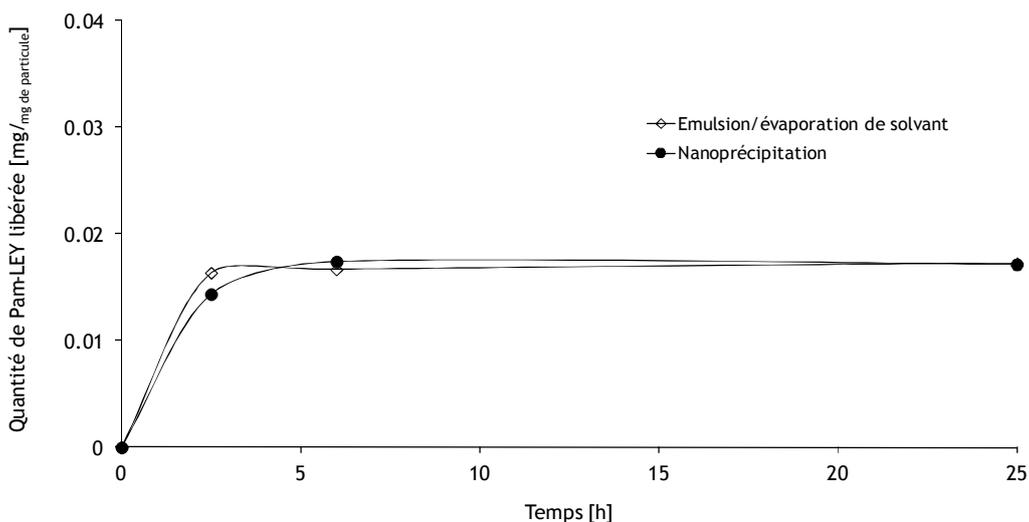


Figure 102 - Dosage direct effectué par les deux procédés d'encapsulation

4.4. Evaluation Biologique

L'évaluation biologique a été conduite sur trois plans dans le cadre d'une collaboration avec le groupe d'Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelles de l'Université Pierre et Marie Curie.

4.4.1. Effet des nanoparticules sur l'activité de la protéase du VIH-1 *in vitro*.

Dans un premier temps, l'influence des nanoparticules de PLA recouvertes de DexC₆-14 et lyophilisées sur l'activité *in vitro* de la protéase du VIH-1 a été évaluée, que les nanoparticules soient vides ou contiennent de l'inhibiteur Pam-LEY. Le test fluorométrique est basé sur le transfert d'énergie de fluorescence [30]. Le substrat fluorogène DABCYL- γ -Abu-S-Q-N-Y-P-I-V-Q-EDANS mime le site de coupure p17-p24 (MA-CA) de la polyprotéine Gag-Pol. Lorsqu'il n'est pas hydrolysé, le substrat fluoresce peu car la fluorescence émise par le groupement EDANS à 490 nm après excitation à 340 nm est éteinte par le groupement DABCYL qui absorbe à cette longueur d'onde. Par contre, l'hydrolyse du substrat provoque l'éloignement des deux groupements et met ainsi fin à l'extinction de fluorescence par le groupement DABCYL. On observe alors une augmentation de fluorescence à 490 nm mesurable à l'aide d'un spectrofluorimètre. Les nanoparticules vides, quel que soit leur mode d'obtention, n'affectent pas l'activité de la protéase (cinétiques durant 4 min environ)

4.4.2. Effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire d'une lignée humaine modèle.

Dans un deuxième temps, la cytotoxicité des nanoparticules sur des cellules modèles humaines été évaluée [30]. Une culture de cellules HEK-293 en phase exponentielle de croissance est centrifugée, puis resuspendue à la concentration de 6×10^5 cellules par mL avant d'être transférée dans la plaque de test. Les cellules ont ensuite été traitées par différentes concentrations de nanoparticules allant de 0,5 mg/mL à 10 mg/mL. La viabilité des cellules a été regardée au bout de 24, 48 et 72 h en utilisant le test XTT. Le test XTT est un test colorimétrique basé sur la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolim (MTT) coloré en jaune par la déshydrogénase mitochondriale de cellules métaboliquement actives ce qui conduit à la formation de formazan bleu-pourpre qui peut être mesuré par spectrophotométrie. La concentration de celui-ci peut être mesurée par spectrophotométrie. L'absorbance est lue à 540 et 690 nm. Les nanoparticules sont dépourvues d'effet cytotoxique sur les cellules humaines testées.

4.4.3. Effet des nanoparticules sur des cellules infectées par le VIH-1 ou le VIH-2.

Les tests cellulaires ont été généreusement conduits au Rega Institute de Leuven (Pr C. Pannecouque). Afin d'évaluer simultanément l'activité antivirale des nanoparticules sur des cellules infectées par le VIH ou sur des cellules témoins, deux séries d'échantillons sont préparées, chaque série étant répétée 3 fois. Une série se compose de dilutions successives d'un facteur 5 de la solution de départ à tester à partir d'une solution 10 fois concentrée. Un contrôle sans inhibiteur est effectué pour chaque échantillon de cellules infectées.

Des stocks de VIH-1 III_B ou de VIH-2 ROD à une concentration équivalente à 100-300 fois la dose infectieuse pour une culture cellulaire ou du milieu de culture sont ajoutées aux cellules infectées par le VIH ou aux cellules témoins. Les cellules témoins permettent d'évaluer l'effet des nanoparticules sur des cellules non infectées afin de déterminer leur cytotoxicité. Une culture de cellules MT4 en phase exponentielle de croissance est centrifugée puis resuspendue à la concentration de 6×10^5 cellules par mL avant d'être transférée dans la plaque de test. La viabilité des cellules infectées par le VIH et des cellules témoins est regardée 5 jours après l'incubation en utilisant le test MTT. L'absorbance est lue à 540 et 690 nm. Les données sont calculées en utilisant la moyenne de la densité optique des trois puits. La concentration d'inhibiteur qui conduit à 50 % de cytotoxicité (CC_{50}) est définie par la concentration de composé testé qui réduit de 50 % l'absorbance à 540 nm des cellules témoins. La concentration qui conduit à 50 % de protection contre l'effet cytotoxique du virus dans les cellules infectées est la concentration efficace à 50 % (EC_{50}). La première série d'expériences n'a pas conduit à une protection notable contre l'effet l'effet cytotoxique du VIH-1 III_B ou du VIH-2 ROD sur les cellules MT-4 infectées. Ces expériences méritent d'être reproduites en vérifiant si possible la stabilité des nanoparticules en solution avant les traitements cellulaires ainsi que le relargage du lipopeptide.

5. Conclusions

Bien que l'élaboration des nanoparticules recouvertes de dextrane ait déjà été étudiée au laboratoire, nous nous sommes proposés d'étudier leur formulation en fonction des différents paramètres des procédés d'élaboration employés à savoir l'émulsion/ évaporation de solvant et la nanoprécipitation. Plus précisément, ces études se sont portées sur l'optimisation et l'homogénéisation de la taille des particules en fonction des paramètres suivants : caractéristiques et concentration du dextrane tensioactif (DexC₆-n), paramètres physiques des procédés d'émulsion/évaporation et de nanoprécipitation, nature et quantité de la phase organique employée. Nous avons ainsi obtenu des nanoparticules de 100 nm dans le cas de l'émulsion/évaporation de solvant et environ 150 nm dans le cas de la nanoprécipitation.

Ces particules étant destinées à une application biologique, il nous a paru primordial que leur stabilité en solution soit étudiée afin qu'elles ne floculent pas dans les vaisseaux sanguins. Cette étude a été réalisée dans des milieux de force ionique variable et la couche de dextrane s'est avérée suffisante pour éviter la floculation dans du NaCl, et ceci même à forte concentration en sel. Toutefois, la couche de dextrane est facilement désorbée en présence de SDS, utilisé comme modèle des propriétés tensioactives des protéines circulantes (albumine essentiellement).

Quel que soit le procédé d'encapsulation testé, nous observons une encapsulation maximale de 40% du Pam-LEY dans les nanoparticules. Aucune libération dans l'eau de ce Pam-LEY encapsulé n'a été testée puisque celui-ci y est insoluble. Par contre, pour mimer les fluides biologiques, une libération en milieu aqueux riche en SDS a été étudiée. La libération de ce peptide inhibiteur de la dimérisation de la protéase du VIH-1 y est alors extrêmement rapide (100% du Pam-LEY libéré en 2h30).

Les particules contenant le Pam-LEY ont toutefois été envoyées à l'Université de Leuven pour des tests sur des cellules infectées par le virus du SIDA. Testées sur des cellules HEK-293, ces nanoparticules se sont avérées non cyto-toxiques mais l'étude de leur efficacité n'est pas concluante. Ces tests étant toutefois très préliminaires, il serait nécessaire d'envisager une étude beaucoup plus approfondie.

Pour pallier le problème de stabilité de la couche de dextrane, nous étudierons dans le prochain chapitre une méthode pour lier de façon covalente la couche hydrophile de surface au cœur PLA de la nanoparticule. Pour cela, la réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre sera employée.

6. Bibliographie

- [1] Bannwarth L., Rose T., Dufau L., Vanderesse R., Dumond J., Jamart-Gregoire B., Pannecouque C., De Clercq E., Reboud-Ravaux M. Dimer Disruption and Monomer Sequestration by Alkyl Tripeptides Are Successful Strategies for Inhibiting Wild-Type and Multidrug-Resistant Mutated HIV-1 Proteases, *Biochem.* 48 (2009) p. 379-387
- [2] Xie J., Wang C.H. Self-Assembled Biodegradable Nanoparticles Developed by Direct Dialysis for the Delivery of Paclitaxel. *Pharm. Res.*, 22 (2005) p. 2079-2090
- [3] Legrand P., Lesieur S., Bochot A., Gref R., Raatjes W., Barratt G., Vauthier C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation, *Int. J. Pharm.* 344 (2007) p. 33-43
- [4] Olivier J.C. Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles. *NeuroRx* 2 (2005) p. 108-119
- [5] Durand A., Dellacherie E. Neutral amphiphilic polysaccharides: chemical structure and emulsifying properties, *Colloid Polym Sci* 284 (2006) p. 536-545
- [6] Rotureau E., Leonard M., Marie E., Dellacherie E., Camesano T.TA, Durand A. From polymeric surfactants to colloidal systems (1): Amphiphilic dextrans for emulsion preparation, *Colloid Surfaces A* 288 (2006) p. 131-137
- [6] Choi S.W., Kwon H.Y., Kim W.S., Kim J.H., Thermodynamic parameters on poly(D,LLactide-co-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process, *Colloid Surfaces* 201 (2002) p. 283-289.
- [8] Rouzes C., Leonard M., Durand A., Dellacherie E. Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 32 (2003) p. 125-135
- [9] Nouvel C., Raynaud J., Marie E., Dellacherie E., Six J.-L., Durand A. Biodegradable nanoparticles made from polylactide-grafted dextran copolymers, *Journal of Colloid and Interface Science* 330 (2009) p. 337-343
- [10] Rouzes C., Nanosphères à coeur de poly(acide lactique) et couronne de dextrane: élaboration, propriétés et applications biomédicales, *Thèse Institut Polytechnique de Lorraine (INPL)*, 2001
- [11] Cécile Gavory, Alain Durand, Jean-Luc Six, Cécile Nouvel, Emmanuelle Marie, Michèle Leonard, Polysaccharide-covered nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Carbohydrate Polymers* 84 (2011) p. 133-140
- [12] D. Quintanar-Guerrero, A.Garem-Quintanar, E. Alleman, H. Fessi, E. Doeller, « influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of PLA nanoparticules prepared by an emulsion diffusion technique », *J. Microencapsul.* 15 (1998) p.107-119
- [13] Deshiikan S.R., Papadopoulos K.D., Modified Booth equation for the calculation of zeta potential. *Colloid. Polym. Sci.* 276:2 (1998) p. 117-124.
- [14] Eversole W.G., Boardman W.W., The effect of electrostatic forces on electrokinetic potentials. *Journal of Chemical Physics*, 9:11 (1941) p. 798-801
- [15] T. Tadros, Interparticle interactions in concentrated suspensions and their bulk (Rheological) properties, *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 168 (2011) p. 263-277
- [16] E. J. W. Verwey, J. T. G. Overbeek, Theory of the stability of lyophobic colloids, *Elsevier, Amsterdam*, 1948

- [17] P.C. Hiemenz, Principles of colloid and surface chemistry, *Marcel Dekker, New-York, 1986*
- [18] B.Dobiás, Coagulation and flocculation, *Marcel Dekker, New York, 1993*
- [19] B. Vincent, J. Edwards, S. Emmett, A. Jones, Depletion flocculation in dispersions of sterically-stabilized particles (« soft spheres »), *Coll. and Surf.*, 18 (1986) p. 261-281
- [20] M.B. Einarson, J.C. Berg, Electrosteric stabilization of colloidal latex dispersions, *J. Colloid. Interf. Sci.*, 155 (1993) p. 165-172
- [21] Tadros ThF. Solid/liquid dispersions. *London: Academic Press; 198*
- [22] J.A Long, D.W. Osmond, B. Vincent, The equilibrium aspects of weak flocculation, *J. Colloid. Interf. Sci.*, 42 (1972) p. 545-553
- [23] D.H. Napper, Polymeric stabilization of colloidal dispersions, *Academic press, New-York, 1983*
- [24] Cattoz B, Cosgrove T, Crossman M, Prescott SW, Surfactant-Mediated Desorption of Polymer from the Nanoparticle Interface, *Langmuir* 28 (2012) p. 2485-2492
- [25] Blokhus AM; Djurhuus K, Adsorption of poly(styrene sulfonate) of different molecular weights on alpha-alumina: Effect of added sodium dodecyl sulfate. *J. Colloid Interf. Sci.* 296 (2006) p. 64-70
- [26] Lauten RA; Kjoniksen AL; Nystrom B, Adsorption and desorption of unmodified and hydrophobically modified ethyl(hydroxyethyl)cellulose on polystyrene latex particles in the presence of ionic surfactants using dynamic light scattering. *Langmuir* 16 (2000) p. 4478-4484
- [27] BROWN W; ZHAO JX, Adsorption of sodium dodecyl sulfate on polystyrene latex particles using dynamic light scattering and zeta potential measurements, *Macromolecules* 26 (1993)p. 2711-2715.
- [28] W. Brown, J. Zhao, Adsorption of sodium dodecyl sulfate on polystyrene latex particles using dynamic light scattering and zeta potential measurements, *Macromolecules*, 26 (1993) p. 2711-2715
- [29] M.J. Santander-Ortega, T. Stauner, B. Loretz, J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, G. Wenz, U.F. Schaefer, C.M. Lehr, Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery, *J. control. Release* 141(2010) p. 85-92
- [30] Laure Dufau, Développement de nouvelles générations d'inhibiteurs de la dimérisation de la protéase du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) : approches structurales, mécanistiques et fonctionnelles ; vectorisation, *Thèse de doctorat de l'UPMC - Sorbonne universités, 2011*

**UTILISATION DE LA CHIMIE-CLICK
POUR LA FONCTIONNALISATION DE
NANOPARTICULES DESTINEES AU
CIBLAGE DE PRINCIPES ACTIFS DANS
LA THERAPIE ANTI-CANCEREUSE**

Parmi les objectifs que nous avons décrits, nous nous sommes proposés d'accroître la stabilité colloïdale des nanoparticules en établissant une liaison covalente entre le cœur hydrophobe de la particule et sa couronne hydrophile. Ceci constituait notre objectif 2. En effet, les particules que nous avons élaborées sont destinées à être utilisées pour une vectorisation passive d'un inhibiteur de la protéase du VIH-1, mais également pour une vectorisation active, par ciblage spécifique de néo-vaisseaux irrigant les tumeurs, dans le cadre d'un traitement anticancéreux. Après injection intraveineuse, les nanoparticules doivent donc être parfaitement stables en fluide biologique.

Une vectorisation active des néo-vaisseaux nécessite une fonctionnalisation particulière des nanoparticules et ceci constituait notre 3^{ème} objectif. Pour permettre une telle modification, nous emploierons les Dex-g-PLA-g-N₃ décrits dans les pages précédentes. Ceux que nous avons sélectionnés possèdent des fonctions N₃ résiduelles qui permettront une post-modification des nanoparticules formulées.

Ces deux objectifs ont été étudiés en fin de contrat doctoral, aussi nous ne montrerons ici que des travaux exploratoires qui démontrent la possibilité d'atteindre de tels objectifs.

1. Nanoparticules élaborées par une étape de Chimie-click

Pour obtenir des particules dans lesquelles la couronne hydrophile est liée au cœur hydrophobe, nous avons testé deux stratégies :

- Utiliser les Dex-g-PLA-g-N₃ précédemment élaborés et les formuler en nanoparticules.
- Provoquer une réaction de Chimie-click pendant la formulation des nanoparticules par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant.

1.1. Emulsion/évaporation de solvant avec chimie-click in situ

1.1.1. Mise en évidence de la réaction de Chimie-click

Contrairement à ce que nous avons décrit dans le chapitre précédent ; la stratégie suivie ici consiste certes à employer du PLA (qui devient le cœur de la particule) et un dérivé amphiphile du dextrane ; mais cette fois-ci, nous utiliserons un PLA et un dextrane fonctionnalisés et pouvant réagir entre eux par Chimie-click. Plus précisément, nous utiliserons un PLA α -alcyne et un DexN₃.

Afin que les DexN₃ employés demeurent solubles dans l'eau et jouent le rôle de tensioactif lors de ce procédé nous avons volontairement limité leur taux de substitution à 15%, sur la base des résultats obtenus pour les DexC₆. Ce DexN₃ se « fixera » au cœur PLA de la particule et constituera au final la surface « hydrophile » de la particule en générant *in situ* des Dex-g-PLA-g-N₃. En effet, le principe du procédé d'émulsion/évaporation de solvant nécessite un apport d'énergie lors de l'étape de sonication. Cette énergie sera ainsi mise à contribution pour la formation du cycle triazole lors d'une réaction de Chimie-click qui se produira entre le DexN₃ et le PLA α -alcyne. Ces deux composés étant solubilisés séparément dans deux phases non miscibles, la réaction devra avoir lieu à l'interface des deux solvants et donc à la surface des gouttelles.

La première formulation testée a été réalisée en solubilisant le DexN₃-15 (5 mg/mL) dans 10 mL d'eau et le PLA α -alcyne (Mn=8000 g/mol, concentration = 25 mg/mL) dans 1 mL de dichlorométhane. A ces

concentrations, on peut alors estimer le ratio molaire alcyne/azide à 13,12 en utilisant la relation ci-dessous:

$$\frac{\text{alcyne}}{\text{azide}} = \frac{\frac{m_{PLA\alpha\text{-alcyne}}}{M_{PLA\alpha\text{-alcyne}}}}{\left(\frac{m_{DexN_3-15}}{M_{DexN_3-15}} \right) \times DS_{DexN_3-15}}$$

Avec :

- $\frac{m_{PLA\alpha\text{-alcyne}}}{M_{PLA\alpha\text{-alcyne}}}$ le nombre de moles de fonctions alcyne. $M_{PLA\alpha\text{-alcyne}}$ et $m_{PLA\alpha\text{-alcyne}}$ sont la masse molaire (8000 g/mol) et la masse introduite (25 mg) du PLA α -alcyne, respectivement. Nous introduisons ici $3,125 \cdot 10^{-6}$ moles de triples liaisons.
- $\left(\frac{m_{DexN_3-15}}{M_{DexN_3-15}} \right) \times DS_{DexN_3-15}$ est le nombre de moles de fonctions azide introduites dans le milieu.
- M_{DexN_3-15} et m_{DexN_3-15} sont les masses molaires de l'unité monomère (182,85 g/mol) et la masse introduite (50 mg) du DexN₃₋₁₅, respectivement. Nous introduisons ici $4,17 \cdot 10^{-5}$ moles de fonctions N₃. DS_{DexN_3-15} est le degré de substitution du DexN₃₋₁₅ (0,15).

Après la formulation des particules, nous avons voulu vérifier que la réaction de Chimie-click a bien eu lieu lors de l'émulsification. Pour cela, une analyse RMN ¹H a été réalisée en dissolvant les particules après lavage et lyophilisation, dans du DMSO d₆.

La *Figure 103* nous montre que si la formulation est réalisée en présence du catalyseur de la réaction de Chimie-click (CuBr), le pic caractéristique du proton du cycle triazole est visible à 8,2ppm. A l'opposé, ce pic est absent dans le cas où le CuBr n'a pas été ajouté à la formulation ce qui témoigne que la réaction de Chimie-click n'a pas eu lieu en l'absence du cuivre durant l'élaboration des nanoparticules.

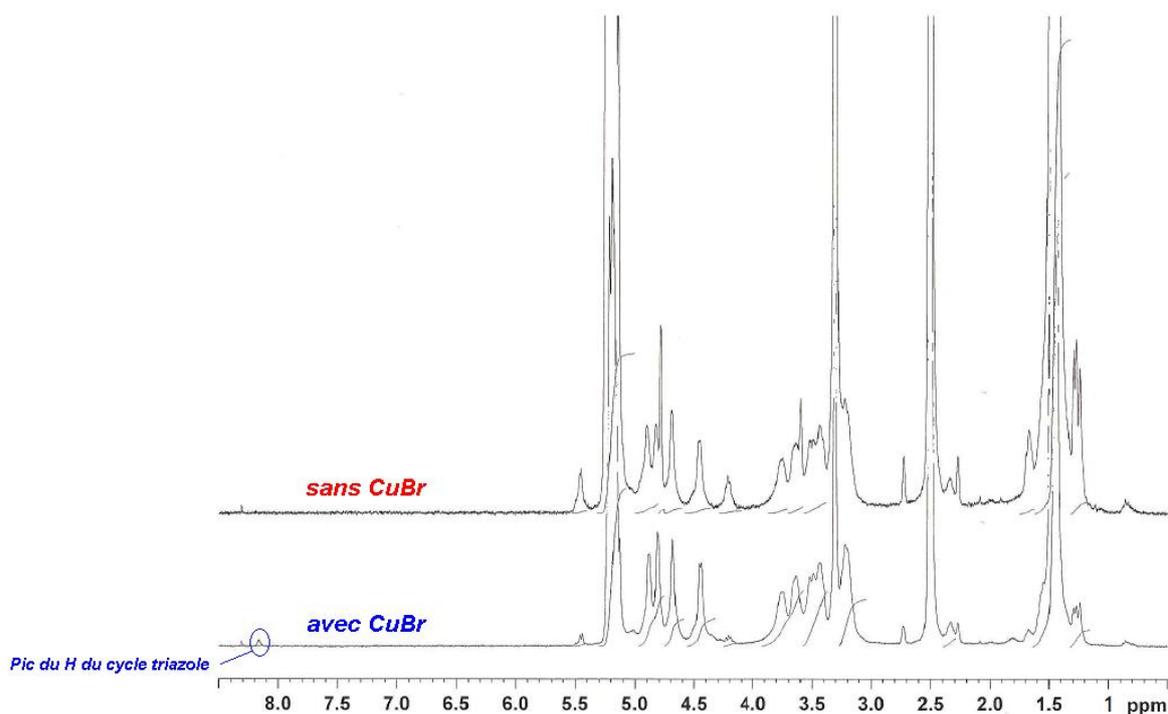


Figure 103 - Spectre RMN ^1H dans le DMSO-d_6 des nanoparticules réalisées par émulsion-évaporation de solvant. Le $\text{DexN}_3\text{-15}$ et le PLA α -alcyne (8000 g/mol, $\text{DPn}=110$) sont utilisés.

La Figure 104, sur laquelle on peut observer un pic à 8,2 ppm, témoigne d'une réaction de Chimie-Click dès que du PLA α -alcyne est solubilisé dans la phase organique. Lors de ce premier test 100% du PLA employé était du PLA α -alcyne. Nous avons réalisé ensuite un autre test où du PLA commercial est additionné au PLA alcyne (50/50 w/w). Le pic à 8,2 ppm peut également être observé, ce qui témoigne cette fois encore que la réaction de Chimie-click a bien eu lieu. Par contre, si du PLA commercial non fonctionnalisé est employé uniquement, ce pic à 8,2 ppm n'est pas observé. Dans ce dernier cas, le DexN_3 joue simplement le rôle de tensioactif et se retrouve, *in fine*, adsorbé à la surface des particules.

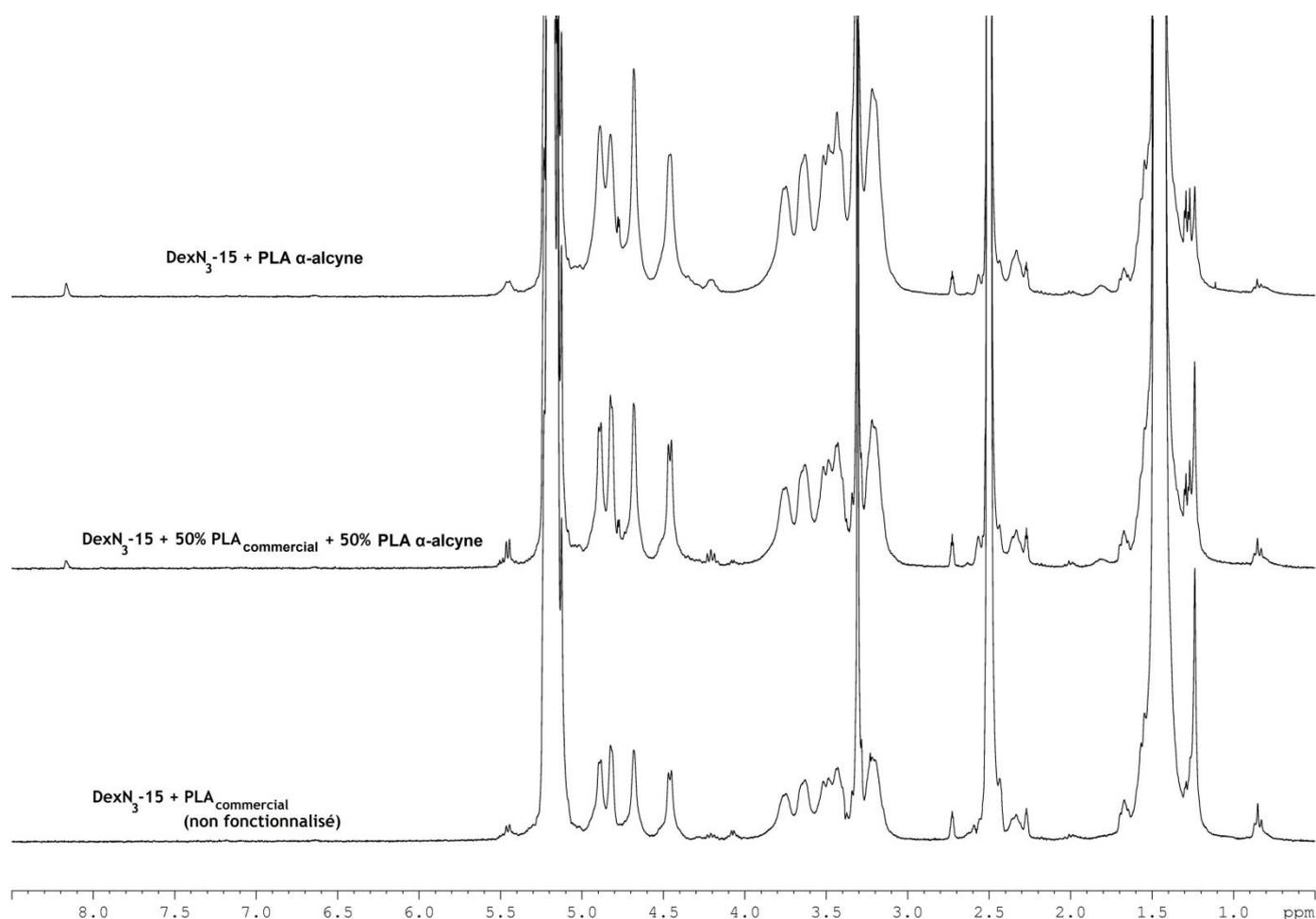


Figure 104 - Spectre RMN 1H des nanoparticules dissoutes dans du DMSO- d_6 après lyophilisation, élaborées par émulsion/évaporation de solvant organique, avec différentes quantités de PLA $_{8000}$ α -alcyne

Le Tableau 18 résume les quantités employées lors de ces manipulations.

Tableau 18 - Quantités de matières introduites lors des émulsions testées

	% massique de PLA α -alcyne dans la solution organique (Total de 25 mg PLA/mL de CH_2Cl_2)		
	0%	50%	100%
PLA α -alcyne introduit (g)	0	0.0125	0.025
PLA commercial introduit (g)	0.025	0.0125	0
DexN3 introduit (g)	0.05	0.05	0.05
Fonction azide (mole)	4.10172E-05	4.10172E-05	4.10172E-05
Fonction alcyne (mole)	0	1.56E-06	3.13E-06
Ratio azide/alcyne	0	26.25	13.13
Z-Average particules (nm)	160	150	150

Le *Tableau 18* nous permet également de voir que les nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation de solvant, avec différentes quantités de PLA α -alcyne, possèdent un diamètre similaire. Le pourcentage de PLA α -alcyne ne semble donc avoir aucun impact direct sur la taille des particules obtenues.

Dans le cas où les particules sont obtenues par émulsion/évaporation de solvant à l'aide de DexN₃ et de PLA α -alcyne, la détermination de la quantité de dextrane liée au PLA α -alcyne, et donc la détermination des paramètres des Dex-g-PLA-g-N₃ produits (paragraphe suivant), ainsi que la quantité de dextrane présent dans les particules (paragraphe 1.4.2), nous permettra d'estimer le taux de fonctions N₃ résiduelles qui peuvent se localiser en surface des particules et donc être de potentiels sites de post-fonctionnalisation des particules (objectif 3). Nous pourrions de plus comparer cette quantité de dextrane dans la particule à celle que nous avons déterminée dans le cas des particules PLA/DexC₆ ou PLA/DexN₃ (paragraphe 1.4.2).

1.2. Caractérisation des particules produites à partir de PLA α -alcyne et de Dex-N₃-15

Après redissolution totale dans le DMSO-d₆ des particules obtenues (*Figure 105*), on peut observer la présence des pics témoins du cycle triazole (CH : 8.16ppm), des protons méthyle (5.2ppm) et méthyne (1,5 ppm) du PLA ainsi que le pic du proton anomère du dextrane (4.67ppm).

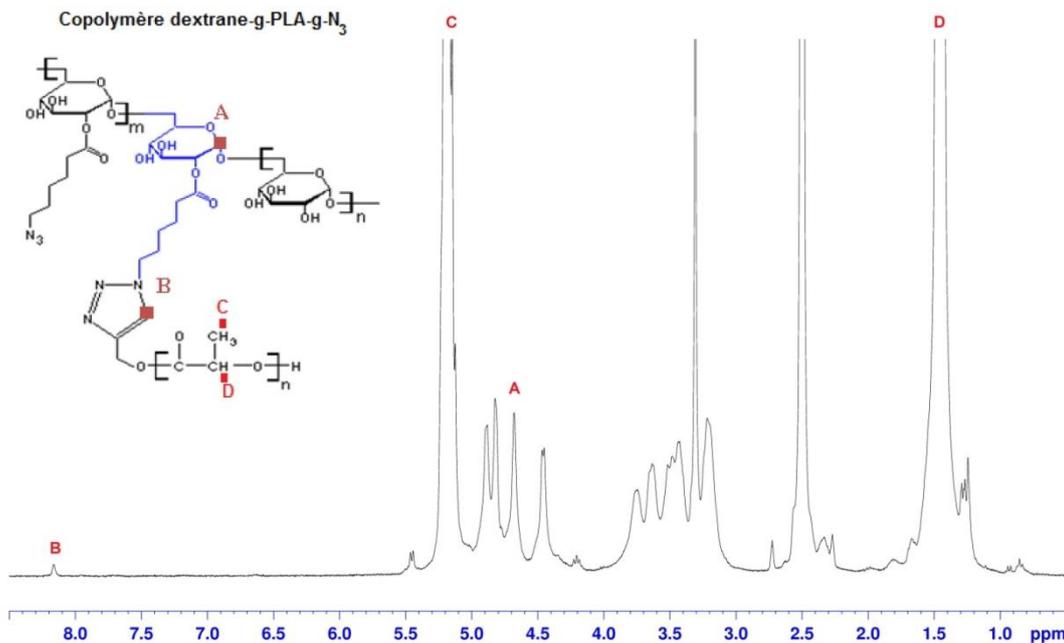


Figure 105 - Spectre RMN ¹H dans le DMSO-d₆ des particules élaborées par émulsion/évaporation de solvant (PLA α-alcyne (Mn : 8000g/mol / DPn: 110) + DexN₃-15).

Quelle que soit la quantité de PLA commercial utilisée par rapport au PLA α-alcyne dans la phase organique, il est possible de déterminer le nombre de cycles triazole produits pour 100 unités glucosidique et ainsi le pourcentage de fonctions N₃ ayant réagi (en se référant au nombre de fonctions N₃ introduites). Ce nombre de cycles triazole produits pour 100 unités glucosidiques correspond au nombre de chaînes PLA α-alcyne (Mn=8000 g/mol) greffées pour 100 unités glucosidiques. On connaît alors « x » et « m » de la nomenclature Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ des copolymères formés à l'interface par chimie-click.

Par différence entre le degré de substitution du DexN₃ utilisé et du nombre de fonctions N₃ qui ont réagi par 100 unités glucosidique, on peut estimer alors « y » (nombre de fonctions N₃ résiduelles pour 100 unités glucosidiques).

Le pourcentage de fonctions N₃ ayant réagi pour 100 unités glucosidique est donné par :

$$\frac{\left(\frac{A_{H_{\text{triazole}}}}{A_{H_{\text{anomérique}}}} \right) \times 100}{A_{H_{\text{anomérique}}} \times DS_{DexN_3}}$$

Où :

A_{H_{triazole}} et A_{H_{anomère}} représentent les aires des protons du cycle triazole et anomère, respectivement

$\left(\frac{A_{H_{\text{triazole}}}}{A_{H_{\text{anomérique}}}} \right) \times 100$ représente le nombre de cycles triazole produits, et donc le nombre de N₃ ayant réagi, pour 100 unités glucosidique.

DS_{DexN_3} représente le Degré de Substitution du Dextrane- N_3 (Ici 15%). $A_{H\text{anomère}} \times DS_{DexN_3}$ représente alors le nombre total de fonctions N_3 introduit.

Dans le cas précis où la phase organique n'est constituée que de PLA α -alcyne, on estime par ce dernier calcul que 1% des fonctions N_3 introduites dans le milieu ont réagi lors de la réaction de Chimie-Click durant l'émulsion (Tableau 19). En conséquence, on peut estimer qu'il y a 12,5 fonctions N_3 résiduelles par 100 unités glucosidiques. Ces fonctions résiduelles peuvent être réparties à la fois dans le cœur de la particule et dans la couronne où elles seront plus ou moins accessibles. Cependant une post-fonctionnalisation des particules reste potentiellement possible comme nous le verrons dans le paragraphe 2.

Tableau 19 - Caractérisation du Dex-g-PLA-g- N_3 produit à l'interface lors du procédé émulsion/évaporation de solvant.

	% massique de PLA α -alcyne introduit dans 1 mL de DCM		
	0%	50%	100%
Nbre de cycles triazoles / 100 unités glucosidiques	0	1,4	2,5
% de fonctions azide ayant réagi	0	1.40	1
Nbre de fonctions azide (=alcyne) ayant réagi	0	$5,7 \cdot 10^{-7}$	$4,1 \cdot 10^{-7}$
% de fonctions alcyne ayant réagi	0	36,8	13,1
Nbre de fonctions N_3 résiduelles / 100 unités glucosidiques	0	13,6	12,5
Dex-g-xPLA _m -g-yN ₃	DexN ₃ -15	Dex-g-1,4PLA ₈₀₀₀ -g-13,6N ₃	Dex-g-2,5PLA ₈₀₀₀ -g-12,5N ₃

Quel que soit le ratio alcyne/azide employé (Tableau 18), les fonctions azide étaient en excès et on peut observer que seule une faible partie de celles-ci réagissent et se transforme en cycle triazole, lieu d'accroche des greffons PLA. Si on s'intéresse aux fonctions alcyne portées par le PLA, on s'aperçoit que toutes les chaînes PLA α -alcyne introduites ne réagissent pas et donc que le cœur PLA des particules doit contenir tout ou en grande partie un certain nombre de ces chaînes.

Lors du procédé d'élaboration, quel que soit le taux de PLA α -alcyne employé, le diamètre des nanogouttelettes intermédiaires reste similaire (Tableau 18). On peut alors supposer que l'accessibilité du PLA α -alcyne à l'interface liquide/liquide (lieu de la réaction chimie-click) n'est que très peu modifiée avec le taux de PLA α -alcyne employé. On peut donc penser que les petites chaînes de PLA α -alcyne ont plutôt tendance à migrer à l'extérieur du cœur de la particule tandis que les longues chaînes de PLA commercial semblent se regrouper au cœur même de la particule. Si on regarde de plus près les paramètres du copolymère Dex-g-PLA-g- N_3 produit à l'interface, il semble que des copolymères similaires soient obtenus que nous utilisons 100% de PLA α -alcyne dans la solution organique ou seulement 50%.

1.3. Nanoprécipitation de copolymères dex-g-PLA-g- N_3 préformés

La deuxième stratégie à laquelle nous avons pensé pour relier chimiquement le cœur PLA de la particule à sa couronne hydrophile consiste à nanoprécipiter les copolymères Dex-g-PLA-N₃ que nous avons préalablement synthétisés par Chimie-click (Chapitre 2, Tableau 11). En effet, la nanoprécipitation est un procédé d'élaboration extrêmement rapide qui ne demande aucun apport d'énergie. Aussi, une réaction de Chimie-click durant ce procédé ne sera pas possible. Les copolymères Dex-g-PLA-g-N₃ ont donc alors été précipités en l'absence de tensioactif supplémentaire. Des nanoparticules sont ainsi obtenues et leurs caractérisations sont évoquées dans le paragraphe suivant.

1.4. Caractérisation des nanoparticules - Comparaison avec les nanoparticules recouvertes de DexC₆

Nous caractérisons les particules dans un premier temps par leur mesure de taille. Ce paramètre étant notre paramètre majeur pour un transport optimal d'éventuels principes actifs dans l'organisme.

1.4.1. Mesure de taille

1.4.1.1. Nanoparticules obtenues par émulsion/évaporation de solvant

Dans le *Tableau 20* nous pouvons voir que les particules élaborées par le procédé émulsion/évaporation de solvant en utilisant le DexN₃-15 comme tensioactif ont toutes une taille similaire, quel que soit le PLA utilisé dans la phase organique (PLA commercial, PLA α -alcyne ou mélange des deux). De plus, que la Chimie-click ait eu lieu ou non (sans CuBr), les nanoparticules formulées avec du DexN₃-15 et du PLA α -alcyne ont également une taille identique.

Tableau 20 - Taille (Z-Average) des nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation de solvant, dans différentes conditions

	Emulsions/Evaporation (phase organique: DCM)				
	DexC ₆ -14 + PLA commercial (voir p 127 chapitre précédent)	DexN ₃ -15 + PLA commercial	Chimie-click in situ - DexN ₃ -15 + PLA α-alcyne (8000g/mol)		DexN ₃ -15 + PLA α-alcyne (8000g/mol) sans CuBr
			50 % PLA α-alcyne / 50% PLA commercial	100 % PLA α-alcyne	
Z-Average déterminé par HPPS (± 30nm)	120	160	150	150	150
PDI	0.01	0.05	0.1	0.1	0.2

Il est cependant important de noter que les particules élaborées de façon classique (DexC₆-14 + PLA commercial) ont une taille inférieure aux nanoparticules élaborées avec du DexN₃-15 + PLA commercial de la même façon. Cette augmentation de taille peut venir de la différence des propriétés tensioactives entre les différents dextrans modifiés. Nous avons en effet montré que les DexC₆ ont des propriétés tensioactives plus marquées que celles des DexN₃ (Figure 63, chapitre 2).

1.4.1.2. Nanoparticules obtenues par nanoprécipitation

En se basant sur des précédents travaux menés au laboratoire qui portaient sur la nanoprécipitation de Dex-g-PLA synthétisés par la voie « grafting from »[1], nous avons testé la nanoprécipitation des Dex-g-PLA-g-N₃ pré-synthétisés. Pour cela, la phase organique que nous avons employée est composée de 5 ou 10% (v/v) d'eau et de 90 ou 95% d'acétone. L'étude précédente avait effectivement montré que l'acétone est un mauvais solvant pour les Dex-g-PLA, alors que c'est un bon solvant pour le PLA [1]. L'ajout de faibles quantité d'eau dans la phase organique permet d'améliorer la solubilité des Dex-g-PLA..

Dans le *Tableau 21* sont rassemblées les mesures de tailles des particules élaborées par nanoprécipitation des différents copolymères Dex-g-PLA-g-N₃ synthétisés. Pour rappel, tous les copolymères testés ici possèdent une fraction massique en PLA semblable (entre 75 et 80 %).

Tableau 21 - Mesure de taille des nanoparticules obtenues par nanoprécipitation des Dex-g-PLA-g-N₃. Les copolymères sont dissouts dans 5mL d'acétone/eau (95/5 ou 90/10 v/v) à 5 et 10 g/L, puis injectés dans 10mL d'eau milliQ.

Copolymère utilisé	Composition de la phase organique	Mn _{PLA} (g/mol)	Proportion massique en PLA (Calculée par RMN ¹ H)	10 g/L de copolymère dans la phase organique		5 g/L de copolymère dans la phase organique	
				Z-Average (nm)	PDI	Z-Average (nm)	PDI
Dex-g-9,5PLA ₈₀₀₀	5% d'eau + 95% d'acétone	8000	80	125	0,146	98	0,101
Dex-g-42PLA ₁₆₀₀	5% d'eau + 95% d'acétone	1600	75	147	0,126	124	0,133
Dex-g-82PLA ₁₀₀₀	5% d'eau + 95% d'acétone	1000	75	131	0,085	65	0,123
Dex-g-16PLA ₅₀₀₀ -g-11N ₃	10% d'eau + 90% d'acétone	5000	80	152	0,110	-	-
Dex-g-9,5PLA ₈₄₀₀ -g-17,5N ₃	10% d'eau + 90% d'acétone	8400	80	189	0,042	-	-
Dex-g-6,6PLA ₈₄₀₀ -g-8,4N ₃	10% d'eau + 90% d'acétone	8400	75	147	0,080	-	-

A titre de comparaison, nous donnons dans le *Tableau 22* la taille des nanoparticules obtenues avec du PLA commercial en présence de DexC₆-14 et DexN₃-15.

Tableau 22 - Taille des particules élaborées par nanoprécipitation du PLA commercial (5 g/L dans 5 mL d'acétone) dans 10 mL de phase aqueuse contenant le DexC₆-14 ou le DexN₃-15 comme tensioactif (5 g/L).

	Nanoprécipitation	
	DexC ₆ -14 + PLA _{commercial}	DexN ₃ -15 + PLA _{commercial}
Z-Average déterminé par HPPS (± 30nm)	155	150
PDI	0.05	0.1

En conclusion, on peut remarquer que l'emploi de Dex-g-PLA ou de Dex-g-PLA-g-N₃, produit par Chimie-click, dans le procédé nanoprécipitation, au préalable optimisé à l'aide des DexC₆, ne semble pas modifier de façon significative les tailles des nanoparticules formulées.

1.4.2. Quantité de dextrane dans la particule

Les nanoparticules formulées ont été, nous l'avons vu, solubilisées dans du DMSO-d₆ pour caractérisation. Le spectre ¹H RMN obtenu nous permet d'estimer la quantité de dextrane présent par

gramme de PLA dans les nanoparticules, comme nous l'avons évalué dans le cas des nanoparticules PLA/DexC₆ (chapitre précédent).

1.4.2.1. Nanoparticules obtenues par nanoprécipitation

Comme on peut le remarquer dans le *Tableau 23*, lorsque des Dex-g-PLA ou Dex-g-PLA-g-N₃ sont nanoprécipités pour élaborer des nanoparticules, la quantité de dextrane par gramme de PLA est plus élevée que lorsque du PLA est nanoprécipité dans une solution aqueuse de DexC₆. Nous ne pouvons toutefois pas conclure que le dextrane présent se trouve en totalité à la surface des particules. En effet, lors de la nanoprécipitation de ces copolymères une partie du dextrane peut-être emprisonnée dans la particule, bien qu'une surface riche en dextrane soit observée [1].

Tableau 23 - Quantité de dextrane par gramme de PLA calculée par RMN ¹H. Cas de la nanoprécipitation de (PLA+acétone) dans une solution aqueuse de DexC₆-14 (5 g/L dans 10mL), de Dex-g-95PLA₁₆₀₀ (95% acétone / 5% d'eau v/v) ou de Dex-g-9,5PLA₁₆₀₀-g-17,4N₃ (95% acétone / 5% d'eau v/v) dans de l'eau milliQ.

	DexC ₆ -14 / PLA _{commercial} (Voir chapitre précédent)	Dex-g-95PLA ₁₆₀₀	Dex-g-9,5PLA ₈₄₀₀ -g-17,4N ₃
mg de Dextrane/g de PLA	94	140	205

1.4.2.2. Nanoparticules obtenues par émulsion/évaporation de solvant

Dans le cadre du procédé d'émulsion/évaporation de solvant, le *Tableau 24* nous indique clairement que la quantité de dextrane dans les nanoparticules augmente significativement lorsqu'une réaction de Chimie-Click est produite *in situ* entre les DexN₃ et les PLA α-alcyne, durant la sonication. On peut effectivement vérifier qu'en utilisant du DexN₃ sans aucune réaction de Chimie-click (absence du CuBr), la quantité de dextrane à la surface des particules est plus faible que dans le cas où le PLA commercial est émulsionné en présence de DexC₆. Ceci témoigne encore du caractère plus hydrophobe des chaînes alkyle présentes sur le DexC₆, qui s'ancrent mieux dans le cœur PLA de la particule. 118 mg de dextrane/g de PLA est évalué si du PLA commercial est émulsionné en présence du DexN₃ alors que seul 70 mg de dextrane/g de PLA sont estimés lorsque du PLA α-alcyne est employé. Les chaînes de PLA α-alcyne (Mn : 8000 g/mol) étant bien plus courtes que celles du PLA_{commercial} (Mn : 35 000g/mol), le DexN₃ a certainement plus de difficulté à s'enchevêtrer aux chaînes PLA situées dans le cœur des nanoparticules.

Tableau 24 - Quantité de dextrane dans les différentes nanoparticules élaborées par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant (évaluée par RMN ¹H dans le DMSO-d₆)

mg de Dextrane/g de PLA				
DexC ₆ / PLA _{commercial} (voir Chapitre précédent)	DexN ₃ / PLA _{commercial}	DexN ₃ / 100% PLA α-alcyne sans CuBr	DexN ₃ / 100% PLA α-alcyne avec CuBr	DexN ₃ / 50% PLA α-alcyne avec CuBr
216	118	70	382	210

Dans le cas des nanoparticules produites en provoquant une chimie-click *in situ*, les quantités de dextrane dans la particule (210 ou 382 mg de dextrane/g de PLA) sont le double ou le triple de la quantité de dextrane adsorbé à la surface de la nanoparticule PLA_{commercial} stabilisée par du DexN₃. Ceci n'est pas le témoignage d'une couche polysaccharide plus épaisse dans le cas où la Chimie-click a lieu comme nous le verrons dans le paragraphe 1.4.3. Nous pensons plutôt que la couche polysaccharide devient plus dense avec la réalisation d'une Chimie-click *in situ* et/ou que les chaînes de dextrane sont enchevêtrées avec les courtes chaînes de PLA dans le copolymère.

Pour finir, lorsque la Chimie-click est réalisée in situ, il est donc possible d'obtenir des nanoparticules de taille similaire et présentant une couche de dextrane plus dense que celle observée avec les DexC₆ utilisés comme tensioactif ; ce qui peut être avantageux pour accroître la furtivité des nanoparticules.

1.4.3. Potentiel Zeta

Le potentiel Zêta des particules élaborées par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant a tout d'abord été étudié en fonction des paramètres du procédé.

La *Figure 106* résume l'évolution du potentiel Zêta de 3 lots de nanoparticules. Deux lots ont été préparés en solubilisant du PLA commercial dans la phase organique et soit du DexC₆-14 ou du DexN₃-15 dans la phase aqueuse. Enfin, un lot a été élaboré en utilisant du DexN₃-15 comme tensioactif, du PLA α -alcyne (Mn :8000 g/mol - DPn : 110) dans la phase organique et en réalisant la Chimie-click *in situ*. On observe que dans le cas des particules formées avec le PLA commercial (35 000 g/mol) et du DexN₃ comme tensioactif, un palier à potentiel Zêta « neutre » est très rapidement atteint alors que ce n'est pas le cas en employant le DexC₆. Ces résultats sont difficiles à expliquer dans la mesure où la quantité de DexC₆ par gramme de PLA est supérieure à celle de DexN₃. On peut cependant penser que les DexN₃ ayant une moindre affinité pour le PLA que le DexC₆, la couche de DexN₃ adsorbée est moins dense mais plus épaisse que celle de DexC₆, d'où une variation plus rapide du potentiel Zêta en fonction de la force ionique.

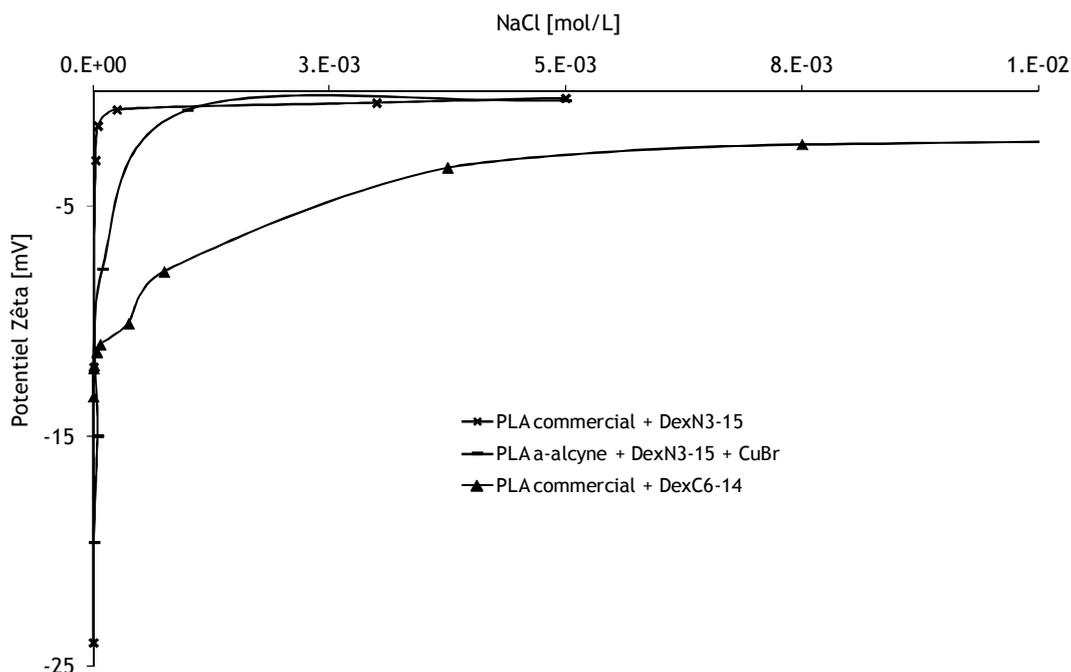


Figure 106 - Potentiel Zêta des nanoparticules élaborées par émulsion/ évaporation de solvant

L'évolution du potentiel Zêta des nanoparticules formulées en mettant en œuvre la Chimie-click *in situ* présentent un profil intermédiaire bien que la quantité de Dextrane par gramme de PLA soit très élevée. Mais dans le cas présent, il est difficile de comparer le potentiel Zêta avec celui des autres particules compte tenu du fait qu'une certaine partie du dextrane est vraisemblablement enchevêtrée avec les courtes chaînes de PLA.

A partir de l'évolution du potentiel Zêta en fonction de la force ionique du milieu, nous pouvons estimer l'épaisseur de la couche hydrophile des nanoparticules élaborées par émulsion/ évaporation de solvant (voir chapitre précédent). Dans le cas de l'utilisation du PLA commercial solubilisé dans la phase organique, l'épaisseur de couche est multipliée par 3 quand on utilise du DexN₃-15 dans la phase aqueuse à la place du DexC₆-14. Ceci peut expliquer pourquoi les particules élaborées avec du DexN₃ atteignent un potentiel neutre plus rapidement que celles élaborées en utilisant du DexC₆ utilisé comme tensioactif. Cela explique également la différence de taille (120 vs 160 nm) observé entre les particules élaborées à partir de DexC₆ et DexN₃, respectivement (Tableau 20). Toutefois, il devient clair ici (Tableau 25) que la couche polysaccharide dans le cas PLA commercial / DexN₃ est moins dense que dans le cas PLA commercial / DexC₆; signe que le DexN₃ doit adopter une conformation « boucle » à la surface des particules.

Tableau 25 - Caractérisation de la couche hydrophile des nanoparticules élaborées par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant. Les épaisseurs de couches sont calculées en utilisant le potentiel Zêta et l'équation de Booth modifiée (Voir chapitre précédent)

	DexC ₆ -14 + PLA commercial	DexN ₃ -15 + PLA commercial	DexN ₃ -15 + PLA α -alcyne (8000 g/mol) avec CuBr
Épaisseur de couche hydrophile (nm)	11	30	20
Quantité de Dextrane/g de PLA par RMN (mg Dextrane/g PLA)	216	118	382

On observe également que les particules ayant subi une réaction de Chimie-click *in situ* lors de la sonication ont une épaisseur de couche inférieure aux particules contenant du PLA commercial et du DexN₃-15. La chimie-click qui a lieu à l'interface provoque sans doute un « aplatissement » des chaînes DexN₃ à la surface des particules et/ou un enchevêtrement des chaînes de Dextrane et de PLA. Les valeurs de quantités de dextrane par gramme de PLA évaluées précédemment (Tableau 24) indiquent cependant une très forte augmentation de la quantité de dextrane dans ces particules. La densité de la couche hydrophile à la surface de la particule élaborée par émulsion/évaporation incluant une étape de Chimie-click durant la sonication est donc vraisemblablement plus élevée que lorsque la particule est élaborée par le même procédé avec du PLA commercial dans la phase organique et du DexN₃-15 dans la phase aqueuse.

Dans le cas où une Chimie-click est provoquée lors de l'élaboration, le DexN₃ est alors plus ancré sur le cœur PLA qu'il ne l'est lorsque le PLA commercial est utilisé. Comme on peut le voir, on atteint alors un taux de recouvrement plus important que celui estimé avec du DexC₆.

1.4.4. Stabilité colloïdale

Nous avons dans un premier temps étudié la stabilité colloïdale des nanoparticules élaborées par nanopréciipitation à partir des Dex-g-PLA-g-N₃ présynthétisés par Chimie-Click. La Figure 107 nous montre à la fois l'évaluation visuelle de la stabilité colloïdale des particules obtenues à partir de Dex-g-9,5PLA₈₀₀₀ sous différentes forces ioniques et l'évolution de paramètre $|n|$ qui est représentatif de la densité optique des suspensions et, par extrapolation, inversement proportionnel à l'évolution de la taille des particules. Ce paramètre $|n|$ témoigne donc, s'il chute, de la floculation des suspensions.

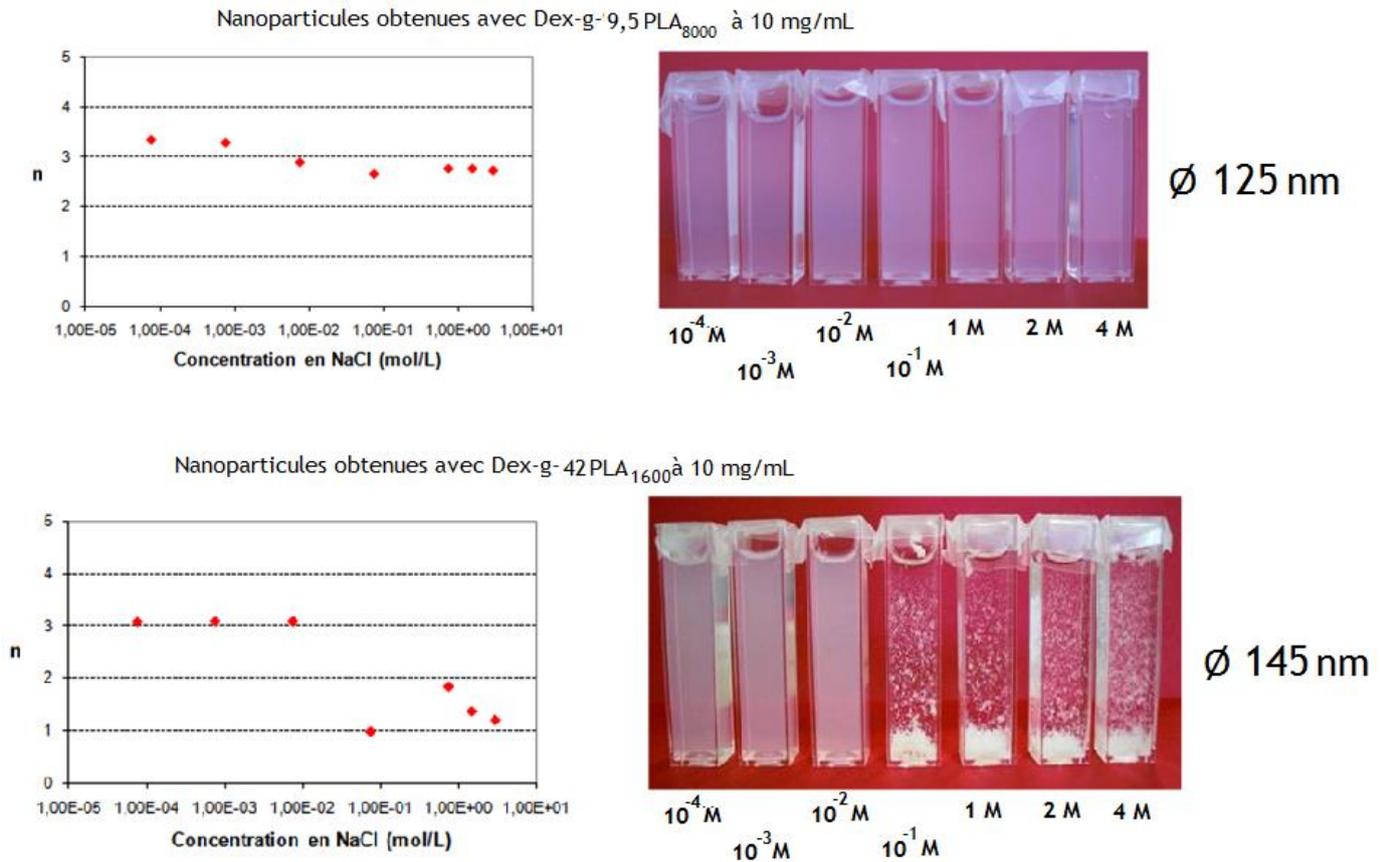


Figure 107 - Stabilité colloïdale de nanoparticules élaborées par nanopréciipitation à différentes forces ioniques.

Comme on peut l'observer dans la Figure 107 (haut), la suspension obtenue par nanopréciipitation des Dex-g-9,5PLA₈₀₀₀ reste stable, quelle que soit la concentration en milieu salin et ce jusque 4M en NaCl. Cette stabilité est également visible à l'œil nu comme on peut le voir.

Contrairement à ce que l'on peut observer dans le cas des particules précédentes, et bien que les diamètres soient similaires (125 Vs 145 nm), la suspension des particules obtenues par nanopréciipitation de Dex-g-42PLA₁₆₀₀ se déstabilise lorsqu'on augmente la concentration saline dans le milieu (Figure 107). Dans ce cas précis, la floculation intervient aux alentours de 0,1 mol/L en NaCl, à savoir proche de la force ionique du sang. Ceci signifie qu'il serait recommandé d'éviter d'employer de telles nanoparticules pour une injection intraveineuse. Le copolymère de Dex-g-42PLA₁₆₀₀ employé ici possède la même proportion massique de PLA que le copolymère de Dex-g-9,5PLA₈₀₀₀ mais présente une configuration totalement différente comme représentée Figure 108.

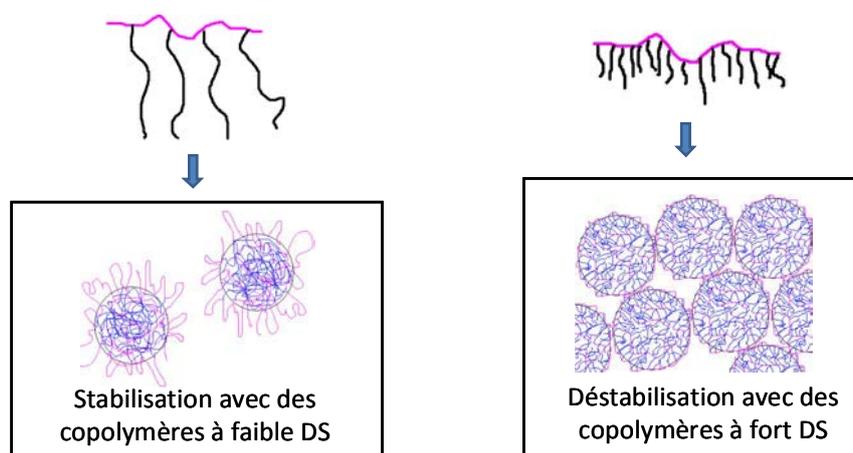


Figure 108 - Représentation schématique de la conformation du copolymère Dex-g-9,5PLA₈₀₀₀ (à gauche) et Dex-g-42PLA₁₆₀₀ (à droite) à la surface des nanoparticules.

Comme on peut l'observer sur la Figure 108, les copolymères Dex-g-PLA qui possèdent peu de longs greffons adoptent certainement une « conformation lâche » et forme des boucles à la surface des particules qui participent à la stabilisation stérique de celles-ci. Dans le cas d'un copolymère présentant un fort taux de courts greffons, celui-ci est certainement bien plus ancré, plus aplati à la surface des particules et ne permet pas d'occulter parfaitement la charge surfacique du cœur PLA de la particule.

Pour une grande stabilité des particules, la proportion massique en PLA n'est donc pas le seul paramètre à prendre en compte. La conformation du copolymère Dex-g-PLA semble jouer également un rôle déterminant, directement en lien avec les paramètres macromoléculaires de ce copolymère.

La stabilité colloïdale de ces nanoparticules élaborées par nanoprécipitation de Dex-g-PLA peut être comparée à celle des particules où le PLA est nanoprécipité dans une phase aqueuse contenant soit un DexC₆-14 ou un DexN₃-15 (Figure 109).

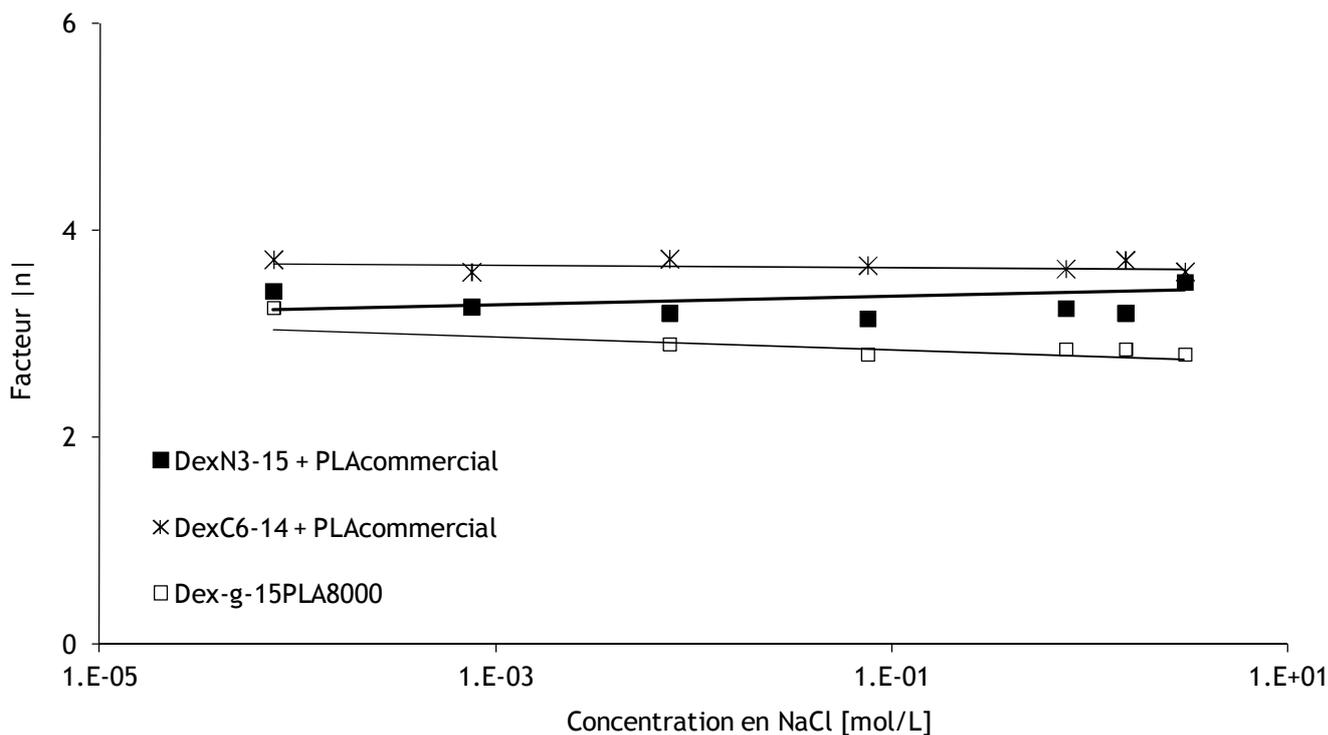


Figure 109 - Stabilité colloïdale des nanoparticules élaborées par nanoprécipitation de PLA commercial dans une solution aqueuse de DexC₆-14 et DexN₃-15.

On peut observer sur la *Figure 109* l'évolution du paramètre $|n|$, indicateur de floculation, en fonction de la force ionique du milieu. Quel que soit le tensioactif utilisé (DexC₆-14 ou DexN₃-15) une stabilité comparable des nanoparticules est observée. L'utilisation du copolymère Dex-g-9,5PLA₈₀₀₀ est donc une excellente alternative à l'élaboration de nanoparticules. En effet, les problèmes de désorption du DexC₆ à la surface des particules de PLA commercial, au contact d'une solution de SDS, pourraient être évités en utilisant ces Dex-g-PLA. La stabilité de ces particules vis-à-vis du SDS sera évaluée dans le paragraphe 1.4.5.

La *Figure 110* représente la stabilité colloïdale de nanoparticules élaborées par nanoprécipitation de trois différents copolymères possédant des fonctions azide résiduelles. On peut dans un premier temps observer que les particules formulées à l'aide du Dex-g-9,5PLA₈₄₀₀-g-17,5N₃ sont parfaitement stables, et ce jusque 4 M en NaCl.

Le facteur $|n|$ des deux autres suspensions de particules semble légèrement diminuer lorsque la concentration en NaCl augmente. Une floculation franche n'est cependant pas observée. Il est donc possible que les particules s'agrègent très légèrement vraisemblablement au cours du temps, mais ne floculent pas directement.

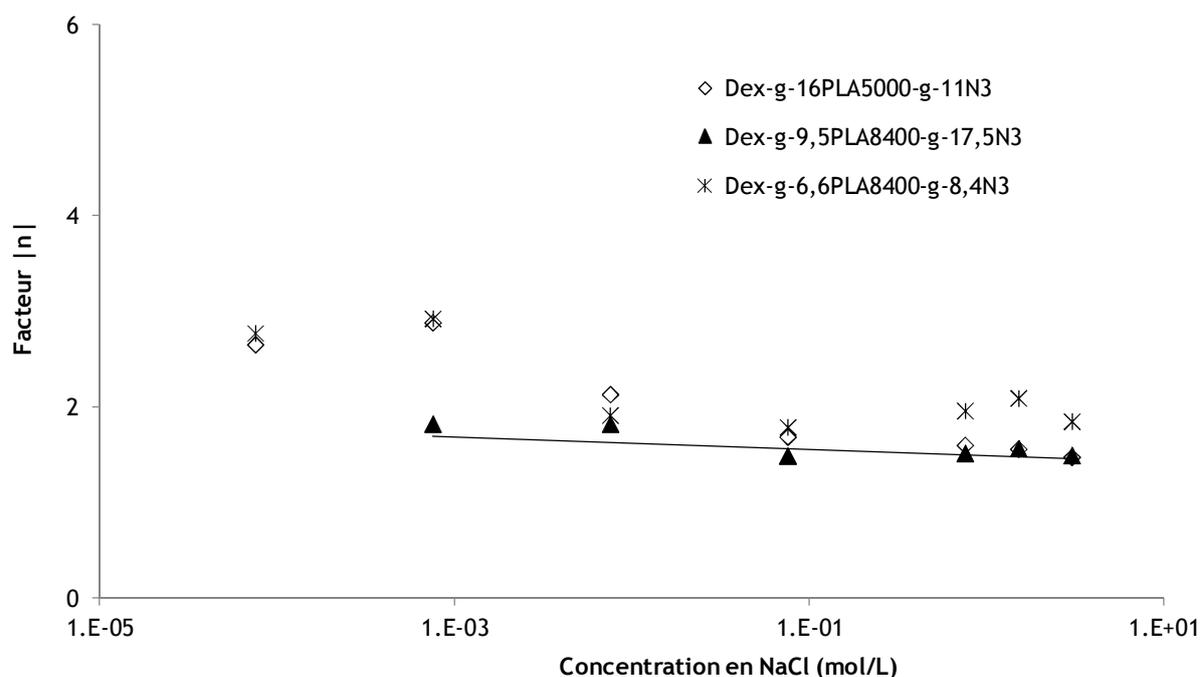


Figure 110 - Stabilité colloïdale de nanoparticules formulées par nanoprécipitation à partir de trois copolymères Dex-g-PLA-g-N₃ possédant des fonctions azide résiduelles

L'ajout de fonctions résiduelles N₃ ne semble donc pas déstabiliser fortement les nanoparticules. Sur la Figure 107 nous avons vu que les nanoparticules élaborées par nanoprécipitation du copolymère Dex-g-9,5PLA₈₀₀₀ restaient stables. Sur la Figure 110, on peut voir qu'en utilisant un copolymère possédant moitié moins de chaînes PLA et des fonctions azide résiduelles permet de formuler des nanoparticules qui restent également stables jusque 4 M en NaCl.

Le cas des nanoparticules élaborées par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant est également intéressant. Dans la Figure 111, on compare la stabilité colloïdale des différentes particules constituées d'un cœur PLA commercial et d'une couronne DexC₆-14, DexN₃-15 et celles produites en réalisant *in situ* une réaction de Chimie-click.

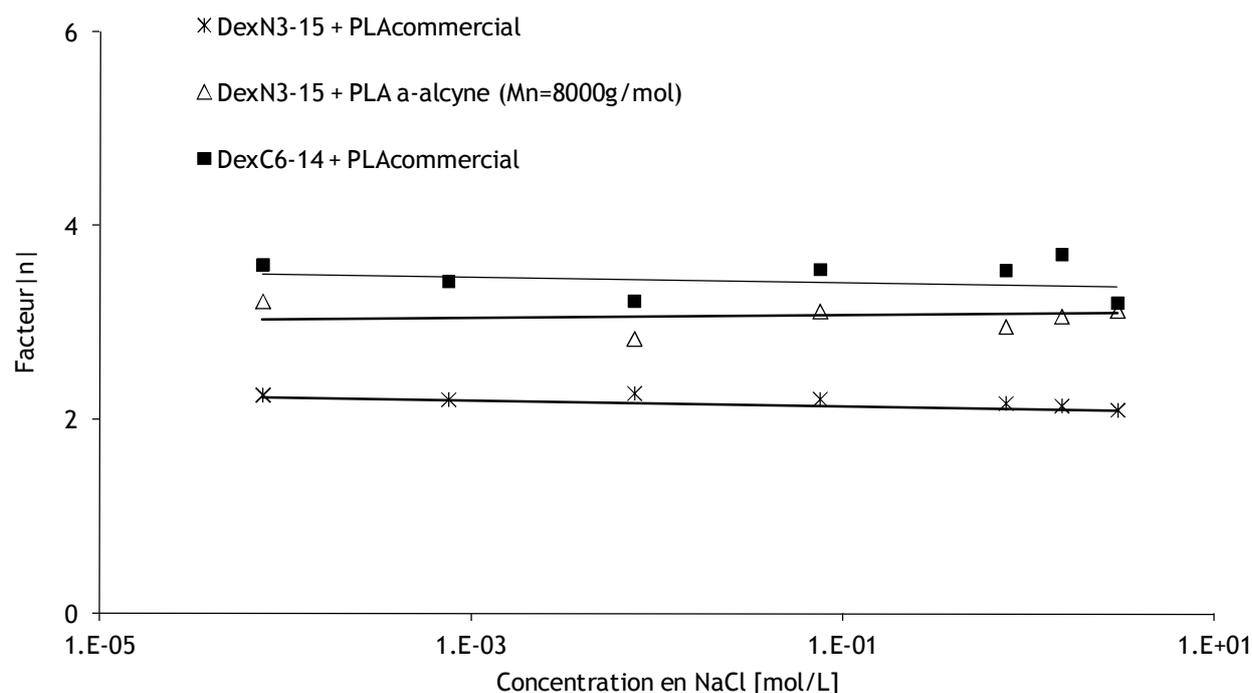


Figure 111 - Stabilité colloïdale des nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation de solvant (PLA commercial ou PLA α -alcyne (M_n : 8000g/mol) solubilisé dans le DCM + solution aqueuse de DexC₆-14 ou DexN₃-15)

Comme on peut l'observer sur la Figure 111, les différentes suspensions présentent une stabilité équivalente en milieu salin. Les particules élaborées par émulsion/évaporation de solvant en réalisant *in situ* une réaction de Chimie-click (DexN₃-15 + PLA α -alcyne) se comportent de façon similaire aux nanoparticules produites en utilisant le même tensioactif (DexN₃-15), mais n'ayant pas subi de réaction de Chimie-Click (PLA Commercial). L'utilisation d'une quantité équivalente (25 mg) de différents PLA (PLA α -alcyne à 8000 g/mol ou PLA_{commercial} à 35000 g/mol) ne modifie donc pas la stabilité des particules obtenues.

La Chimie-click que nous avons réalisée lors de l'étape de sonication ou préalablement (cas nanoprécipitation des Dex-g-PLA-g-N₃) nous a permis de fixer la couronne dextrane de façon covalente au cœur PLA des nanoparticules, tout en conservant une taille et une stabilité similaire à celles obtenues « classiquement ». Dans le prochain paragraphe, nous vérifierons que ces liens covalents sont effectifs pour un ancrage fort de la couronne lorsque ces particules sont confrontées à une solution aqueuse de Sodium Dodécyle Sulfate (SDS).

1.4.5. Désorption de la couche de dextrane en présence de SDS

Dans le cas des nanoparticules élaborées en présence de DexC₆, nous avons observé une désorption complète de la couronne DexC₆ en présence de SDS (chapitre précédent). Ce test a été renouvelé pour évaluer la stabilité de la couronne polysaccharide lorsque les nanoparticules sont élaborées par

le procédé d'émulsion/évaporation de solvant en employant le DexN₃-15 comme tensioactif, ou lorsque la Chimie-click est réalisée *in situ*. Les nanoparticules élaborées par nanopréciipitation de Dex-g-PLA ont également été testées.

Nous réalisons dans un premier temps des nanoparticules en employant du DexN₃-15 comme tensioactif et du PLA commercial. Après lavage, la suspension de nanoparticules est mise en présence de SDS pendant 24h puis lavée une nouvelle fois, lyophilisée et analysé par RMN ¹H (Figure 112).

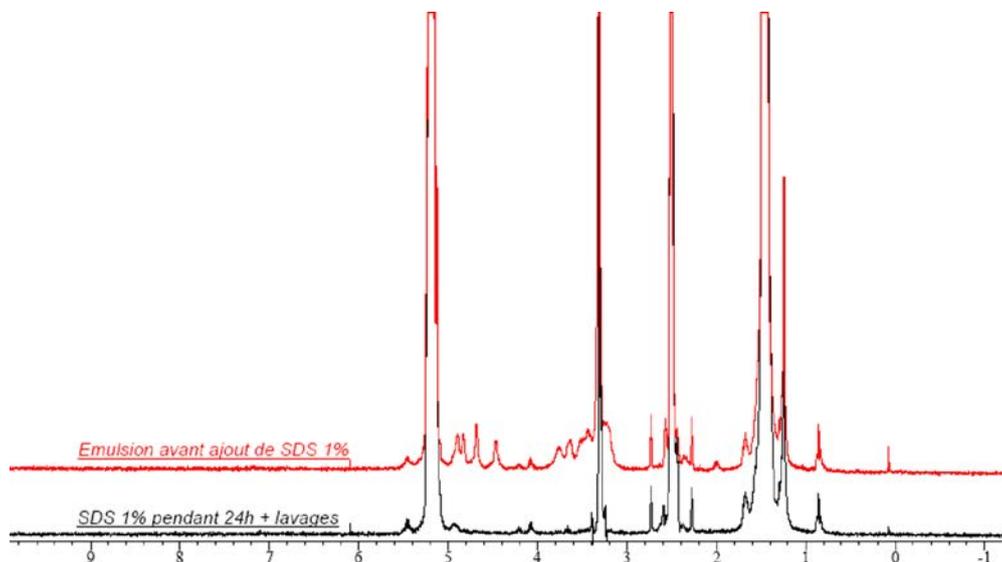


Figure 112 - Analyse RMN ¹H dans DMSO-d₆ d'une suspension de nanoparticules de PLA commercial recouvertes de DexN₃-15

Sur la Figure 112 nous pouvons clairement voir une disparition des pics caractéristiques de la chaîne polysaccharide après que les nanoparticules aient été mises en contact avec le SDS. Ceci signifie que les particules ne sont plus recouvertes de DexN₃, et que la désorption de la couronne DexN₃ a eu lieu, tout comme c'était le cas avec une couronne DexC₆.

Dans un second temps, nous avons testé les nanoparticules produites en présence de DexN₃-15, de PLA α -alcyne et de CuBr. La suspension obtenue est ensuite traitée de la même façon que précédemment puis analysée par RMN ¹H. Comme on peut l'observer sur la Figure 113, Il semble que la couronne dextrane soit toujours présente à la surface des nanoparticules après leur contact avec le SDS, et donc qu'elle ne se désorbe pas dans ce cas. Ce test permet alors de confirmer que la réaction de Chimie-click réalisée lors de l'étape de sonication permet de fixer de manière permanente la couronne hydrophile polysaccharide à la surface des particules de PLA. De telles particules devraient être particulièrement stables lors de leur injection dans le système sanguin.

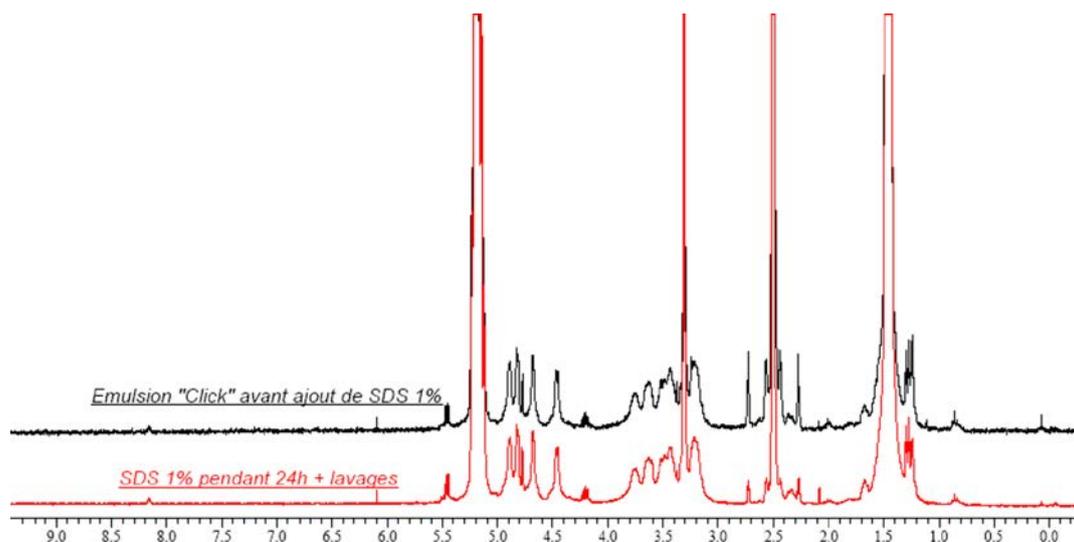


Figure 113 - Spectre RMN ^1H dans le DMSO-d_6 d'une suspension de nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation de solvant avec Chimie-click durant l'émulsion (DexN_3 + PLA α -alcyne + CuBr)

L'étude RMN des nanoparticules obtenues par nanoprécipitation des Dex-g-PLA est là encore indiscutable. La couronne polysaccharidique est bien insensible au contact du SDS (Figure 114).

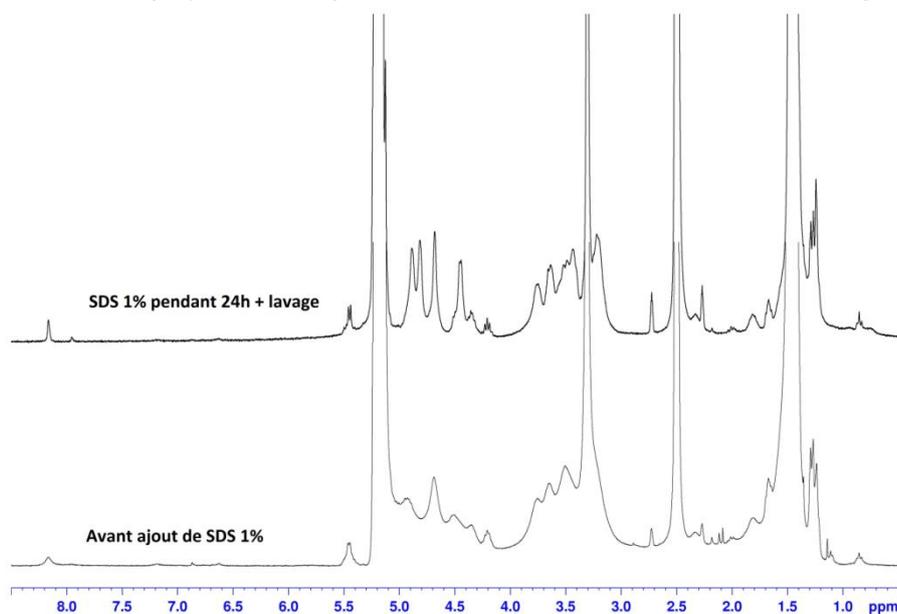


Figure 114 - Spectre RMN ^1H dans le DMSO-d_6 d'une suspension de nanoparticules élaborées par nanoprécipitation de Dex-g-5PLA $_{8000}$ -g-10N $_3$.

1.5. Publication

Polysaccharide-covered nanoparticles with improved shell stability using click-chemistry strategies

Maxime LAVILLE^{1,2}, Jérôme BABIN^{1,2}, Isabel LONDONO^{1,2}, Mélanie LEGROS^{1,2}, Cécile NOUVEL^{1,2}, Alain DURAND^{1,2}, Régis VANDERESSE^{1,2}, Michèle LEONARD^{1,2}, Jean-Luc SIX^{1,2} *

1) Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire LCPM, UMR 7568, Nancy F-54000, France

2) CNRS, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire LCPM, UMR 7568, Nancy F-54000, France

Publié dans Carbohydrate polymers 93 (2013) 537-546)

*Corresponding author

Email: Jean-Luc.Six@univ-lorraine.fr

Fax: 33(0)3-83-37-99-77 ; Tel : 33(0)3-83-37-52-61

ABSTRACT

Dextran-covered PLA nanoparticles have been formulated by two strategies. On one hand, Dextran-g-PLA copolymers have been synthesized by click-chemistry between azide-multifunctionalized dextran (DexN₃) and alkyne end-functionalized PLA chains (α -alkyne PLA); then nanoprecipitated without any additional surfactants. On the other hand, DexN₃ exhibiting surfactant properties have been emulsified with unfunctionalized or α -alkyne PLA, which are dissolved in organic phase with or without CuBr. Depending on the o/w emulsion/evaporation process experimental conditions, Dextran-g-PLA copolymers have been produced *in situ*, by click chemistry at the liquid/liquid interface during the emulsification step. Whatever the process, biodegradable core/shell polymeric nanoparticles have been obtained, then characterized. Colloidal stability of these nanoparticles in the presence of NaCl or SDS has been studied. While the physically adsorbed polysaccharide based shell has been displaced by SDS, the covalently-linked polysaccharide based shell ensures a permanent stability, even in the presence of SDS.

Keywords :

core/shell nanoparticles; dextran; polysaccharide; PLA; click-chemistry; colloidal stability

I. INTRODUCTION

Nanoparticles, which are defined here as particles with a mean diameter lower than 200 nm, could be used in a wide number of applications. Their submicron size results in a high surface to volume ratio. Consequently, nanoparticles surface characteristics largely control their interactions with surrounding medium, their properties and their potential applications. These characteristics easily be adjusted using specific surfactants in the fabrication process. At the end, these surfactants are physically adsorbed onto the particle core yielding core/shell nanoparticles and the two main characteristics of the covering shell are its density and its thickness.

Among all possibilities, polysaccharide surfactants are very attractive and offer significant advantages. Since the pioneering work of Landoll [1], such amphiphilic compounds have been prepared by hydrophobic modification of polysaccharides leading to brush-like derivatives. Depending on the hydrophobization degree, these surfactants exhibit emulsifying properties, which can be adjusted. For several years, our previous papers are dealing with polymeric surfactants based on dextran (a neutral bacterial polysaccharide). These surfactants have been produced by chemical modification [265] or using polysaccharide derivatives as macroinitiators for several polymerization mechanisms [6-8].

When drug-delivery applications are considered, the preparation of nanoparticles with polysaccharide based surfaces [9] can be carried-out by several processes. Some involve an initial oil-in-water (o/w) emulsion stabilized by a polysaccharidic surfactant [10-13] while amphiphilic polysaccharide can also be nanoprecipitated [14-17]. Moreover, the polysaccharidic shell can provide biocompatibility, biodegradability and other useful specific properties depending on the targeted application. For instance, hyaluronic acid-covered nanoparticles have been produced for CD44-overexpressing cells adhesion [18-20], while alginic acid or chitosan shells could be selected for other specific adhesions [21-23].

A dextran shell provides colloidal stability because of steric repulsion. But questions related to the surface properties of particles are always relevant for stability considerations as well as for the applications. In previous papers, we showed that hydrophobically modified dextrans could be used as stabilizers to produce stable poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles by the o/w emulsion/evaporation technique [3, 12]. Particle analysis studies have shown that the dextran layer was quasi-irreversibly adsorbed onto the particle surface as the brush-like dextran derivatives are multi-anchored. This shell provided protection against non-specific interactions with Bovine Serum Albumin (BSA) and ensured colloidal stability in the

presence of salts [11]. Nevertheless, the debate is still open as to the best way to fix dextran-shell on the nanoparticle surface (end-on *versus* side-on coverage) [24-26].

This paper reports the preparation of PLA nanoparticles covered with a covalently-linked or a physically-adsorbed dextran shell combining o/w emulsion/evaporation or nanoprecipitation process with copper-catalyzed click-chemistry. Two different synthesis strategies have been designed: i) DexN₃ was reacted by click-chemistry with end-functionalized PLA (α -alkyne PLA) to obtain dextran-g-PLA graft copolymers. Nanoprecipitation of such copolymers produced dextran-covered PLA nanoparticles. ii) DexN₃ was used as stabilizers in the o/w emulsion/evaporation technique with commercial or α -alkyne PLA, in the presence or not of CuBr. The characteristics of nanoparticles in term of size, zeta potential and anchored dextran amount obtained by both strategies are systematically compared. Nanoparticles stability was examined in the presence of salts and dextran-shell anchorage was investigated using an anionic surfactant: sodium dodecyl sulfate (SDS).

II. MATERIALS AND METHODS

1) Materials

Dextran T40 [$\overline{M}_n = 34\ 000\ \text{g mol}^{-1}$, $I_p = 1.2$] was purchased from Sigma-Aldrich and dried under a reduced pressure at 100 °C for one night. No degradation of chains was evidenced under these drying conditions as attested by size exclusion chromatography coupled to a multi-angle laser light scattering detector (SEC-MALLS). 6-azidohexanoic acid has been obtained from 6-bromohexanoic acid using sodium azide in DMSO at room temperature [27]. Carbonyldiimidazole (CDI), propargyl alcohol, dimethylformamide (DMF), PLA [$\overline{M}_n = 35\ 000\ \text{g mol}^{-1}$, $I_p = 1.3$, inherent viscosity 0.55-0.75 dL/g], stannous octoate (SnOct₂), copper bromide (CuBr), sodium dodecyl sulfate (SDS), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka and were used without any further purification. D,L-Lactide from Lancaster was recrystallized twice with dry toluene and dried under vacuum before use. Dimethyl sulfoxide (DMSO) and toluene were refluxed, distilled over CaH₂ and then added in the reaction media via cannula under nitrogen atmosphere.

2) DexN_{3-n}

Compound 1 (Scheme 1) has been obtained by reaction between 6-azidohexanoic acid (12.88 g, 80.5 mmol) and CDI (14.5 g, 88.55 mmol) in 200 mL CH₂Cl₂ during 2h at room temperature. 6-azidohexanoic acid has been diluted with CH₂Cl₂, then added dropwise to the

CDI solution while CO₂ bubbles have been produced. After the reaction, compound 1 has been recovered by washing, drying and solvent evaporation (88% yield). General synthesis of DexN₃-24 : Dried dextran (2.18 g, 13.4 mmol glucosidic units) has been dissolved in 20 mL DMSO and 0.7 g (3.35 mmol) of compound 1) per 100 glucose units has been added. The reaction has been carried out at 50°C during 2 days, then azido-functionalized dextran has been recovered by precipitation from ethanol. Depending on experimental conditions, DexN₃-n has been obtained, where n the modification degree i.e. the number of N₃ groups per 100 glucose units. Characteristics of such derivatives have been given in S1 (See supporting info). Modification degree (n) has been estimated by ¹H NMR in DMSO-d₆ (See supporting info S2) using equation (1) where A_f, A_g and A_h are the areas of 6 protons of alkyl chains (from 1.3 to 1.6 ppm). A_a is the area of the anomeric proton centered at 4.7 ppm.

$$n = \frac{(A_f + A_g + A_h)/6}{A_a} \times 100 \quad \text{Equation}$$

(1)

3) α -alkyne PLA

General synthesis of PLA₅₂₀₀ : Propargyl alcohol (0.1466 g, 2.61 mmol) and SnOct₂ (0.0318 g, 0.0785 mmol) have been dissolved in dry toluene, separately. Each solution has been transferred to a hot D,L-lactide (11.31 g, 78.5 mmol) solution in 54 mL toluene (80 °C), under nitrogen flow. To reduce transesterification side reactions, a SnOct₂/ OH functions molar ratio equal to 0.03 has been used [6]. Consequently, each PLA chains exhibit one alkyne end-function. Polymerization temperature was kept at 100 °C for 16 hours, then the polymerization has been stopped by addition of a catalytic amount of acidic methanol. Polymer was precipitated twice into cold ethanol. \overline{DP}_n of each α -alkyne PLA was determined from ¹H NMR spectrum of purified product in CDCl₃ using $\overline{DP}_n = \frac{B}{C/2}$ where B and C are the areas of PLA methyne protons (5.2 ppm) and of CH₂ protons from initiator group (4.7 ppm), respectively. Peak characteristic of HC proton was observed at 2.5 ppm.

4) Dextran-g-PLA produced by click-chemistry

General synthesis of Dex-g-14PLA₅₂₀₀-g-10N₃ : Syntheses have been carried out after dissolving DexN₃-24 (0.501 g, 0.61 mmol of N₃) and α -alkyne PLA₅₂₀₀ (1.93 g, 0.37 mmol of alkyne functions) in DMF (Scheme 1). 1 equivalent of CuBr (87 mg) and 0.1 equivalent of Cu⁰ (3.9 mg) per N₃ function have then been added and the reaction was left to proceed under

stirring during one day at room temperature. After reaction, the crude medium has been filtered and diluted by acetone/water mixture (95/5 v/v), then precipitated from an EDTA aqueous phase. Extraction of non-grafted PLA chains has been realized by washing with acetone/diethylether (80/20 v/v). The efficiency of this elimination has been proved by ¹H NMR in DMSO-d₆ and by SEC (See supporting info S3). Yield of click-chemistry was estimated to be higher than 98 %. Depending on experimental conditions, Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ have been obtained, with x and y the number of PLA grafts (\overline{M}_n equal to m) and of residual N₃ groups per 100 glucose units, respectively. When Dextran-g-PLA copolymers exhibit no residual N₃ functions, their names will be Dex-g-xPLA_m. Characteristics of such copolymers have been given in Table 1. x was estimated using equation (2) where A_a and T are the areas of the anomeric proton (4.7 ppm) and of the proton of each triazole ring (8.15 ppm), respectively. y was calculated from (n-x) where n is the modification degree of DexN₃-n.

$$x = 100 \frac{T}{A_a} \quad \text{Equation (2)}$$

Moreover, each copolymer could also be characterized by the PLA weight fraction (ρ_{PLA}) estimated from equation (3) where 162 and 301 are the molar masses (g/mol) of glucose unit and glucose unit carrying one N₃-end alkyl chain, respectively.

$$\rho_{PLA} = \frac{x * n * m}{x * n * m + n * 301 + (100 - n) * 162} * 100 \quad \text{Equation (3)}$$

Knowing the number of PLA grafts (x), the theoretical \overline{M}_n of Dextran-g-PLA has been calculated using equation (4), where 139 is the molar mass (g/mol) of the N₃-end alkyl chain. From this theoretical \overline{M}_n , the theoretical average number of PLA grafts per copolymer chain (N_{grafts}) was easily estimated from equation (5).

$$\text{Theoretical } \overline{M}_n = \overline{M}_{n_{dextran}} + \frac{\overline{M}_{n_{dextran}}}{162} * n * (m * x + 139) \quad \text{Equation (4)}$$

$$N_{grafts} = \frac{\text{Theoretical } \overline{M}_n - \overline{M}_{n_{dextran}}}{m + 139} \quad \text{Equation (5)}$$

5) Nanoprecipitation of clicked Dex-g-xPLA_m-g-yN₃

Nanoprecipitations have been performed at ambient temperature by a classic technique [17]. 50 mg of Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ have been dissolved in 5mL of acetone/water (95/5 v/v) for 24 h, then added dropwise to 10mL of water under magnetic stirring. Complete addition was achieved in 15 minutes. The suspension has been maintained under magnetic stirring for 10 min, then solvent has been evaporated 2.5 hours at 37°C. The crude suspensions have then been centrifuged for washing (8 500 rpm, 75 min at 15°C). The supernatant containing nanoparticles has been freeze-dried.

6) o/w emulsion/evaporation technique

The nanoparticles have been prepared by an o/w emulsion method as follows: 25 mg of either commercial PLA or α -alkyne PLA or a 50/50 blend of both have been dissolved in 1 mL of CH₂Cl₂. 10 ml of an aqueous solution (CH₂Cl₂-saturated) of DexN₃-n at 5 mg/mL have been degassed by N₂ bubbling during 30 minutes. The organic phase has been added under vigorous stirring to the aqueous one. 5 mg of CuBr has been rapidly added to this emulsion and the mixture has then been sonicated (pulsed mode, 10 W, 2 min in an ice bath) using a Vibracell 75043 model (Bioblock Scientific). The solvent has been evaporated at 37°C for 2.5 hours. Finally EDTA has been poured into the resulting suspension and let to stir for one day to complex CuBr. Suspensions have then been centrifuged (8 500 rpm, 75 min at 15°C) and the collected nanoparticles have been re-suspended in water, then centrifuged again in order to remove the non-adsorbed dextran derivatives [11]. The supernatant containing nanoparticles has been freeze-dried. To characterize Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ that has been produced by Huisgen-type copper (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) click-chemistry, nanoparticles have been dissolved in DMSO-d₆ and we used the same equations described above (Table 3). The percentage of alkyne (% alkyne) that reacted has been evaluated from equation (6) where B and T are the respective areas (¹H NMR spectra in DMSO-d₆) of the PLA methyne protons centered at 5.2 ppm and of the proton of each triazole ring (8.15 ppm). \overline{DP}_n and α are the \overline{DP}_n and the percentage of α -alkyne PLA we used in each formulation, respectively.

$$\% \text{ alkyne} = \frac{100 \cdot T \cdot \overline{DP}_n}{B \cdot \alpha} \quad \text{Equation}$$

(6)

8) Characterization techniques

¹H NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 apparatus (300,13 MHz, 25°C) in DMSO-d₆ or CDCl₃.

Size exclusion chromatography analyses of dextran derivatives were performed in DMF-LiCl (20 g/L) at 70°C using a Merck HPLC pump (L-6200A) equipped with a degazer, three PLgel 5µm columns (105 Å, 103 Å and 100 Å - Polymer laboratories). Elution (0.7 ml/min) was dually monitored by multi-angle laser light scattering (MALLS - MiniDawn Tri Star, Wyatt Technology) and differential refractometry (Waters 410). Solutions (10 mg/mL) were prepared by dissolution in the eluent and were left under vigorous stirring for 24 h. Filtration of these solutions was carried out right before injection.

Surface (water/air) tension measurements have been carried out at 25°C using a K8 surface tensiometer (Krüss, Germany). Surface tensions have been measured using the Wilhemy technique. All samples have been equilibrated for a sufficient time (15 min to 1 h) to reach constant readings.

The size distribution of nanoparticles has been determined in 10⁻⁴M NaCl (1 mL of suspension added to 3 mL of NaCl), by dynamic light scattering using a HPPS from Malvern. The mean diameter, D_z (nm), is the so-called z-average from cumulant analysis, i.e. an intensity average diameter.

The specific surface area (S_p) of the nanoparticles was calculated according equation (7), where ρ the nanoparticle density calculated by picnometry (here $\rho = 1.26 \cdot 10^6$ g / m³).

$$S_p \text{ (m}^2 \text{ / g PLA)} = \frac{6}{\rho D_z} \quad \text{Equation (7)}$$

From ¹H NMR spectrum of washed nanoparticles, one can estimate the amount of dextran per gram of PLA using equation (8), where 162 and 72 are the molar masses (g/mol) of glucose unit and of PLA monomer unit, respectively. A_a (4.7 ppm) and B (5.2 ppm) are the areas of anomeric proton and PLA methyne ones, respectively.

$$\text{mg dextran / g PLA} = \frac{A_a \times 162}{B \times 72} \quad \text{Equation (8)}$$

The amount of adsorbed dextran by PLA particle surface unit (Γ in mg/m²) was calculated using equation (9):

$$\Gamma \text{ (mg/m}^2\text{)} = \frac{\text{mg dextran/g PLA}}{m_{NP} S_p} \quad \text{Equation (9)}$$

where m_{NP} is the mass of particles used for analysis.

The electrophoretic mobility of purified nanoparticles has been determined using a Malvern Zetasizer 4 (Mavern Instruments,UK) and studied in NaCl as a function of ionic strength (from 10^{-6} to 10^{-2} M). The zeta potential (ζ) has been calculated from the electrophoretic mobility using the modified Booth equation [28]. This equation allows the calculation of zeta potential for any k_H and a values, where λ_D is the Debye length and $D_p/2$ the radius of particles, whereas the classical Smoluchowsky and Hückel equations are applicable only under two limiting cases, $k_H \lambda_D > 100$ and $k_H \lambda_D < 0.1$, respectively. The electrokinetic layer thicknesses (Δ_{PZ}) were calculated from the zeta potential evolution *versus* k_H using the Eversole and Boardman equation (equation (10)) [29].

$$\ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \zeta}{4 k_B T} \right) \right] = \ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \zeta_0}{4 k_B T} \right) \right] - k_H \times \Delta_{PZ} \quad \text{Equation (10)}$$

where $z=1$ (electrolyte valence), ζ_0 is the surface potential.

The colloidal stability of PLA dispersions toward added electrolyte has been assessed by turbidimetry. Typically, 1 mL of dispersions has been added to 3mL of NaCl (from 1×10^{-4} to 4 M). The samples have been allowed to stand for 1 hour and their absorbance has been measured over the range 450-700 nm, at 50 nm intervals. The slope of the straight line $\log(\text{optical density})$ *versus* $\log(\text{wavelength})$ was taken as an indication of particle aggregation. The colloidal stability of suspension toward SDS has been carried out after adding SDS aqueous solution (1% weight) to the suspension. The samples have been allowed to stand for 24 hours under stirring. The nanoparticles have been recovered after washing and freeze-drying, then dissolved in DMSO- d_6 .

III. RESULTS AND DISCUSSION

1) Azide-multifunctionalized dextran (DexN_{3-n})

1.1) Synthesis of DexN_{3-n}

Azide-multifunctionalized dextrans (DexN_{3-n}) have been synthesized by the reaction described in scheme 1. Using this reaction and depending on experimental conditions, N₃-end alkyl chains have been linked on dextran leading to various DexN_{3-n} (See supporting info S1). This reaction has been proved as non-degrading reaction for the native dextran (SEC-MALLS experiments, not shown). We found that modification degree (n) increased linearly with added amount of compound (1) and the efficiency was evaluated to be equal to 83%.

DexN_{3-n} with n \leq 30% will be used below as water-soluble surfactants. Moreover, if n was too high, we observed that hydrophobized dextrans became not well soluble in water, like in case of DexC_{6-n} whose synthesis has already been reported [11, 30].

1.2) Adsorption of DexN_{3-n} at air/water interface

Whatever the modification degree of water-soluble DexN_{3-n}, we studied its effect on the steady state surface tension of water that has been measured as a function of the polymer concentration. The results are plotted against the logarithm of the hydrophobic alkyl chains concentration, as shown in Figure 1. These DexN_{3-n} compounds have been compared to DexC_{6-n} whose surfactant abilities have already been reported [11]. While dextran exhibits no surfactant activity (surface tension equal to 70 mN/m, whatever the aqueous phase concentration), one can see that each DexN_{3-n} and DexC_{6-n} decreases the surface tension of the water phase. It is clear that this lowering is much more pronounced when the modification degree or concentration increases. On other hand, one can see on figure 1 that the surface tension lowering is lower in case of DexN_{3-n} compared to DexC_{6-n} for similar n. Similar decrease has been observed in case of DexN₃₋₂₄ and DexC₆₋₇ for instance. It could be explained by the presence of N₃ function at the end of each alkyl chain grafted on dextran (DexN_{3-n}). Indeed this function is polar and hydrophilic. Nevertheless, we will observe below that i) the surface activity of such DexN_{3-n} is sufficient enough to stabilize liquid/liquid interface and ii) these compounds will provide an hydrophilic shell onto the PLA core of nanoparticles.

2) First strategy: nanoprecipitation of dextran-g-PLA

2.1) Synthesis of dextran-g-PLA copolymers by click-chemistry

We have already reported on the controlled synthesis of dextran-g-PLA via δ grafting from δ strategy using partially silylated dextran as ring-opening polymerization macroinitiator [6]. In this paper, Dextran-g-PLA have been obtained using δ grafting onto δ strategy via one click-chemistry step, more precisely the Huisgen-type copper (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) (Scheme 1). Since the introduction of this click concept [31], various polymer modifications or copolymer syntheses have been reported [32-36] and more recently, some reviews deal with copper-free click chemistries [37-39]. CuAAC has been carried out in this paper to prove the studied concept.

Thanks to the scheme 1 and depending on the experimental conditions, various Dex-g-xPLA_{m-g-y}N₃ that exhibit different number (x) and length (m) of PLA grafts, as well as number (y) of residual N₃ functions have been produced (Table 1). Superimposing the Dex-N₃

and purified Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ ¹H NMR spectra (See supporting info S2) enables checking the presence of PLA grafted onto the dextran backbone via triazole ring. Nevertheless, in this paper, only the copolymers soluble in acetone phase are described. In S3 (supporting info), one can see the SEC curves of initial DexN₃ and of α-alkyne PLA, as well as those of pure and unpurified copolymers. As shown, the two copolymer curves are shifted to lower elution volume that means an increase of hydrodynamic volume and certainly of molecular weight (even we know that grafted copolymers and linear chains have not the same behavior in solution). In case of unpurified copolymer, a small shoulder with the same elution volume as α-alkyne PLA chains can be observed, but this shoulder is perfectly removed after precipitation. As shown in table 1, several copolymers among those synthesized exhibit similar PLA weight fraction (ρ_{PLA} around 80%) but various parameters (x, m, y). From SEC analysis, one can compare the theoretical \overline{M}_n and the value estimated from SEC (SEC \overline{M}_n). For each copolymer, dn/dc has been measured in DMF-LiCl eluent. Taking into account imprecision of SEC measurements, a strong correlation is observed between the two values.

2.2) Preparation of dextran-covered nanoparticles

The preparation of dextran-covered nanoparticles by nanoprecipitation has already been reported by us following essentially two strategies. The first one consisted in using PLA dissolved in the organic solvent and a dextran derivative surfactant dissolved in the aqueous phase [11]. During the precipitation, this surfactant adsorbed onto the nanoparticles. An alternative strategy involved the use of dextran-g-polyester copolymers that are oil-soluble [17, 40]. With those amphiphilic copolymers, another stabilizer has not been required in the aqueous phase. The self-organization of these copolymers allowed the formation of nanoparticles in which polyester chains were essentially in the core while polysaccharide backbone was located in the outer part thus forming a hydrophilic coverage. Multi-cluster aggregates may also be formed.

In this paper, Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ has been dissolved in acetone containing 5 % of water (v/v). Actually, previous study [17] proved that acetone is a poor solvent for the Dex-g-PLA, while this is a good solvent for PLA. The addition of a small amount of water (5 %) allowed the swelling of dextran backbone and consequently the random coil formation. Indeed water and organic solvent diffuse one to each other during nanoprecipitation. Consequently, a rearrangement of Dex-g-PLA occurs with dextran backbone swelling, then a contraction driven by the aggregation of PLA grafts leads to the formation of nanoparticles, which have a dextran-enriched surface

2.3) Characterization of nanoparticles

In table 2a are given the mean diameters (D_z) and size distributions (PDI) of the nanoparticles obtained by nanoprecipitation. All the Dex-g-xPLA_m used have similar PLA weight fraction (ρ_{PLA} between 75 and 80%). As shown, similar diameters have been obtained but are lower than those of commercial PLA / DexC_{6-n} or DexN_{3-n} nanoparticles (155 and 150 nm, respectively). This is probably related to the viscosity of the organic phases as shown [17] and as reported in literature [41].

As shown in table 2a, when Dex-g-xPLA_m have been nanoprecipitated, the amount of dextran per gram of PLA was higher than in case of nanoprecipitated commercial PLA in the presence of DexC₆₋₁₄ surfactant. However, we can't conclude that dextran is only present in whole of the particle surface. Indeed, during the nanoprecipitation, a part of the dextran may be trapped inside the particle although a dextran-rich surface has been observed as previously established [17].

2.4) Colloidal stability in the presence of salt

The colloidal stability of nanoparticles has been examined in water at various NaCl concentrations (ranging from 10^{-4} to 4 mol/L). The stability of nanoparticles in the presence of salt is an important point to consider in view of potential uses like in biological fluids for instance. Furthermore, differences in critical flocculation salt concentration provide a simple means to detect modification in the surface characteristics of nanoparticles according to their conditions of preparation. Above 10^{-3} M NaCl, suspensions of uncoated PLA nanospheres were no more stable, due to the screening of residual surface charges by electrolyte [17]. This flocculation originated from Van der Waals attractions which occurred upon increasing ionic strength. This flocculation was shown by a decrease of the straight line slope of $\log(\text{optical density})$ versus $\log(\text{wavelength})$ ($d(\log OD/d\lambda)$).

Colloidal stability of the nanoparticles obtained by nanoprecipitation has been studied. On one hand, flocculation was not observed over the whole NaCl concentration range for Dex-g-9.5PLA₈₀₀₀ for instance (Figure 2a). On the other hand, flocculation appeared when increasing NaCl concentration in case of Dex-g-42PLA₁₆₀₀, even initial nanoparticles had similar D_z (125 vs 147 nm). Dex-g-9.5PLA₈₀₀₀ and Dex-g-42PLA₁₆₀₀ have similar PLA weight fraction but exhibit different number and length of PLA grafts that could explain different chain conformations at the nanoparticles surface and various stabilities. As schematically drawn on S4 (supporting info), copolymers with few long grafts may adopt a loop conformation on the nanoparticles surface. These loops become solvated in aqueous medium, thus creating an effective steric barrier that prevents the other particles from approaching too close. This

phenomenon is also called entropic stabilization, because when particles approach each other, the solvated loops at particles surface lose some of their freedom degrees that results in a decrease in entropy. Such entropy decreasing gives rise to repulsive forces, which keep the particles away from each other. In the case of copolymers having many short grafts, chains are certainly more rooted and flattened at the particle surface and don't perfectly conceal the PLA core. In that last case, the colloidal stability of such Dex-g-PLA nanoparticles can be compared to that of particles formulated by nanoprecipitation of commercial PLA with a DexC₆-14 or DexN₃-15 aqueous phase (Figure 2a). Whatever the surfactant we used (DexC₆-14, DexN₃-15 or Dex-g-9.5PLA₈₀₀₀) similar stabilities have been observed.

3) Second strategy: o/w emulsion/evaporation technique combined with click-chemistry

3.1) Emulsification of commercial or α -alkyne PLA with DexN₃-n

Nanoparticles have been formulated by an o/w emulsion/evaporation technique that requires energy input during the sonication step. Either commercial PLA or α -alkyne PLA or a 50/50 blend of both has been dissolved in the organic phase while DexN₃-n (or DexC₆-n for comparison) dissolved in the aqueous phase acted as the liquid/liquid stabilizer. Moreover, when CuBr has been added to the emulsion, α -alkyne PLA and DexN₃-n reacted together by CuAAC click-chemistry at the liquid/liquid interface. That led to produce amphiphilic Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ chains at this interface, which allowed to covalently link the dextran shell to the nanoparticles PLA core. Such click-chemistry has been already described during the sonication step [42]. Nevertheless, some polysaccharide-g-polyester have been already produced at liquid/liquid interface [43] but up to our best knowledge CuAAC click-chemistry has never been carried out at interface to obtain such compounds.

Three experiments have been carried out (Table 3). After nanoparticles purification by repeated washing steps (see materials and methods part), ¹H NMR spectrum in DMSO-d₆ has been realized to check if click-chemistry occurred (Figure 3). As shown, if the nanoparticles have been made in the presence of CuBr, the characteristic peak of the triazole proton appears at 8.15 ppm. In contrast, no peak was observed if the process has been carried out without CuBr or in case of commercial PLA. This proves that the click chemistry has occurred during the sonication step. Nevertheless, the characteristic peaks of PLA and of dextran can be seen on the spectrum of nanoparticles formulated without CuBr (these peaks are of course also shown when CuBr was added). This indicates the physical adsorption of DexN₃ at the surface of the nanoparticles made without CuBr (see below). From these spectra, one can evaluate the parameters of such Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ produced at liquid/liquid interface by CuAAC click-

chemistry. More precisely, the number of triazole rings i.e. the number of PLA grafts (x) and consequently the number of residual N_3 (y) could be estimated. We can also calculate the percentage of alkyne functions added in the medium that have been reacted during the sonication step (Equation (6), Table 3). Whatever this ratio, $Dex-g-xPLA_m-g-yN_3$ that have been produced have quite similar parameters. It means that some residual N_3 functions could be present at the surface of the nanoparticles and could allow a post-functionalization. Whatever this click-chemistry yield, we will see below that it was enough to ensure a perfectly stable shell that is covalently anchored to the PLA core.

3.2) Characteristics of nanoparticles

In table 2b, one can see that all the nanoparticles formulated by the o/w emulsion/evaporation technique exhibit similar mean diameter (D_z around 150 nm), whatever the PLA and the dextran surfactants used. That proves D_z was not influenced by the presence of α -alkyne PLA. Moreover, carrying out an *in situ* click-chemistry or not, similar D_z have been still observed. When comparing with $DexC_6-14$, we have to mention that nanoparticles produced with $DexN_3-15$ are bigger. This size difference could be due to a larger amount of dextran derivatives on the particle core or to a different adsorption of $DexC_6$ and $DexN_3$. Indeed, alkyl chains of $DexC_6-14$ are more hydrophobic than those present in the $DexN_3-15$ due to the presence of N_3 functions at the end-chain. One can also imagine that $DexN_3-15$ has a greater affinity to water, based on the surface tension measurements (figure 1). Consequently, $DexN_3-15$ can be proposed to adopt a β loops conformation on the surface, while a more β tail compact conformation resulting from stronger interactions between alkyl chain and PLA core can be proposed in case of $DexC_6-14$. Similar results have already been observed when replacing C_6 alkyls groups by short PLA grafts (12).

When an *in situ* CuAAC click-chemistry occurred during the sonication step, we observed a clear increase of the dextran amount in the nanoparticles (table 2b). Indeed, this amount (210, 382 mg of dextran / g of PLA) is twice or three-time the one obtained when $DexN_3-15$ is only physically adsorbed on the commercial PLA nanoparticle surface. Without click reaction, only 118 mg of dextran (70 mg of dextran) per gram of PLA has been estimated when commercial (α -alkyne) PLA has been used with such $DexN_3$. As α -alkyne PLA chains are shorter than those of commercial PLA, $DexN_3-15$ must certainly tangle up with more difficulty in PLA chains in the nanoparticle core. In the same way, when $DexC_6-14$ or $DexN_3-15$ surfactant have been used with commercial PLA, lower dextran amount was observed in case of $DexN_3-15$, in agreement with the lower hydrophobicity of these N_3 -end alkyl chains. This is not proving that a thicker layer should be obtained when CuAAC click-chemistry

takes place *in situ*. But, we believe that the density of the polysaccharidic layer increases with the *in situ* CuAAC click-chemistry (see below).

The electrophoretic mobility of PLA particles covered with DexN₃ or DexC₆ has been measured in NaCl as a function of the ionic strength. The evolution of zeta potential (ζ) versus ionic strength is shown in figure 4 for 3 types of nanoparticles that resume all the cases. These particles have been formulated by the o/w emulsion/evaporation technique using commercial PLA or α -alkyne PLA ($\overline{M}_n = 8\ 000$ g/mol) and DexC₆-14 or DexN₃-15 as surfactant. In one case, the CuAAC click-chemistry has been occurred during the process. In all curves and whatever the ionic strength, it can be observed that PLA nanoparticles have a negative potential that is attributed to the presence of ionized carboxyl groups on the surface [43]. Nevertheless, $|\zeta|$ decreases with increasing NaCl concentration. When comparing nanoparticles made with commercial PLA, one can observe that zeta potential of DexN₃-covered nanoparticles exhibits faster neutrality than DexC₆-covered ones. When CuAAC click-chemistry has been occurred during the process, similar evolution of zeta potential has been observed and neutrality has been attained at around $3 \cdot 10^{-3}$ mol/L of NaCl.

The evaluation of the zeta potential (ζ) allows us to estimate the thickness of the dextran layer (Δ_{PZ}) using the equation (10). In case of commercial PLA/DexC₆-14 nanoparticles, Δ_{PZ} has been evaluated at 11 nm while a 30 nm layer has been observed with DexN₃-15 as surfactant, as shown in table 2b. This three-time thicker shell could be one explanation of the zeta potential neutrality that is faster attained in case of commercial PLA/DexN₃-15 nanoparticles but also of the difference in nanoparticles mean diameter (120 *versus* 160 nm). Anyway, it is clear that the dextran shell density (Γ) in case of commercial PLA/DexN₃-15 nanoparticles is lower than using DexC₆-14. This indicates that DexN₃-15, adsorbed at the particle surface, adopts a δ loopö conformation in agreement with the polarized character of N₃, while a δ tailö conformation may be adopted by DexC₆-14. On the other hand, one can see that in case of *in situ* CuAAC click-chemistry, Δ_{PZ} has been evaluated at 20 nm that is lower than that observed with DexN₃-15. The click-chemistry that occurred at liquid/liquid interface may flatten surfactant chains at the nanoparticle surface that enhances the surfactant anchorage. Consequently, the amount of adsorbed dextran per PLA particle surface unit (Γ) is increasing. Nevertheless, using DexN₃-15 as surfactant (with or without CuAAC click-chemistry) instead of DexC₆-n increases Δ_{PZ} .

3.3) Colloïdal stability in the presence of salt

The colloidal stability of nanoparticles obtained by o/w emulsion/evaporation technique has been studied. Three formulations could be compared as shown in figure 2b: commercial PLA has been emulsified with DexC₆-14 or DexN₃-15, while α -alkyne PLA has been reacted with DexN₃-15 during the sonication step. As shown, all these suspensions are quite stable whatever the ionic strength of the water phase. Nanoparticles prepared via an *in situ* CuAAC click-chemistry behave similarly to the other ones classically produced.

The CuAAC click chemistry we used during the sonication step (o/w emulsion/evaporation technique) or to previously synthesize Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ (nanoprecipitation) allowed to link in a covalent way the dextran shell to the PLA core, while maintaining size and colloidal stability similar to classical-produced nanoparticles. In the next paragraph, we will verify that these covalent bonds give a strong and permanent anchorage of the shell.

4) Colloidal stability of dextran-covered nanoparticles in the presence of SDS

In previous paper [11], BSA was used as a test protein to evaluate the dextran shell effect on the extent of nonspecific protein adsorption. Dextran shell decreased the interactions of the nanoparticles surface with this protein compared to uncoated PLA particles. This result gave evidence of the effect of the superficial dextran chains steric protection against protein adsorption.

To evaluate the stability of our covalently-linked shell, the colloidal stability of various formulated nanoparticles has been studied in the presence of a drastic anionic surfactant: sodium dodecyl sulfate (SDS). Indeed, desorption of polymeric layers by SDS has already been reported in literature [44-47]. After 1 day contact with 1 wt% SDS solution, nanoparticles have been washed several times, freeze-dried and dissolved in DMSO-d₆ for ¹H NMR characterization. Clearly and without doubt, no more peaks characteristic of dextran has been shown on ¹H NMR spectra when nanoparticles were produced using DexC₆-14 or DexN₃-15 (without CuBr) (Table 4, Supporting info S5a). Due to their high affinity for hydrophobic surfaces, molecules of SDS desorbed DexC₆-14 or DexN₃-15 by competitive adsorption on the PLA surface. This release of dextran-shell proves that here is a physically adsorbed shell to the PLA core. On the other hand, when CuAAC click-chemistry has been carried out previously (nanoprecipitation of Dex-g-xPLA_m-g-yN₃) or *in situ* during the sonication step (o/w emulsion/evaporation), peaks characteristic from dextran (glucosidic protons, anomeric or alcohol ones) are always observed in the ¹H NMR spectra. Moreover, no decrease of peaks intensity compared to nanoparticles spectrum before SDS contact has been observed (See supporting info S5b), that means no significant desorption of dextran layer

(Table 4). This test confirms that click-chemistry reaction allows fixing in a permanent way the polysaccharide shell to the PLA core. Such nanoparticles should be very stable after their injection into the bloodstream for instance.

CONCLUSIONS

Dex-N₃ surfactants have been used to produce nanoparticles using two different processes: o/w emulsion/evaporation and nanoprecipitation. As DexC₆, these surfactants allow obtaining PLA core/hydrophilic dextran shell nanoparticles with similar characteristics (mean diameter, stability in the presence of salts). Nevertheless, characteristics of the shell (thickness, density) are quite different to those observed with DexC₆ surfactants. That is due to the polarized N₃ function at the end of each alkyl chain in DexN₃.

The presence of many N₃ functions on dextran chain allows us to carry out a CuAAC click-chemistry before (nanoprecipitation) or during the process (o/w emulsion/evaporation). Nanoparticles with similar characteristics to the previous ones in term of diameter, colloidal stability in presence of salts, ...have been formulated. Nevertheless, higher density of dextran shell covalently-linked to the core has been observed. The permanent hydrophilic shell anchorage has been proved using a drastic anionic surfactant (SDS) that mimic aggressive environment.

A deep characterization of this clicked shell as well as post-functionalization of nanoparticles that exhibit residual N₃ functions will be studied in the next future.

Acknowledgements

Maxime Laville was supported by CNRS and Région Lorraine, while Mélanie Legros by the ANR Particart. The authors express their highest gratitude to Marie-Christine Grassiot for help in SEC measurements and Olivier Fabre for NMR measurements.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at

References

- [1] Landoll, L. M. (1982). Nonionic polymer surfactants. *Journal of Polymer Science - Part A - Polymer Chemistry*, 20, 443-455.
- [2] Fournier, C., Léonard, M., Le Coq-Léonard, I., Dellacherie, E. (1995). Coating polystyrene particles by adsorption of hydrophobically-modified dextran. *Langmuir*, 11, 2344-2347.
- [3] Rouzes, C., Durand, A., Léonard, M., Dellacherie, E. (2002). Surface activity and emulsification properties of hydrophobically modified dextrans. *Journal of Colloid and Interface Science*, 253, 217-223.
- [4] Rotureau, E., Léonard, M., Dellacherie, E., Durand, A. (2004). Amphiphilic derivatives of dextran: Adsorption at air/water and oil/water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 279, 68-77.
- [5] Carrier, O., Covis, R., Marie, E., Durand, A. (2011). Inverse emulsions stabilized by a hydrophobically modified polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 84, 599-604.
- [6] Nouvel, C., Dubois, P., Dellacherie, E., Six, J. L. (2004). Controlled synthesis of amphiphilic biodegradable polylactide-grafted dextran copolymers. *Journal of Polymer Science - Part A - Polymer Chemistry*, 42, 2577-2588.
- [7] Dupayage, L., Save, M., Dellacherie, E., Nouvel, C., Six, J. L. (2008). PMMA-Grafted Dextran Glycopolymers by Atom Transfer Radical Polymerization. *Journal of Polymer Science - Part A - Polymer Chemistry*, 46, 7606-7620.
- [8] Ouhib, R., Renault, B., Mouaziz, H., Nouvel, C., Dellacherie, E., Six, J. L. (2009). Biodegradable amylose-g-PLA glycopolymers from renewable resources. *Carbohydrate Polymers*, 77, 32-40.
- [9] Lemarchand, C., Gref, R., Couvreur, P. (2004). Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 327-341.
- [10] Lemarchand, C., Couvreur, P., Besnard, M., Costantini, D., Gref, R. (2003). Novel polyester-polysaccharide nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 20, 1284-1292
- [11] Rouzes, C., Léonard, M., Durand, A., Dellacherie, E. (2003). Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 32, 125-135.
- [12] Nouvel, C., Raynaud, J., Marie, E., Dellacherie, E., Six, J. L., Durand, A. (2009). Biodegradable nanoparticles made from polylactide-grafted dextran copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 330, 337-343.

- [13] Ma, W. J., Yuan, X. B., Kang, C. S., Su, T., Yuan, X. Y., Pu, P. Y., Sheng, J. (2008). Evaluation of blood circulation of polysaccharide surface-decorated PLA nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 72, 75-81.
- [14] Vila, A., Sanchez, A., Tobio, M., Calvo, P., Alonso, M. J. (2002). Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, 78, 15-24.
- [15] Zhang, H., Gao, F., Liu, L., Li, X., Zhou, Z., Yang, X., Zhang, Q. (2009). Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 71, 19-26.
- [16] Jeong, Y., Na, H. S., Oh, J. S., Choi, K. C., Song, C. E., Lee, H. C. (2006). Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly(DL-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan. *International Journal of Pharmaceutics*, 322, 154-160.
- [17] Gavory, C., Durand, A., Six, J. L., Nouvel, C., Marie, E., Léonard, M. (2011). Polysaccharide-covered nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1336-140.
- [18] Zille, H., Paquet, J., Henrionnet, C., Scala-Bertola, J., Léonard, M., Six, J. L., Deschamp, F., Netter, P., Verges, J., Gillet, P., Grossin, L. (2010). Evaluation of intra-articular delivery of Hyaluronic Acid functionalized biopolymeric nanoparticles in healthy rat knees. *Bio-medical Materials and Engineering*, 20, 235-242.
- [19] Jeong, Y. I., Kim, D. H., Chung, C. W., Yoo, J. J., Choi, K. H., Kim, C. H., Ha, S. H., Kang, D. H. (2012). Self-assembled nanoparticles of hyaluronic acid/poly(DL-lactide-co-glycolide) block copolymer. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 90, 28-35.
- [20] Yadav, A. K., Mishra, P., Mishra, A. K., Mishra, P., Jain, S., Agrawal, G. P. (2007). Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine*, 3, 246-257.
- [21] Wang, W., Zhou, S., Sun, L., Huang, C. (2010). Controlled delivery of paracetamol and protein at different stages from core-shell biodegradable microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 79, 437-444.
- [22] Bravo-OSuna, I., Vauthier, C., Farabollini, A., Palmieri, G. F., Ponchel, G. (2007). Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials*, 28, 2233-2243.

- [23] Messai, I., Lamalle, D., Munier, S., Verrier, B., Ataman-Onal, Y., Delair, T. (2005). Poly(D,L-lactic acid) and chitosan complexes: interactions with plasmid DNA. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 255, 65-72.
- [24] Bertholon, I., Vauthier, C., Labarre, D. (2006). Complement activation by core-shell poly(isobutylcyanoacrylate)-polysaccharide nanoparticles: Influences of surface morphology, length, and type of polysaccharide. *Pharmaceutical Research*, 23, 1313-1323.
- [25] Vauthier, C., Persson, B., Lindner, P., Cabane, B. (2011). Protein adsorption and complement activation for di-block copolymer nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 1646-1656.
- [26] Osterberg, E., Bergstrom, K., Holmberg, K., Schuman, T. P., Riggs, J. A., Burns, N. L., Vanalstine, J. M., Harris, J. M. (1995). Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations ó Comparison to PEG. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29,741-747.
- [27] Zhang, W., Huang, J., Fan, N., Yu, J., Liu, Y., Liu, S., Wang, D., Li, Y. (2010). Nanomicelle with long-term circulation and enhanced stability of camptothecin based on mPEGylated , -poly (l-aspartic acid)-camptothecin conjugate. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 81, 297-303.
- [28] Deshiikan, S. R., Papadopoulos, K. D. (1998). Modified Booth equation for the calculation of zeta potential. *Colloid and Polymer Science*, 276, 117-124.
- [29] Eversole, W. G., Boardman, W. W. (1941). The Effect of Electrostatic Forces on Electrokinetic Potentials. *Journal of Chemical Physics*, 9, 798-801.
- [30] Rotureau, E., Chassenieux, C., Dellacherie, E., Durand, A. (2005). Neutral polymeric Surfactants derived from dextran: A study of their aqueous solution behavior. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 206, 2038-2046.
- [31] Rostotev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie- International Edition*, 41, 2596-2599.

- [32] Tizzotti, M., Labeau, M. P., Hamaide, T., Drockenmuller, E., Charlot, A., Fleury, E. (2010). Synthesis of Thermosensitive Guar-Based Hydrogels with Tunable Physico-Chemical Properties by Click Chemistry. *Journal of Polymer Science - Part A - Polymer Chemistry*, 48, 2733-2742.
- [33] Le, D., Montembault, V., Soutif, J. C., Rutnakornpituk, M., Fontaine, L. (2010). Synthesis of Well-Defined omega-Oxanorbornenyl Poly(ethylene oxide) Macromonomers via Click Chemistry and Their Ring-Opening Metathesis Polymerization. *Macromolecules*, 43, 5611-5617.
- [34] Nielsen, T. T., Wintgens, V., Amiel, C., Wimmer, R., Larsen, K. L. (2010). Facile Synthesis of beta-Cyclodextrin-Dextran Polymers by "Click" Chemistry. *Biomacromolecules*, 11, 1710-1715.
- [35] Darcos, V., El Habnoui, S., Nottelet, B., El Ghzaoui, A., Coudane, J. (2010). Well-defined PCL-graft-PDMAEMA prepared by ring-opening polymerisation and click chemistry. *Polymer Chemistry*, 1, 280-282.
- [36] Babinot, J., Renard, E., Langlois, V. (2011). Controlled Synthesis of Well Defined Poly(3-hydroxyalkanoate)s-based Amphiphilic Diblock Copolymers Using Click Chemistry. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 212, 278-285.
- [37] Lowe, A. B., Hoyle, C. E., Bowman, C. N. (2010). Thiol-yne click chemistry: A powerful and versatile methodology for materials synthesis. *Journal of Materials Chemistry*, 20, 4745-4750.
- [38] Hoyle, C. E., Bowman, C. N. (2010). Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie-International Edition*, 49, 1540-1573.
- [39] Tasdelen, M. A. (2011). Diels-Alder "click" reactions: recent applications in polymer and material science. *Polymer Chemistry*, 2, 2133-2145.
- [40] Ydens, I., Degée, P., Nouvel, C., Dellacherie, E., Six, J. L., Dubois, P. (2005). Surfactant-free stable nanoparticles from biodegradable and amphiphilic poly(ϵ -caprolactone)-grafted dextran copolymers. *e-Polymers*, 046.
- [41] Legrand, P., Lesieur, S., Bochet, A., Gref, R., Raatjes, W., Barratt, G., Vauthier, C. (2007). Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*, 344, 33-43.

- [42] Cintas, P., Palmisano, G., Cravotto, G. (2011). Power ultrasound in metal-assisted synthesis: From classical Barbier-like reactions to click chemistry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18-S1, 836-841.
- [43] Colinet, I., Dulong, V., Hamaide, T., Le Cerf, D., Picton, L. (2009). New amphiphilic modified polysaccharides with original solution behaviour in salt media. *Carbohydrate Polymers*, 75, 454-462.
- [44] Stolnik, S., Garnett, M. C., Davies, M. C., Illum, L., Boustia, M., Vert, M., Davis, S. S. (1995). The colloidal properties of surfactant-free biodegradable nanospheres from poly(β -malic acid *ó*co- benzyl malate)s and poly(lactic acid *ó*co- glycolide). *Colloids and Surfaces A- Physicochemical and Engineering Aspects*, 97, 235-245.
- [45] Cattoz, B., Cosgrove, T., Crossman, M., Prescott, S. W. (2012). Surfactant-Mediated Desorption of Polymer from the Nanoparticle Interface. *Langmuir*, 28, 2485-2492.
- [46] Blokhus, A. M., Djurhuus, K. (2006). Adsorption of poly(styrene sulfonate) of different molecular weights on alpha-alumina: Effect of added sodium dodecyl sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 296, 64-70.
- [47] Lauten, R. A., Kjoniksen, A. L., Nystrom, B. (2000). Adsorption and desorption of unmodified and hydrophobically modified ethyl(hydroxyethyl)cellulose on polystyrene latex particles in the presence of ionic surfactants using dynamic light scattering. *Langmuir*, 16, 4478-4484.
- [48] Brown, W., Zhao, J. X. (1993). Adsorption of sodium dodecyl sulfate on polystyrene latex particles using dynamic light scattering and zeta potential measurements. *Macromolecules*, 26, 2711-2715.

SCHEME AND FIGURE CAPTIONS

Scheme 1. Syntheses of DexN₃ and Dextran-g-PLA

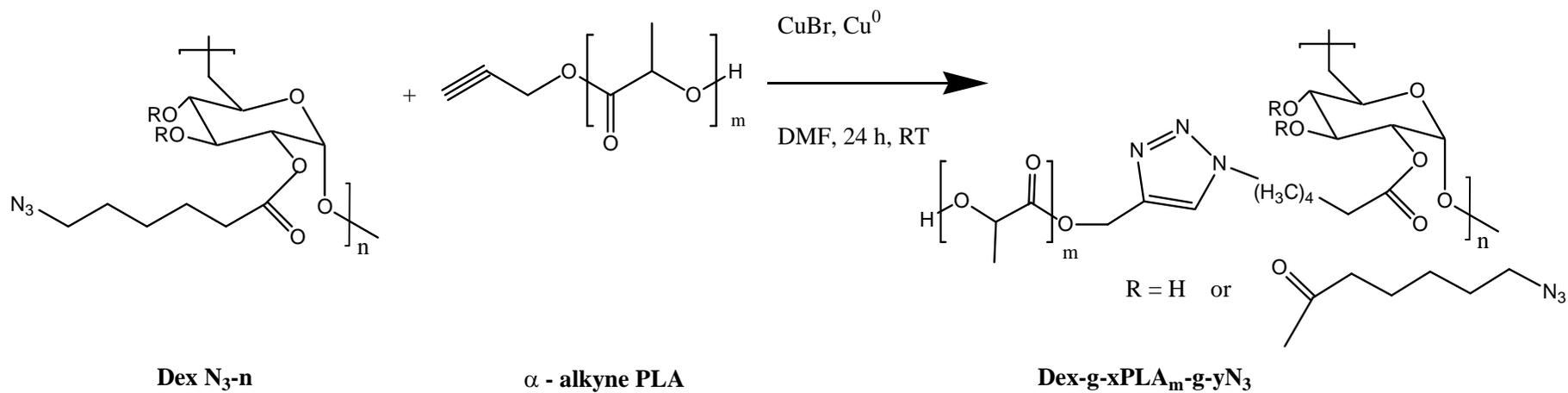
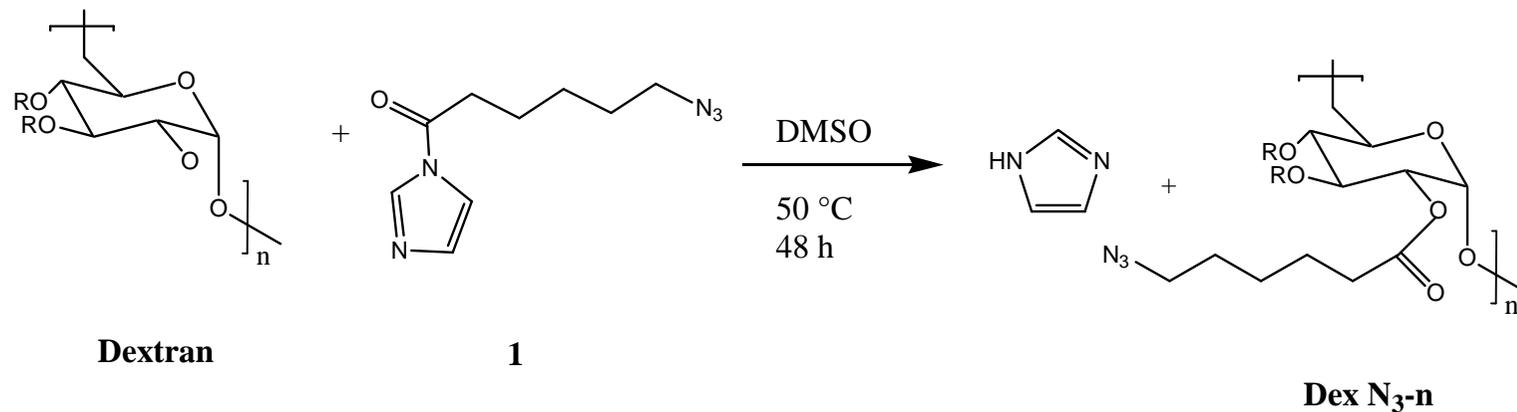
Figure 1. Surface tension of aqueous DexN₃-n or DexC₆-n solutions.

Figure 2. Colloidal stability of nanoparticles in the presence of NaCl. Case of nanoprecipitation (a). Case of o/w emulsion/evaporation (b)

Figure 3. ¹H NMR (DMSO-d₆) spectra of nanoparticles produced via o/w emulsion/evaporation technique. DexN₃-15 and various amounts of α-alkyne PLA ($\overline{M}_n = 8\ 000$ g/mol) have been used with or without addition of CuBr.

Figure 4. Zeta potential of nanoparticles made by o/w emulsion/evaporation technique.

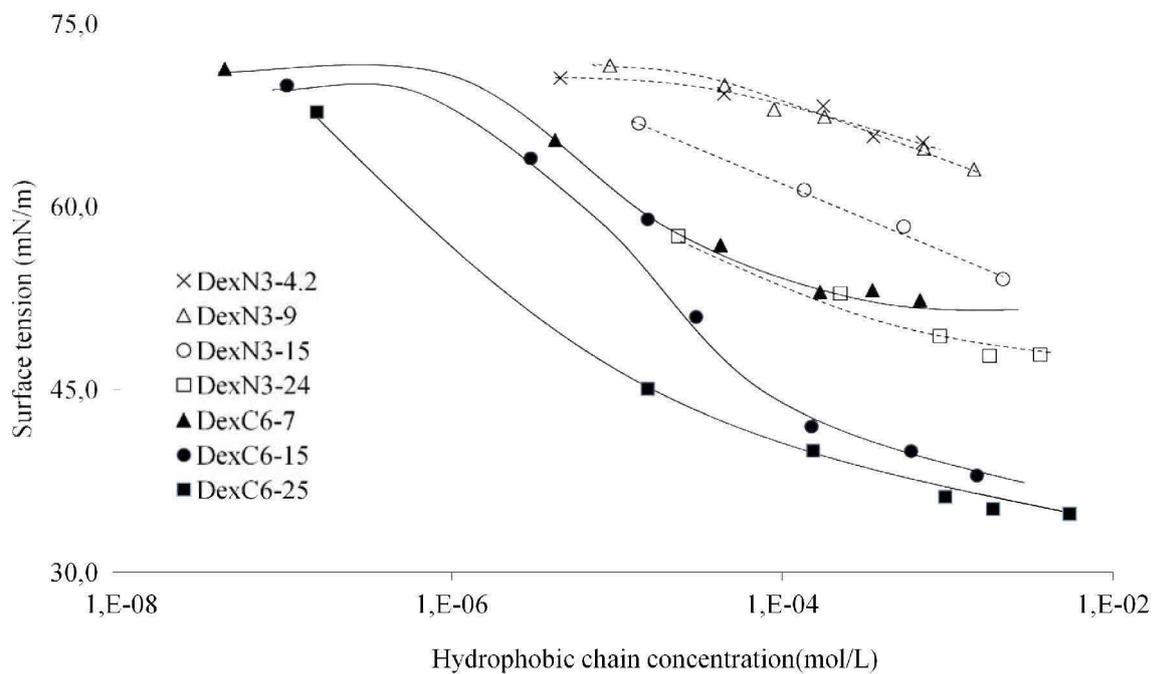
1 Scheme 1. Syntheses of DexN₃ and Dextran-g-PLA



2

3

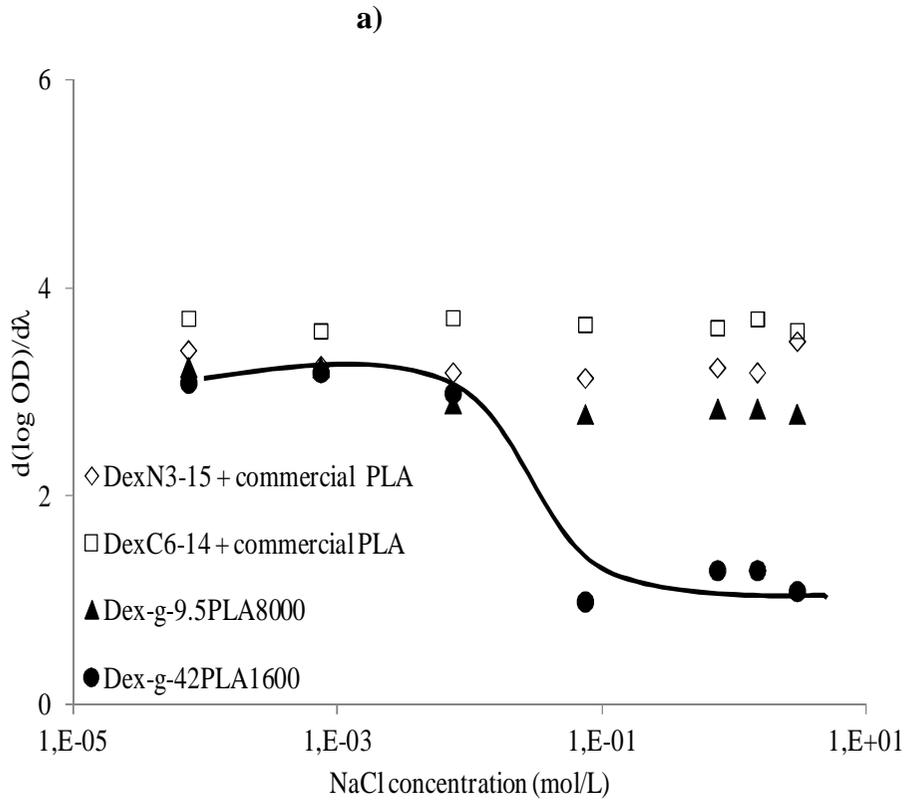
4 Figure 1. Surface tension of aqueous DexN₃-n or DexC₆-n solutions.



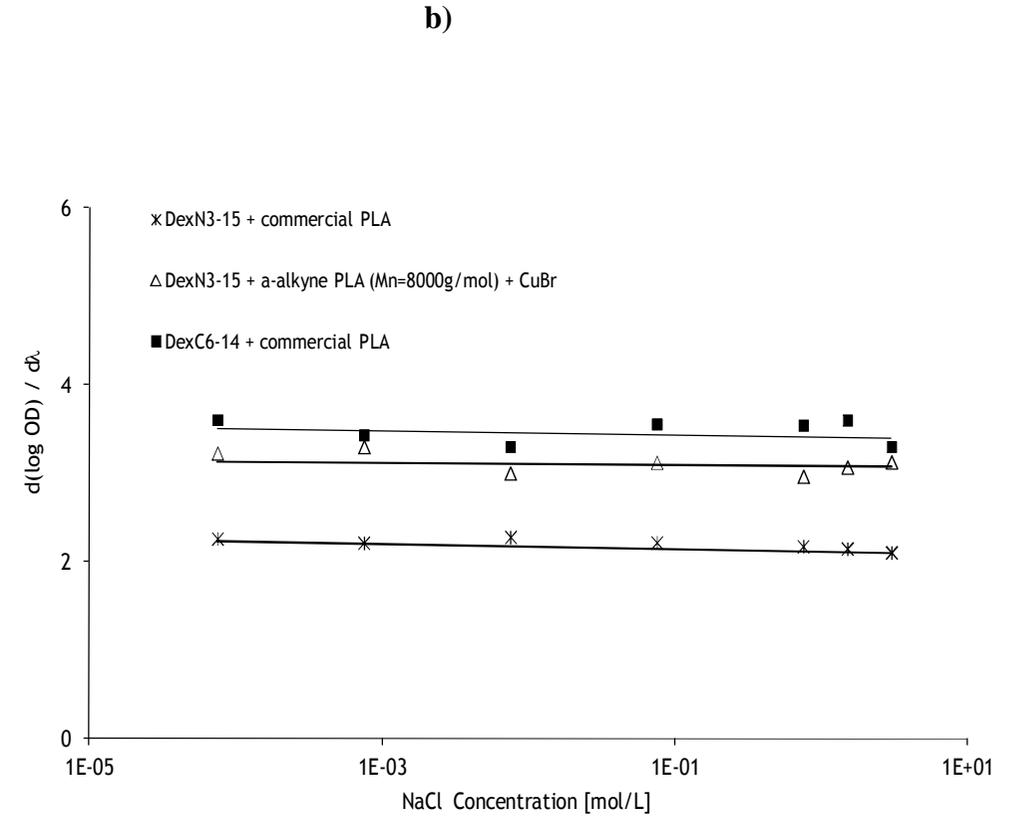
5

6 Figure 2. Colloidal stability of nanoparticles in the presence of NaCl. Case of nanoprecipitation (a). Case of o/w emulsion/evaporation (b)

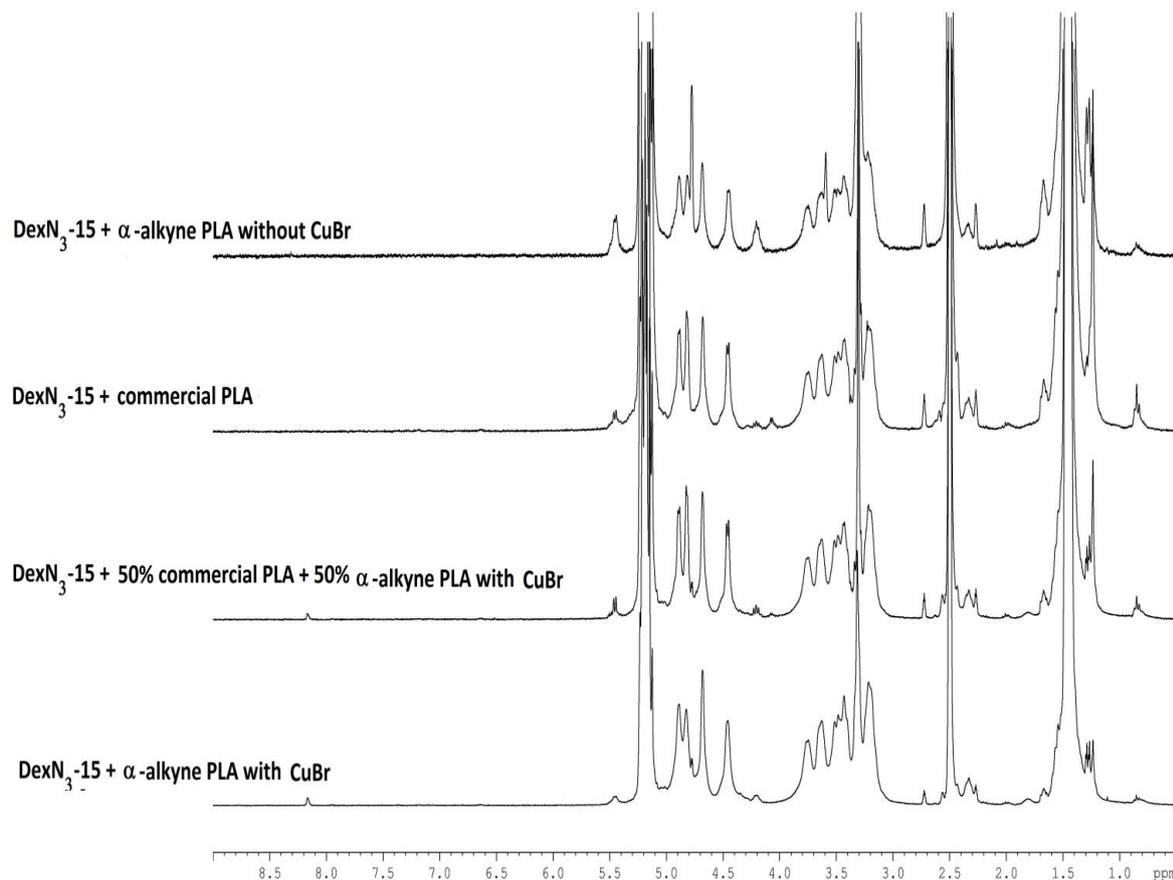
7



8

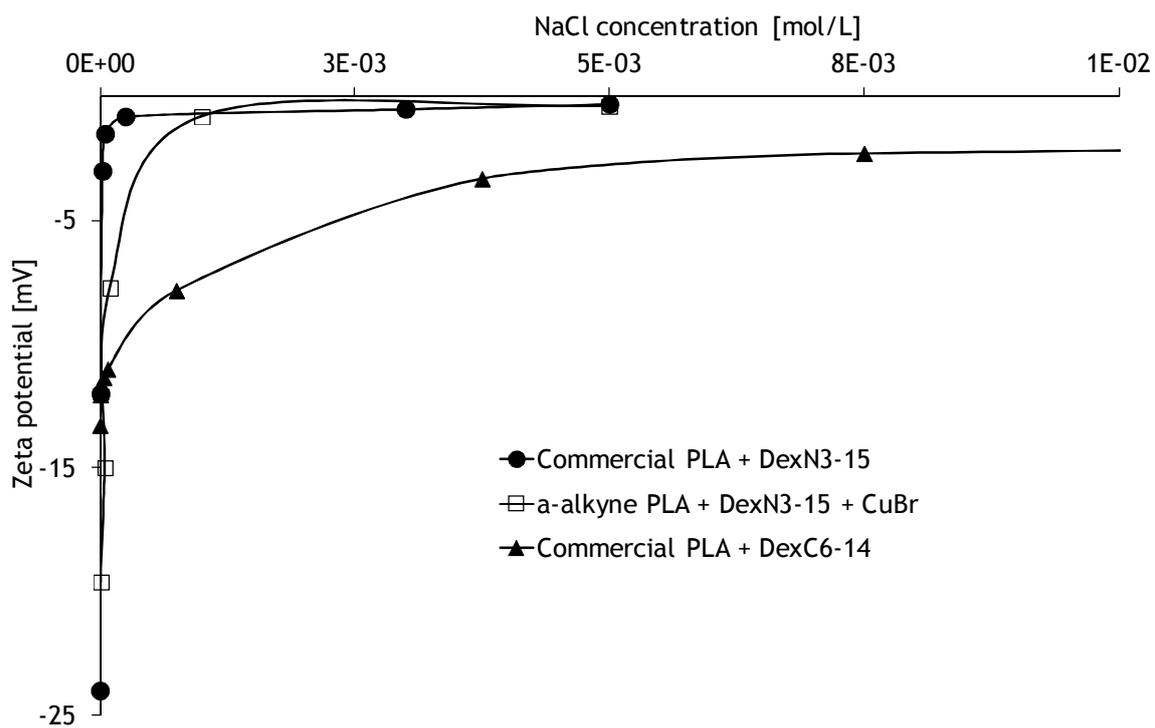


9 Figure 3. ^1H NMR (DMSO- d_6) spectra of nanoparticles produced via o/w
10 emulsion/evaporation technique. DexN₃-15 and various amounts of α -alkyne PLA ($\overline{M}_n =$
11 8 000 g/mol) have been used with or without addition of CuBr.



12
13

14 Figure 4. Zeta potential of nanoparticles made by o/w emulsion/evaporation technique



15
16

17 **TABLE CAPTIONS**

18 Table 1 Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ characteristics

19 Table 2. Characteristics of nanoparticles

20 a) obtained by nanoprecipitation of Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ (10 g/L in organic solvent

21 (acetone/water 95/5 v/v))

22 b) formulated with o/w emulsion/evaporation technique. α -alkyne PLA ($\overline{M}_n = 8\ 000$ g/mol)

23 has been used. The concentration of PLA in organic solvent was 25 g/L.

24 Table 3. Characteristics of Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ produced at liquid/liquid interface

25 Table 4. Amount of dextran (mg dextran / g PLA) in nanoparticles before and after contact

26 with 1 wt% SDS solution.

27 Table 1. Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ characteristics

28

Dex-g-xPLA _m -g-yN ₃ *	DexN ₃ -n *	α-alkyne PLA (M _n g/mol)	ρ _{PLA} ^{a)}	Theoretical M _n ^{b)} (g/mol)	dn/dc	SEC M _n * (g/mol)	N _{grafts} ^{c)}
Dex-g-9.5PLA ₈₀₀₀	DexN ₃ -9.5	8 000	81	196 300	0.035	152 300	15
Dex-g-14PLA ₅₂₀₀ -g-10N ₃	DexN ₃ -24	5 200	79	198 200	0.029	229 600	36
Dex-g-42PLA ₁₆₀₀	DexN ₃ -42	1 600	75	187 300	0.039	196 500	95
Dex-g-82PLA ₁₀₀₀	DexN ₃ -82	1 000	75	230 000	0.036	184 200	133

29
30

31 * : for explanations, see materials and methods part

32 a) From equation (3)

33 b) From equation (4)

34 c) From equation (5)

35 Table 2. Characteristics of nanoparticles

36 a) obtained by nanoprecipitation of Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ (10 g/L in organic solvent (acetone/water 95/5 v/v))

37 b) formulated with o/w emulsion/evaporation technique. α -alkyne PLA ($\overline{M}_n = 8\ 000$ g/mol) has been used. The concentration of PLA in
38 organic solvent was 25 g/L.

39

40 **a)**

Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ *	$\rho_{\text{PLA}}^{\text{a)}$	Dz (nm)	PDI	mg dextran / g PLA ^{b)}
Dex-g-9.5PLA ₈₀₀₀	80	125	0.146	-
Dex-g-42PLA ₁₆₀₀	75	147	0.126	140
Dex-g-82PLA ₁₀₀₀	75	131	0.085	222

41

42

43

44

45

46 **b)**

	DexC ₆ -14 + commercial PLA	DexN ₃ -15 + commercial PLA	DexN ₃ -15 + 50 % commercial PLA + 50% -alkyne PLA + CuBr	DexN ₃ -15 + alkyne PLA + CuBr	DexN ₃ -15 + -alkyne PLA without CuBr
Dz (nm)	120	160	150	150	150
PDI	0.01	0.05	0.10	0.10	0.20
Δ_{PZ} (nm) ^{c)}	11	30		20	
mg dextran / g PLA ^{b)}	216	118	210	382	70
Γ (mg/m ²) ^{d)}	4.45	1.49		6.42	

47

48 a) From Equation (3)

49 b) From Equation (8). In case of commercial PLA nanoprecipitated in the presence of DexC₆-14, the amount of dextran was estimated to be 94
50 mg dextran/g PLA.

51 c) From Equation (10)

52 d) From Equation (9)

53 Table 3. Characteristics of Dex-g-xPLA_m-g-yN₃ produced at liquid/liquid interface

	-alkyne PLA/commercial PLA weight ratio (%)		
	0	50	100
-alkyne PLA (g) *	0	0.0125	0.025
Commercial PLA (g)	0.025	0.0125	0
DexN ₃ -15 (g)	0.05	0.05	0.05
N ₃ /alkyne molar ratio	0	26.25	13.12
Dex-g-xPLA _m -g-yN ₃ produced at the interface	DexN ₃ -15	Dex-g-1.4PLA ₈₀₀₀ -g-13.6N ₃	Dex-g-2.5PLA ₈₀₀₀ -g-12.5N ₃
% alkyne **	0	36.8	13.1

54

55 * $\overline{Mn} = 8\ 000\ \text{g/mol}$

56 ** estimated from equation (6)

57

58 Table 4. Amount of dextran (mg dextran / g PLA) in nanoparticles before and after contact with 1 wt% SDS solution.

59

	DexC ₆ -14 + commercial PLA		DexN ₃ -15 + commercial PLA		DexN ₃ -15 + a-alkyne PLA (8 000 g/mol) + CuBr		Dex-g-9.5PLA ₈₀₀₀	
	Before SDS	After SDS	Before SDS	After SDS	Before SDS	After SDS	Before SDS	After SDS
o/w emulsion/evaporation	216	0	118	0	382	360	-	-
nanoprecipitation	94	0	-	-	-	-	210	200

60

61

Supporting Info

62

63 S1. DexN₃-n characteristics

Name	Equivalent of compound 1 per 100 glucose units	n *	Hydrophobic/hydrophilic molar fraction (%)**
DexN ₃ -4.2	5	4.2	3.5
DexN ₃ -9.5	10	9.5	7.7
DexN ₃ -15	18	15	11.94
DexN ₃ -24	25	24	17.1
DexN ₃ -42	50	42	26.5
DexN ₃ -82	100	82	41.3

64

65 * n is the modification degree estimated using equation (1)

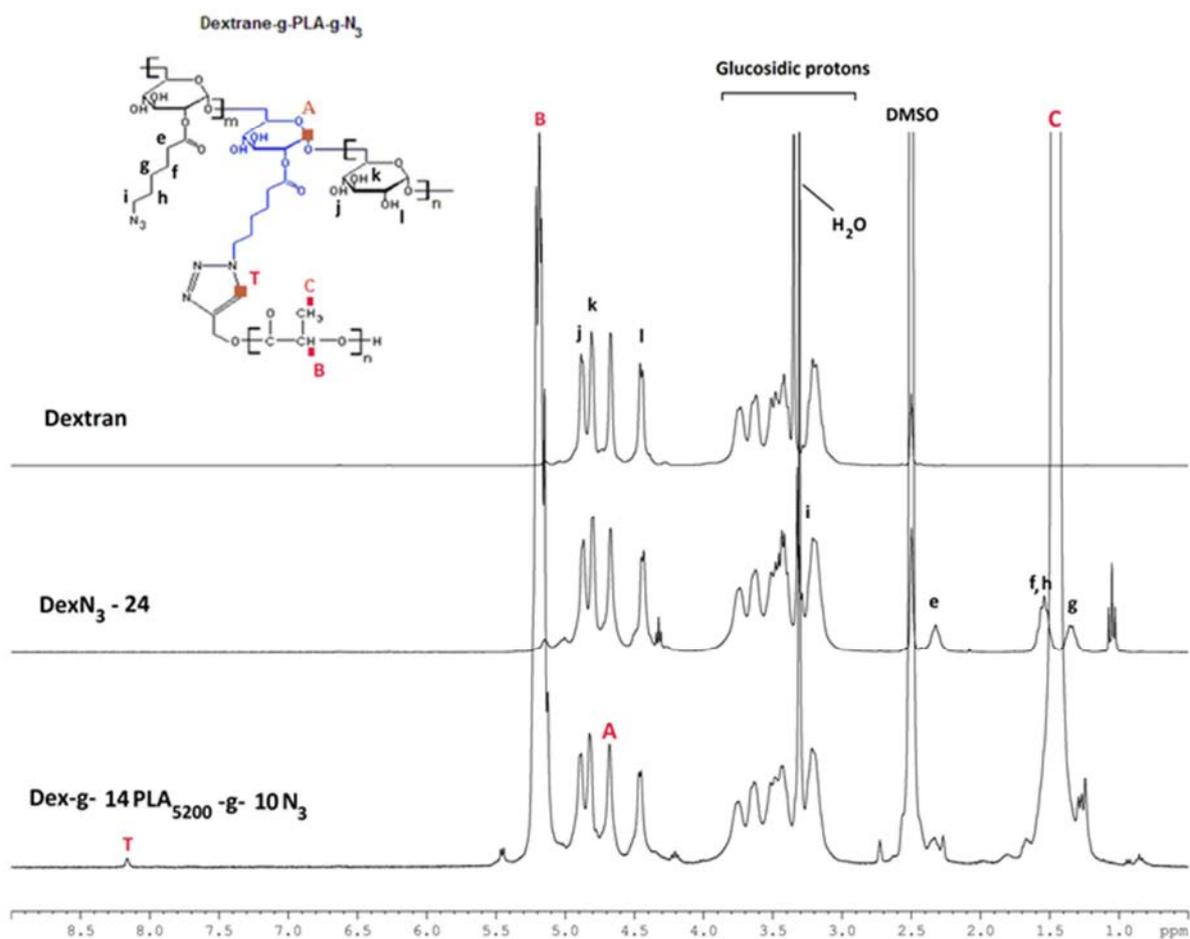
66 ** The hydrophobic/hydrophilic molar fraction has been estimated using

$$67 \frac{n * 139}{n * 301 + (100 - n) * 162} * 100$$

68 where 162 and 301 are the molar masses of glucose unit and of glucose unit carrying one N₃-

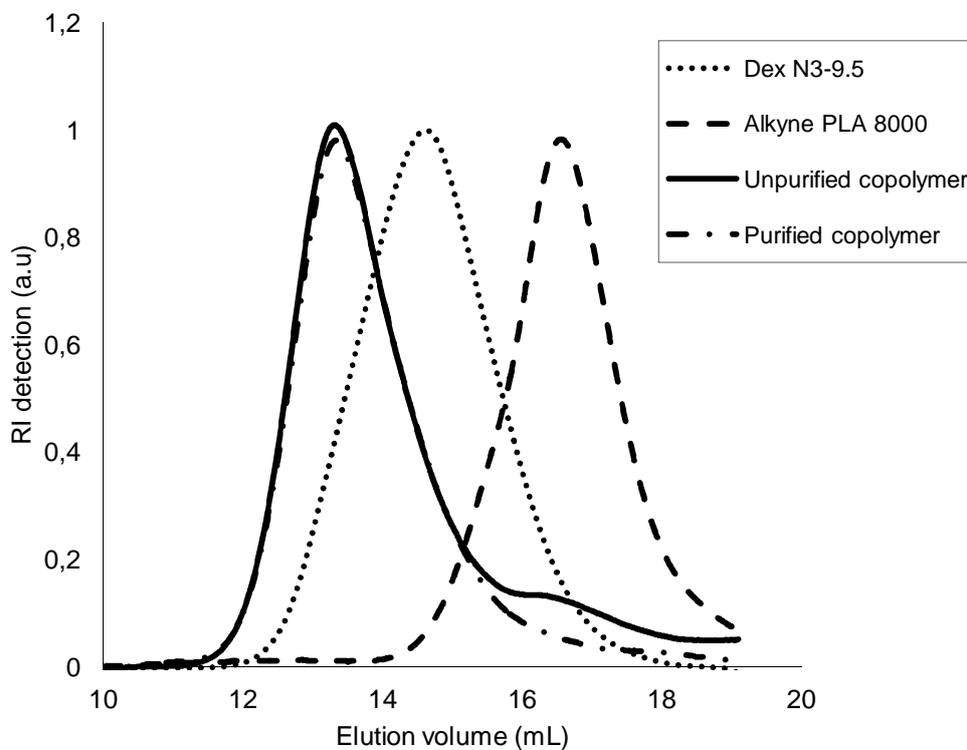
69 end alkyl chain (its molar mass is equal to 139), respectively.

70 S2. ^1H NMR (DMSO-d_6) spectra of Dextran, DexN_3 -24 and purified $\text{Dex-g-14PLA}_{5200}\text{-g-}$
 71 10N_3



72
 73

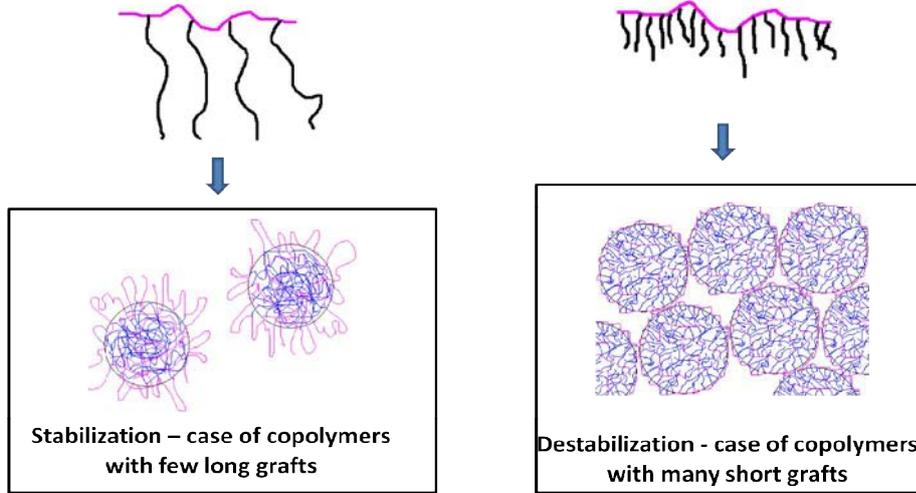
74 S3. SEC chromatograms of DexN₃-9.5, α -alkyne PLA ($\overline{M}_n = 8\,000$ g/mol), purified and
75 unpurified Dex-g-9.5PLA₈₀₀₀ (DMF-LiCl, refractometric detection).



76
77

Utilisation de la Chimie-click pour la fonctionnalisation de nanoparticules destinées au ciblage de principes actifs dans la thérapie anti-cancéreuse (Objectif 2)

S4. Schematic conformations of Dex-g-PLA copolymers at the surface of nanoparticles

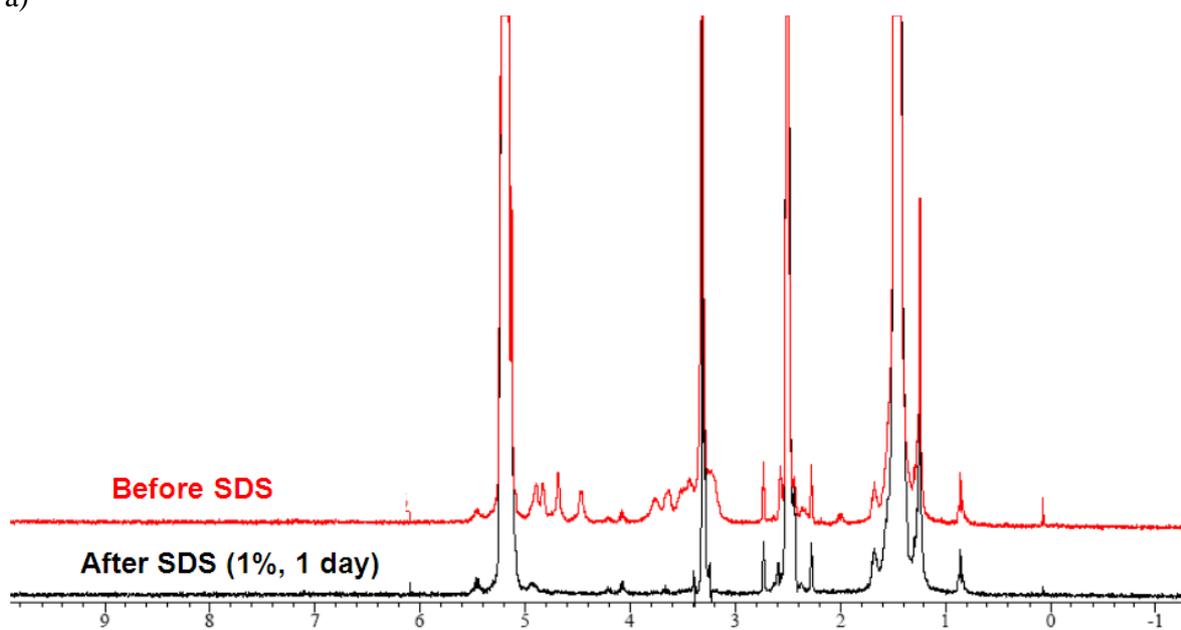


S5. ^1H NMR spectra (DMSO- d_6) of washed and freeze-dried nanoparticles before and after contact with 1 wt% SDS solution.

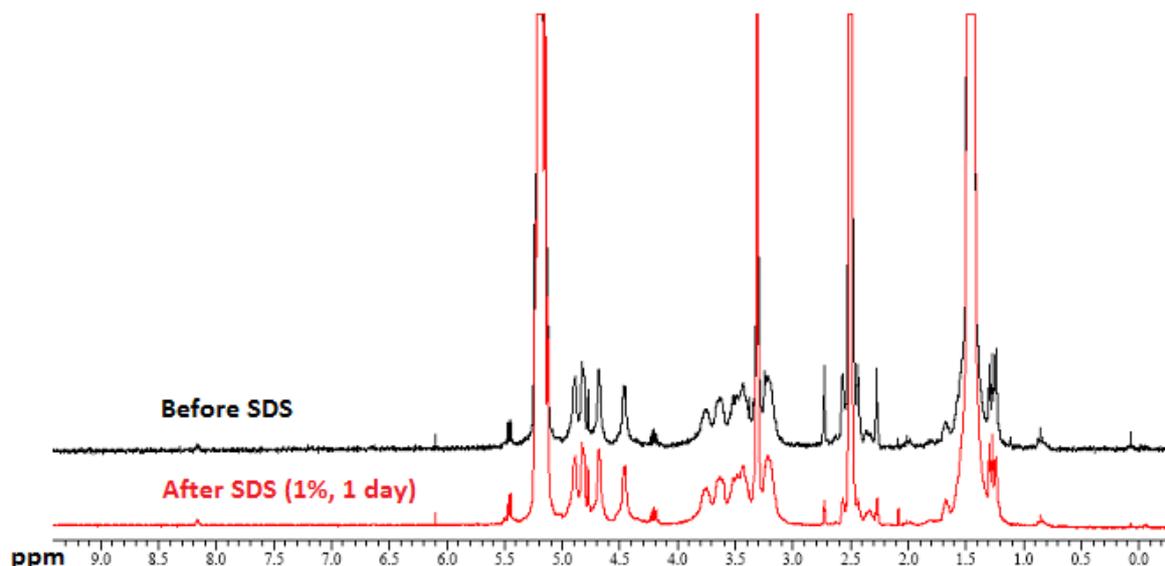
a) Case of nanoparticles made by o/w emulsion/evaporation (DexN₃-15 + commercial PLA)

b) Case of nanoparticles made by o/w emulsion/evaporation (DexN₃-15 + -alkyne PLA (8000 g/mol) + CuBr)

a)



b)



2. Nanoparticules de troisième génération : Fonctionnalisation en surface

Nous venons de démontrer la très grande efficacité et l'apport de la Chimie-click aux nanoparticules. Que cette Chimie-click soit employée en amont (obtention préalable des Dex-g-PLA-g-N₃) ou lors du procédé d'émulsion/évaporation de solvant, les nanoparticules obtenues conservent leur stabilité colloïdale et leur taille. De plus, la couche de dextrane se trouve alors fixée de manière covalente au cœur PLA, ce qui assure une stabilité accrue des nanoparticules en milieu salin ou en présence de tensioactif anionique.

Le 3^{ème} objectif que nous nous étions fixés lors de ce doctorat était de produire des nanoparticules aptes à cibler spécifiquement certaines cellules particulières. Plus précisément, nous avons envisagé d'employer ces particules dans une thérapie anticancéreuse, en ciblant les néovaisseaux qui irriguent les cellules tumorales. Le but de cette étude étant de fixer un peptide ciblant la neuropiline 1 surexprimée à la surface de ces néovaisseaux. Nous montrerons dans les pages qui suivent les résultats qualitatifs d'une post-modification de nanoparticules.

Les particules utilisées pour cette post-fonctionnalisation seront toujours les mêmes et seront élaborées dans les conditions résumées dans le *Tableau 26*.

Tableau 26 - Résumé des conditions d'élaboration des nanoparticules utilisées pour la post-fonctionnalisation

	Émulsion/évaporation	Nanoprécipitation
DexN ₃ -15	5 mg/mL	-
PLA α -alcyne (MN:8000g/mol)	5 mg/mL	-
Dex-g-9,5PLA ₈₄₀₀ -g-17,4N ₃	-	10 mg/mL
Phase organique	1 mL DCM	5 mL acétone/eau (95%/5%)
Phase aqueuse	10 mL eau	10 mL eau
Chimie-Click	durant la sonication	durant la synthèse du copolymère
Z-Average mesuré par HPPS	150 nm	189 nm
Épaisseur de couche hydrophile	11	-
Quantité de Dextrane/g de PLA (mg/g de PLA)	382	205

2.1. Post-fonctionnalisation à l'aide d'une sonde fluorescente modèle

Tout d'abord, une molécule modèle fluorescente à base de coumarine (*Figure 115*) est utilisée pour effectuer la post-fonctionnalisation des nanoparticules en lieu et place du marqueur de reconnaissance. L'utilisation de cette sonde nous permettra de mettre en évidence rapidement la faisabilité de cette fonctionnalisation en surface des nanoparticules.

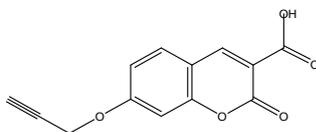


Figure 115 : Molécule modèle fluorescente utilisée

La post-fonctionnalisation qui se déroule à la surface des nanoparticules se réalise en mettant en œuvre une réaction de Chimie-click entre le dérivé coumarine et le dextrane-g-PLA-g-N₃ présent à la surface des particules selon le schéma suivant:

Utilisation de la Chimie-click pour la fonctionnalisation de nanoparticules destinées au ciblage de principes actifs dans la thérapie anti-cancéreuse (Objectif 2)

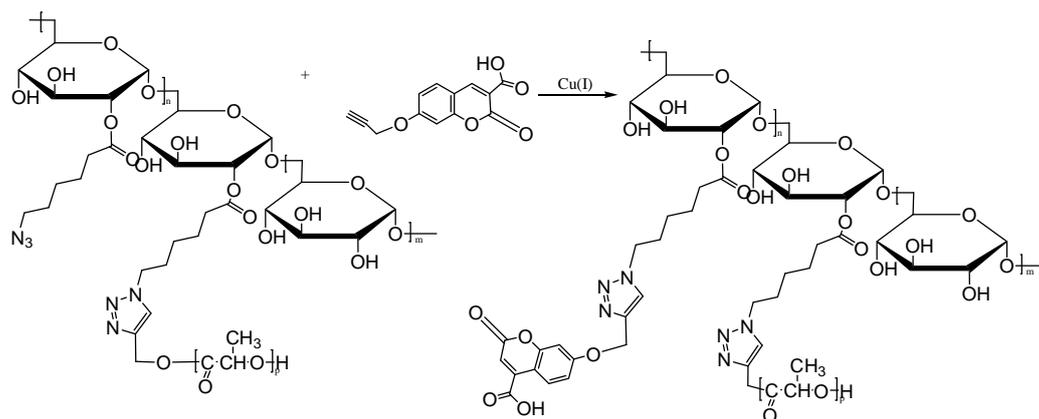


Schéma 5 - Réaction de Chimie-click entre le copolymère (localisé à la surface des nanoparticules) et le dérivé de coumarine

Pour vérifier que cette post-fonctionnalisation se déroule bien et que le dérivé coumarine n'est pas juste adsorbé à la surface des particules, deux expériences ont été réalisées : l'une avec CuBr, l'autre sans CuBr. Comme les quantités de sondes fluorescentes utilisées sont trop faibles pour être analysées par RMN ^1H , nous vérifierons le greffage de manière qualitative, sous irradiation par lumière U.V. à 345 nm après lavage et redispersion. La Figure 116, qui montre les suspensions irradiées par une lampe U.V., confirme la présence de molécules fluorescentes à la surface des nanoparticules lorsque la post-fonctionnalisation est réalisée avec CuBr. En effet, aucune fluorescence n'est observée avec les nanoparticules initiales ou lorsque la tentative de post-fonctionnalisation est réalisée sans CuBr. Ce résultat est observé pour des nanoparticules obtenues par nanopréciipitation de Dex-g-9,5PLA₈₄₀₀-g-17,5N₃, mais également dans le cas des nanoparticules produites par émulsion/évaporation de solvant en utilisant le DexN₃-15 comme tensioactif.

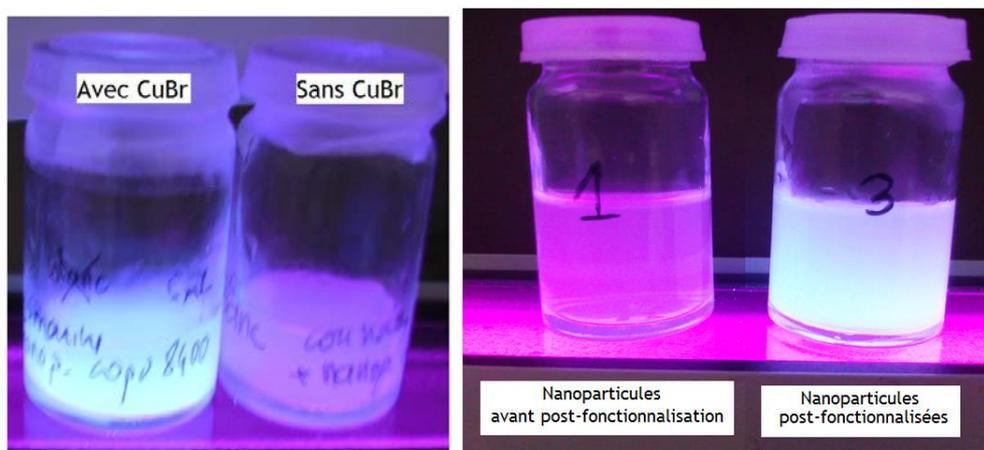


Figure 116 - Suspensions, sous lumière U.V., de nanoparticules réalisées par nanopréciipitation (gauche) et par émulsion/évaporation de solvant (droite) et post-fonctionnalisées (avec CuBr) ou non.

Après avoir prouvé qualitativement la post-fonctionnalisation des particules, il nous semblait important de réaliser une mesure de taille pour vérifier que la suspension conserve ses principales caractéristiques lors de cette modification. Le diamètre moyen Z-average des nanoparticules après post-fonctionnalisation est tout à fait comparable (légèrement supérieur) à celui de la suspension avant fonctionnalisation (Figure 117). On peut alors conclure que le greffage du dérivé de coumarine ne modifie donc pas significativement le diamètre des particules.

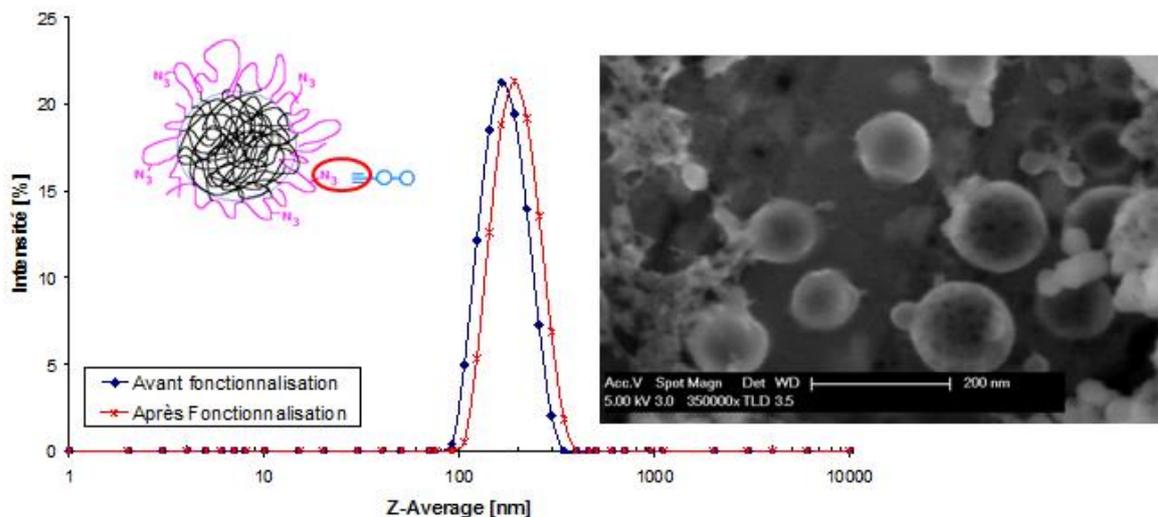


Figure 117 - Mesure de taille des nanoparticules avant et après fonctionnalisation par HPPS (à gauche). Microscopie Electronique à Balayage MEB (droite) pour les particules fonctionnalisées.

Le principe de fonctionnalisation étant validé pour les deux procédés d'élaboration, nous pouvons donc tester la post-fonctionnalisation des particules avec la molécule ciblant la neuropiline-1.

2.2. Post-fonctionnalisation à l'aide d'un peptide de reconnaissance

2.2.1. Introduction

Très brièvement, une tumeur cancéreuse correspond à une dégénérescence locale des tissus humains. La tumeur peut rester stable ou grossir lentement car elle se suffit à elle-même pour survivre dans l'organisme. On dit que cet ensemble de cellules est infraclinique. Paradoxalement, à un certain stade de croissance, la tumeur aura besoin de nutriments extérieurs, notamment d'oxygène, pour continuer son processus de développement. C'est à ce stade qu'intervient l'angiogenèse vasculaire, à savoir la création de vaisseaux sanguins qui relie le réseau sanguin préexistant à la tumeur afin de l'alimenter en nutriments. Parmi les régulateurs clés de l'angiogenèse figurent les facteurs de croissance d'angiogenèse vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF)) et leurs récepteurs, notamment la Neuropiline-1.

Un des problèmes majeurs dans le traitement du cancer réside dans le fait qu'il est difficile de cibler une tumeur cancéreuse par un système de vectorisation des principes actifs et encore plus difficile de

la détruire, sans endommager le tissu humain sain environnant et créer alors des effets secondaires que le patient subit.

Le but de la post-fonctionnalisation des nanoparticules est alors de fixer un peptide ciblant la tumeur ou les vaisseaux sanguins responsables de son alimentation. Plus précisément, dans notre cas, il s'agit de cibler la Neuropiline 1 (NRP1) surexprimée à la surface des néo-vaisseaux irriguant la tumeur. Des études menées dans notre laboratoire par le Groupe de Synthèses Organiques et Biosystèmes ont permis d'isoler un heptapeptide permettant de cibler avec succès la NRP1, à savoir l'ATWLPPR [3]. Nous avons alors mis à profit ces études et avons modifié ce peptide de manière à pouvoir le fixer à la surface de nos nanoparticules de PLA recouvertes d'une couche hydrophile dextrane qui présente des fonctions N_3 résiduelles. Une fonction alcyne lui a donc été ajoutée lors de sa dernière étape de synthèse du support solide. Le peptide ATWLPPR ω -alcyne est alors synthétisé sur support solide et son spectre RMN 1H est donné dans la *Figure 118* où l'on remarque le pic correspondant au proton NH indolique du tryptophane qui résonne à 10,8 ppm et celui du proton de la fonction ω -alcyne dans le massif à 2,2 ppm.

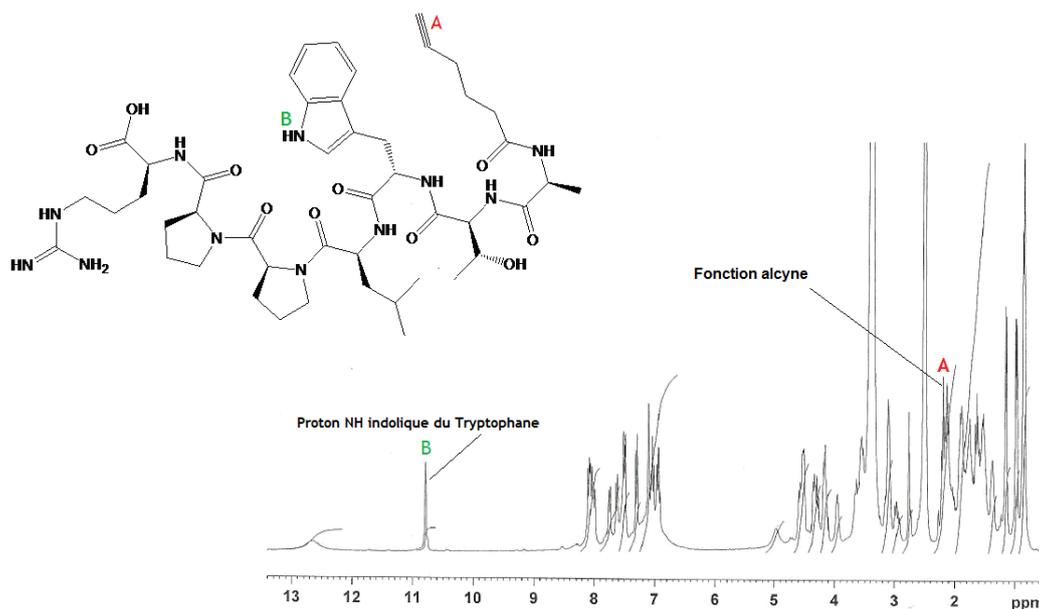


Figure 118 - Spectre RMN 1H dans DMSO- d_6 de l'heptapeptide ATWLPPR- ω -alcyne ($M=932$ g/mol)

2.2.2. Greffage du peptide

Le peptide préalablement modifié sur son unité C-terminale par l'introduction d'une fonction alcyne est fixé par chimie-click au dextrane-g-PLA-g- N_3 présent en surface des nanoparticules selon la réaction décrite sur le schéma 2.

Utilisation de la Chimie-click pour la fonctionnalisation de nanoparticules destinées au ciblage de principes actifs dans la thérapie anti-cancéreuse (Objectif 2)

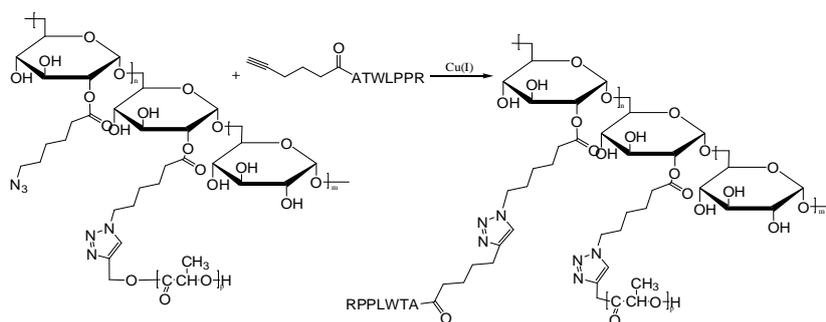


Schéma 6 - Réaction de Chimie-click entre le copolymère et le peptide fonctionnalisé

Les nanoparticules utilisées ont été élaborées par nanoprécipitation du Dex-g-9,5PLA₈₄₀₀-g-17,5N₃ ou par émulsion/évaporation de solvant en utilisant le DexN₃-15 et le PLA commercial, puis purifiées par centrifugation comme décrit précédemment. Le peptide étant soluble dans l'eau, la post-fonctionnalisation des nanoparticules se fait aisément en employant directement une suspension. 25mg de nanoparticules seront mises en suspension dans 10mL d'eau, et 1mg d'ATWLPPR ω -alcyne et de quelque mg de CuBr y sont ajoutés. Les particules sont ainsi laissées sous agitation pendant 12h à l'abri de l'oxygène pour éviter toute oxydation du CuBr et ainsi permettre à la réaction de Chimie-click d'avoir lieu.

Dans le

Tableau 27 sont résumées les quantités des différentes entités en présence. Le nombre de fonctions azide indiqué comme résiduelles correspond aux fonctions azide disponibles, mais celles-ci ne sont pas forcément accessibles pour la réaction de Chimie-click. En effet, dans le cas de la nanoprécipitation, ce nombre est estimé à partir du Dex-g-PLA-g-N₃ employé, avant sa nanoprécipitation. Or, la nanoprécipitation induit très certainement que beaucoup de fonctions azide se retrouvent non accessibles pour la post-fonctionnalisation des nanoparticules, « piégées » au sein de l'objet.

Tableau 27 - Tableau récapitulatif des quantités de chaque entité en présence lors de la post-fonctionnalisation des nanoparticules élaborées par nanoprécipitation et émulsion/évaporation de solvant

	Emulsion/Evaporation	Nanoprécipitation
Masse de particules	25 mg	25 mg
N ₃ résiduelles pour 100 unités glucosidique	12	17,5
Nbre moles de fonctions N ₃	4.04E-05	3.17E-02
Quantité d'ATWLPPR ω -alcyne introduit	1 mg	1 mg
Nbr de mol de ATWLPPR ω -alcyne	1.07E-06	1.07E-06
Ratio fonctions alcyne/azide	0.0266	3.38E-05

Après lavage, récupération et fonctionnalisation, de l'EDTA est ajouté à la suspension de nanoparticules de manière à capter et extraire le CuBr introduit. Les particules sont ensuite lavées par centrifugation avec de l'eau.

2.2.3. Preuve par RMN ^1H

Après dissolution dans le DMSO- d_6 , les nanoparticules post-fonctionnalisées par le peptide ATWLPPR ω -alcyne peuvent être étudiées par RMN ^1H (Figure 119). Sur ce spectre il est possible de quantifier chaque entité en présence par des pics caractéristiques:

- 4.67ppm : pic du proton anomère (A) du dextrane
- 5.2ppm : pic du proton méthyne (D) du PLA

Le peptide est représenté par le proton NH indolique du tryptophane (10,8 ppm) et du massif caractéristique de ce composé entre 6,8 et 8,1 ppm. Le proton du cycle triazole produit par la réaction de Chimie-click résonne à 8,2 ppm.

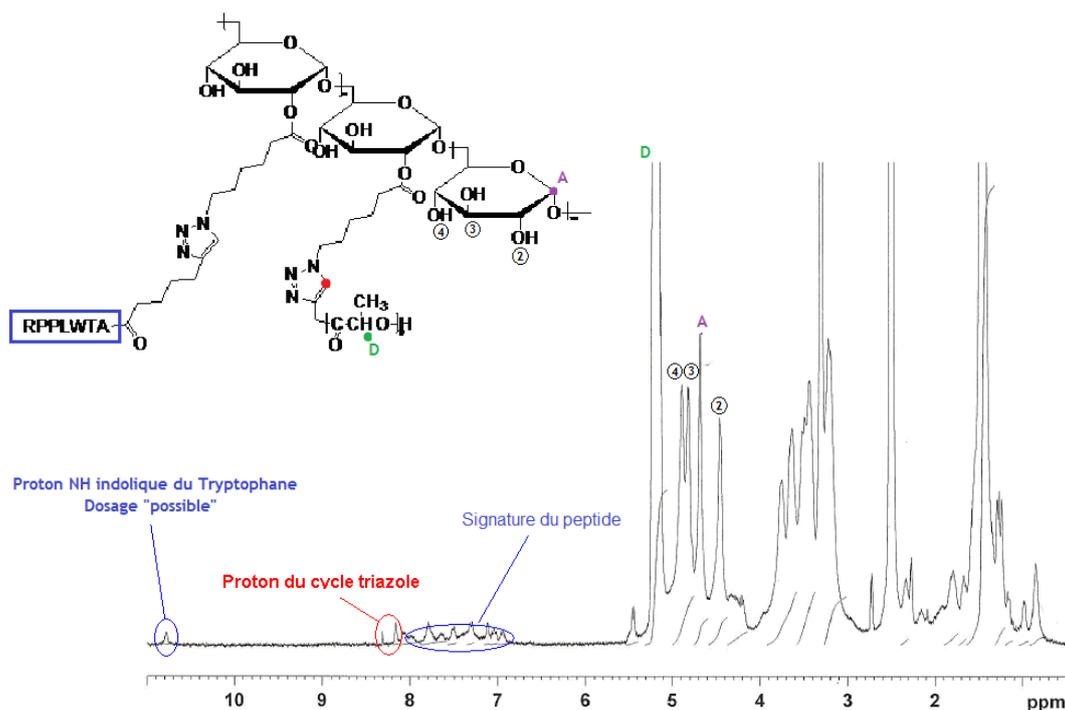


Figure 119 - Spectre RMN ^1H dans le DMSO- d_6 des nanoparticules élaborées par Chimie-click *In situ* lors du procédé d'émulsion/ évaporation, puis post-fonctionnalisées par ATWLPPR ω -alcyne

Le rapport des intensités des pics A et D, permet d'estimer la quantité de dextrane dans la nanoparticule selon la formule ci-dessous.

Utilisation de la Chimie-click pour la fonctionnalisation de nanoparticules destinées au ciblage de principes actifs dans la thérapie anti-cancéreuse (Objectif 2)

$$\frac{A_{H_{\text{anomérique}}} \cdot \text{MasseMolaire}_{\text{Dextrane}}}{A_{H_{\text{PLA}}} \cdot \text{MasseMolaire}_{\text{PLA}}} = \text{Dextrane}(\text{mg} / \text{g}_{\text{PLA}})$$

Où :

$A_{H_{\text{anomérique}}}$: Aire du pic à 4.67 ppm correspondant au proton anomère du Dextrane

$A_{H_{\text{CHPLA}}}$: Aire du pic à 5.20 ppm correspondant au proton méthyne du PLA

Masse Molaire de l'unité monomère du dextrane = 162 g/mol

Masse Molaire de l'unité monomère du PLA = 72 g/mol

On peut alors comparer cette valeur avec celle que nous avons déterminé avant post-fonctionnalisation des nanoparticules et ainsi s'assurer si cette post-fonctionnalisation est ou non dégradante.

Une perte d'environ 20% de dextrane par gramme de PLA (de 382 à 297 mg de dextrane/ g de PLA) est observée après post-fonctionnalisation des nanoparticules élaborées par émulsion/ évaporation de solvant (cas DexN₃ + PLA α-alcyne). Il semblerait donc que tout le DexN₃ ne soit pas relié chimiquement au cœur PLA mais qu'une partie soit tout simplement adsorbée à la surface. En effet, dans le cas des nanoparticules élaborées par nanoprecipitation de Dex-g-PLA-g-N₃ présynthétisé puis fonctionnalisées, aucune perte de dextrane n'est observable (*Figure 120*).

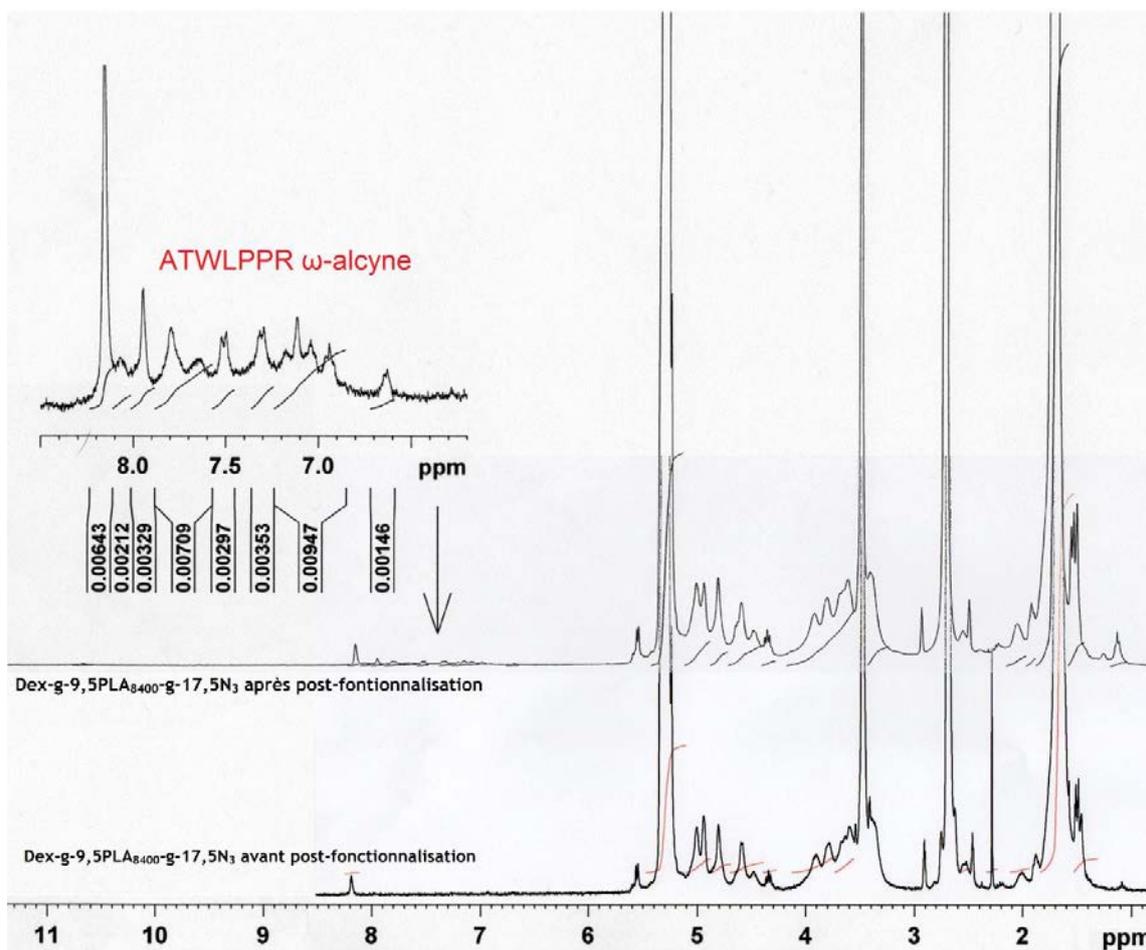


Figure 120 - Analyse RMN ^1H dans le DMSO- d_6 des nanoparticules élaborées par nanopréciipitation de Dex-g-9,5PLA₈₄₀₀-g-17,5N₃, avant et après fonctionnalisation par ATWLPPR ω -alkyne

La perte de dextrane observée dans le cas des particules élaborées par émulsion/évaporation est certainement liée à l'ajout de l'EDTA et aux multiples lavages successifs pour éliminer le cuivre en solution, l'EDTA introduit et le peptide non fonctionnalisé.

Grâce à la Figure 121, nous pouvons confirmer que le peptide introduit ne s'adsorbe pas à la surface des nanoparticules durant la post-fonctionnalisation. En effet, lorsque les nanoparticules sont mises en présence d'ATWLPPR ω -alkyne, sans addition de CuBr afin qu'aucune réaction de Chimie-click n'ait lieu, aucune trace du peptide n'est visible par RMN ^1H après lavage des particules.

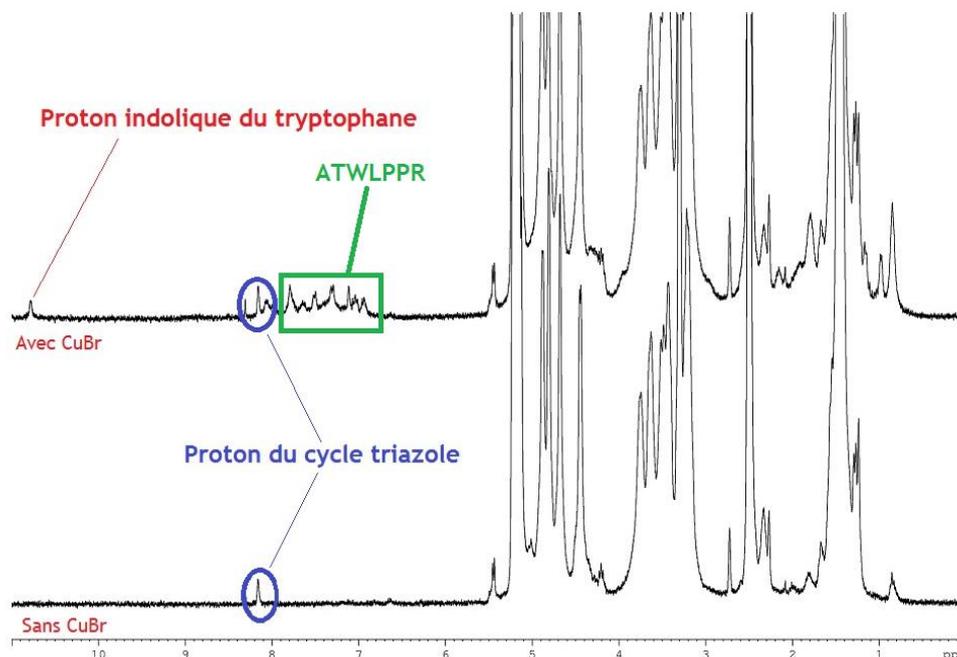


Figure 121 - Spectre RMN ^1H dans le DMSO-d_6 des nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation de solvant en réalisant la réaction de chimie-click durant la sonication. Les particules sont ensuite mises en présence d'ATWLPPR ω -alcyne, avec et sans CuBr.

Cela nous permet de confirmer que la quantité de peptide que nous estimons après que les particules post-fonctionnalisées soient analysées par RMN ^1H correspond bien à du peptide fixé de manière covalente aux nanoparticules.

Un moyen d'estimer ce degré de modification repose sur l'intégration du pic à 10,8ppm (proton NH du tryptophane de l'ATWLPPR) qui, en toute rigueur, doit correspondre à l'intégration du pic résonnant à 8,2ppm.

Le pourcentage de modification peut alors être calculé par :

$$\frac{\left(\frac{A_{\text{NHtryptophane}}}{A_{\text{Hanomérique}}} \times 100 \right)}{N_3}$$

Où :

$$\left(\frac{A_{\text{NHtryptophane}}}{A_{\text{Hanomérique}}} \times 100 \right) \text{ est la quantité de peptide pour 100 unités glucosidiques}$$

$A_{\text{NHtryptophane}}$ et $A_{\text{Hanomère}}$ représentent les aires des protons du cycle triazole et anomère, respectivement

N_3 représente le nombre de fonction N_3 résiduelles pour 100 unités glucosidiques après la réaction de Chimie-click produite *in situ* pendant l'élaboration préalable des nanoparticules par émulsion/évaporation de solvant (Tableau 19).

On peut estimer qu'environ 0,4 % des fonctions N_3 résiduelles sur les nanoparticules ont réagi avec l'ATWLPPR ω -alcyne lors de la post-fonctionnalisation, alors que nous avons introduit 2,6 % de peptide par N_3 résiduelles. Ces valeurs sont extrêmement faibles, difficilement détectables par RMN 1H et donc sujettes à une imprécision importante. L'augmentation de la quantité de peptide introduit devrait améliorer ce taux de post-fonctionnalisation.

Les résultats préliminaires sont semblables concernant les nanoparticules élaborées par nanopréciipitation et post-fonctionnalisées.

Une formulation de nanoparticules a été réalisée par émulsion/évaporation de solvant en utilisant du PLA α -alcyne, du Dex N_3 -15. Dans ce cas précis, le peptide de reconnaissance est également solubilisé dans la solution aqueuse de Dex N_3 -15. Cette expérience a été réalisée pour voir s'il était possible de fixer le Dex N_3 -15 au PLA α -alcyne lors de l'élaboration de la nanoparticule, tout en fonctionnalisant sa surface par l'ATWLPPR ω -alcyne. Nous réalisons cette formulation avec et sans CuBr. En effet, il a déjà été vérifié qu'il était possible de réaliser des nanoparticules par émulsion/évaporation de solvant du PLA α -alcyne et du Dex N_3 -15, sans CuBr. L'absence de CuBr ne devait pas permettre ici d'observer du peptide ATWLPPR après post-fonctionnalisation et lavage.

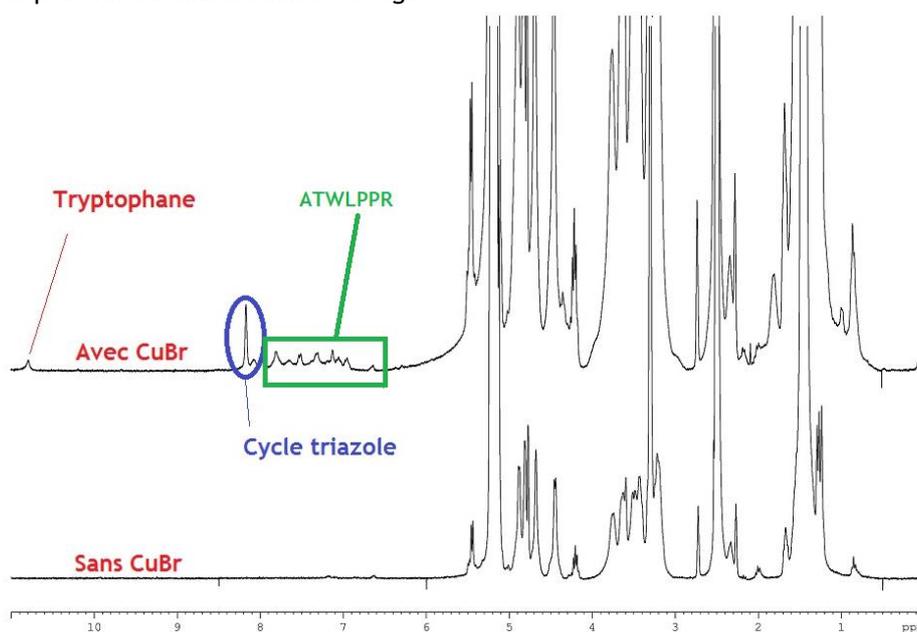


Figure 122 - Nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation de solvant. Le peptide est introduit dans la phase aqueuse contenant le Dex N_3 -15. La solution organique contient du PLA α -alcyne (spectre après lavage).

La Figure 122 nous montre les résultats RMN 1H des nanoparticules redissoutes dans le DMSO- d_6 . On peut voir que l'absence de CuBr ne permet pas d'obtenir des particules (après lavage) contenant du peptide adsorbé ou encapsulé. A l'opposé, lorsque le CuBr est ajouté dans la formulation, la réaction de Chimie-click entre les fonctions N_3 et le peptide se produit pendant l'étape de sonication. On peut également voir la présence de pics témoins du peptide (6,5-8 ppm). Ceci nous indique qu'il est donc possible d'élaborer ET de fonctionnaliser des nanoparticules de PLA en une seule étape.

2.2.4. Preuve par fluorescence

Une détection par fluorescence du peptide à la surface des nanoparticules semble être le moyen le plus précis pour avoir une valeur quantitative de la quantité d'ATWLPPR ω -alcyne à la surface des nanoparticules. Cette technique a l'avantage de quantifier la quantité de peptide à la surface des particules, sans détruire les particules par solubilisation comme c'est le cas pour la mesure par RMN ^1H .

Afin de quantifier *in fine* la quantité de peptide fixée à la surface des nanoparticules, nous réalisons tout d'abord une courbe de calibration de la fluorescence de ce peptide dans l'eau. La Figure 123 est une représentation graphique des mesures de fluorescence réalisées sur différentes solutions à des concentrations en ATWLPPR ω -alcyne connues.

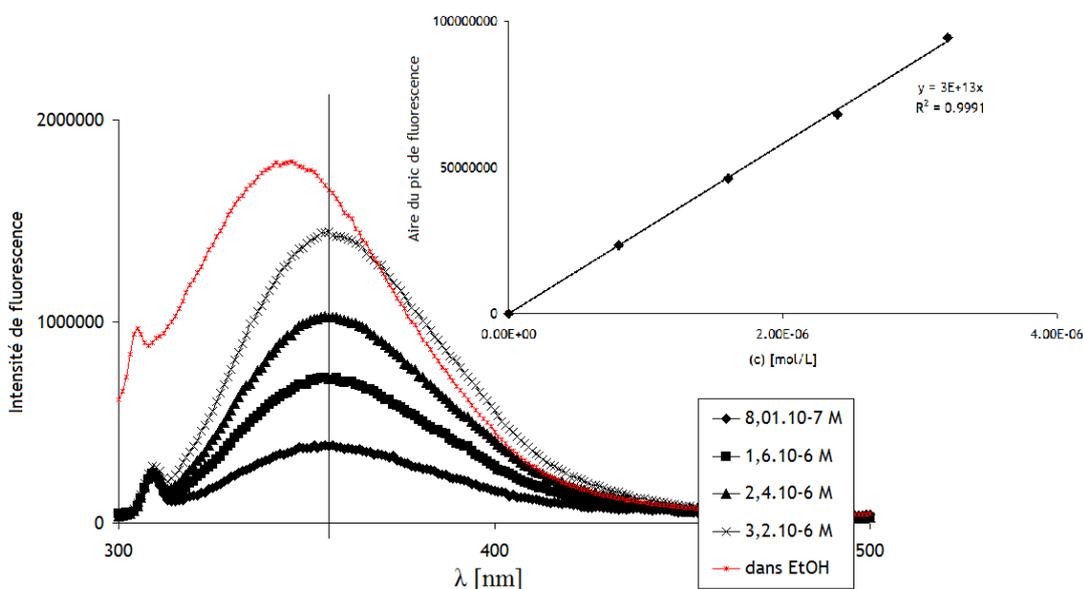


Figure 123 - Courbes de fluorescence d'ATWLPPR ω -alcyne et droite d'étalonnage (excitation faite à 280 nm)

Une fois la calibration effectuée, nous analysons trois suspensions de nanoparticules précédemment élaborées sous les conditions expérimentales différentes:

Une suspension de nanoparticules élaborées par émulsion/évaporation de solvant en réalisant la Chimie-click *in situ*. La suspension lavée est ensuite post-fonctionnalisée par l'ATWLPPR ω -alcyne. (Fonctionnalisation post-émulsion)

Une suspension de nanoparticules réalisées par nanoprécipitation de Dex-g-9,5PLA₈₄₀₀-g-17,5N₃, lavée puis post-fonctionnalisée par l'ATWLPPR ω -alcyne. (fonctionnalisation post-nanoprécipitation)

Une suspension élaborée par Chimie-click *in situ* lors du procédé d'émulsion/évaporation de solvant. Dans ce cas, le peptide est également introduit durant l'émulsion, dans la phase aqueuse contenant le DexN₃-15. (Fonctionnalisation pendant l'émulsion)

La Figure 124 représente la fluorescence de nos suspensions de nanoparticules et démontre une nouvelle fois que la fonctionnalisation de nos particules par le peptide ATWLPPR a été réalisée avec succès, puisque la bande de fluorescence caractéristique de ce peptide est observée.

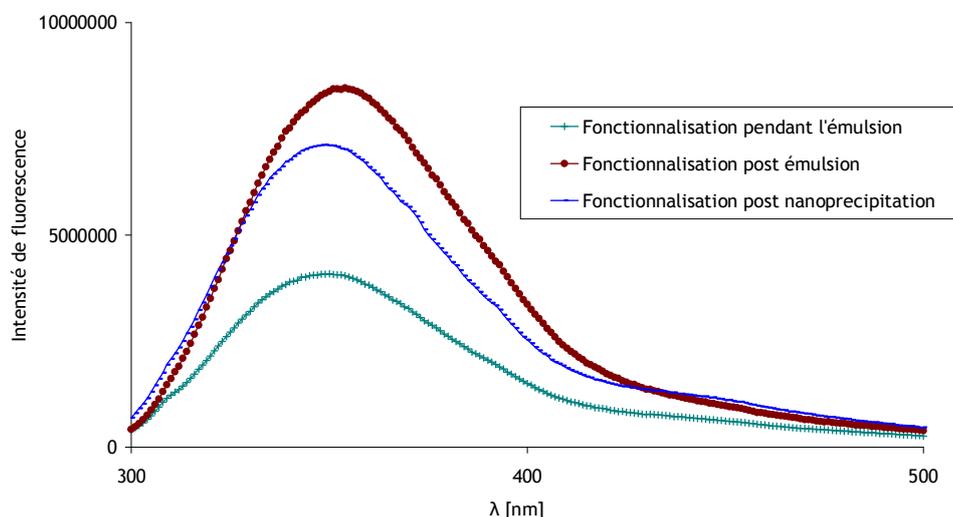


Figure 124 - Preuve par fluorescence de la présence d'ATWLPPR ω -alcyne à la surface des nanoparticules

Pour confirmer notre observation de la Figure 121, la fonctionnalisation des nanoparticules par l'ATWLPPR ω -alcyne durant l'élaboration des particules par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant a bien fonctionné. En moindre quantité certes par rapport aux post-fonctionnalisations, mais cela est une nouvelle voie de fonctionnalisation qui nous permettrait de nous affranchir d'une étape de lavage. On peut toutefois penser que, dans ce cas, une partie du peptide fixé se retrouve à la surface de la particule et qu'une autre partie peut-être « au cœur » de la particule. En effet, la spectroscopie de fluorescence ne permet de visualiser que ce qui est en solution, et non le peptide « emprisonné » dans la particule par exemple.

Connaissant l'intensité du pic de fluorescence caractéristique du peptide, nous pouvons quantifier la quantité de peptide greffé à la surface des nanoparticules en utilisant la courbe de calibration précédemment établie.

Le Tableau 28 nous donne les premiers résultats prometteurs sur la fonctionnalisation des nanoparticules par le peptide de reconnaissance. Quel que soit le procédé d'élaboration, la post-fonctionnalisation des nanoparticules conduit à introduire environ 12% du peptide ajouté dans la suspension. La fixation du peptide en « one pot » durant le procédé d'émulsion/évaporation de solvant n'est au contraire pas d'une grande efficacité (seulement 5% du peptide est fixé en surface des nanoparticules). Cependant, cette technique n'est pas à négliger tant que nous n'aurons pas déterminé la quantité minimale de peptide nécessaire à une étude biologique correcte. Le peptide étant onéreux aucune étude de fluorescence n'a encore été réalisée en faisant varier la quantité de peptide initialement introduite dans les suspensions.

Tableau 28 - Calcul de la quantité de ATWLPPR ω -alcyne à la surface des nanoparticules.

	Quantité de ATWLPPR ω -alcyne introduite initialement (mg)	Quantité de ATWLPPR ω -alcyne mesurée par fluorescence (mg)	Proportion de ATWLPPR ω -alcyne greffée calculée par rapport à la quantité initiale (%)
Dex-g-PLA + ATWLPPR ω -alcyne Fonctionnalisation post émulsion/évaporation	1.25	0.15	11.79
Dex-g-9,5PLA ₈₄₀₀ -g-17,5N ₃ + ATWLPPR ω -alcyne Fonctionnalisation post nanopréciptation	1.00	0.13	12.54
DexN ₃ -15 + PLA α -alcyne + ATWLPPR ω -alcyne Fonctionnalisation in situ pendant l'émulsion	1.36	0.07	5.03

3. Conclusions et perspectives

L'inconvénient majeur des nanoparticules de PLA recouvertes de DexC₆ est lié à la stabilité de la couronne hydrophile dans des milieux agressifs tels que les fluides biologiques. Pour "mimer" ces fluides, un tensioactif anionique (SDS) réputé pour désorber les couches polymères adsorbées à la surface d'un matériau a été employé. En liant de façon covalente la couche hydrophile polysaccharidique sur le coeur PLA, nous garantissons une fixation irréversible de la couronne. Le temps de circulation de ces nanoparticules après injection intraveineuse devrait donc s'accroître.

L'usage de la réaction de Chimie-click en amont ou pendant la formulation des nanoparticules nous a permis d'élaborer des nanoparticules tout à fait similaires à celles déjà obtenues au laboratoire par les procédés d'émulsion/évaporation de solvant ou nanopréciptation en terme de diamètre moyen, stabilité colloïdale en solution saline,... Néanmoins, ces nanoparticules présentent dorénavant une stabilité bien plus élevée car la couche polysaccharide "résiste" à l'agression du SDS.

En plus d'assurer le lien entre la couronne et le coeur de la particule, la réaction de chimie-click s'est avérée être un atout pour post-fonctionnaliser la surface des nanoparticules et ainsi orienter nos travaux vers des particules de 3^{ème} génération. Une sonde modèle de fluorescence dérivée de la coumarine a validé le concept de post-fonctionnalisation de ces nano-objets. Des objets de troisième génération sont ainsi élaborés de manière relativement simple et rapide, sans aucune détérioration. Après validation du concept, la post-fonctionnalisation des nanoparticules par un peptide de reconnaissance a été démontrée avec succès. La quantification du peptide alors fixée en surface des nanoparticules s'est avérée délicate par RMN ¹H; mais la spectrométrie de fluorescence a permis d'évaluer le taux de fixation.

Dans un futur proche, il serait intéressant, au regard des résultats biologiques, d'estimer la quantité minimale de peptide de reconnaissance à fixer à la surface des nanoparticules et d'étudier plus en détail cette fonctionnalisation durant l'élaboration même des nanoparticules. De plus, l'encapsulation d'un principe actif au sein de ces objets, dont l'efficacité a pu être démontrée durant le chapitre précédent, pourrait également avoir lieu durant l'élaboration des nanoparticules. Nous serions alors en présence de systèmes de délivrance de principes actifs de troisième génération, élaborés en une seule étape .

4. Biblio

- [1] Gavory C., Durand A., Six J.L., Nouvel C., Marie E., Léonard M., Polysaccharide-covered nanoparticles prepared by nanoprecipitation, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) p. 133-140
- [2] Legrand P., Lesieur S., Bochot A., Gref R., Raatjes W., Barratt G., et al, Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *Int. J. Pharm.*, 344 (2007) p. 33-43
- [3] Pierre Couleaud, Fonctionnalisation par des peptides de nanoparticules hybrides multifonctionnelles pour de la thérapie photodynamique ciblant neuropiline-1, *Thèse de doctorat en Génie des procédés et des produits, INPL, 2011*

Utilisation de la Chimie-click pour la fonctionnalisation de nanoparticules destinées au ciblage de principes actifs dans la thérapie anti-cancéreuse (Objectif 2)

MATERIELS ET METHODES

1. DexC₆

1.1. Synthèse

La nomenclature que nous utiliserons pour les dérivés obtenus est DexC₆-n, où n représente le taux de substitution correspondant au nombre (n) de chaînes alkyle greffées pour 100 unités glucosidiques. Ce taux de substitution est déterminé par analyse RMN ¹H. Il est parfois également noté Degré de Substitution (DS).

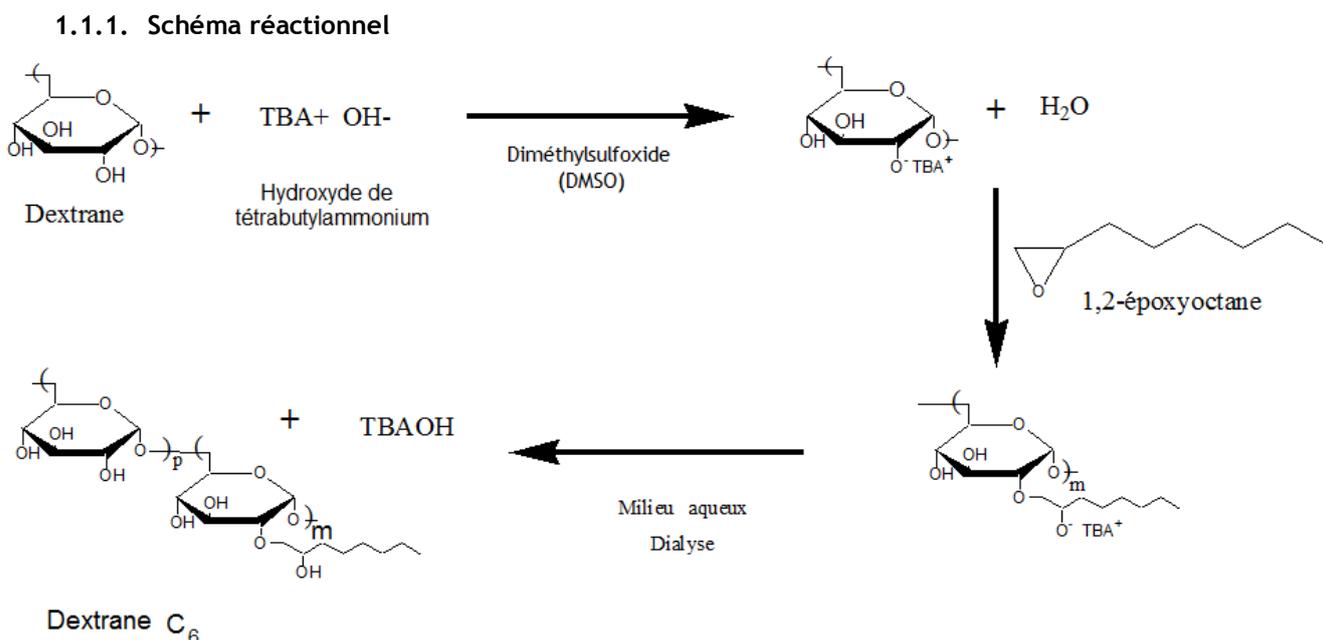


Schéma 7 - Synthèse du dextrane-C₆

1.1.2. Protocole

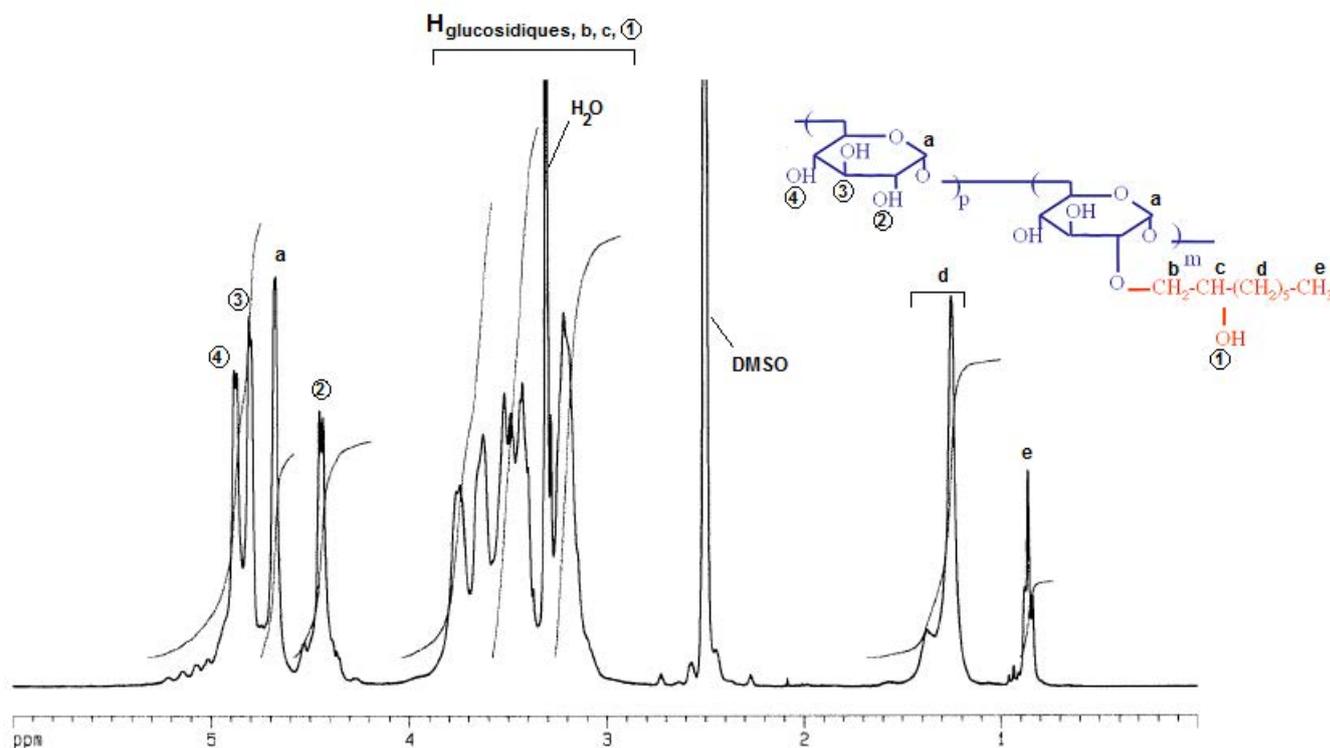
- Dissoudre 1g de Dextrane T40 ($\overline{M}_w \sim 35\,000$ g/mol) pur dans 10 mL de DMSO (HPLC grade, Sigma Aldrich) pendant 3h, sous agitation magnétique à 40-42 °C

A température ambiante, ajouter x équivalents par unité glucosidique (x eq/unité glucosidique) d'une solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium à 1 mol/L (solution commerciale de TBAOH : solution aqueuse à 40% massique, Sigma Aldrich) + y eq/unité glucosidique de 1,2-époxyoctane (Sigma Aldrich) selon le taux de substitution recherché. Laisser agir 48h sous agitation magnétique et à température ambiante.

L'élimination du TBAOH se fait par dialyse contre un mélange eau MilliQ/éthanol 96% (50/50 v/v) pendant 7 jours, puis contre de l'eau MilliQ pendant 7 jours. Changer l'eau de dialyse 4 fois par jour. Après dialyse, transférer la solution dans un ballon de 1L et mettre à lyophiliser 48h. Si un gel apparaît pendant la dialyse, séparer la suspension et le gel avant la lyophilisation pour pouvoir caractériser séparément chaque phase.

1.1.3. Estimation du taux de modification par RMN ^1H

Les spectres RMN ^1H des divers DexC₆ obtenus ont été réalisés dans le DMSO- d_6 (Figure 125). Ils nous permettent d'identifier clairement les protons (d,e) de la chaîne alkyle au nombre de 13, ainsi que le proton anomère (a) de chaque unité glucosidique du dextrane (4,7 ppm). Les protons (b,c) de la chaîne alkyle, ainsi que le proton OH (1) résonnent sous le massif correspondant aux protons glucosidiques (3-4 ppm). Les pics situés à 4,4 , 4,8 et 4,9 ppm correspondent respectivement aux 3 protons hydroxyle des unités glucosidiques [5].



Il est alors facile de calculer le taux de substitution (n) selon l'équation :

$$n = \frac{\left(\frac{A_{\text{CH}_2} + A_{\text{CH}_3}}{13} \right)}{A_{H_{\text{anomère}}}} \times 100$$

Où A_{CH_2} , A_{CH_3} et $A_{H_{\text{anomère}}}$ correspondent aux intégrales des pics attribués aux protons (d), (e) et (a) respectivement (Figure 125).

2. Dex-g-PLA-g-N₃

2.1. Synthèse des DexN₃

2.1.1. Acide activé porteur d'une fonction azide

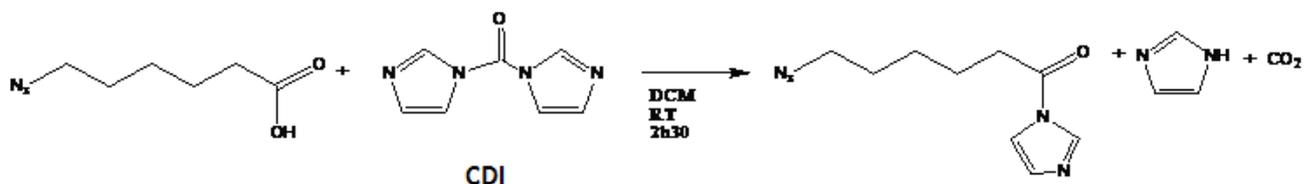


Schéma 8 - Activation de la fonction acide

Pour éliminer les traces d'eau lors de la manipulation, la verrerie est mise à l'étuve et le montage purgé sous azote. Le solvant choisi pour la réaction d'activation de la fonction acide est du dichlorométhane anhydre (DCM) (Schéma 2). Dans le ballon réactionnel (Schéma 3), on introduit alors la carbonyldiimidazole (CDI) dans 250 ml de solvant. L'acide, dilué à 50% par le solvant, est ajouté goutte à goutte pendant 5 minutes et on observe progressivement une libération de CO₂ formé. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 2h30.

La CDI est partiellement soluble dans le dichlorométhane contrairement au produit final qui l'est totalement: on observe donc une diminution de la turbidité du milieu au fur et à mesure de la réaction.

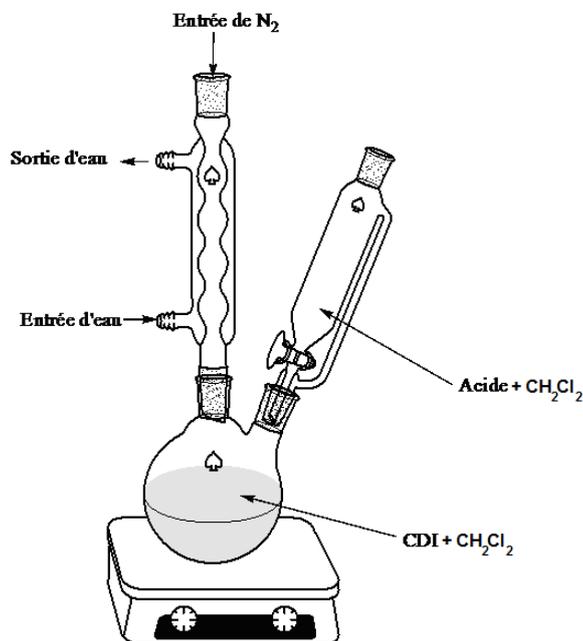


Schéma 9 - Montage utilisé pour la synthèse de l'acide activé

Dans une ampoule à décanter, le milieu réactionnel est lavé avec 100ml d'eau et la phase organique est récupérée. On hydrolyse ainsi la CDI en excès qui se solubilise alors dans la phase aqueuse. Cette phase est lavée au dichlorométhane. La totalité des phases organiques est ensuite lavée deux fois à l'eau puis séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée au rotavapor. Le produit final est conservé au congélateur et utilisé sans autre purification.

Une analyse RMN 1H dans le $CDCl_3$ indique que le produit synthétisé est pur à 96%. (Figure 126).

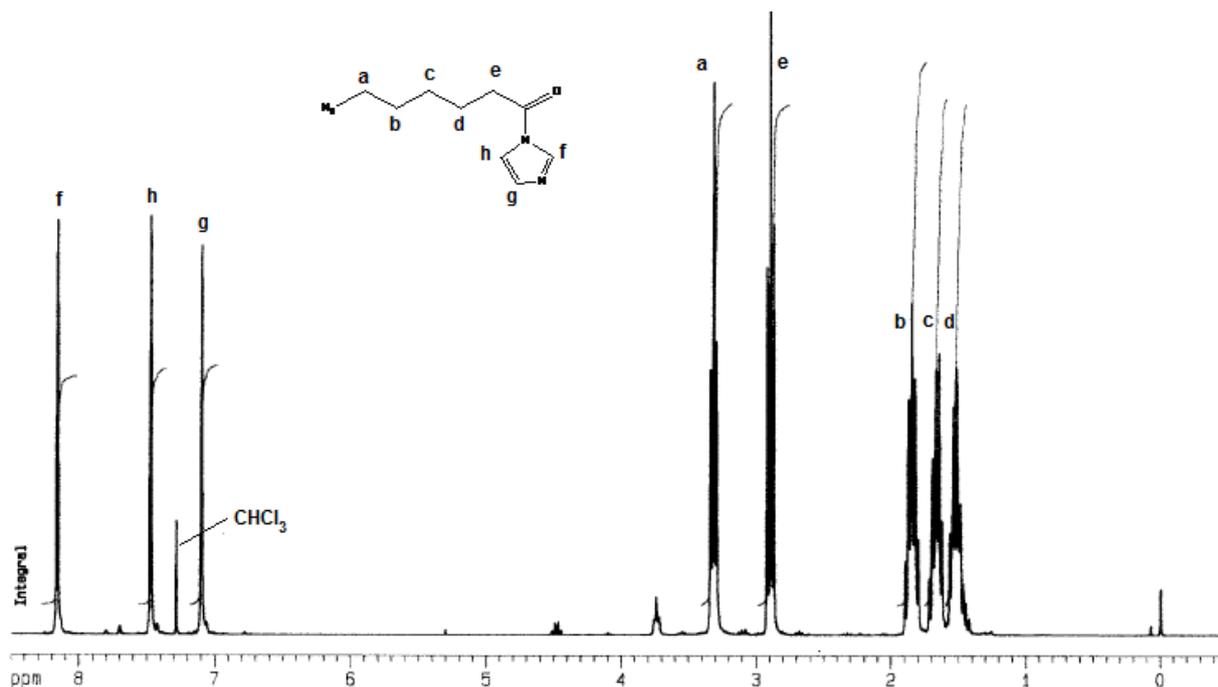


Figure 126 - Spectre RMN 1H dans le $CDCl_3$ de l'ester activé après purification

2.1.2. Fonctionnalisation du dextrane par des groupes N_3

Pour obtenir un taux de modification correct, il faut éviter toutes traces d'eau lors de la réaction (tant au niveau des réactifs que du montage) qui réagirait avec l'acide activé. C'est pourquoi le dextrane est séché (chauffage à $100^\circ C$ sous vide dynamique). De même, le solvant (DMSO) est distillé sur hydrure de calcium et sous azote avant réaction. Le DMSO est introduit via une canule dans le ballon réactionnel contenant le dextrane, puis après solubilisation, l'acide activé est introduit via une seringue. On ajoute alors x équivalents d'acide activé pour 100 unités glucosidiques selon le taux de modification désiré. La réaction se fait à $50^\circ C$ pendant 48h (Schéma 4).

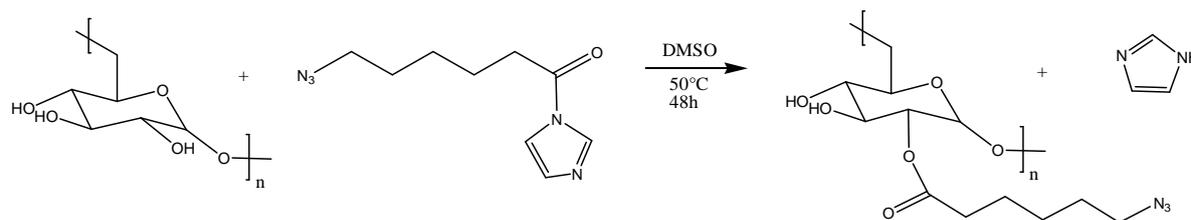


Schéma 10 - Formation du DexN₃

La solution réactionnelle brute est concentrée par distillation du DMSO sous vide (à 60 °C) puis le DexN₃ est précipité par un grand volume d'éthanol, puis récupéré par filtration. Le solide est alors lavé une seconde fois à l'éthanol puis filtré. La poudre est séchée sous vide dynamique à 30 °C.

2.2. Synthèse des PLA α -alcyne

Pour pouvoir contrôler la longueur de la chaîne polymère, il faut éviter toute trace d'eau. C'est pourquoi le toluène est distillé une première fois sur hydrure de calcium, puis distillé sur paroi froide en présence de polystyryllithium. De même, l'alcool propargylique est distillé sur paroi froide en présence d'hydrure de calcium.

Le monomère (D,L-lactide) est quant à lui recristallisé trois fois dans le toluène puis séché sous vide (à 50 °C).

Dans un ballon monocol, le lactide est dissout dans le toluène puis les solutions d'alcool propargylique et d'octoate d'étain dans le toluène sont introduites. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à 100 °C pendant une nuit. La réaction est arrêtée par acidification du milieu (mélange d'éthanol et d'acide acétique).

Le mélange est concentré par évaporation sous vide (pour éliminer le maximum de toluène), puis dilué dans un minimum de tétrahydrofurane (THF). La précipitation est réalisée par un volume dix fois plus important d'éthanol. Un produit solide est obtenu après séchage à l'étuve sous vide.

2.3. Synthèse des copolymères Dex-g-PLA-g-N₃

2.3.1. Protocole opératoire

La réaction de chimie-click a été menée en milieu homogène dans 10mL de DMF (N,N-diméthylformamide) (Schéma 5).

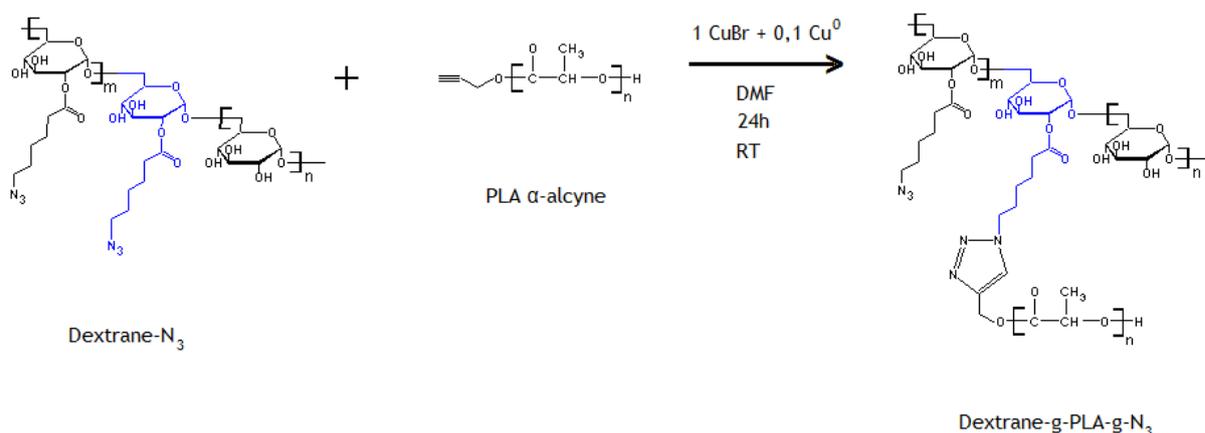


Schéma 11 - Greffage des greffons PLA sur le dextrane pour Chimie-click

Le dextrane-N₃ et le PLA α-alcyne sont pesés et introduits dans un schlenk. Le volume de DMF est ajouté et le système est maintenu sous agitation jusqu'à la complète dissolution des produits. Le catalyseur utilisé est le Cu(I) introduit sous forme CuBr. En présence de dioxygène le Cu(I) s'oxyde en Cu(II), qui n'est pas catalyseur de la réaction. Afin d'éviter cette oxydation, un barbotage de la solution par l'azote est réalisé pendant 10min avant l'ajout du catalyseur. Du Cu⁰ est également ajouté au milieu réactionnel. En effet, la médiamutation de Cu(II) peut éventuellement se former. Le Cu⁰ introduit conduit alors au renouvellement de Cu(I). Les quantités de Cu(I) et Cu⁰ utilisées sont respectivement de 1 équivalent de Cu(I) et de 0,1 équivalent de Cu⁰ par fonction azide. L'ajout de Cu(I) et Cu⁰ entraîne une légère coloration jaune du milieu réactionnel. Si des traces de dioxygène sont présentes dans le milieu la coloration vire au vert, conséquence de la formation d'ions Cu(II).

Après l'ajout du catalyseur le milieu réactionnel est maintenu clos et sous agitation pendant 24h à température ambiante (Schéma 5).

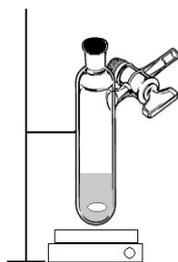


Schéma 12 - Montage expérimental de la réaction de chimie-click

2.3.2. Purification des copolymères

De manière à avoir une concentration permettant une bonne précipitation de ces produits, on dilue le milieu réactionnel avec un mélange composé de 5% d'eau et 95% d'acétone. La précipitation du Dex-g-PLA-g-N₃ est réalisée par une solution aqueuse d'EDTA qui permet alors de complexer le Cu(II). Le Cu(I) s'oxyde en effet en Cu(II) à l'air libre. La solution prend alors une coloration bleutée. Le solide récupéré par filtration est redissout dans l'acétone pour une deuxième précipitation. Le solide final est ensuite lyophilisé.

Si la précipitation par l'eau se déroule mal, on procède par dialyse (boudin de MWCO de 8000, contre une solution aqueuse d'EDTA pendant deux jours, puis contre de l'eau (pendant deux jours supplémentaires) suivie d'une lyophilisation. On constate que les solides obtenus présentent une teinte légèrement verte : malgré les lavages, le Cu(II) n'a pas été éliminé dans sa totalité.

2.3.3. Caractérisation par RMN ¹H

Les mesures de Résonance Magnétique Nucléaire sont réalisées à l'aide d'un appareillage BRUKER Avance III 300MHz dans lequel est installé une sonde BBFO 5mm. Cet appareil est équipé du logiciel TopSpin3.0 pour le traitement des données.

La superposition des spectres RMN ^1H (DMSO- d_6) du copolymère et du dextrane- N_3 (Figure 127) met en évidence les pics caractéristiques de la chaîne polysaccharide et l'apparition des pics (C) et (D) correspondants aux protons CH et CH_3 des greffons PLA (5,2 et 1,4 ppm). Par ailleurs, on peut également noter l'apparition du pic B à 8,15ppm correspondant au proton du cycle triazole. Ceci atteste que le PLA s'est bien greffé sur le dextrane via la formation de ce cycle par la cycloaddition dipolaire 1,3 de Huisgen.

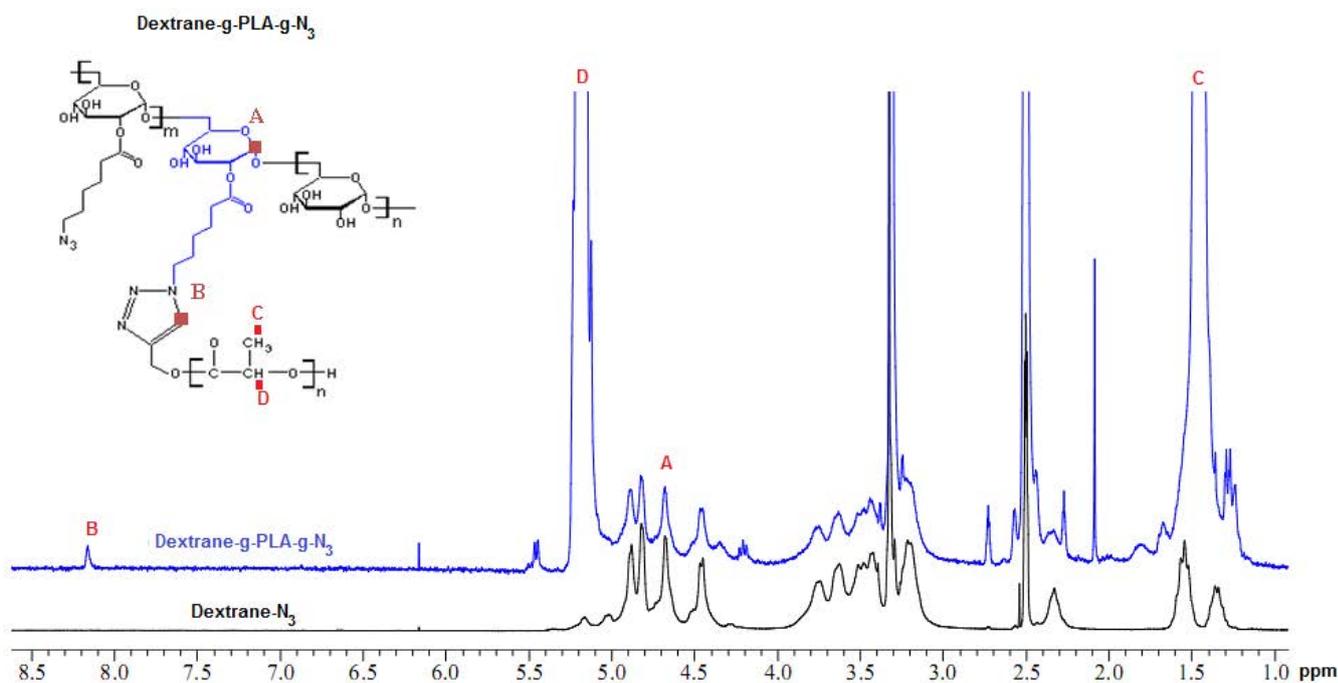


Figure 127 : Spectre RMN ^1H dans le DMSO- d_6 du copolymère Dex-g-16PLA $_{5000}$ -g-11N $_3$

Quelle que soit la quantité de PLA commercial utilisée par rapport au PLA α -alcyne dans la phase organique, il est possible de déterminer le nombre de cycles triazole produits pour 100 unités glucosidique et ainsi le pourcentage de fonctions N_3 ayant réagi (par rapport au nombre de fonctions N_3 introduites). Ce nombre de cycles triazole produits pour 100 unités glucosidiques correspond au nombre de chaînes PLA α -alcyne ($M_n=8000$ g/mol) greffées pour 100 unités glucosidiques. On connaît alors « x » et « m » de notre nomenclature Dex-g-xPLA $_m$ -g-yN $_3$ des copolymères formés à l'interface par chimie-click.

Par différence entre le degré de substitution du DexN $_3$ utilisé et du nombre de fonctions N_3 qui ont réagi par 100 unités glucosidique, on peut estimer alors le « y » (nombre de fonctions N_3 résiduelles pour 100 unités glucosidiques).

Le pourcentage de fonctions N₃ ayant réagi pour 100 unités glucosidique est donné par :

$$\frac{\left(\frac{A_{H\text{triazole}}}{A_{H\text{anomérique}}} \right) \times 100}{A_{H\text{anomérique}} \times DS_{DexN_3}}$$

Où :

- A_{Htriazole} et A_{Hanomère} représentent les aires des protons du cycle triazole (B) et anomère (A), respectivement
- $\left(\frac{A_{H\text{triazole}}}{A_{H\text{anomérique}}} \right) \times 100$ représente le nombre de cycles triazole produits, et donc le nombre de N₃ ayant réagi, pour 100 unités glucosidique.
- DS_{DexN3} représente le Degré de Substitution du Dextrane-N₃ (Ici 15%). A_{Hanomère} x DS_{DexN3} représente alors le nombre total de fonctions N₃ introduit.

De plus, le spectre RMN ¹H réalisé après purification permet de déterminer le degré de substitution de la chaîne dextrane par les greffons PLA (noté x dans la nomenclature). Le rapport entre l'intégration du pic B et celle du pic A (proton anomère) donne la quantité de greffons PLA fixés réellement sur 100 unités glucosidiques selon la formule:

$$x = 100 \frac{A}{B}$$

3. Techniques de caractérisation des dérivés du dextrane

3.1. Mesure de tension superficielle

Des mesures de tension superficielle ont été réalisées sur des solutions aqueuses des différents DexC₆ obtenus afin d'évaluer leur pouvoir tensioactif, et ainsi leur capacité à stabiliser une émulsion huile dans eau.

3.1.1. Principe

L'interface liquide/air présente un caractère plus ou moins "élastique" selon les caractéristiques propres du liquide étudié. Ce phénomène est quantifié par la mesure de la tension de surface (σ) du liquide qui représente le travail réversible à fournir au système pour augmenter la surface du liquide d'une unité. (σ) peut être calculée par :

$$\sigma = \left(\frac{\partial U_s}{\partial S} \right)_{T^0C}$$

Avec : - ∂U_s la variation d'énergie interne de la région interfaciale ;

- ∂S la variation de surface.

La technique de mesure de la tension superficielle utilisée dans cette étude est celle de l'anneau de Lecomte Du Noüy. Ce système consiste à étirer un ménisque du liquide étudié au moyen d'un anneau en platine. Le fil doit avoir une section uniforme aussi circulaire que possible et le plan de l'anneau doit être parfaitement parallèle à la surface du liquide. Dans un premier temps, l'anneau est plongé sous la surface du liquide. La cuve contenant le liquide est ensuite lentement abaissée et l'on mesure simultanément la résultante verticale des forces s'exerçant sur l'anneau en s'étant au préalable affranchi du poids de l'anneau. Quand l'anneau atteint la surface, il ne la traverse pas mais l'étire en formant un ménisque, augmentant ainsi l'aire interfaciale (*Figure 128*).

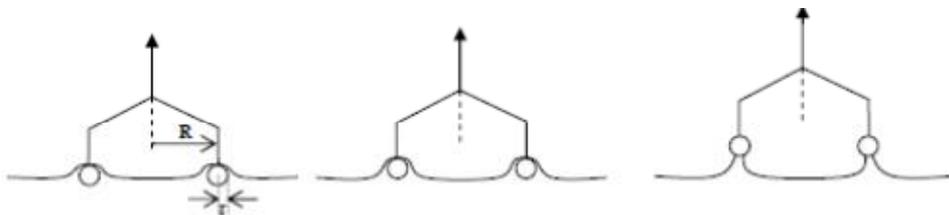


Figure 128 - Evolution du ménisque pendant l'arrachement de l'anneau

Expérimentalement, il est possible d'observer qu'au fur et à mesure de l'étirement du ménisque, la force de traction augmente pour passer par un maximum : au-delà elle décroît jusqu'à rupture du ménisque. Il est alors possible de déterminer la tension superficielle (σ) du liquide étudié par la seule connaissance de l'intensité de la force en son maximum par la relation :

$$\sigma = \frac{F^{\max}}{4.\pi.R} . J . \left(\frac{R}{r} \cdot \left(\frac{\Delta\rho.g.R^3}{F^{\max}} \right) \right)^{\frac{1}{3}}$$

Avec : - Fmax l'intensité maximale de la force de traction ;

- R le rayon de l'anneau ;
- r le rayon du fil de platine ;
- g la force de gravité ;
- $\Delta\rho$ la différence de densité entre le liquide et l'air ;
- J le facteur correctif de Harkins et Jordan.

Dans les conditions du laboratoire, il est possible de mesurer la tension superficielle d'un liquide avec une erreur de 0,5 mN/m. Cette précision peut être obtenue avec de nombreuses méthodes en tenant cependant compte de certaines corrections dans les calculs et en effectuant les manipulations avec soin. Il faut noter que la valeur mesurée de la tension superficielle d'un liquide n'a de signification que lorsque la température à laquelle la mesure a été effectuée est contrôlée et quand le ménisque du liquide n'est pas refroidi par évaporation. De plus, la source d'erreur la plus importante reste la présence d'impureté ou de contamination dans le liquide.

3.1.2. Mode opératoire

La solution en polymère amphiphile la plus concentrée est préparée 24 h à l'avance avec de l'eau MilliQ (système de filtration Millipore). Les mesures de tension superficielle sont effectuées à l'aide d'un tensiomètre Krüss K20 EasyDyne, automatique, qui donne directement la valeur de (σ). Un bain thermostaté à 25°C est utilisé afin que la température de mesure soit identique pour tous les échantillons.

Le pilulier constituant la cellule de mesure et destiné à recevoir la solution à analyser est au préalable rincé abondamment à l'eau puis à l'acétone et séché. Il est important qu'il ne subsiste aucune trace de savon ou de solvant volatil afin de ne pas fausser les mesures. L'échantillon de solution, soit 20 mL, est introduit dans le pilulier et laissé au repos 24h pour permettre la stabilisation de l'interface par le tensioactif [3]. Un temps d'attente d'un quart d'heure est respecté avant la mesure pour permettre la stabilisation en température.

Entre chaque mesure, l'anneau est rincé à l'eau puis à l'acétone et séché par la flamme d'un chalumeau. Une valeur moyenne sur trois mesures successives est calculée pour chaque échantillon. Les solutions les moins concentrées sont ensuite étudiées après chaque mesure par dilutions successives et les mesures sont effectuées selon le même protocole opératoire. Les concentrations en polymère testées sont de 6.5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.01, 0.0001 g/L

3.2. Caractérisation SEC

3.2.1. Détermination de l'incrément d'indice de réfraction

Un réfractomètre nous permet de mesurer l'incrément d'indice de réfraction (dn/dC) d'un composé avant son analyse SEC.

Une solution de concentration 10mg/mL de polymère (DexC₆ ou autre) est préparée dans 5mL de DMF-LiCl (éluant utilisé pour la SEC). Trois solutions diluées de 5mg/mL, 2,5mg/mL et 1,25mg/mL sont alors préparées par dilutions successives. Les solutions sont injectées dans le réfractomètre différentiel WATER 410. L'intensité I mesurée (proportionnelle à l'indice de réfraction) peut donc être tracée en fonction de la concentration massique en polymère (C_p). Sachant que l'intensité mesurée est proportionnelle à cette concentration, on peut calculer la pente de la courbe $I = AC_p$. La pente A correspond, à un coefficient correctif prêt, au dn/dC nécessaire au calcul des masses molaires par SEC.

3.2.2. Chromatographie d'Exclusion Stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique analytique basée sur la rétention sélective des macromolécules en solution en fonction de leur volume hydrodynamique. Cette technique permet d'estimer la masse molaire moyenne des polymères et leur distribution. Le couplage de cette technique avec un détecteur diffusion de la lumière permet d'estimer les masses molaires des polymères sans avoir recours à un étalonnage. La théorie fondamentale de la diffusion de la lumière par des solutions de polymères émane des travaux de Debye et Zimm.

L'équation générale reliant l'intensité de la lumière diffusée par une solution diluée de polymère de masse molaire moyenne en masse $\overline{M_w}$ à un angle θ est la suivante [4]:

$$\frac{K \cdot C}{R_\theta} = \frac{1}{M_w \cdot P(\theta)} + 2 \cdot A_2 \cdot C$$

Où :

- la constante K est le produit de plusieurs constantes et en particulier du $\left(\frac{dn}{dc}\right)^2$ du polymère :

$$K = \frac{2 \cdot \pi^2 \cdot n_0^2}{N_A \cdot \lambda_0^4} \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)^2$$

- n_0 est l'indice de réfraction du solvant, N_A le nombre d'Avogadro et λ_0 la longueur d'onde de la lumière dans le vide.
- R_θ est le rapport de Rayleigh, défini comme $R_\theta = \frac{I_\theta \cdot r^2}{I_0 \cdot V}$
- I_0 est l'intensité lumineuse du faisceau incident
- I_θ est l'intensité lumineuse du faisceau diffusé à un angle θ .
- V est le volume de la cellule de mesure
- r est la distance de la cellule de mesure au détecteur
- C est la concentration massique en polymère
- A_2 est le deuxième coefficient du Viriel

3.2.3. Système employé

Le système de chromatographie d'exclusion stérique utilisé est composé d'une pompe Merck HPLC pump L-6200A (débit de 0,7 mL/min) équipée d'un dégazeur, d'une vanne rhéodyne reliée à une boucle d'injection de 100 μ L et d'un système « by-pass », puis d'une série de colonnes Polymer Laboratories. Les colonnes utilisées sont de type PL gel 5 μ m 10³A, 300 * 7.5 mm (PL 1110-6530) et PL gel 5 μ m 10⁵A, 300 * 7.5 mm (PL 1110-6550). En sortie de colonnes, se trouve un photodiffusiomètre de modèle MiniDawn (Wyatt Technology Corporation). La longueur d'onde du laser est fixée à 690 nm par le constructeur et trois photodiodes mesurent l'intensité diffusée à 47,6°, 90,0° et 132,4°. Une double détection est effectuée à l'aide d'un réfractomètre différentiel de type Waters 410 installé en série. Les résultats sont collectés et traités par le logiciel Astra 4.90.

4. Elaboration des nanoparticules

4.1. Procédé d'émulsion/Evaporation de solvant

4.1.1. Cas des systèmes PLA commercial + DexC₆ ou DexN₃

La phase aqueuse est composée de 10mL d'eau saturée en acétate d'éthyle ou en DCM (selon le solvant organique utilisé) dans laquelle est dissous 5mg/mL de DexC₆ ou DexN₃ hydrosoluble.

La phase organique est composée de 1mL d'acétate d'éthyle saturée en eau ou de dichlorométhane et de 25mg/mL de PLA commercial (Poly(D,L-lactide), viscosité inhérente 0.55-0.75 - Sigma Aldrich). Si on désire encapsuler un principe actif (dans notre cas le Pam-LEY), celui-ci est dissous à 1mg/mL dans cette phase organique.

L'émulsion est grossièrement mélangée au vortex manuel (1 minute), suivi de 2 minutes de sonication (1s pulse - 1s rien). La sonication est réalisée dans un tube falcon de 50mL plongé dans un bain d'eau glacée.

La sonde à ultrasons est couplée à un amplificateur Bioblock Scientific vibracell 75043, placé dans une enceinte capitonnée.

L'émulsion est ensuite mise dans un pilulier et évaporée dans une étuve ventilée maintenue à 37°C pendant 5h, sous agitation magnétique. Les particules sont ensuite lavées par centrifugation. La technique consiste à centrifuger les particules, à remplacer le surnageant par une solution de lavage, puis à les redisperser par ajout de 10 mL d'eau MilliQ. L'opération est ainsi réalisée plusieurs fois. Cependant, il arrive très souvent que les particules s'agrègent pendant ces opérations. Les paramètres à prendre en compte lors de la centrifugation sont la taille des particules à centrifuger, les dimensions du tube de centrifugation et/ou la quantité de suspension dans ce tube, la vitesse de sédimentation (reliée avec le paramètre précédent), la vitesse et le temps de centrifugation. Dans notre cas, nous avons déterminé que quel que soit le procédé d'élaboration des nanoparticules employé, les paramètres suivants pouvaient être appliqués pour mener cette purification:

- Centrifugeuse GR20-22 JOUAN avec rotor AG 100-18 6 * 100 mL
- les tubes de centrifugation utilisés ont un diamètre de 20 mm et sont remplis avec un seul lot de suspension (~10mL).
- Les tubes sont centrifugés à 8500 tr/min pendant 1h15 à 15°C

Après le dernier lavage, les particules peuvent être lyophilisées (lyophilisateur LABCONCO) en présence d'un cryoprotecteur (D-(+)-Trehalose dihydrate, Sigma-Aldrich à hauteur de 0,4 mg par mg de particules) pour s'affranchir d'une agrégation permanente lors de leur congélation par azote liquide. Les particules seront ainsi facilement redispersables dans l'eau (redispersion par l'ajout d'environ 10mL d'eau MilliQ).

4.1.2. Réalisation d'une Chimie-click *in situ*

Le procédé employé ici reste le même que pour l'émulsion/évaporation avec les DexC₆ ou DexN₃. La phase organique (1 mL) est cette fois-ci du dichlorométhane HPLC grade et contient 25 mg d'un mélange de PLA commercial et de PLA α -alcyne, en quantité variable. Avant l'ajout de la phase organique, la solution aqueuse de DexN₃ (10 mL à 5 mg/mL) est mise à barboter sous azote pendant 30min. On ajoute ensuite très rapidement la solution organique ainsi que 5mg de CuBr avant l'étape de sonication. Les procédés d'émulsification, d'évaporation (2h30 seulement) et de lavage restent similaire que ceux décrits précédemment.

4.2. Procédé de Nanoprécipitation

4.2.1. Nanoprécipitation de PLA dans une solution aqueuse de DexC₆ ou DexN₃

La phase aqueuse est composée de 10mL d'eau MilliQ dans laquelle est dissous 5mg/mL de DexC₆ ou DexN₃ hydrosoluble. 5mL de phase organique sont utilisés (PLA à 5mg/mL dans l'acétone avec éventuellement de 0.2 mg/mL de Pam-LEY) et sont injectés dans la phase aqueuse à l'aide d'une microseringue de 500 μ L Hamilton sous forte agitation magnétique (vitesse d'injection d'environ 0.3mL par minute). Les particules sont ensuite mises à évaporer à 37°C pendant 2h30 puis lavées (même protocole que précédemment).

4.2.2. Nanoprécipitation de copolymères Dex-g-PLA-g-N₃

Le protocole est le même que dans le cas de la nanoprécipitation du PLA par la solution aqueuse de tensioactif. Cependant ici la solution aqueuse ne comporte aucun tensioactif et est uniquement composée d'eau milliQ.

Le copolymère (non hydrosoluble) est solubilisé dans un mélange acétone/eau (95/5 v/v) à 5mg/mL et précipité dans les mêmes conditions que précédemment.

4.3. Caractérisation des systèmes particulaires

4.3.1. Mesure de taille

4.3.1.1. HPPS

- Principe de la mesure

Le HPPS (High Performance Particle Sizer) est une méthode de mesure de la taille des particules submicroniques basée sur la rétrodiffusion de la lumière (*Figure 129*). Un faisceau laser passe dans une cuve contenant la dispersion et est diffusé par les particules en suspension. Celles-ci sont constamment soumises au mouvement brownien et l'intensité de ce mouvement dépend de la viscosité du milieu dispersant et de la taille des particules. Plus le milieu est visqueux, plus les particules sont grandes, plus elles bougent lentement.

Le HPPS mesure donc les variations du mouvement brownien dans le temps via les variations de la diffusion de la lumière autour d'une valeur moyenne. La lumière diffusée est récupérée par un photomultiplicateur et le signal est ensuite traité par un corrélateur numérique permettant d'obtenir une fonction d'auto-corrélation. Cette fonction traduit la probabilité de retrouver une particule à l'instant $(t+dt)$ au même endroit qu'à l'instant (t) . Il s'agit donc d'une exponentielle décroissante en fonction du temps.

Avec l'appareil HPPS disponible au laboratoire (HPPS-ET Malvern Instruments), les mesures se font en rétro-diffusion à un angle d'observation de 173° ce qui permet l'étude de dispersions relativement concentrées. La position de mesure du faisceau s'ajuste automatiquement en fonction de la concentration de l'échantillon pour éviter les effets de diffusion multiple. L'appareil possède aussi un système de contrôle de la température dont les variations pourraient faire varier la viscosité du système.

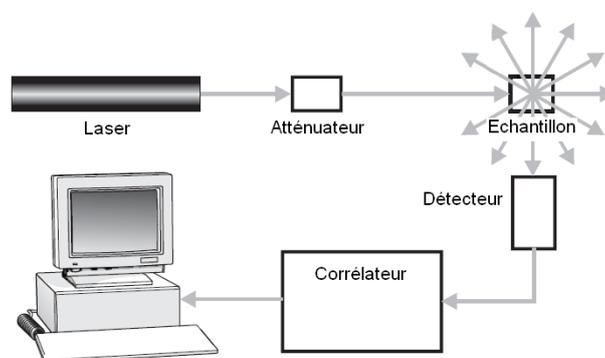


Figure 129 - Principe de fonctionnement du HPPS.

Le HPPS permet d'accéder à une valeur appelée « Z-Average Size » qui correspond à la taille moyenne de particule en intensité de lumière diffusée. Il donne aussi la distribution de tailles de particules en intensité. Afin de renseigner sur l'adéquation de la mesure à la taille réelle des nanoparticules, l'appareil donne aussi un Indice de Polydispersité (PDI). Cet indice traduit la concordance entre les courbes de corrélation mesurée et modélisée que l'appareil utilise pour calculer la distribution de taille. Un PDI inférieur à 0,5 correspond à une mesure relativement conforme.

Cette méthode est adaptée aux particules submicroniques. Elle ne détecte donc pas les agrégats de taille supérieure au micron pouvant se former lors de la nanoprecipitation, mais s'avère complémentaire de la mesure par granulométrie Mastersizer car elle permet de confirmer la taille et la distribution des particules nanométriques.

4.3.1.1.1. Protocole

1mL de dispersion est placé dans une cuve en plastique puis 3mL de solution NaCl 10^{-4} M y sont ajoutés. La cuve est agitée manuellement puis placée dans l'enceinte permettant de faire la mesure. Après la stabilisation de l'échantillon en température et vibrations extérieures, la mesure peut être réalisée. Il suffit alors de lancer une SOP pour effectuer la mesure. L'utilisation de la solution de NaCl permet d'écranter les interactions hydrophobes entre les particules et ainsi d'éviter la formation d'agrégats.

Remarque : Une SOP (Procédure Opératoire Standardisée) est un fichier où les paramètres nécessaires à la mesure sont préentrés. Dans mon cas, j'ai utilisé une SOP pour des particules de PLA dans une solution de NaCl 10^{-4} M. Les données préentrées dans cette SOP concernent le dispersant (indice de réfraction et viscosité de la solution NaCl) et les particules (indice de réfraction et adsorption du PLA). Etant donné que les copolymères (et donc les nanoparticules) sont constitués à environ 80% de PLA nous avons pris les valeurs correspondant au PLA.

4.3.1.2. Granulomètre Malvern

4.3.1.2.1. Principe de la mesure

Le granulomètre Mastersizer2000© Malvern (*Figure 130*) utilisé permet d'apporter une caractérisation supplémentaire de la taille des nanoparticules. Il permet aussi d'avoir la distribution de tailles des dispersions en se basant sur le volume des particules dans l'échantillon. Le principe de base de cet appareil est la diffraction de la lumière (générée par un laser) par les particules en suspension. Nombreux modèles théoriques ont été développés afin de décrire ce phénomène. En particulier, la théorie de Mie permet de prévoir la diffusion de la lumière par les particules sphériques, en tenant compte de la manière dont la lumière traverse la particule ou est absorbée par celle-ci. Il faut alors connaître l'indice de réfraction et l'absorption des particules dans l'échantillon. Chaque taille de particule possède sa propre image de diffraction. Le Mastersizer capte les images de diffraction générées par l'ensemble des particules dans l'échantillon et, en se basant sur la théorie de Mie, calcule les tailles des particules et la distribution de celles-ci.

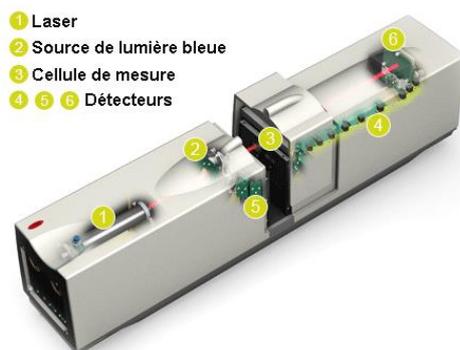


Figure 130 - Mastersizer2000© Malvern [5]

En l'absence de particules, un faisceau laser (Hélium-Néon) converge au centre du détecteur grâce à la lentille placée en sortie de la cellule de mesure. En revanche si des particules se trouvent dans la cellule de mesure, la lumière est diffractée sur les autres éléments du détecteur (cellules photosensibles réparties autour du point central et dont la surface augmente avec leur position angulaire). L'angle de déviation de la lumière est inversement proportionnel à la taille de la particule qui la dévie. La lentille a la particularité de récupérer la lumière diffusée par un ensemble de particules de même taille et de la superposer sur les mêmes portions du détecteur. Ainsi, l'image de diffraction obtenue rassemble la diffraction de toutes les particules de l'échantillon et peut être interprétée grâce au modèle de Mie.

L'appareil donne alors la taille des particules sous la forme $d(0,1)$, $d(0,5)$ et $d(0,9)$ ainsi que la distribution des tailles en prenant comme base le volume des particules. Ainsi $d(0,1)$ représente le diamètre de particule en dessous duquel se trouve 10% du volume de l'échantillon, $d(0,5)$ le diamètre en dessous et au dessus duquel se situe 50% du volume de l'échantillon et $d(0,9)$ le diamètre en dessous duquel se situe 90% du volume de l'échantillon.

- **Protocole opératoire**

La mesure par Mastersizer nécessite la réalisation d'un blanc. Dans le cadre de ces travaux, le blanc est effectué avec une solution de NaCl à 10^{-4} M.

De la même façon que pour le HPPS une SOP (Procédure Opératoire Standardisée) est lancée et la mesure peut débuter. L'enceinte de mélange est remplie de la solution NaCl 10^{-4} M. L'agitation et la pompe sont mises en marche. La cellule de mesure se remplit alors de la solution NaCl. Le blanc est effectué : l'appareil détecte l'image de diffraction du blanc qui sera ensuite soustraite à l'image de diffraction de l'échantillon.

10mL de dispersion de nanoparticules sont alors ajoutés à l'enceinte de mélange, la mesure est effectuée. L'appareil donne la distribution de tailles en volume de particules ainsi que le $d(0,1)$, $d(0,5)$ et $d(0,9)$.

4.3.2. Stabilité colloïdale des nanoparticules par turbidimétrie

4.3.2.1. Principe de la mesure

Lorsque les dispersions colloïdales flocculent ou s'agrègent, la taille des particules augmente. Ceci se traduit par une augmentation de la turbidité du système dans le cas où les particules ont un rayon inférieure à $\lambda/5$ (avec λ la longueur d'onde de la lumière d'observation).

Par ailleurs, la turbidité de la suspension est proportionnelle à sa densité optique (DO). En suivant les variations de la DO en fonction de la concentration en sel, on peut donc suivre les variations de la turbidité en fonction de la force ionique du milieu dispersant et par ce biais, la variation de tailles de particules d'une dispersion. Il suffit de bien choisir la longueur d'onde utilisée pour réaliser les mesures de DO. Pour des particules de taille de l'ordre de la centaine de nanomètres, des mesures par spectrophotométrie visible permettent de repérer les changements de stabilité.

Long et al. [6] ont développé une méthode permettant de suivre la floculation de dispersions stabilisées stériquement en fonction de la force ionique. Il suffit alors de mesurer la DO d'une dispersion en fonction de la longueur d'onde pour une force ionique donnée. Le tracé du $\log(DO)$ en fonction de $\log(\lambda)$ donne une droite dont la pente n peut être calculée. Le tracé de la valeur absolue des pentes n en fonction de la force ionique donne une courbe de stabilité. Une diminution brutale de $|n|$ témoigne de l'augmentation de la taille des particules et donc des phénomènes de floculation ou d'agrégation [7][8][9].

4.3.2.2. Mode opératoire

Le but ici est d'évaluer la stabilité colloïdale des particules en présence de sels. Nous avons donc mesuré la variation de DO des dispersions diluées dans plusieurs solutions de concentrations croissantes en NaCl. Les concentrations en NaCl utilisées sont : 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, 10^{-1} M, 1 M, 2 M et 4 M.

Des cuves spectrophotométriques ont été remplies avec 3mL de chaque solution NaCl. 1mL de dispersion de nanoparticules a ensuite été ajouté dans chaque cuve. Les cuves ont été agitées manuellement et laissées au repos pendant une heure.

Les DO ont été mesurées par un spectrophotomètre (UVikon-XL Bio-Tek Instruments) avec un balayage entre 450nm et 700nm (mesures tous les 50nm). Pour chaque concentration en NaCl, la courbe $\log(DO)$ en fonction de $\log(\lambda)$ a été tracée et la pente n calculée. Le tracé des valeurs absolues des pentes n en fonction de la concentration est ensuite donné.

4.3.3. Stabilité des nanoparticules en présence de Sodium dodécyl sulfate (SDS)

La suspension des nanoparticules est assurée par la présence, en quantité suffisante, de dextrane à la surface des particules. Mais ce dextrane est-il simplement adsorbé sur la particule de PLA ou bien ancré par le biais des chaînes hydrophobes greffées au dextrane ? Pour vérifier ceci, une quantité de SDS (1% massique) est ajoutée à la suspension (10 mL) de particules après lavage, centrifugation et redispersion. Le mélange est maintenu sous agitation magnétique à température ambiante pendant 24h. La suspension est ensuite lavée par centrifugation de la même manière que lors de l'élaboration des particules. La suspension est ensuite caractérisée par mesure de taille. Si une désorption de la couche hydrophile a lieu, on observe une déstabilisation de la suspension et donc une augmentation de la taille des nanoparticules. Les particules lyophilisées sont ensuite dissoutes dans le DMSO-d₆ pour caractérisation.

4.3.4. Potentiel Zêta

Le but est de mesurer le potentiel Zêta des nanoparticules à différentes concentration en NaCl pour caractériser l'épaisseur électrocinétique de la couche interfaciale lorsqu'elles seront injectées dans le circuit sanguin (force ionique 0.15). Les 9 concentrations en NaCl utilisées vont de 10⁻⁶ à 10⁻² mol/L.

1.5mL de suspension à 2,5 mg de particules/mL de suspension, puis 1.5mL de solution de NaCl sont introduits dans la cuve en U à l'aide d'une seringue de 2mL. On veillera à ne pas laisser de bulles d'air dans la cuve.

Les valeurs de potentiel sont tracées en fonction de la concentration en NaCl. A l'aide de l'équation de Booth modifiée, puis de la relation de Gouy et Chapmann, on parvient à estimer l'épaisseur de couronne polysaccharide (Δ_{pz}). (Voir chapitre 2 de ce manuscrit)

5. Encapsulation du Pam-LEY

5.1. Synthèse du Pam-LEY

La synthèse peptidique sur support solide est effectuée à l'aide d'un synthétiseur automatisé ResPepXL (Intavis AG) en stratégie Fmoc. La synthèse est réalisée dans un réacteur de synthèse comportant un fritté et contenant une résine insoluble. La résine commerciale (Novabiochem) utilisée est une résine de type Wang (Fmoc-Tyr(tBu)-Wang) et est donnée avec un taux de greffage de 0,7 mmol de sites réactionnels par gramme de résine. Cela revient à utiliser 286 mg de résine par réacteur (6 réacteurs chargés chacun de 0,2 mol de Tyrosine). La masse de chaque acide aminé à ajouter (3 équivalents par site réactionnel) est donnée dans le *Tableau 29*. Toutes les étapes de couplage et de déprotection se font dans le *N,N*-diméthylformamide, DMF (*Tableau 30*).

Tableau 29 - Quantité d'acides aminés à ajouter pour la synthèse automatisée

Acide aminé	Formulation	Masse à ajouter
Leucine	Fmoc-Leu-OH	2214 mg
Acide Glutamique	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2666 mg

Tableau 30 - Quantités d'agents de couplage, de capping et de solvant de lavages à ajouter

Molécule	Action	Masse ou volume de molécule	Volume de DMF
HBTU	Activateur	4.7 g	20.7 mL
NMM	Base	2.8 mL	3.5 mL
NMP	Aide à la solubilisation	0.5 mL	-
DCM	Solvant de lavage	882 mL	-
MeOH	Solvant de lavage	315 mL	-
Anhydride acétique	Capping	1.8 mL	34.3 mL
Pipéridine 20%	Déprotection du Fmoc	11.9 mL	47.5 mL
HOBt	Empêche l'épimérisation	1.7 g	19 mL

En fin de synthèse, la résine est séchée sous vide poussé durant 1 nuit. Le peptide est clivé de son support solide par ajout d'un mélange d'eau milliQ, de triisopropyl silane et d'acide trifluoroacétique (H₂O/TIPS/TFA, 2.5/5/92.5, v/v/v) pendant 4 h. Ce mélange permet à la fois de cliver le peptide du support solide et de déprotéger les chaînes latérales. La résine est lavée successivement 3 fois avec ce mélange, 3 fois avec du méthanol puis 3 fois avec du dichlorométhane. La solution est évaporée sous vide. Le produit obtenu est ensuite lyophilisé et conservé au congélateur.

5.2. Dosage par HPLC du Pam-LEY

Le montage est composé d'une pompe merck L-6200 A sur laquelle est montée un injecteur équipé d'une boucle de 20 µL. Les bouteilles de 500 mL d'éluant sont reliées à un dégazeur 3 entrées elite Alltech. La

colonne utilisée est une Macherey Nagel Nucleosil 300-7 ref 720060 40 reliée à un spectromètre U.V. UV 2000, spectra physics analytical. Les intégrations sont réalisées à l'aide d'un intégrateur Merck D-2500 A. Les injections sont effectuées avec seringue Hamilton de 500 μ L. deux éluants sont employés et dégazés pendant 30min au bain à ultrasons.

Eluant A : eau MilliQ 99.9% + 0.1% de TFA

Eluant B : CH₃CN 80% + 19.9% eau MilliQ + 0.1% de TFA

L'éluant B est composé d'eau car le fait de mélanger l'eau à l'acétonitrile produit une phase gazeuse. Le mélange préalable de ces deux solvants permet ainsi d'éviter cette production de gaz dans la colonne et la présence de bulles d'air dans la colonne. Le TFA (acide Trifluoroacétique) est utilisé pour éviter la prolifération bactérienne dans les éluants, et permet donc d'allonger la durée de vie de la colonne. Cela semble également stabiliser la ligne de base.

Avant injection, un cycle de stabilisation du système est réalisé pendant 12h (10% solvant B et 90% solvant A à 0.2ml/min). Le cycle d'injection repris d'un protocole étudié par le Groupe de Synthèses Organiques et Biostructures du LCPM est décrit sur la *Figure 131*.

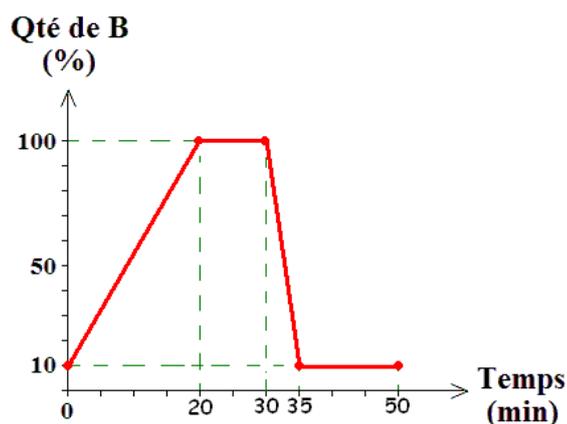


Figure 131 - Cycle d'injection du Pam-LEY en solution dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO), pour une analyse par HPLC

La détection du Pam-LEY est réalisé par spectroscopie UV-visible à 280nm (absorption par le cycle aromatique de la tyrosine). Le Pam-LEY est élué à 18,5 minutes. Différentes solutions de Pam-LEY à concentration connue dans du DMSO HPLC grade (ou de l'eau) sont utilisées pour tracer une courbe de calibration nécessaire au dosage du Pam-LEY dans une solution à analyser.

5.3. Etude de la libération

Avant chaque étude de libération nous avons mesuré par U.V. le taux d'encapsulation de Pam-LEY dans nos particules réalisées par les deux procédés de formulation. Pour chaque lot de particules, nous avons les formulations suivantes :

- Dans le cas de l'élaboration par émulsion/évaporation : (25 mg de PLA + 1 mg de Pam-LEY + 1 mL d'acétate d'éthyle saturée en eau) et (50 mg de DexC₆-14 + 10 mL d'eau).
- Dans le cas de l'élaboration par nanopréciipitation : (25 mg de PLA + 1 mg de Pam-LEY + 5 mL d'acétone) et (50 mg de DexC₆-14 + 10 mL d'eau).

Une fois lavées, les particules sont lyophilisées sans tréhalose puis dissoutes dans du DMSO. On mesure l'absorbance de la solution et on obtient la concentration en Pam-LEY dans la cuve en utilisant les courbes de calibrations.

Afin d'étudier la cinétique de libération du Pam-LEY hors des particules cœur PLA/couronne DexC₆, celles-ci sont tout d'abord lyophilisées puis redispersées à 2,5mg de particules / mL de solution aqueuse à 1% massique de SDS. La suspension des particules dans cette solution aqueuse de SDS est agitée magnétiquement à 37°C.

- Pour chaque mesure, on prélève 3mL de cette solution (particules+H₂O+SDS) que l'on centrifuge à 40 000 tr/min pendant 20min. 1.5mL de surnageant est prélevé pour le dosage U.V.. On dose alors le peptide présent dans ce surnageant et donc libéré (dosage direct).
- Le culot, séché sous vide dynamique pendant 1 nuit est ensuite redissout dans 1.5mL de DMSO et dosé par U.V.. On mesure alors le peptide contenu dans cette solution et donc encore contenu dans les particules, non libéré (dosage indirect).

Le peptide se caractérise donc en U.V. par l'absorption du cycle aromatique de la Tyrosine présente dans le Pam-LEY. On vérifie au préalable que ni les solvants utilisés, ni le SDS ne modifie pas les spectres d'absorbance du peptide.

La mesure est réalisée dans des cuves en quartz bifaces à l'aide d'un appareil UVikon-XL Bio-Tek Instruments et son logiciel associé. La mesure est réalisée 5 fois à 280 nm (absorption du cycle aromatique de la tyrosine) et une moyenne est calculée. La ligne de base est faite en utilisant le solvant de mesure.

La concentration du peptide dans le surnageant ou encore contenu dans les particules est estimée à partir de courbes de calibration réalisées dans le SDS 1% et dans le DMSO.

5.4. Tests cellulaires

5.4.1. Effet de la viabilité cellulaire

Les nanoparticules chargées de Pam-LEY ont été testées sur des cellules HEK-293¹⁴ (Laboratoire d'Enzymologie moléculaire et Fonctionnelle de l'Université Pierre et Marie Curie). Une culture de cellules HEK-293 en phase exponentielle de croissance est centrifugée puis resuspendue à la concentration de 6×10^5 cellules par mL avant d'être transférée dans la plaque de test. La viabilité des cellules est regardée pendant 24, 48 et 72 h après l'incubation en présence d'inhibiteur (0,5 mg à 5 mg/mL) en utilisant le test MTT.

Ce test MTT est une méthode rapide de numération des cellules vivantes. Ceci consiste en un test colorimétrique basé sur la réduction d'un sel jaune de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) par la NADPH¹⁵ (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) réductase mitochondriale de cellules métaboliquement actives ; ce qui conduit à la formation de formazan (*Figure 132*) bleu violet. La concentration de celui-ci peut être mesurée par spectrophotométrie. L'absorbance est lue à 540 et 690 nm.

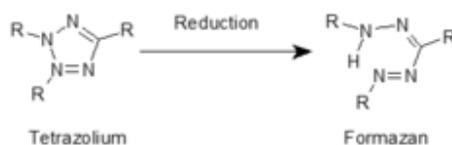


Figure 132 - Réduction du sel de tétrazolium en formazan

5.4.2. Tests cellulaires sur cellules infectées par le VIH

Les tests cellulaires sont généreusement conduits au Rega Institute de Leuven (Pr C. Pannecouque). Les techniques utilisées sont résumées ci-dessous.

Afin d'évaluer simultanément l'activité antivirale du Pam-LEY encapsulé sur des cellules infectées par le VIH ou sur des cellules témoins, deux séries d'échantillons sont préparées, chaque série étant répétée 3 fois. Une série se compose de dilutions successives d'un facteur 5 du composé à tester à partir d'une solution 10 fois concentrée. Un contrôle sans inhibiteur est effectué pour chaque échantillon de cellules infectées.

Des stocks de VIH-1 III_B ou de VIH-2 ROD à une concentration équivalente à 100-300 fois la dose infectieuse pour une culture cellulaire ou du milieu de culture sont ajoutés aux cellules infectées par le VIH ou aux cellules témoins. Les cellules témoins permettent d'évaluer l'effet du composé sur des cellules non infectées afin de déterminer sa cytotoxicité. Une culture de cellules MT4¹⁶ en phase

¹⁴ Human Embryonic Kidney-293. Lignée cellulaire humaine dont le tissu d'origine est l'épithélium rénal embryonique

¹⁵ Les NADH et NADPH sont dits porteurs de pouvoir réducteur, car ils sont capables de fournir de l'énergie lors du transfert de leur atome d'Hydrogène: ils rendent possible des réactions de réduction nécessaires à la cellule

¹⁶ Lignée de lymphocytes T humains

exponentielle de croissance est centrifugée puis resuspendue à la concentration de 6×10^5 cellules par mL avant d'être transférée dans la plaque de test. La viabilité des cellules infectées par le VIH et des cellules témoins est regardée 5 jours après l'incubation en utilisant le test MTT (voir paragraphe précédent).

Les données sont calculées en utilisant la moyenne de la densité optique des trois puits. La concentration d'inhibiteur qui conduit à 50 % de cytotoxicité (CC_{50}) est définie par la concentration de composé qui réduit de 50 % l'absorbance à 540 nm des cellules témoins. La concentration qui conduit à 50 % de protection contre l'effet cytotoxique du virus dans les cellules infectées est la concentration efficace à 50 % (EC_{50}).

6. Post-fonctionnalisation de la surface des nanoparticules

6.1. Post-fonctionnalisation par une sonde fluorescente modèle

6.1.1. Protocole opératoire

On introduit 5ml de dispersion de nanoparticules lavées et lyophilisées (à 2,5mg/mL) ainsi que 1ml de solution aqueuse (1mg/mL) du dérivé de coumarine dans un schlenk (Figure 133).

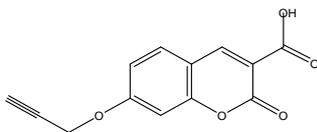


Figure 133 - Molécule modèle fluorescente utilisée

Cette solution mère du dérivé coumarine est préparée en dissolvant 10mg du composé coumarine (synthétisé par Jérôme Babin du LCPM) dans 9ml d'eau milliQ et 1ml de solution basique (soude 2mg/mL). Ce pH basique permet de transformer la fonction carboxylique du dérivé sous forme carboxylate, ce qui permet de solubiliser ce produit dans l'eau.

Le catalyseur utilisé est le Cu(I) introduit sous forme CuBr solide à 5mg. En présence de dioxygène le Cu(I) s'oxyde en Cu(II). Afin d'éviter cette oxydation, un barbotage de la solution par l'azote est réalisé pendant 15min avant l'ajout du catalyseur. Du Cu^0 est également ajouté au milieu réactionnel, en très faible quantité (0,5 mg).

Après l'ajout du catalyseur le milieu réactionnel est maintenu clos et sous agitation pendant 24h.

On prépare de la même manière un « blanc » où l'expérience est réalisée sans ajout de cuivre. Utile lors de la caractérisation, il permet de montrer que l'ajout de Cu(I) est nécessaire pour que la réaction se fasse et que les molécules à fixer ne s'adsorbent pas simplement à la surface des particules.

6.1.2. Purification des nanoparticules

Après post-fonctionnalisation les nanoparticules sont purifiées. Afin de complexer le cuivre on ajoute une spatule d'EDTA dans le schlenk de réaction. La solution devient alors bleutée. On laisse la solution à

agiter 24h. Les dispersions sont ensuite centrifugées pendant 15min, à 12000rpm à 15°C. Le surnageant est rapidement éliminé et les nanoparticules sont redispersées dans environ 5ml d'eau milliQ pour une seconde centrifugation. Les nanoparticules alors récupérées sont redispersées dans 5ml d'eau milliQ afin de les caractériser.

6.2. Synthèse du peptide de reconnaissance : ATWLPPR ω -alcyne

La synthèse peptidique sur support solide est effectuée à l'aide d'un synthétiseur automatisé ResPepXL (Intavis AG) en stratégie Fmoc. La synthèse est réalisée dans un réacteur de synthèse comportant un fritté et contenant une résine insoluble. La résine commerciale (Novabiochem) utilisée est une résine chlorotriptyl, Fmoc-Arg(Pbf)-Trt, et est donnée avec un taux de greffage de 0,58 mmol de sites réactionnels par gramme de résine. Cela revient à utiliser 345 mg de résine pour une charge de 0,2 mol d'Arginine par réacteur. La masse de chaque acide aminé à ajouter (3 éq.) est donnée dans le *Tableau 31*. Toutes les étapes de couplage et de déprotection se font dans le *N,N*-diméthylformamide, DMF.

Tableau 31 - Quantités d'acides aminés à ajouter pour la synthèse automatisée

Acide aminé	Formulation	Masse à ajouter
Alanine	Fmoc-NH-Ala-OH	1278 mg
Thréonine	Fmoc-NH-Thr(tBu)-OH	1632 mg
Tryptophane	Fmoc-NH-Trp(Boc)-OH	2162 mg
Leucine	Fmoc-NH-Leu-OH	1451 mg
Proline	Fmoc-NH-Pro-OH	2770 mg

Les quantités d'agent de couplage, de *capping* et de solvant de lavages sont données dans le *Tableau 32*.

Tableau 32 - Quantités d'agents de couplage, de capping et de solvant de lavage à ajouter.

Molécule	Action	Masse ou volume de molécule	Volume de DMF
HBTU	Activateur	9,3 g	40,6 mL
NMM	Base	5,5 mL	6,8 mL
NMP	Aide à la solubilisation	1 mL	-
DCM	Solvant de lavage	337 mL	-
MeOH	Solvant de lavage	145 mL	-
Anhydride acétique	Capping	3,7 mL	69 mL
Pipéridine	Déprotection du Fmoc	28,8 mL	116 mL

La pipéridine utilisée est à 20 % et l'anhydride acétique à 5 % en volumes dans le DMF.

Une fois les couplages peptidiques réalisés, 2 couplages avec à chaque fois 2 équivalents d'acide 5-hexynoïque sont mis en œuvre.

En fin de synthèse la résine est séchée sous vide poussé durant 1 nuit. Le peptide est clivé de son support solide par ajout d'un mélange d'eau milliQ, de triisopropylsilane et d'acide trifluoroacétique (H₂O/TIPS/TFA, 2.5/5/92.5, v/v/v) pendant 4 h. Ce mélange permet à la fois de cliver le peptide du support solide et de déprotéger les chaînes latérales. La résine est lavée successivement 3 fois avec ce mélange, 3 fois avec du méthanol puis 3 fois avec du dichlorométhane. La solution est évaporée sous vide. Le produit obtenu (Figure 134) est ensuite lyophilisé puis redilué dans un mélange DMSO/ACN, (1/9, v/v) pour être purifié par HPLC (HPLC : Colonne C18, 5 μm (150 x 21,2 mm)- Varian Pursuit).

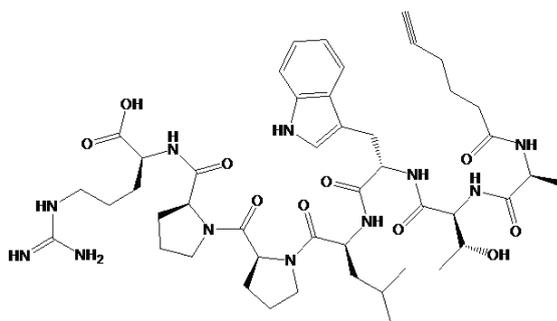


Figure 134 : Peptide de reconnaissance ATWLPPR ω-alcyne (M=932 g/mol)

6.3. Post-fonctionnalisation des nanoparticules par ATWLPPR ω-alcyne

6.3.1. Protocole opératoire

La post-fonctionnalisation réalisée utilise le même protocole pour les nanoparticules élaborées par nanopréciipitation de dextrane-g-PLA-g-N₃ ou par Chimie-click *in situ* par émulsion/évaporation de solvant.

On introduit 10ml de dispersion de nanoparticules lavées (soit 25mg de particules) ainsi que 1mg de peptide (soluble dans l'eau) fonctionnalisé dans un schlenk. Cela revient à introduire 5% de fonction alcyne (venant d'ATWLPPR ω-alcyne) par fonctions N₃ libres et supposées présentes à la surface des particules (venant du copolymère dextrane-g-PLA-g-N₃). Le catalyseur utilisé est le Cu(I) sous forme CuBr. En présence de dioxygène le Cu(I) s'oxyde en Cu(II). Afin d'éviter cette oxydation, un barbotage de la solution par l'azote est réalisé pendant 15min avant l'ajout du catalyseur. Après l'ajout du catalyseur le milieu réactionnel est maintenu clos et sous agitation pendant 24h.

6.3.2. Purification des particules

Pour complexer le cuivre introduit, on ajoute une spatule d'EDTA dans le schlenk de réaction et on laisse agiter environ 30 minutes. La solution devient alors bleutée. Les dispersions finales sont centrifugées pendant 20min, à 12000rpm. Le surnageant est alors rapidement éliminé et les nanoparticules sont redispersées dans environ 10ml d'eau milliQ contenant de l'EDTA. Les solutions sont centrifugées de nouveau, puis les nanoparticules redispersées dans 10ml d'eau milliQ. On répète ensuite cette opération. Les nanoparticules alors récupérées sont redispersées dans 10ml d'eau milliQ afin de les conserver (au réfrigérateur) ou de les lyophiliser en vue d'une analyse par RMN ^1H .

6.4. Etude de la fluorescence des nanoparticules

Les spectres de fluorescence des nanoparticules ont été obtenus en utilisant un spectrofluorimètre Fluorolog-3 (Jobin-Yvon Horiba S.A.S.) équipé d'une lampe à arc basse pression contenant du xénon (450 W), d'un double monochromateur à l'excitation, de deux doubles monochromateurs à l'émission et d'un compartiment échantillon thermostaté à par effet Peltier. La température de consigne a été maintenue à 25 °C. Nos études se faisant de manière classique (analyse à 90 °), il est nécessaire, pour effectuer des mesures quantitatives, de se placer à une concentration adéquate en chromophore. Pour nos analyses, nous avons utilisé des cuves en quartz d'un centimètre de parcours optique.

Une courbe de calibration a été réalisée en mesurant la fluorescence du peptide à différentes concentrations dans l'eau, solvant dans lesquelles les nanoparticules post-fonctionnalisées sont mises en suspensions.

Nos suspensions de nanoparticules, contenant une concentration inconnue en peptide sont ensuite mesurées et la concentration en peptide à la surface des particules est alors estimée en utilisant la courbe de calibration.

7. Bibliographie

- [1] Rudy Covis. «Synthèse de polysaccharides amphiphiles à partir de dextrane et application à la stabilisation d'émulsions directs et inversées ». Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine. 04/02/2011
- [2] E. Rotureau, E. Marie, E. Dellacherie, A. Durand, From polymeric surfactants to colloidal system (3): Neutral and anionic polymeric surfactants derived from dextran. *Colloid Surface A*, 301 (2007) p. 229-238
- [3] Elise Rotureau, « Dextranes amphiphiles : adsorption aux interfaces liquide/liquide et application à la stabilisation d'émulsion ». Doctorat de l'Institut Polytechnique Nationale de Lorraine. 18/03/2005.
- [4] Patrice Castignolles, « Cinétique de la polymérisation radicalaire des acrylates par polymérisation par LASER pulsé et chromatographie d'exclusion stérique multi-detection (PLP-SEC) - Analyse critique ». Doctorat de l'Université Paris 6
- [5] Manuel d'utilisation du granulomètre Mastersizer2000© Malvern
- [6] Long, J, Osmond, D et Vincent, B. The equilibrium aspects of weak flocculation. *J. Colloid Interf. Sci.*, 42(3) (1973) 545-553.
- [7] Chattopadhyay N., Zastre J., Wong H.L., Wu X.Y., Bendayan R., solid lipid nanoparticles enhance the delivery of HIV protease inhibitor, atazanavir, by a Human Brain Endothelial Cell Line, *pharm. Res.*, 25(10) (2008)
- [8] Wei M., Ruys A.J., Milthorpe B.K., Sorrell C.C., Solution ripening of hydroxyapatite nanoparticles: Effects on electrophoretic deposition, *J. Biomed. Mater. Res.*, 45(1) (1999), p. 11-19
- [9] Barker A.J., Cage B., Russek S., Stoldt C.R., Ripening during magnetite nanoparticle synthesis, Resulting interfacial defects and magnetic properties, *J. Appl. Phys.*, 98(6) (2005), p. 1-7

CONCLUSION GENERALE

Depuis plusieurs années, le LCPM a acquis une forte expérience dans l'élaboration de nanoparticules biocompatibles et biodégradables. Plus particulièrement, il s'est spécialisé dans les nanoparticules de PLA recouvertes d'une couronne hydrophile polysaccharidique. C'est avec la volonté de démontrer qu'une telle couronne présente des atouts (propriétés surfactives des polysaccharides, stabilité des particules obtenues, possibilité de fonctionnalisation) que nous avons menés les travaux décrits dans ce manuscrit.

La première partie du travail décrit a consisté à améliorer et diversifier la synthèse de dextrane amphiphiles. Ces dérivés (DexC₆, DexN₃ et Dex-g-PLA-g-N₃) nous ont permis de formuler des nanoparticules de PLA recouvertes d'une couche polysaccharidique hydrophile. L'étude et l'optimisation de deux procédés d'élaboration (émulsion/évaporation de solvant organique et nanoprécipitation) ont été menées avec ces divers composés. Toutefois, nous avons pu observer que la couronne DexC₆, bien que stable en milieu aqueux jusqu'à une force ionique de 4 mol/L est simplement adsorbée physiquement à la surface des particules et donc, de ce fait, elle peut être facilement désorbée en présence de SDS utilisé comme "modèle" des fluides biologiques.

Le peptide Pam-LEY, candidat pour une inhibition de la dimérisation de la protéase du VIH-1, a été synthétisé avec succès puis encapsulé dans des nanoparticules coeur PLA/couronne DexC₆. Sa libération très rapide est malheureusement observée lorsque ces nano-objets sont placés en suspension dans une solution aqueuse de SDS. Concernant les tests biologiques, aucun résultats probant n'a été obtenu mais le nombre d'expérimentations réalisé est trop faible, par manque de temps, pour que des conclusions puissent être tirées.

La deuxième partie du travail a consisté à fixer de manière covalente cette couronne hydrophile polysaccharidique au coeur hydrophobe PLA de la nanoparticule pour, *in fine*, conserver une stabilité colloïdale dans des milieux simulants les fluides biologiques. C'est dans cette optique que la Chimie-click a été introduite dans nos procédés d'élaboration. D'une part, les DexN₃ hydrosolubles ont été émulsionnés en présence de chaînes PLA α -alcyne. Par l'ajout de CuBr dans l'émulsion, on observe une réaction de chimie-click se produisant *in situ*, localisée à l'interface liquide/liquide et pendant l'étape de sonication. En effet, l'énergie délivrée lors de la sonication permet la création de cycles triazole reliant les DexN₃ aux PLA α -alcyne. De cette façon, la couche polysaccharidique se lie alors de façon irréversible au coeur PLA de la nanoparticule. En parallèle, des copolymères Dex-g-PLA-g-N₃ de différentes structures, tant en nombre qu'en longueur des greffons PLA mais aussi qu'en nombre de fonctions N₃ résiduelles, ont pu être synthétisés par Chimie-click. Ceux-ci ont ensuite été nanoprécipités dans l'eau, sans ajout de tensioactif supplémentaire. Les nanoparticules obtenues par ces deux procédés d'élaboration se sont avérées extrêmement stables en présence de SDS. Un lien covalent entre le coeur et la couronne des nanoparticules est désormais réalisable, ce qui devrait nous permettre dorénavant de nous affranchir des précédents problèmes de stabilité.

Un autre avantage majeur de la Chimie-click réside également dans le fait que des fonctions résiduelles azide peuvent être disponibles à la surface des nanoparticules. De ce fait, il nous a été possible d'évaluer leur post-fonctionnalisation à l'aide de molécules solubles en milieu aqueux et contenant une fonction alcyne. Un dérivé fluorescent de la coumarine à tout d'abord été employé comme molécule modèle. Sa fixation à la surface des nanoparticules a été vérifiée de manière qualitative, prouvant cependant la validité du concept. Par ailleurs, aucune aggrégation des particules n'est observée durant cette étape de post-fonctionnalisation.

Conclusion générale

Dans la 3^{ème} partie du travail présenté dans ce manuscrit, les précédents travaux du LCPM menés dans le cadre de la recherche sur le cancer, en partenariat avec le Centre de cancérologie nancéen (CRAN-CAV) et le LRGP, ont permis de synthétiser un peptide (ATWLPPR) capable de cibler un co-récepteur de VEGF, nommé Neuropiline-1, surexprimé à la surface des néo-vasseaux irriguant les tumeurs cancéreuses. La modification de ce peptide par une fonction alcyne terminale nous a permis de le fixer à la surface des nanoparticules présentant des fonctions azide libres, en utilisant un procédé d'élaboration en une seule étape. Pour cela, le DexN₃ a été émulsionné avec le PLA α -alcyne, en présence de CuBr et d'ATWLPPR ω -alcyne.

Bien que ce résultat soit très prometteur, aucune caractérisation biologique n'a pu être réalisée faute de temps.

Cependant, d'intéressantes perspectives à moyen terme se présentent pour un suivi constructif de ce travail, à savoir :

- L'encapsulation et l'évaluation biologique du Pam-LEY dans des nanoparticules pour lesquelles la couronne polysaccharide sera liée chimiquement au cœur PLA de la particule. Des nanoparticules élaborées par nanopréciipitation de Dex-g-PLA-g-N₃, ou par émulsion/évaporation de solvant organique en utilisant du PLA ω -alcyne et DexN₃, pourront être comparées. Un suivi biologique de ces particules ainsi que l'évaluation de la quantité utile minimale de peptide pour inhiber la dimérisation de la protéase du VIH-1 devraient être menés.
- Une étude plus poussée sur la post-fonctionnalisation des nanoparticules par le peptide ATWLPPR nécessitera de reproduire les manipulations préliminaires et de caractériser de manière approfondie les nano-objets obtenus. L'évaluation biologique d'une telle post-fonctionnalisation pourra être menée *via* des tests ELISA. Ces tests pourraient confirmer un ciblage des cellules cancéreuses par les nanoparticules ainsi décorées. Ici encore, une quantité minimale utile de peptide à la surface des particules devra être évaluée.

A plus long terme, ces travaux devraient permettre la formulation de divers objets destinés à des applications dans le domaine biomédical. Ainsi, la synthèse de peptides particuliers couplée chimiquement sur des nano- ou micro-objets constitue un point fort de nos prochaines thématiques de recherche.

A Nancy, le 11 février 2013

No étudiant : 30300252

LAVILLE MAXIME
5 rue amalairé
57000 METZ

Monsieur,

Par décision en date du 04 février 2013, vous avez été autorisé à présenter en soutenance vos travaux en vue de l'obtention du diplôme :

Doctorat Génie des Procédés et des Produits

La soutenance aura lieu le 22 février 2013 à 14h00 à l'adresse suivante :

ENSIC - 1 rue Granville - NANCY 54000

La soutenance sera publique.

Je vous prie d'agréer, Monsieur, l'expression de mes salutations distinguées.

Le Président



Université de Lorraine
Le Président

Pierre MUTZENHARDT

**AUTORISATION DE SOUTENANCE
DU DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur PICTON Luc, Professeur, LPBS Université de Rouen,

Monsieur DESBRIERES Jacques, Professeur, IPREM Université de Pau.

Le Président de l'Université de Lorraine, autorise :

Monsieur LAVILLE Maxime

à soutenir devant un jury de l'UNIVERSITE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Nanoparticules polymères de deuxième et troisième génération pour des applications thérapeutiques anti-cancer et anti-HIV"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

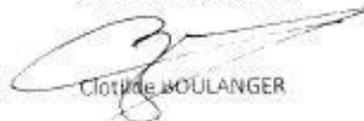
Intitulé du doctorat : **"Génie Procédés et des Produits"**

Fait à Vandoeuvre, le 1^{er} Février 2013

Le Président de l'Université de Lorraine.

Pierre MUTZENHARDT

Pour le Président et par délégation,
La Vice-Présidente du CS.



Clotilde BOULANGER

Titre: Nanoparticules polymères de deuxième et troisième générations pour des applications thérapeutiques anti-cancer et anti-HIV.

Résumé: Les travaux portent sur l'élaboration de nanoparticules dont le cœur polyester (PLA) est recouvert d'une couche polysaccharide hydrophile à base de dextrane. Des composés amphiphiles polysaccharidiques (DexC₆, DexN₃, Dex-g-PLA-g-N₃) ont été synthétisés et leur comportement tensioactif a été évalué. Leur capacité à stabiliser les interfaces a été mise à contribution pour élaborer les nanoparticules *via* deux procédés: émulsion/évaporation de solvant organique et nanoprécipitation. Un peptide inhibiteur de la dimérisation de la protéase du VIH-1 (Pam-LEY), a alors été encapsulé au sein de nanoparticules PLA recouvertes de DexC₆. Bien que stable en milieu aqueux de haute force ionique (4M), la désorption de la couronne physiquement adsorbée est observée en présence de SDS. La Chimie-click a été une alternative pour fixer cette couronne polysaccharidique hydrophile de façon irréversible à la surface des nanoparticules selon 2 stratégies. D'une part, des copolymères organosolubles Dex-g-PLA-g-N₃ ont été présynthétisés par Chimie-click puis nanoprécipités dans l'eau. L'autre méthode consiste à émulsionner une solution aqueuse de DexN₃ et une solution organique de PLA α -alcyne en présence de CuBr. Une chimie-click se produit alors *in situ* à l'interface liquide/liquide, et assure le lien covalent entre le cœur et la couronne de la nanoparticule. La Chimie-click nous a également permis d'obtenir des nanoparticules possédant des fonctions azide résiduelles à leur surface. Une post-fonctionnalisation de ces dernières a été réalisée avec un dérivé d'ATWLPPR, un peptide ciblant les co-récepteurs NRP-1 de VEGF surexprimés au niveau des néo-vaissaux irriguant les tumeurs cancéreuses.

Mots Clés: Nanoparticule, encapsulation, dextrane, copolymère, émulsion, nanoprécipitation, stabilité, fonctionnalisation, Chimie-click, VIH-1, cancer

Titre: Second and third generation of polymeric nanoparticles for therapeutical applications: anti-cancer and anti-HIV.

Abstract: This work deals with biodegradable/biocompatible polymeric nanoparticles based on PLA and covered by a polysaccharidic shell (dextran). First of all, amphiphilic dextran derivatives (DexC₆, DexN₃, Dex-g-PLA-g-N₃) have been produced and their surfactive properties have been evaluated depending on their architecture and substitution degree. Then we took advantages of their ability to stabilize interfaces to formulate nanoparticles via two processes: emulsion/organic solvent evaporation and nanoprecipitation. Pam-LEY, peptide used as HIV-1 protease dimerisation inhibitor, was encapsulated with 40% efficiency into PLA nanoparticles covered by DexC₆. Because this DexC₆ surface is just physically adsorbed on the PLA core, a desorption is observed in presence of SDS. The use of Click-chemistry was judged interesting to solve that issue and to covalently link the hydrophilic polysaccharidic shell to the PLA core. Two strategies could be opposed. On one hand, oil-soluble Dex-g-PLA-g-N₃ copolymers have been synthesized by click chemistry in homogeneous media and then nanoprecipitated in water. On other hand, an hydrophilic DexN₃ has been emulsified with a α -alkyne PLA organic solution, in the presence of CuBr. By this way, click-chemistry occurred *in situ*, at liquid/liquid interface during the emulsification step. Produced triazole rings link the core to the shell. Moreover, the use of the Huisgen cycloaddition reaction allowed us to produce nanoparticles having some residual azide functions on their surface. The nanoparticles have been post-fonctionalized by a peptide used to target NRP-1, co-receptor of Vascular Endothelial Growth Factor over-exprimed on the cancer tumors area.

Keywords: Nanoparticle, encapsulation, dextran, copolymer, click chemistry, emulsion, nanoprecipitation, fonctionnalization, HIV-1, cancer