



Conception de nanocapsules biodégradables recouvertes de dextrane par réaction "click" interfaciale

Katarzyna Balkun Poltorak

► To cite this version:

Katarzyna Balkun Poltorak. Conception de nanocapsules biodégradables recouvertes de dextrane par réaction "click" interfaciale. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0134 . tel-01752028

HAL Id: tel-01752028

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752028>

Submitted on 13 Nov 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>

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des procédés et des produits

Par

Katarzyna POLTORAK

***Conception de nanocapsules biodégradables recouvertes
de dextrane par réaction « click » interfaciale***

Soutenue le 12 novembre 2015 devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY

Président :	Jean-François LUTZ	Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg
Rapporteurs :	Stéphanie BRIANÇON	Professeur Université Claude Bernard Lyon 1
	Maud SAVE	Directeur de Recherche CNRS, Pau
Examineur :	Alain DURAND	Professeur Université de Lorraine
Membre invité :	Jean-Claude PIHAN	Professeur Honoraire Université de Lorraine, Directeur Scientifique Société BioCapTech
Directrice de thèse :	Cécile NOUVEL	Professeur Université de Lorraine
Co-directeur de thèse :	Jean-Luc SIX	Professeur Université de Lorraine

*A mon mari Lukasz,
pour son soutien constant.*

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM, UMR 7375, Nancy F-54000). Je remercie en premier lieu Monsieur Alain Durand, Directeur du laboratoire et Professeur à l'Université de Lorraine de m'y avoir accueilli. Je lui suis en plus reconnaissante d'avoir suivi ce travail et de ces remarques scientifiques enrichissantes.

Que Madame Stéphanie Briançon, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, Madame Maud Save, Directeur de Recherche CNRS à Pau et Monsieur Jean-François Lutz, Directeur de Recherche CNRS à Strasbourg trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier Madame Cécile Nouvel, Professeur à l'Université de Lorraine et Monsieur Jean-Luc Six, Professeur à l'Université de Lorraine pour m'avoir encadré au cours de ces trois années, pour la confiance qu'ils m'ont accordée, de leur disponibilité et de la qualité scientifique de leurs nombreux conseils qui m'ont permis d'aboutir à la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Jean-Claude Pihan, Monsieur Loïc Chomel de Varagnes, Monsieur François Issler de m'avoir accepté dans le projet BioCapTech et à toutes les personnes impliquées dans le projet pour leur collaboration.

Je tiens également à remercier Madame Michèle Léonard, Chargé de Recherche au CNRS, pour ses conseils scientifiques sur ma thèse.

Je remercie les permanents du LCPM qui ont apporté leur contribution à ces travaux : Monsieur Olivier Fabre pour les analyses RMN, Madame Marie-Christine Grassiot pour l'aide avec la SEC-MALLS, Monsieur Henri Lenda pour l'aide avec la MDSC et Monsieur Frédéric Roze pour les analyses ICP-OES. Je remercie Madame Nathalie Brenon pour son aide administrative et Monsieur Jean-Claude Sivault pour son appui technique tout au long de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier ma stagiaire Laura Marcela Casas Cevallos pour son apport important dans la partie encapsulation.

Un grand merci à tous mes passés et présents collègues qui ont su mettre une bonne ambiance au laboratoire et lors de déjeuners : Laura (on a partagé le bureau et le labo pendant ces 3 ans sans aucune dispute ;)), Ancuta (ma chère amie), Vincent, Isabelle et Asma (ensemble dans le même projet BCT), Ning, Natcha et Poup (my dear colleagues from Thailand), Lupita (it was nice to grumble together ;)), Xavier (pour des moments plus ou moins sympa ;)), Amirah (for nice chats in the meantime), Mariem, Nesrine, Miao, Soliman, Rudy, Maxime, Khalid, Audrey, Faten, Mohammed (x2), Sébastien, Eugénie, Lucie, Hicham ...

Je remercie également Dr Pranee Inprakhon pour son bon humour (et pour ses savons originaux !) et Professeur Anne Jonquière pour une bonne ambiance lors de déjeuners.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance à tous les membres du LCPM pour leur bienveillance, leur bonne humeur et l'excellente ambiance pendant ces trois années de thèse !

Katarzyna

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	5
 <u>PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	 9
 I. INTRODUCTION	 9
 II. NANOPARTICULES POLYMERES.....	 10
II.1. LES DIFERENTES MORPHOLOGIES	10
II.1.1. Nanosphères polymères	12
II.1.2. Nanocapsules polymères	13
II.1.2.1. Définition et avantages	13
II.1.2.2. Différents types de cœurs liquides.....	14
II.1.2.2.1. Nanocapsules à cœur huileux	14
II.1.2.3. Applications des nanocapsules à cœur liquide	15
II.1.3. Recouvrement des nanoparticules par un polymère hydrophile.....	22
II.1.3.1. Adsorption physique de polymères amphiphiles.....	22
II.1.3.2. Utilisation de copolymères amphiphiles.....	23
II.1.3.3. Ancrage chimique d'un polymère hydrophile à la surface.....	23
 III. METHODES D'ELABORATION DE CAPSULES A CŒUR LIQUIDE.....	 23
III.1. SEGREGATION DE PHASES.....	24
III.1.1. Nanoprécipitation	24
III.1.2. Emulsion-diffusion de solvant	25
III.1.3. Emulsion-évaporation de solvant	26
III.1.3.1. Emulsion simple	26
III.1.3.2. Emulsion double.....	27
III.1.4. Emulsion-coacervation.....	29
III.1.5. Polymérisation.....	30
III.1.6. Problèmes de contrôle de la morphologie des capsules	31
III.2. EMULSION TEMPLATE	33
III.2.1. Méthode couche-par-couche	33
III.2.1.1. Templating « dur »	33

III.2.1.2. Templating « mou »	35
III.2.2. Dépôt d'une couche polymère ou « polymer-coating »	36
III.3. REACTIONS A L'INTERFACE LIQUIDE/LIQUIDE	38
III.3.1. Polymérisation à l'interface.....	38
III.3.1.1. Polymérisation par étapes : Polycondensation/Polyaddition	39
III.3.1.2. Polymérisation en chaîne.....	40
III.3.2. Réactions de chimie « click » à l'interface.....	41
IV. REACTIONS DE CHIMIE « CLICK »	44
IV.1. GENERALITES.....	44
IV.2. CYCLOADDITION AZIDE-ALCYNE CATALYSEE PAR Cu(I)	45
IV.2.1. Avantages.....	46
IV.2.2. Méthodes de génération de Cu(I).....	47
IV.2.2.1. Utilisation des sel de Cu(I).....	48
IV.2.2.2. Génération <i>in situ</i> de Cu(I) à partir de sels de Cu(II).....	49
IV.2.2.3. Oxydation de Cu(0) métallique.....	51
IV.3. REACTIONS THIOL-ENE	51
IV.3.1. Mécanisme nucléophile (ou basique).....	52
IV.3.2. Mécanisme radicalaire	54
IV.3.2.1. Photo-amorceurs	55
IV.3.2.2. Amorceurs thermiques	58
IV.3.2.3. Amorceurs redox.....	58
IV.4. APPLICATIONS DES REACTIONS DE CHIMIE « CLICK » A LA PREPARATION ET/OU FONCTIONNALISATION DE PARTICULES POLYMERES	60
V. CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	70
VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	71

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

OBJECTIFS ET STRATEGIE DE SYNTHESE.....	83
--	-----------

CHAPITRE I : Synthèse et caractérisation de polymères précurseurs pour la chimie « click ».....87

I. SYNTHÈSE DES POLYLACTIDES	87
I.1. Généralités	87
I.2. Conditions de synthèse du PLA α -alcyne	88
I.3. Conditions de synthèse du PLA α -SH	89
I.3.1. Etape I : Synthèse du PLA-SS-PLA	90
I.3.2. Etape II : Réduction des liaisons disulfure.....	91
I.4. Caractérisation par RMN ^1H et SEC-MALLS.....	92
I.4.1. PLA α -alcyne et PLA-SS-PLA	92
I.4.2. PLA α -SH	95
II. SYNTHÈSES DES DÉRIVÉS DU DEXTRANE	97
II.1. Généralités	97
II.2. Conditions de synthèse du dextrane porteur de fonctions azide (DexN ₃)	98
II.3. Conditions de synthèse des dextrans porteurs de doubles liaisons	99
II.3.1. Synthèse du DexC=C.....	99
II.3.2. Synthèse du DexC ₆ C=C.....	100
II.4. Caractérisation des dérivés du dextrane	101
II.4.1. RMN ^1H	101
II.4.2. SEC-MALLS	103
II.4.3. Propriétés tensioactives	104
III. CONCLUSIONS DU CHAPITRE	106

CHAPITRE II : Optimisation de la réaction « click » à l'interface afin d'obtenir des nano-objets polymères.....109

I. OPTIMISATION DE LA RÉACTION « CLICK » CuAAC A L'INTERFACE	110
I.1. Mise en évidence de la formation du copolymère	111
I.2. Efficacité de la réaction « click » CuAAC.....	113

I.3. Elaboration de NSs. Influence des conditions opératoires sur l'efficacité de la réaction CuAAC.....	114
I.4. Elaboration de NCs. Influence du M810 sur l'efficacité de la réaction CuAAC	115
I.5. Elimination du cuivre résiduel	117
II. OPTIMISATION DE LA REACTION « CLICK » THIOL-ENE A L'INTERFACE	119
II.1. Réaction thiol-ène nucléophile	119
II.1.1. Expériences préliminaires menées en milieu homogène	120
II.1.1.1. Mise en évidence de la formation du copolymère	120
II.1.1.2. Efficacité de la réaction et résultats	123
II.1.2. Réaction thiol-ène nucléophile à l'interface d'une émulsion pour obtenir des NPs	125
II.2. Réaction thiol-ène radicalaire à l'interface.....	128
II.2.1. Expériences préliminaires.....	128
II.2.2. Efficacité de la réaction et résultats	129
III. CONCLUSIONS DU CHAPITRE	131
<u>CHAPITRE III : Caractérisation des nano-objets</u>	135
I. DISTRIBUTION DE TAILLE DES NANO-OBJETS	135
II. CARACTERISATION DE LA COUCHE EXTERNE HYDROPHILE	141
II.1. Mise en évidence du recouvrement hydrophile	141
II.2. Détermination de l'épaisseur de la couche externe et du taux de recouvrement.....	142
III. STABILITE COLLOIDALE	148
III.1. Stabilité colloïdale en fonction de la force ionique.....	149
III.2. Stabilité du recouvrement en présence d'un tensioactif compétitif	151
IV. MORPHOLOGIE DES NANO-OBJETS	155
IV.1. Analyse thermique (MDSC)	155
IV.2. Analyses MET.....	159

V. CONCLUSIONS DU CHAPITRE	161
---	-----

CHAPITRE IV : Encapsulation et libération d'une substance active à partir des nano-objets.....163

I. GENERALITES	164
-----------------------------	-----

I.1. Encapsulation d'une SA au sein de NCs.....	164
I.2. Libération d'une SA à partir des NCs.....	165
I.3. Modélisation de la cinétique de libération	167
I.4. SA modèle choisie	171

II. RESULTATS	171
----------------------------	-----

II.1. Solubilité de l'OG dans la formulation et dans les NCs.....	171
II.2. Encapsulation de l'OG.....	173
II.2.1. Distribution de taille des NCs.....	173
II.2.2. Efficacité d'encapsulation de la SA.....	174
II.2.3. Cinétiques de libération de la SA	177

III. CONCLUSIONS DU CHAPITRE	180
---	-----

IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	181
--	-----

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	185
--	-----

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS	191
---------------------------	-----

II. PROTOCOLES OPERATOIRES DE SYNTHES	192
--	-----

II.1. POLYMERISATION DU LACTIDE	192
II.1.1. PLA α -alcyne.....	192

II.1.2. PLA α -SH	193
II.1.2.1. Synthèse de PLA-SS-PLA.....	193
II.1.2.2. Réduction du PLA-SS-PLA.....	194
II.2. MODIFICATION DU DEXTRANE.....	195
II.2.1. Dex-azide (DexN ₃)	195
II.2.1.1. Synthèse de l'acide 6-azidohexanoïque.....	195
II.2.1.2. Synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohexanoïque	196
II.2.1.3. Réaction du dextrane avec l'acide 6-azidohexanoïque activé	197
II.2.2. Dex-méthacrylate (DexC=C).....	197
II.2.3. Dex-alcène (DexC ₆ C=C)	198
II.2.3.1. Synthèse de l'ester activé de l'acide hex-5-énoïque.....	198
II.2.3.2. Réaction du dextrane avec l'acide hex-5-énoïque activée.....	199
II.3. PREPARATION DES NANO-OBJETS	199
II.3.1. Nano-objets clickés.....	199
II.3.1.1. Chimie « click » CuAAC.....	199
II.3.1.1.1. Utilisation de CuBr ou CuI comme catalyseur	200
II.3.1.1.2. Utilisation de CuSO ₄ ($\pm$ BPMODA)/AAsc.....	200
II.3.1.1.3. Réalisation de la réaction « click » après évaporation de CH ₂ Cl ₂	200
II.3.1.1.4. Nano-objets avec de l'OG encapsulé à l'intérieur	201
II.3.1.2. Chimie « click » thiol-ène.....	201
II.3.1.2.1. Conditions nucléophiles	201
II.3.1.2.1.1. Expériences préliminaires en milieu homogène	201
II.3.1.2.1.2. Réactions à l'interface	201
II.3.1.2.2. Conditions radicalaires	202
II.3.2. Nano-objets non-clickés	203
II.3.3. Nano-objets nus	203
III. CARACTERISATION DES POLYMERES.....	203
III.1. Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	203
III.2. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	203
III.3. Propriétés tensioactives	204
IV. CARACTERISATION DES NANO-OBJETS.....	205

IV.1. Calculs des erreurs expérimentales	205
IV.2. Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	205
IV.2.1. Détermination de la quantité de M810 dans les NCs	206
IV.2.2. Détermination du ratio molaire Dex/PLA	207
IV.2.3. Détermination du taux de recouvrement en dextrane [mg/m ²]	208
IV.2.4. Détermination de la solubilité maximale du gallate d'octyle dans le M810....	208
IV.3. Distribution de taille (granulométrie laser)	209
IV.4. Mesures de la mobilité électrophorétique (détermination de l'épaisseur du recouvrement en dextrane)	210
IV.5. Stabilité colloïdale en présence de NaCl.....	213
IV.6. Stabilité du recouvrement en dextrane en présence d'un tensioactif compétitif.....	213
IV.7. Calorimétrie Différentielle à Balayage Modulée (MDSC)	213
IV.8. Microscopie Electronique à Transmission	214
IV.9. Détermination de la quantité de cuivre résiduel.....	215
IV.10. Cinétique de libération de la SA	215
IV.11. Détermination du rayon interne de la nanocapsule	216
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	216
LISTE DES FIGURES.....	219
LISTE DES SCHEMAS.....	223
LISTE DES TABLEAUX.....	227

LISTE D'ABREVIATIONS

A

AAsc : acide ascorbique

AcOEt : acétate d'éthyle

ATRP : polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atomes

B

BP : benzophénone

BPO : peroxyde de benzoyle

BPMODA : *N, N*-bis(2-pyridylméthyl)octadécylamine

C

CDCl₃ : chloroforme

CDI : 1,1'-carbonyldiimidazole

CH₂Cl₂ : dichlorométhane

Cryo-MET : Microscopie Électronique à Transmission à basse température

CuAAC : cycloaddition azide-alcyne catalysée par le cuivre (I) (ang. Copper-Catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition)

D

D : Coefficient de diffusion d'une substance active dans une matrice polymère

Đ : dispersité

DexC=C : dextrane porteur de fonctions méthacrylate

DexC₆C=C : dextrane porteur de fonctions alcène

Dex-N₃ : dextrane porteur de fonctions azide

D,L-LA : D,L-lactide

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : N,N-diméthylformamide

DMPA : 2,2-Diméthoxy-2-phénylacétophénone

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMSO- d_6 : diméthylsulfoxyde déutééré

dn/dc : incrément d'indice de réfraction pour un polymère dans un solvant [mL/g]

DTT : dithiothréitol

E

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EE : efficacité d'encapsulation de la substance active

Et₃N : triéthylamine

H

HexAm : *n*-hexylamine

HSQC : corrélation hétéronucléaire entre un carbone et un proton liés par liaison covalente (ang. Heteronuclear Single Quantum Coherence)

M

MCs : microcapsules

MDSC : Calorimétrie Différentielle à Balayage Modulée

$\overline{M}_n$: masse molaire moyenne en nombre

$\overline{M}_w$: masse molaire moyenne en masse

MET : Microscopie Électronique à Transmission

M810 : Miglyol®810

N

NaAsc : ascorbate de sodium

NCs : nanocapsules

NPs : nanoparticules

NSs : nanosphères

O

OG : gallate d'octyle

o/w : émulsion huile-dans-eau

P

PACA: poly(cyanoacrylates d'alkyle)

PBA : poly(acrylate de *n*-butyle)

PBMA : poly(méthacrylate de *n*-butyle)

PCL: poly(ϵ -caprolactone)

PEG : poly(éthylène glycol)

PLA : polylactide ou acide(poly lactique)

PLA_{comm} : polylactide α , ω -dihydroxy (commercial)

PLA α -alcyne : polylactide fonctionnalisé par des fonctions alcyne en bout de chaîne

PLA α -SH : polylactide fonctionnalisé par des fonctions thiol en bout de chaîne

PLA-SS-PLA : polylactide porteur d'une liaison disulfure en milieu de chaîne

PLGA : poly(acide lactique-*co*-glycolique)

PMMA : poly(méthacrylate de méthyle)

PNIPAM : poly(*N*-isopropylacrylamide)

POC : polymérisation par ouverture de cycle

PS : polystyrène

R

RAFT : polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation

RMN ^1H : résonance magnétique nucléaire du proton

S

SA : substance active

SDS : dodécyl sulfate de sodium

SEC-MALLS : chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière multi-angle

SnOct₂ : octoate d'étain ou 2-éthylhexanoate d'étain

T

TCEP : chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl) phosphine

T_f : température de fusion

T_g : température de transition vitreuse

THF : tétrahydrofurane

U

u.g. : unité glucopyranose

W

w/o : émulsion eau-dans-huile

Autres

τ : taux de substitution ; nombre moyen de groupements hydrocarbonés fixés pour 100 motifs glucopyranose

Δ_{PZ} : épaisseur du recouvrement en dextrane en surface de NPs

λ : longueur d'onde

ζ : potentiel Zêta

% click : efficacité de la réaction « click »

% m : pourcentage massique

% vol : pourcentage volumique

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION

GENERALE

Au cours des dernières décennies, l'encapsulation de substances actives (SA) au sein de particules polymères a suscité un fort intérêt dans de nombreux domaines d'applications : biomédical, alimentaire, agrochimique, cosmétique, peintures et recouvrements... Dans le domaine de l'environnement, les pesticides et les engrais sont les SA dont l'encapsulation a été le plus étudiée. Les pesticides (herbicides ou insecticides par exemple) sont utilisés pour protéger les récoltes en luttant contre des organismes considérés comme nuisibles (mauvaises herbes ou insectes, respectivement). Les engrais sont, quant à eux, employés pour améliorer la croissance ainsi que la qualité et le rendement des récoltes. Ces deux SA ayant un mode d'action différent, elles sont généralement conjointement utilisées sur les cultures : par exemple, les pesticides sont généralement employés périodiquement, tandis que les engrais doivent être délivrés progressivement et sur une durée de plusieurs mois. L'encapsulation d'une de ces SA à l'intérieur de capsules polymères peut alors permettre de la libérer à la dose souhaitée, adaptée aux besoins des cultures.

Pour des applications environnementales, l'encapsulation d'une SA possède plusieurs avantages par rapport à son utilisation directe dans le milieu : (i) la possibilité de contrôler la libération de la SA, (ii) protection de la SA contre la dégradation provoquée par le milieu extérieur (meilleure résistance à la pluie ou à d'autres conditions atmosphériques...), (iii) diminution de l'effet écotoxique^a (notamment diminution de l'impact sur des organismes non-ciblés), (iv) protection contre la distribution incontrôlée des xénobiotiques^b, (v) réduction des

^a Toxicité de la substance pour le milieu environnant.

^b Substance chimique étrangère présente dans un organisme vivant, polluante et souvent toxique.

pertes de la SA (par exemple, si elle est volatile), vi) diminution de la pollution environnementale (par exemple dans le cas d'un lessivage des sols), vii) réduction de la quantité totale de SA utilisée, viii) masquage éventuel de l'odeur, ix) stockage plus sûr (par exemple en raison d'une réduction de l'inflammabilité ou de la volatilité de la SA) ...

Ainsi, plusieurs pesticides et engrais ont déjà été encapsulés dans des capsules polymères et sont commercialement disponibles. Le Tableau suivant regroupe quelques exemples. Ces formulations commerciales contiennent des capsules de diamètres variant de quelques micromètres jusqu'à 2-3 millimètres. De plus, ils existent dans la littérature des travaux sur élaboration des capsules de taille submicronique pour agriculture^c ; mais ces formulations n'ont pas encore été commercialisées.

Tableau. Exemples des capsules polymères commerciales encapsulant des pesticides ou des engrais (d'après Knowles, D.A (1998), *Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations*, p. 146; Benita, S. (2006), *Microencapsulation*, chapitre 2, p. 55-77. Trenkel, M.E. (2010), *Slow- and Controlled release and Stabilized Fertilizers*. International Fertilizer Industry Association; Jacobs D.F. (2005), *Variation in Nutrient Release of Polymer-Coated Fertilizers*, United States Department of Agriculture)

Application	Nom commercial	Substance active	Ecorce polymère	Fournisseur
Insecticide	Knox-Out® 2FM	Diazinon	Polyamide, polyurée	Elf Atochem/Pennwalt Corp.
	Penncapthrin® 200	Permethrin	Polyamide, polyurée	Elf Atochem/Pennwalt Corp.
	Penncap-M®	Parathion méthyle	Polyamide, polyurée	Elf Atochem/Pennwalt Corp.
Herbicide	Micro-Tech®	Alachlor	Polyurée	Monsanto
	Bullet®		Polyurée	Monsanto
Engrais	Nutricote®	Majoritairement de nutriments de base contenant les éléments : azote, phosphore et potassium	Polyoléfines, poly(chlorure de vinylidène) et leur copolymères	Chisso-Asahi Fertilizer Co.
	Meister®			
	Osmocote®		Résines alkydes (polyesters modifiés avec des acides gras)	O.M. Scotts Co.
	Polyon®		Polyuréthane	Agrium/Pursell
	Multicote®		Polyuréthane	Haifa Chemicals

^c Voir exemples dans la Partie I, Paragraphe II.1.2.3., p. 15.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet BioCapTech soutenu par la Région Lorraine. Il associe 5 entreprises et 7 laboratoires lorrains et vise à développer des traitements biocides à moindre impact sur l'environnement. L'idée est de concevoir, fabriquer et commercialiser des vecteurs innovants sous forme de particules matricielles (sphères) ou de capsules susceptibles de diffuser des SA d'origine naturelle dans la lutte contre les proliférations d'algues. Il s'agit alors d'un type particulier de pesticide – un algicide^d. Dans ce cadre, deux thèses ont été menées en parallèle au LCPM et font suite aux recherches menées jusqu'alors sur l'élaboration de nanosphères (NSs) recouvertes de polysaccharide. Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit consistent plus précisément à développer un nouveau type d'objets pour le LCPM : des nanocapsules (NCs) à cœur liquide recouvertes de polysaccharide. L'objectif était donc de concevoir des NCs biodégradables et non toxiques pour les milieux aquatiques, permettant l'encapsulation et la libération de ces SA.

L'originalité de ces travaux de thèse est double car il existe peu de travaux sur élaboration de NCs à cœur liquide recouvertes de polysaccharide, et encore moins d'exemples de capsules dont le recouvrement hydrophile soit attaché de façon covalente à l'écorce par couplage à l'interface. A notre connaissance, aucun travail ne regroupe ces deux aspects. Ainsi, le challenge de ce doctorat était dans un premier temps de réaliser un couplage efficace et peu écotoxique entre le polymère constituant l'écorce et le recouvrement polysaccharide, et ce au cours d'un procédé classique d'élaboration de NCs. Nous avons choisi de mener un couplage par chimie « click » à l'interface liquide/liquide. Les effets d'un tel couplage sur les caractéristiques des NCs ont ensuite été étudiés ainsi que l'aptitude de ces nano-objets à l'encapsulation et la libération d'une SA modèle.

Ce manuscrit est donc divisé en trois grandes parties : (I) étude bibliographique, (II) résultats et discussion et (III) matériels et méthodes.

La première partie est entièrement consacrée à une étude bibliographique focalisée sur deux grands thèmes : nanoparticules polymères et réactions de chimie « click ». Dans un premier temps, nous nous intéressons plus particulièrement aux NCs à cœur liquide, leurs applications potentielles et leurs différents procédés d'élaboration. Concernant ces derniers, nous avons entre autres examiné les réactions de chimie « click » réalisées *in situ* à l'interface liquide/liquide. Dans un deuxième temps, nous présentons des généralités sur les réactions de

^d Une SA algicide peut avoir un double effet: algicide – consistant à détruire la totalité des algues présentes dans le milieu d'analyse, ou algistatique – consistant à arrêter la croissance et/ou le développement des algues.

chimie « click » en nous focalisant principalement sur les deux types de réactions les plus souvent utilisées pour le couplage des polymères : la cycloaddition azide-alcyne catalysée par le cuivre (I) (CuAAC) et les réactions de type thiol-ène. Cette partie bibliographique se termine sur les applications potentielles des réactions de chimie « click » pour la préparation et/ou la fonctionnalisation des particules polymères.

La deuxième partie présente les résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse. Ainsi, le 1^{er} chapitre décrit la synthèse et la caractérisation des polymères précurseurs (dérivés du polylactide et du dextrane) utilisés pour des réactions « click ». Le 2^{ème} chapitre est consacré quant à lui à l'optimisation de la réaction « click » *in situ* à l'interface liquide/liquide lors de l'élaboration des nano-objets polymères. Dans le 3^{ème} chapitre, ces nano-objets sont caractérisés en termes de tailles, de taux de recouvrement en dextrane, d'épaisseur et de stabilité de ce recouvrement, de morphologie ainsi que de stabilité colloïdale. Finalement, le 4^{ème} chapitre aborde les études sur l'encapsulation et la libération d'une SA modèle à partir de ces nano-objets.

Enfin, ce manuscrit se clôture par une conclusion générale et par l'énumération de quelques perspectives. Les protocoles expérimentaux et les techniques de caractérisation utilisées lors de cette thèse seront présentés à la fin de ce manuscrit.

PARTIE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. INTRODUCTION

Depuis quelques dernières décennies les particules polymères de taille submicronique suscitent un fort intérêt de la part des chercheurs. Ces objets sont destinés à de nombreuses applications potentielles, comme plus particulièrement des systèmes de délivrance de substances actives dans des domaines aussi variés que le domaine biomédical, environnemental, agroalimentaire, ... etc. Cette partie bibliographique présente dans un premier temps les différents types de nanoparticules polymères qui, selon leur morphologie, sont divisées en deux groupes principaux : nanosphères et nanocapsules. Dans un deuxième temps, notre intérêt se portera sur les nanocapsules à cœur liquide. Après avoir mentionné quelques-unes des applications potentielles de ce type de nano-objets, nous discuterons de leurs différents procédés d'élaboration. Parmi ces procédés, nous nous sommes particulièrement intéressés aux réactions de chimie « click » réalisées *in situ* à l'interface liquide/liquide. Après des généralités sur cette chimie, les deux types de réactions les plus utilisées seront détaillées: la cycloaddition azide-alcyne catalysée par le cuivre (I) et des réactions de type thiol-ène. Nous insisterons tout particulièrement sur l'utilisation de ces réactions pour la synthèse et la fonctionnalisation de particules polymères.

II. NANOPARTICULES POLYMERES

II.1. LES DIFFERENTES MORPHOLOGIES

Les premières nanoparticules (NPs) ont été développées dans les années 1970 dans le but d'encapsuler des médicaments anticancéreux et/ou des vaccins afin de faciliter leur administration¹. Elles sont définies comme des objets colloïdaux globalement sphériques et de taille submicronique, c'est-à-dire de dimension inférieure à 1 μm . Selon leur morphologie, les NPs peuvent être divisées en deux groupes principaux: les particules polymères matricielles (nanosphères, NSs) et les particules de type cœur liquide/écorce (nanocapsules, NCs) (Figure I.1).

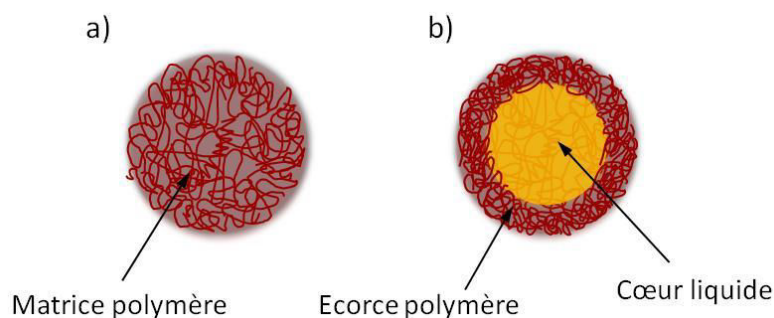
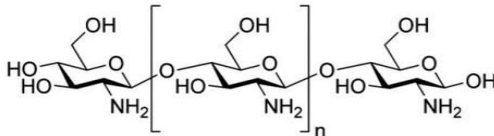
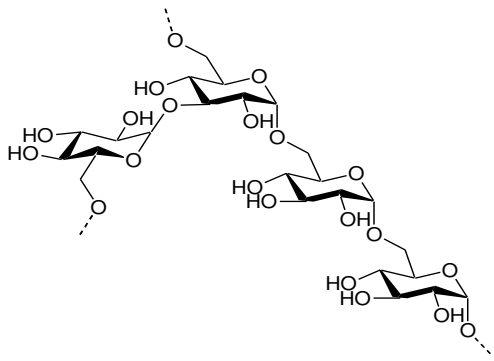
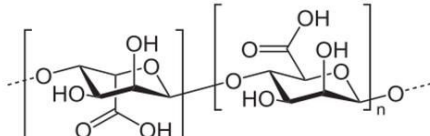
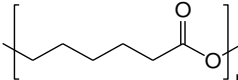
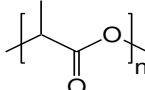
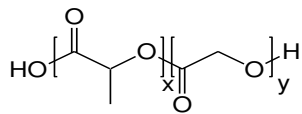
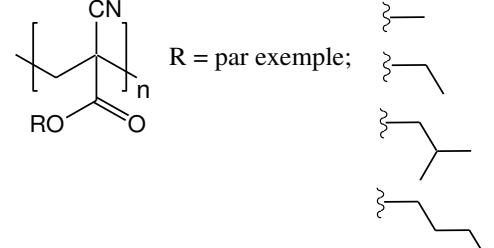


Figure I.1. Nanoparticules polymères: a) nanosphère, b) nanocapsule

Afin d'éviter l'accumulation des NPs dans un système (qu'il s'agisse d'applications biomédicales, alimentaires ou environnementales), elles sont le plus souvent constituées de polymères biodégradables². Ces derniers sont soit d'origine naturelle, soit synthétiques (Tableau I.1). Parmi les polymères naturels³, on peut citer les polysaccharides^{4, 5} (par exemple le chitosane, le dextrane ou l'alginate) et les protéines^{6, 7} (telles que la gélatine ou l'albumine) qui sont utilisés pour former des NPs. Concernant les polymères synthétiques biodégradables, les plus couramment utilisés sont les polyesters aliphatiques tels que la poly(ϵ -caprolactone) (PCL)⁸, le polylactide aussi appelé poly(acide lactique) (PLA)⁹ ou le poly(acide lactique-*co*-glycolique) (PLGA)¹⁰, ainsi que les poly(cyanoacrylates d'alkyle) (PACA)¹¹.

Tableau I.1. Structures de certains polymères biodégradables d'origine naturelle ou synthétiques utilisés pour former des NPs

Origine du polymère	Nom	Formule
Naturelle	Chitosane	
	Dextrane	
	Alginate	
Synthétique	Poly(ε-caprolactone) (PCL)	
	Poly lactide ou poly(acide lactique) (PLA)	
	Poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA)	
	Poly(cyanoacrylates d'alkyle) (PACA)	

II.1.1. Nanosphères polymères

Les nanosphères (NSs) sont des systèmes sphériques matriciels possédant une structure pleine et homogène dans l'ensemble de la particule. Une substance active (SA), qu'elle soit de nature hydrophile ou lipophile, peut y être incorporée sous forme dissoute, dispersée et/ou encore être attachée physiquement (par adsorption) ou chimiquement à leur surface (Figure I.2). Cependant, l'encapsulation de la SA au sein de la particule est préférable à son attachement en surface. Ceci peut en effet permettre une meilleure protection de la SA mais également une libération plus progressive¹.

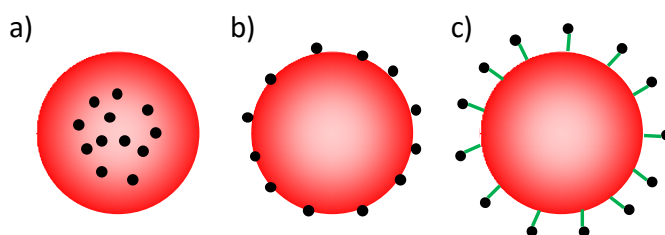


Figure I.2. Nanosphères polymères contenant une substance active: a) encapsulée à l'intérieur, b) adsorbée en surface, c) accrochée chimiquement à la surface

Dans la littérature, il existe de nombreuses méthodes pour préparer ce type de vecteurs particuliers^{12, 13}. Elles peuvent être regroupées en deux grands procédés : (i) l'utilisation de méthodes physico-chimiques en employant des polymères préformés et (ii) des techniques de polymérisation de monomères. Dans le premier type de procédé, la formation de la matrice polymère peut être provoquée par l'évaporation de solvant organique (émulsion-évaporation¹⁴), la diffusion de solvant organique vers la phase aqueuse (nanoprécipitation¹⁵, émulsion-diffusion¹⁶) ou encore l'ajout d'un agent coacervant (émulsion-coacervation¹⁷). Dans le deuxième cas, le polymère est formé directement *in situ* au cours de processus de polymérisation qui se déroule en milieu dispersé. Afin d'obtenir des objets de taille suffisamment petite et peu dispersée, la polymérisation en miniémulsion est la technique de polymérisation la plus utilisée¹⁸. Le procédé choisi dépend de plusieurs paramètres telles que les propriétés physico-chimiques du polymère utilisé, celles de la SA à encapsuler ainsi que de la gamme de tailles d'objets envisagées¹⁹.

II.1.2. Nanocapsules polymères

II.1.2.1. Définition et avantages

Les nanocapsules sont des systèmes particuliers de morphologie cœur/écorce composés d'un cœur entouré d'une couche fine de polymère. Le cœur est le plus souvent liquide (aqueux ou huileux) (Figure I.3b-c) mais peut aussi être vide (NCs creuses) (Figure I.3d) ou solide (cas d'huiles qui se solidifient à température ambiante). Dans la présente étude, notre intérêt s'est majoritairement porté sur des NCs à cœur liquide.

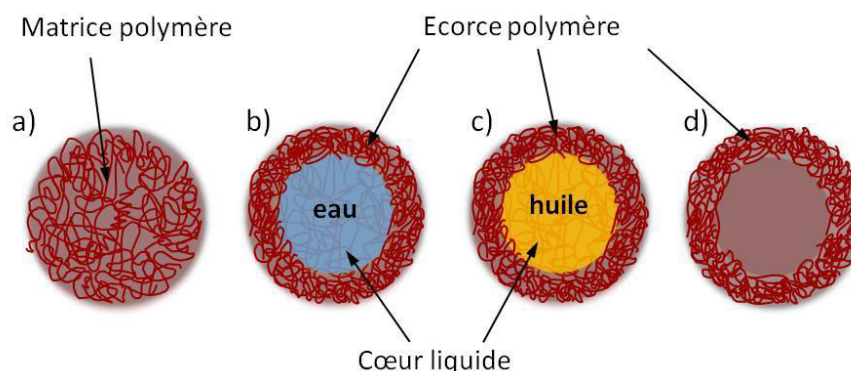


Figure I.3. Nanoparticules polymères: a) nanosphère, b-c) nanocapsules à cœur liquide, d) nanocapsule creuse (à cœur vide)

Le cœur de NCs peut servir de réservoir pour y encapsuler une SA^{20, 21} ou peut être la SA elle-même comme par exemple dans le cas des huiles essentielles^{22, 23} ou des huiles alimentaires^{24, 25}. L'écorce polymère située autour de ce cœur joue le rôle d'une membrane de protection vis-à-vis de la SA²⁶. Idéalement, elle permet de contrôler les échanges de matière entre le cœur et le milieu environnant la NC. En réalité, selon les NCs, la SA peut être aussi bien adsorbée en surface des NCs, qu'être encapsulée, sous forme dissoute, liquide ou dispersée à l'état solide, dans le cœur ou encore dans l'écorce polymère²⁷. Selon la nature du cœur liquide de la NC (aqueux ou huileux), des substances hydrophiles ou lipophiles peuvent y être incorporées. Même si l'efficacité d'encapsulation d'une SA dépend du procédé utilisé pour l'élaboration des NCs, la solubilité de la SA dans le cœur doit être optimale afin de permettre son encapsulation au sein du cœur^{28, 29}. Un de principaux avantages des capsules par rapport aux particules pleines (sphères) est la possibilité de moduler la cinétique de libération de la SA en variant la polarité du cœur, mais aussi la nature chimique et l'épaisseur de l'écorce polymère (c'est-à-dire la morphologie des objets)^{30, 31}.

II.1.2.2. Différents types de cœurs liquides

Comme représenté sur la Figure I.3, le cœur des NCs peut être constitué d'un liquide de nature hydrophile (aqueux) ou lipophile (huileux). Lorsque le cœur des NCs est aqueux, celles-ci peuvent encapsuler des SA hydrophiles³² par exemple des hormones telles que l'insuline³³ ou des médicaments comme la pénicilline³⁴. Dans le cas de NCs à cœur huileux, la polarité de l'huile peut être modulée ce qui permet l'encapsulation d'une large gamme des composés de polarité variable dissous dans ce liquide. Dans la suite de ce paragraphe nous allons présenter particulièrement des NCs à cœur huileux qui font l'objet de ces travaux de thèse.

II.1.2.2.1. Nanocapsules à cœur huileux

Afin d'obtenir des NCs à cœur huileux, une huile non-miscible ou peu-miscible au polymère qui constitue l'écorce de la NC doit être employée afin d'assurer une séparation de phases efficace qui permet de générer au final une structure cœur/écorce. L'huile choisie, en plus d'être un bon solvant pour la SA à encapsuler, doit être non-toxique, de préférence peu volatile (afin notamment d'éviter son évaporation tout au long de processus d'élaboration des NCs) et non réactive vis-à-vis du polymère et de la SA²⁸. Néanmoins, il existe dans la littérature des exemples de NCs contenant des huiles volatiles dans leur cœur, notamment dans le cas des huiles essentielles pour lesquelles la SA constitue l'huile elle-même^{22, 23, 35}. Dans ce cas-là, la volatilité de l'huile complique parfois son encapsulation³⁶. Si on considère les huiles non-volatiles les plus couramment utilisées dans des formulations pharmaceutiques³⁷, on peut citer les triglycérides d'acides caprique (C10) et caprylique (C8), par exemple le Miglyol®810, le Miglyol®812, le Neobee®M-5, le Myritol®318. Ces triglycérides varient en composition en acides C8 et C10 (voir Tableau I.2)³⁸⁻⁴². D'autres huiles, moins fréquentes comme le benzoate de benzyle^{43, 44} ou d'autres huiles triglycérides, insaturées, telles que l'huile d'olive^{45, 46} ou l'huile de ricin^{39, 47} ont aussi été testées (Tableau I.2). Des huiles qui cristallisent à température ambiante (encore appelées lipides solides) peuvent être employées afin de former des capsules à cœur solide, lequel peut devenir liquide par simple augmentation de température du milieu. Parmi les lipides solides on trouve par exemple le palmitate de cétyle, l'acide stéarique, l'acide éicosanoïque (encore appelée acide arachidique), les paraffines ou le dibéhénate de glycéryle (Tableau I.3). Ce type d'huiles a principalement été utilisé pour obtenir des particules solides lipidiques (SLN) ne contenant pas de polymère⁴⁸. Néanmoins, des NCs polymères ont aussi été obtenues^{49, 50}.

Les propriétés de l'huile employée, comme sa viscosité, son hydrophobie, sa tension interfaciale avec l'eau ainsi que la formulation employée lors du procédé d'élaboration (ratio entre tous les composants, nature du tensioactif et du polymère utilisés) peuvent influencer la distribution de taille et la morphologie des NCs obtenues⁵¹⁻⁵³.

II.1.2.3. Applications des nanocapsules à cœur liquide

Les NCs polymères, notamment celles à cœur liquide, ont suscitées un fort intérêt au cours des dernières décennies grâce à leur grande capacité d'encapsulation. L'incorporation des SA dans le cœur liquide permet de les protéger au mieux contre la dégradation du milieu environnant. Ceci permet également de diminuer les effets toxiques potentiels d'une SA s'il s'agit par exemple d'un médicament, ou écotoxiques par exemple dans le cas d'un pesticide. De plus, de nombreuses SA sont insolubles dans l'eau ou encore volatiles, et il est donc intéressant de les encapsuler pour pouvoir les véhiculer dans un système aqueux.

Les NCs polymères ont trouvé de nombreuses applications en tant que vecteurs de SA, destinées à différents domaines tels que la santé^{28, 54}, les industries cosmétiques^{55, 56}, agrochimiques^{57, 58} ou alimentaires⁵⁶. De nombreuses SA ont été encapsulées : médicaments^{20, 33, 34, 38, 59-62}, parfums^{63, 64}, filtres UV^{65, 66}, agents de contraste⁶⁷⁻⁷⁰, pesticides^{41, 42}, colorants⁷¹⁻⁷³, huiles essentielles^{22, 23, 35, 74, 75}, alimentaires^{24, 25} ou autres^{36, 76-78}. Les différents domaines d'applications ainsi que les méthodes et les réactifs utilisés pour préparer ces NCs sont récapitulés dans le Tableau I.4.

Tableau I.2. Exemples d'huiles non-volatiles utilisées dans la formulation de NCs

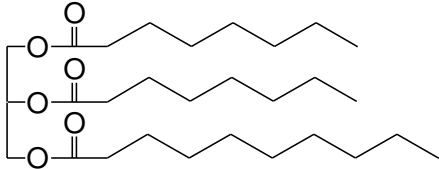
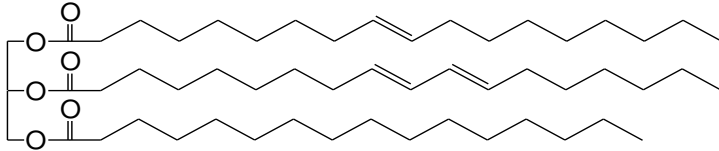
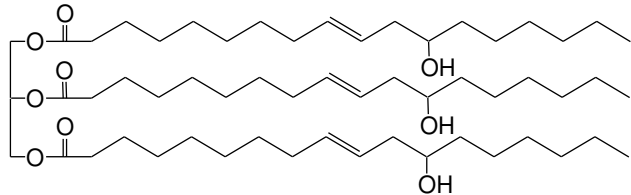
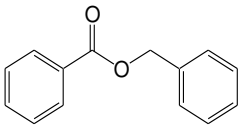
Huile	Structure	Composition massique moyenne		
		Nom commercial	Acide caprylique (C _{8:0})	Acide caprique (C _{10:0})
Triglycéride d'acides caprique et caprylique		Miglyol®810	65-80%	20-35%
		Miglyol®812	50-65%	30-45%
		Neobee®M-5	65-75%	23-33%
		Myritol®318	65-77%	23-35%
Huile d'olive		Acide oléique (C _{18:1}) : 74% Acide linoléique (C _{18:2}) : 9,5% Acide palmitique (C _{16:0}) : 11,5%		
Huile de ricin		Acide ricinoléique (C _{18:1})		
Benzoate de benzyle		Benzoate de benzyle		

Tableau I.3. Exemples d'huiles qui se solidifient à température ambiante

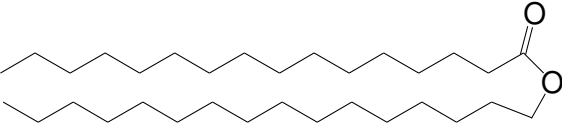
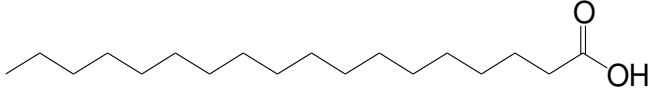
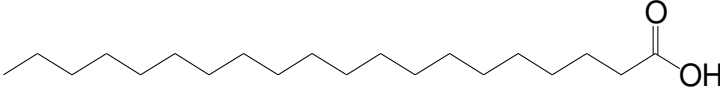
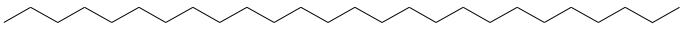
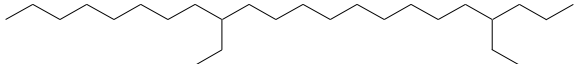
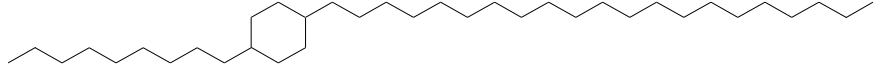
Huile	Structure	Température de fusion [°C]
Palmitate de cétyle		54
Acide stéarique		69
Acide éicosanoïque (arachidique)		75
Paraffine solide (mélange d'hydrocarbures linéaires (n-paraffine), ramifiés (iso- paraffine) ou cycliques (cycloparaffine))	 n-paraffine  iso-paraffine  cycloparaffine 80-90% en masse 10-20% en masse	46-68 (selon la composition)
Dibéhénate de glycérile (Compritol®888 ATO)	 R = C ₂₂ H ₄₃ O ₂	65-77

Tableau I.4. Applications des NCs polymères à cœur liquide préparées par différents procédés. (*Composition de l'huile non précisée)

Applications	Ecorce polymère	Cœur liquide	Substances encapsulées et leurs actions	Méthode	Réf.
Agriculture	PCL	Miglyol®810 Myritol®318	Amétryne ou atrazine ou simazine (<i>herbicides</i>)	Nanoprécipitation	41, 42
Cosmétiques	PLA	Miglyol®810 Palmitate de rétinyle	Palmitate de rétinyle (<i>agent anti-vieillessement</i>)	Nanoprécipitation	65, 79
	Phtalate acétate de cellulose	Méthoxycinnamate d'octyle	Méthoxycinnamate d'octyle (<i>filtre UV</i>)	Emulsion-diffusion	66
	Copolymères (méth)acryliques : P(MMA)-co-BA), P(MMA-co-BMA-co-MAA-co-BDDMA)	Lilial α -pinène (<i>parfums</i>)	Lilial ou α -pinène (<i>parfums</i>)	Polymérisation à l'interface	63 64
Santé	PLGA	Triglycéride d'acides caprique et caprylique*	Benzocaine (<i>anesthésique locale</i>)	Nanoprécipitation	20
	Eudragit® RS100	Huile de noix de coco	Clotrimazole (<i>antimycosique</i>)	Nanoprécipitation	60
	PEG- <i>b</i> -PBA- <i>b</i> -PEG	Huile d'olive	Extraits de plantes médicinales : <i>Elaeagnus angustifolia</i> , <i>Onopordon leptolepis</i> (<i>anti-inflammatoires, analgésiques, antifongiques</i>)	Emulsion-diffusion	45, 80

Applications	Ecorce polymère	Cœur liquide	Substances encapsulées et leurs actions	Méthode	Réf.
Santé	PLGA PLGA- <i>b</i> -PEG	Bromure de perfluorooctyle	Bromure de perfluorooctyle (<i>agent de contraste</i>)	Emulsion-évaporation	67-70
	Gomme de xanthane	Huile d'amande Myristate d'isopropyle	Porphyrique (<i>agent photototerapeutique</i>)	Emulsion-coacervation	61
	PBA _d	Eau	Pénicilline (<i>antibiotique</i>)	Emulsion double	34
	PLA	Eau	Chlorhydrate de gemcitabine (<i>anticancéreux</i>) ou insuline (<i>hormone</i>)	Emulsion double	59 33
	PDADMAC ⁺ , PSS ⁻	Palmitate d'isopropyle, Acide oléique N-dodécane	Cyanine ou Oil red (<i>colorants hydrophobes</i>)	Emulsion template couche-par-couche	73,71
	PMMA, PCL, PMA	Eau	Digluconate de chlorhexidine (<i>antiseptique</i>)	Déposition d'une couche polymère	62
	PU	Miglyol®812	Ibuprofène (<i>anti-inflammatoire et analgésique</i>)	Polymérisation à l'interface	38

Applications	Ecorce polymère	Cœur liquide	Substances encapsulées et leurs actions	Méthode	Réf.
Santé/ Industrie alimentaire	Alginate de sodium	Huile de curcuma	Huile de curcuma (<i>additif alimentaire, agent antibactérien, antifongique, antioxydant, anticarcinogène</i>)	Emulsion-coacervation	36
	Alginate de sodium/chitosane				76
	Gélatine	Capsaïcine	Capsaïcine (<i>additif alimentaire, agent antimicrobien, analgésique</i>)	Emulsion-coacervation	77
	Chitosane	Huile d'origan Carvacol	Huile d'origan ou carvacol (<i>huiles essentielles</i>)	Emulsion-coacervation	23 35
Industrie alimentaire	PCL	Triglycérides d'acides caprique et caprylique*	Bixine (<i>colorant naturel</i>)	Nanoprécipitation	72
	PCL	Huile de tournesol, Acétate d' α -tocophéryle Huile de soja	Huile de tournesol ou acétate d' α -tocophéryle ou huile de soja (<i>additifs alimentaires, antioxydants</i>)	Emulsion-diffusion	24
	PLA	Acide α -linoléique	Acide α -linoléique (<i>additif alimentaire, antioxydant</i>)	Emulsion-diffusion	78
	PCL	Huile de poisson Eugénol	Huile de poisson (<i>agent nutritif</i>) ou eugénol (<i>arôme</i>)	Emulsion-diffusion	25 81

Applications	Ecorce polymère	Cœur liquide	Substances encapsulées et leurs actions	Méthode	Réf.
Industrie alimentaire/ Emballages	Chitosane	Eugénol	Eugénol (<i>agent antimicrobien, antioxydant</i>)	Emulsion-coacervation	22, 75

PLA : polylactide, PCL : poly(ε-caprolactone), PLGA : poly(acide lactique-co-glycolique), PEG : polyéthylène glycol, Eudragit®RS100 : copolymère d'acrylate d'éthyle et de méthacrylate de méthyle contenant une petite fraction d'un ester méthacrylique, PBA_d : adipate de polybutyle, PDADMA⁺ : poly(chlorure de diallyldiméthyle ammonium), PSS⁻ : poly(4-styrène sulfonate de sodium), PMMA : poly(méthacrylate de méthyle), PMA : poly(acrylate de méthyle), PBMA : poly(méthacrylate de butyle), PMAA : poly(acide méthacrylique), PBDDMA : poly(diméthacrylate de 1,4-butanediol), PBA : poly(acrylate de n-butyle), PU : polyuréthane.

II.1.3. Recouvrement des nanoparticules par un polymère hydrophile

Les NPs peuvent être recouvertes d'une couronne de polymère hydrophile et neutre (Figure I.4) pour différentes raisons. Il s'agit parfois de leur assurer une meilleure stabilité colloïdale et/ou d'empêcher l'adsorption de molécules indésirables à leur surface. Par exemple, dans le cas d'applications biomédicales, il s'agit d'empêcher l'adsorption de certaines de protéines (opsonines) à la surface, ce qui permet de diminuer la reconnaissance et l'élimination prématurée des NPs par le système immunitaire^{82, 83}. Le plus souvent, ce recouvrement est constitué de poly(oxyde d'éthylène) aussi appelé poly(éthylène glycol) (PEG)^{67, 68, 84} ou de polysaccharides^{85, 86} tel que le dextrane^{15, 87}. En général, l'hydrophilisation de la surface des NPs se fait par trois méthodes : (i) l'adsorption physique des polymères amphiphiles après ou lors de la préparation des NPs, (ii) l'utilisation de copolymères amphiphiles pour préparer directement des NPs ou encore (iii) l'ancrage chimique d'un polymère hydrophile sur des NPs préformées.

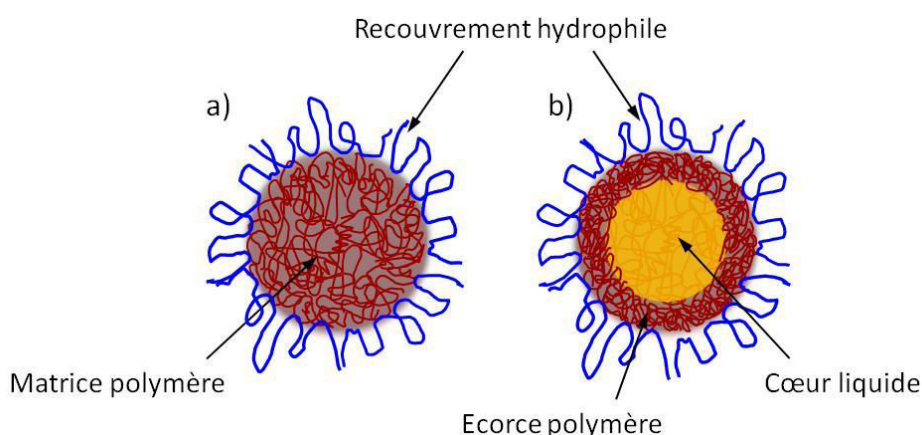


Figure I.4. Nanoparticules polymères recouvertes d'une couronne de polymère hydrophile: a) nanosphère, b) nanocapsule

II.1.3.1. Adsorption physique de polymères amphiphiles

Certains polymères peuvent s'adsorber à la surface de NPs hydrophobes par interactions électrostatiques (s'il s'agit des particules chargées) ou par interactions hydrophobes (s'il s'agit de particules hydrophobes et neutres). Par exemple, du chitosane (polysaccharide chargé positivement) a été adsorbé en surface des NCs de poly(ϵ -caprolactone) de charge surfacique opposée⁸⁸. Dans le cas d'interactions hydrophobes, un polymère amphiphile (par exemple un dextrane modifié par des groupements hydrophobes) peut être utilisé comme stabilisant de l'interface huile-dans-eau et restera adsorbé en surface

des NSs de PLA grâce à des interactions hydrophobes avec la matrice⁸⁹. Cette adsorption peut aussi être réalisée après la préparation des objets eux-mêmes⁹⁰.

II.1.3.2. Utilisation de copolymères amphiphiles

L'utilisation de copolymères amphiphiles (à blocs ou greffés) au cours d'un procédé d'élaboration de NPs permet leur ancrage physique en surface si la partie hydrophobe du copolymère est compatible avec le polymère qui constitue le cœur de NPs (matrice ou écorce polymère). Si cette partie hydrophobe est suffisamment importante, elle peut elle-même constituer le cœur de ces NPs. Par exemple, des copolymères à bloc PLA-*b*-PEG, PLGA-*b*-PEG⁶⁸ ou tribloc PEG-*b*-PBA-*b*-PEG⁴⁵ ont servi pour obtenir des NCs à cœur huileux, tandis qu'un copolymère greffé dextrane-*g*-PLA^{15, 87} a été utilisé pour élaborer des NSs.

II.1.3.3. Ancrage chimique d'un polymère hydrophile à la surface

L'ancrage chimique d'un polymère hydrophile à la surface de NPs consiste à former des liaisons covalentes entre ce polymère et des fonctions introduites (ou existantes) en surface des NPs. Ceci peut se faire par différentes réactions chimiques : soit par couplage direct du polymère avec les fonctions en surface (par exemple par chimie « click »⁹¹, voir Paragraphe IV pour plus de détails sur la chimie « click »), soit par polymérisation d'un monomère hydrophile à partir de ces fonctions (par exemple par polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP) amorcée en surface de la particule⁹²).

III. METHODES D'ELABORATION DE CAPSULES A CŒUR LIQUIDE

Dans la littérature de nombreuses revues sont dédiées aux méthodes de préparation des NPs polymères^{1, 13, 18, 19, 26-28} mais peu de revues sont focalisées uniquement sur les NCs^{27, 28}. Dans le cas des NCs à cœur liquide, ces procédés d'élaboration peuvent être classés en trois groupes principaux : (i) ségrégation de phases entre le polymère (généralement préformé ou formé *in situ* par polymérisation) qui constituera au final l'écorce de la NC et le cœur liquide. Ceci aboutit à la précipitation du polymère autour du cœur liquide ; (ii) déposition (ou précipitation) d'un polymère préformé en surface d'un nano-template dur ou mou et (iii) réactions interfaciales à la surface des nano-gouttelettes d'une émulsion. Ces trois grands types de procédés sont décrits plus en détails dans la suite de ce chapitre.

III.1. SEGREGATION DE PHASES

La première technique pour élaborer des NCs consiste à induire une ségrégation de phases entre le polymère de l'écorce (préformé ou formé *in situ* par polymérisation) et le cœur liquide. Dans le cas de polymères préformés, leur précipitation est généralement induite soit par élimination du bon solvant du polymère de la phase dispersée suite à sa diffusion dans la phase continue (nanoprécipitation⁹³, émulsion-diffusion⁹⁴) ou à son évaporation (émulsion-évaporation⁶⁷), soit par ajout d'un agent coacervant (émulsion-coacervation³⁶). Dans le cas où le polymère est formé *in situ* par polymérisation, il s'agit généralement de polymérisation en chaîne. Ces différents procédés d'élaboration sont successivement discutés ci-dessous.

III.1.1. Nanoprécipitation

La nanoprécipitation, appelée aussi déplacement de solvant (« solvent displacement ») ou déposition interfaciale (« interfacial deposition ») est une méthode développée en 1988 par Fessi *et al.*^{93, 95}. Depuis, elle est parmi les techniques les plus couramment utilisées pour obtenir des NCs à partir de polymères préformés.

Cette technique nécessite l'emploi de deux solvants miscibles. Le polymère synthétisé au préalable est solubilisé dans un premier solvant, solvant 1 (bon solvant du polymère, c'est souvent l'acétone). Ce solvant 1 contient également l'huile (qui constituera au final le cœur liquide de la NC) et le plus souvent la SA à encapsuler. Cette solution de polymère (phase dispersée) est ensuite ajoutée goutte-à-goutte et sous agitation modérée dans la phase continue contenant un deuxième solvant (solvant 2) miscible au premier et non-solvant du polymère (le plus souvent l'eau). La phase continue contient souvent des tensioactifs permettant la stabilisation des particules formées. Une diffusion rapide du solvant 1 vers le solvant 2 conduit à la précipitation du polymère. Le polymère, étant immiscible à l'huile, s'en sépare, ce qui conduit à la formation de NCs (Schéma I.1). Le solvant 1 est finalement éliminé par évaporation, dialyse ou filtration⁹⁶. Les paramètres physico-chimiques²⁸ tels que le débit d'injection de la phase dispersée dans la phase continue, la vitesse d'agitation, le ratio volumique phase dispersée/phase continue⁹⁷ ainsi que la nature et la concentration du polymère dans la phase dispersée ou celles du tensioactif dans la phase continue influencent les propriétés des NCs obtenues^{53, 98} : taille, taux de recouvrement, efficacité d'encapsulation de la SA, etc.

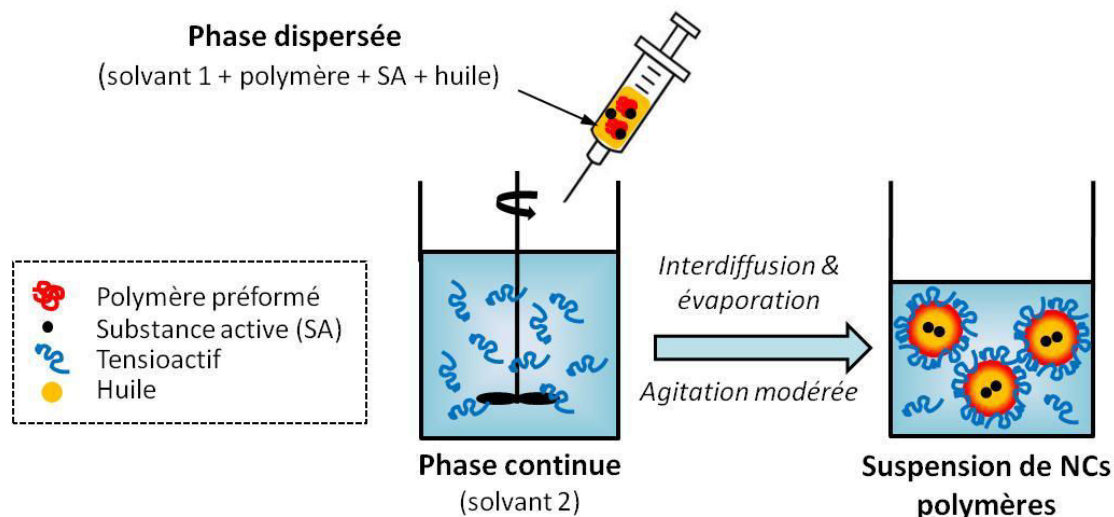


Schéma I.1. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé de nanopréciipitation

Le procédé de nanopréciipitation est simple et ne requiert pas d'apport d'énergie important car l'agitation est assurée par un agitateur magnétique ou mécanique, ce qui rend ce procédé facilement transposable à l'échelle industrielle¹. Cependant, cette méthode n'est pas adaptée à l'encapsulation de SA hydrophiles à cause de leur tendance à migrer vers la phase aqueuse externe pendant la formation de la dispersion colloïdale⁹⁹. En revanche, les SA lipophiles peuvent être encapsulées avec de grandes efficacités si elles présentent une très bonne solubilité dans le cœur huileux^{21, 41, 72}.

III.1.2. Emulsion-diffusion de solvant

Le procédé d'émulsion-diffusion de solvant pour l'élaboration de NCs a été proposé en 1998 par Quintanar-Guerrero *et al.*¹⁰⁰. Cette méthode consiste à préparer une émulsion d'une phase dispersée dans une phase continue. Par exemple, la phase continue est de l'eau (solvant 2) saturée avec le solvant de la phase organique dispersée (solvant 1). Cette phase continue contient un tensioactif stabilisant l'émulsion (par exemple du poly(alcool vinylique)). Le solvant 1 de la phase dispersée est aussi saturé avec le solvant 2 et contient le polymère préformé, une huile non-volatile et non-miscible au solvant 2 et, éventuellement, une SA à encapsuler. Le solvant 1 choisi doit être partiellement miscible au solvant 2 (par exemple l'acétate d'éthyle). Après dispersion de la phase dispersée dans la phase continue, l'addition d'une grande quantité de solvant 2 (par exemple l'eau) provoque la diffusion du solvant 1 dans la phase continue. Ceci entraîne la précipitation du polymère et s'il est immiscible à l'huile, aboutit à la formation de NCs (Schéma I.2). Le solvant 1 et une partie de solvant 2 sont ensuite éliminés par évaporation afin d'obtenir une suspension concentrée de NCs

polymères^{1, 24, 45}. Plusieurs paramètres influencent les propriétés des objets formés (notamment leur taille). Celles-ci sont par exemple les conditions d'émulsification (vitesse et durée d'agitation) mais aussi la viscosité et la concentration de l'huile utilisée pour former le cœur des NCs ou la concentration du tensioactif présent dans la phase continue^{94, 101, 102}. Cependant, le paramètre crucial qui influence le plus la taille des objets formés est le volume de solvant 2 ajouté après émulsification. Ce volume doit être suffisamment important afin d'assurer une diffusion totale et rapide du solvant 1 des gouttelettes d'émulsion vers la phase continue⁹⁴. En variant tous ces paramètres, des capsules peuvent être préparées dans une large gamme de tailles. Au final, les solutions obtenues sont très diluées. Ceci est un inconvénient majeur de la méthode d'émulsion-diffusion puisqu'il est nécessaire d'éliminer de grandes quantités de solvant 2 (le plus souvent l'eau).

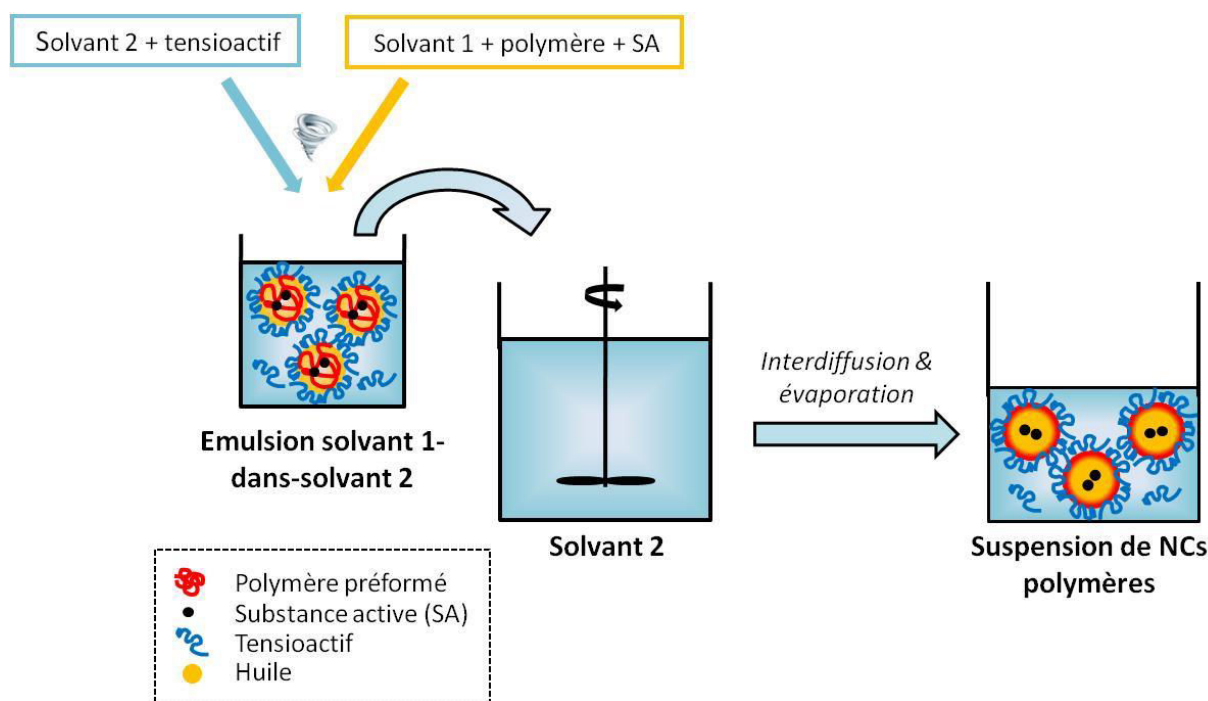


Schéma I.2. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé d'émulsion-diffusion

III.1.3. Emulsion-évaporation de solvant

III.1.3.1. Emulsion simple

Le procédé d'émulsion-évaporation de solvant est la première méthode à avoir été utilisée pour préparer des NPs à partir de polymères préformés¹³. Elle consiste à former une émulsion en dispersant deux phases non-miscibles (généralement huile-dans-eau). La phase continue (solvant 2, le plus souvent de l'eau) contient généralement un stabilisant de

l'émulsion. La phase dispersée est composée d'un polymère et de la SA à encapsuler, tous deux dissous dans un solvant volatil (solvant 1). Ce dernier doit être un bon solvant pour le polymère, par exemple le dichlorométhane (CH_2Cl_2), le chloroforme (CHCl_3) ou l'acétate d'éthyle si le solvant 2 est de l'eau. Dans le but d'obtenir des NCs, une huile non-volatile miscible au solvant 1 et mauvais solvant du polymère est ajoutée dans la phase dispersée.

L'émulsification de la phase dispersée dans la phase continue nécessite un apport conséquent d'énergie qui peut être fourni par exemple à l'aide des ultrasons. L'évaporation du solvant 1 (bon solvant du polymère) entraîne la précipitation du polymère dans la phase continue et une ségrégation de phases entre le polymère et l'huile correctement choisie ce qui provoque la formation de l'écorce polymère et du cœur liquide (Schéma I.3)^{67, 69}. La taille des NCs peut être contrôlée en jouant sur la méthode d'émulsification (ultrasons, homogénéisateur, agitation magnétique, etc.), la viscosité de la phase dispersée et celle de la phase continue, ainsi que sur le type et la concentration du tensioactif dans la phase continue¹².

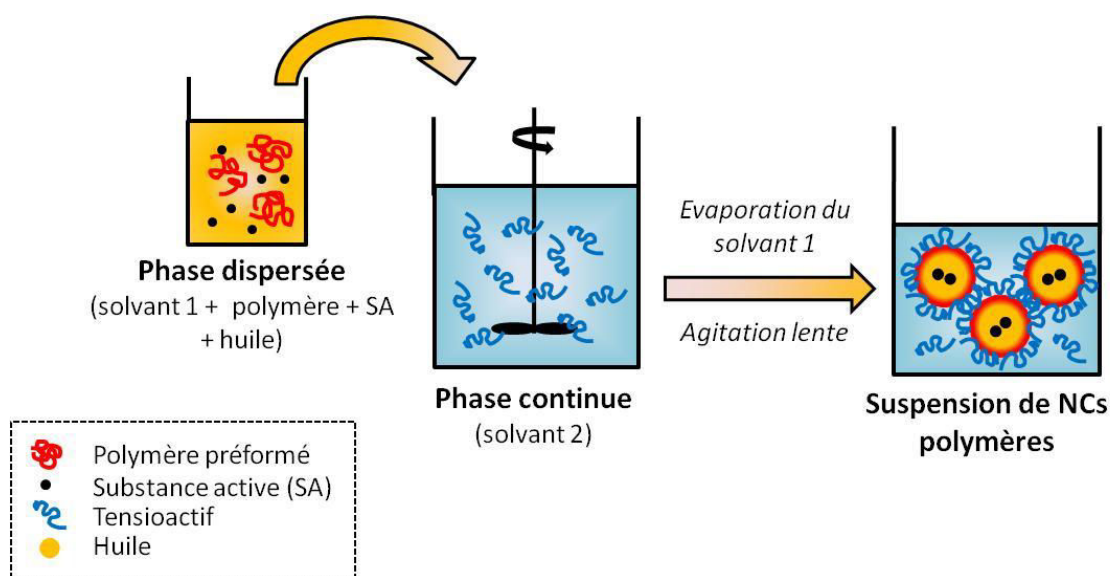


Schéma I.3. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant

III.1.3.2. Emulsion double

Les émulsions doubles sont des systèmes complexes souvent appelées « émulsions des émulsions ». Généralement, on peut distinguer deux types des émulsions doubles : émulsion eau-dans-huile-dans-eau (w/o/w) et huile-dans-eau-dans-huile (o/w/o)¹⁰³. Les émulsions w/o/w sont plus couramment utilisées dans la littérature et permettent d'encapsuler des SA

hydrophiles dans le cœur aqueux des NCs. Ces émulsions sont préparées par deux étapes d'émulsification, en utilisant deux types de tensioactifs. D'une part, un tensioactif lipophile, dissous dans la phase organique, stabilise l'interface eau-dans-huile (w/o) et de l'autre, un tensioactif hydrophile présent dans la phase aqueuse est utilisé pour stabiliser l'interface eau-dans-huile-dans-eau (w/o/w)^{33, 34, 59}.

Par exemple, Cosco *et al.*⁵⁹ ont préparé une émulsion w/o/w afin d'encapsuler une SA hydrophile et anticancéreuse au sein d'une NC de type cœur aqueux/écorce PLA. Dans ce cas, une double émulsion a été obtenue par dispersion d'une première émulsion (réalisée à partir d'une phase aqueuse contenant la SA et d'une phase organique dans laquelle le polymère PLA et un tensioactif lipophile ont été dissous) dans une phase aqueuse contenant un tensioactif hydrophile. L'interface interne w/o est alors stabilisée par le tensioactif lipophile et l'interface externe w/o/w par le tensioactif hydrophile. Le solvant organique utilisé a ensuite été éliminé par évaporation et les NCs contenant la SA hydrophile ont été formées (Schéma I.4). L'ajout d'un poly(éthylène glycol) hydrophobisé dans la phase organique a permis d'obtenir un recouvrement stable en PEG pour les NCs finales, ce qui améliore leur biocompatibilité⁵⁹.

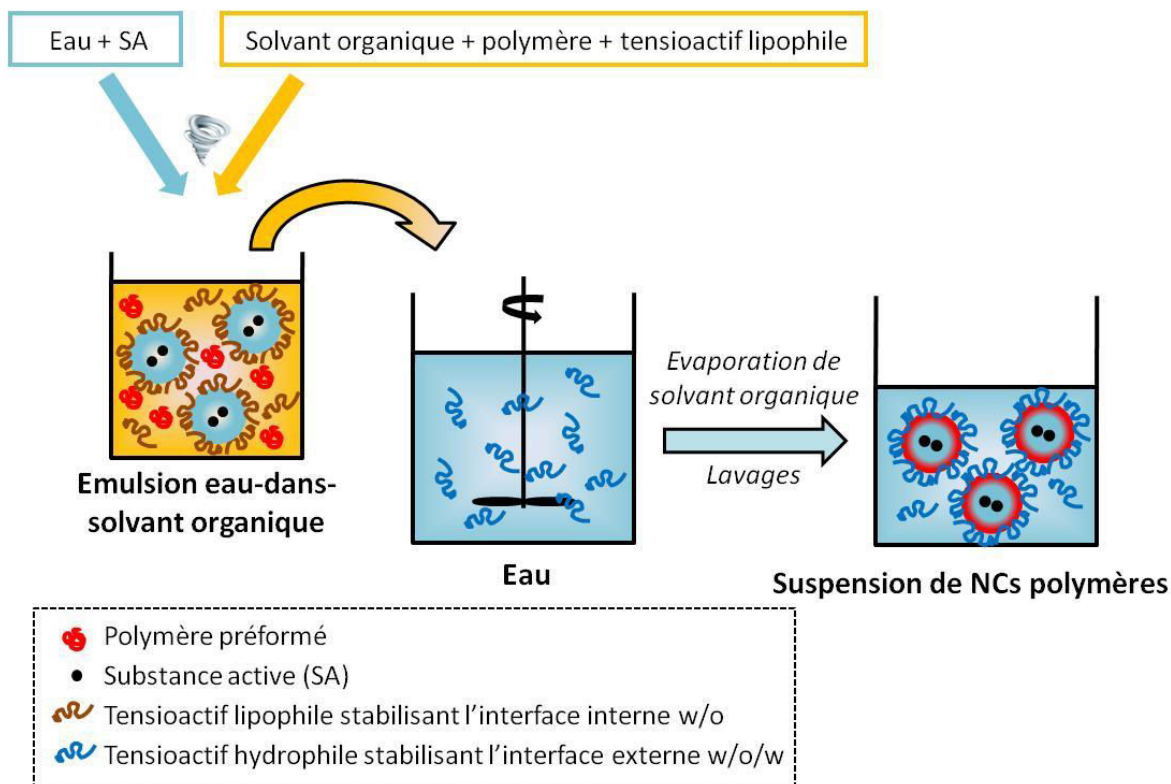


Schéma I.4. Elaboration de NCs à cœur aqueux par le procédé de double émulsification

III.1.4. Emulsion-coacervation

La méthode d'émulsion-coacervation se déroule en deux étapes : tout d'abord un solvant 1 (par exemple de l'huile) est dispersé dans un solvant 2 auquel il n'est pas miscible (le plus souvent de l'eau) sous agitation mécanique ou grâce aux ultrasons. Les gouttelettes de cette émulsion servent ensuite de template lors de la seconde étape de coacervation. La coacervation consiste à diminuer la solubilité du polymère initialement dissous dans le solvant 2 de façon à le faire précipiter. Si le solvant 2 est l'eau, on peut réduire la solubilité du polymère par un changement de la température du milieu²⁸ ou par addition de quantité importante de différents composés : un électrolyte (par exemple CaCl_2 ^{36, 76}, Na_2SO_4 ⁶¹) qui peut favoriser la précipitation par effet de « salting-out » (c'est-à-dire par augmentation des interactions hydrophobes); un agent déshydratant (par exemple un alcool⁷⁷); un non-solvant du polymère. Dans la méthode de coacervation, les molécules de polymère dessolvatées coalescent et forment des gouttelettes, dites gouttelettes de coacervat. Si la coacervation se fait dans une phase dispersée d'une émulsion, les gouttelettes de coacervat se regroupent à l'interface liquide/liquide de l'émulsion créant ainsi une membrane qui devient l'écorce de la NC (Schéma I.5). Il est possible de durcir cette membrane et de la rendre plus résistante par des réactions de réticulation (« cross-linking ») entre les chaînes de polymère en utilisant, par exemple, le glutaraldéhyde⁷⁷ ou un réticulant ionique tel que le tripolyphosphate pentasodique^{22, 35}.

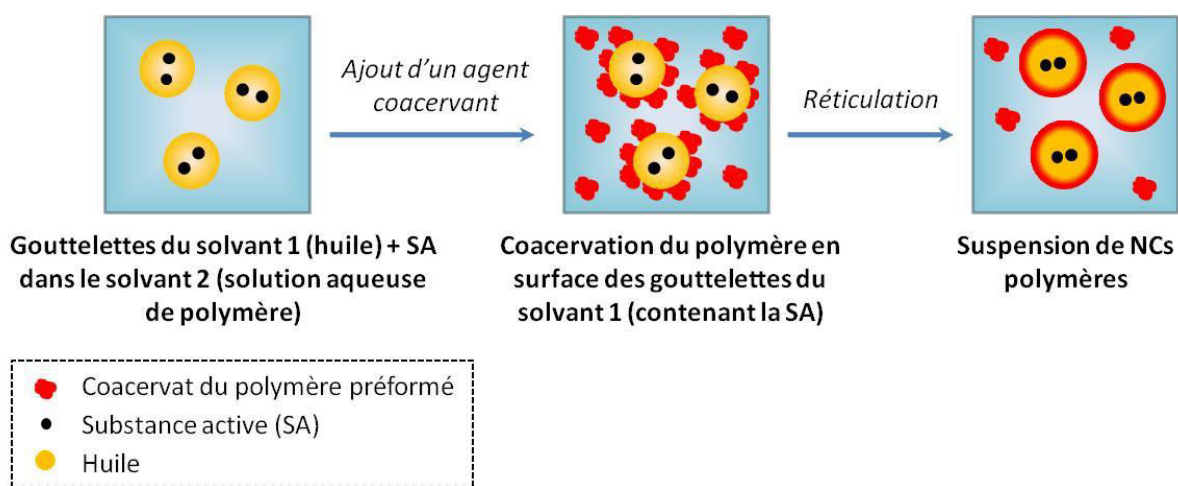


Schéma I.5. Elaboration des NCs à cœur huileux par le procédé d'émulsion-coacervation

Les polymères employés pour former des NCs par la méthode d'émulsion-coacervation sont le plus souvent d'origine naturelle, comme par exemple le chitosane²³, la gomme xanthane⁶¹ ou l'alginate de sodium^{36, 76}. Mais des polymères synthétiques comme le

PLA¹⁰⁴ ou autres¹⁰⁵ peuvent aussi être employés. Dans une coacervation dite complexe, deux polymères (ou plus) de charges opposées sont employés : par exemple la gélatine chargée positivement est associée à la gomme arabique chargée négativement¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Puisque, la coacervation complexe repose sur les interactions électrostatiques entre deux polymères, l'ajustement du pH du milieu est primordial. La difficulté de la méthode d'émulsion-coacervation réside notamment dans la mise au point des paramètres opératoires afin d'obtenir des NCs monodisperses et une bonne efficacité d'encapsulation de la SA.

III.1.5. Polymérisation

La polymérisation des monomères en milieu dispersé (le plus souvent polymérisation en chaîne) est une autre technique classique d'obtention de systèmes colloïdaux. Associée à un phénomène de ségrégation de phases, cette méthode permet également d'obtenir des capsules à cœur liquide. Pour obtenir des NCs, la polymérisation en miniémulsion¹⁸ est la technique la plus appropriée. Elle consiste à réaliser la polymérisation dans les gouttelettes d'une émulsion. Suivant le type de capsules envisagé (cœur huileux ou aqueux), une miniémulsion est formée par dispersion de la phase organique dans la phase aqueuse (miniémulsion directe) ou par dispersion de la phase aqueuse dans la phase organique (miniémulsion inverse). La distribution de taille des gouttelettes est, dans le cas idéal, étroite et se situe en moyenne entre 50 et 500 nm. Comme dans le cas du procédé d'émulsion-évaporation de solvant, l'obtention d'une nano-émulsion nécessite l'apport d'une quantité importante d'énergie (fournie par des techniques telles que les ultrasons ou un homogénéisateur à haute pression). La stabilité de la dispersion des nano-gouttelettes dans la phase continue est assurée par la présence d'un tensioactif stabilisant et d'un co-stabilisant. Ce co-stabilisant est réparti de manière homogène dans les gouttelettes de la miniémulsion et a la particularité d'être très peu soluble dans la phase dispersée de façon à diminuer l'effet de murissement d'Ostwald. Grâce à cela, la taille des objets finaux est très similaire à la taille des gouttelettes de miniémulsion de départ¹⁰⁹. Afin d'obtenir des NCs, il faut cependant ajouter une huile non-volatile dans la phase dispersée de départ. Cette huile doit être parfaitement miscible au(x) monomère(s) et, au contraire, immiscible au polymère formée. Ainsi, une séparation de phases se produira au cours de la polymérisation entre le polymère formé *in situ* et l'huile, ce qui assurera la formation des NCs à cœur liquide huileux (Schéma I.6).

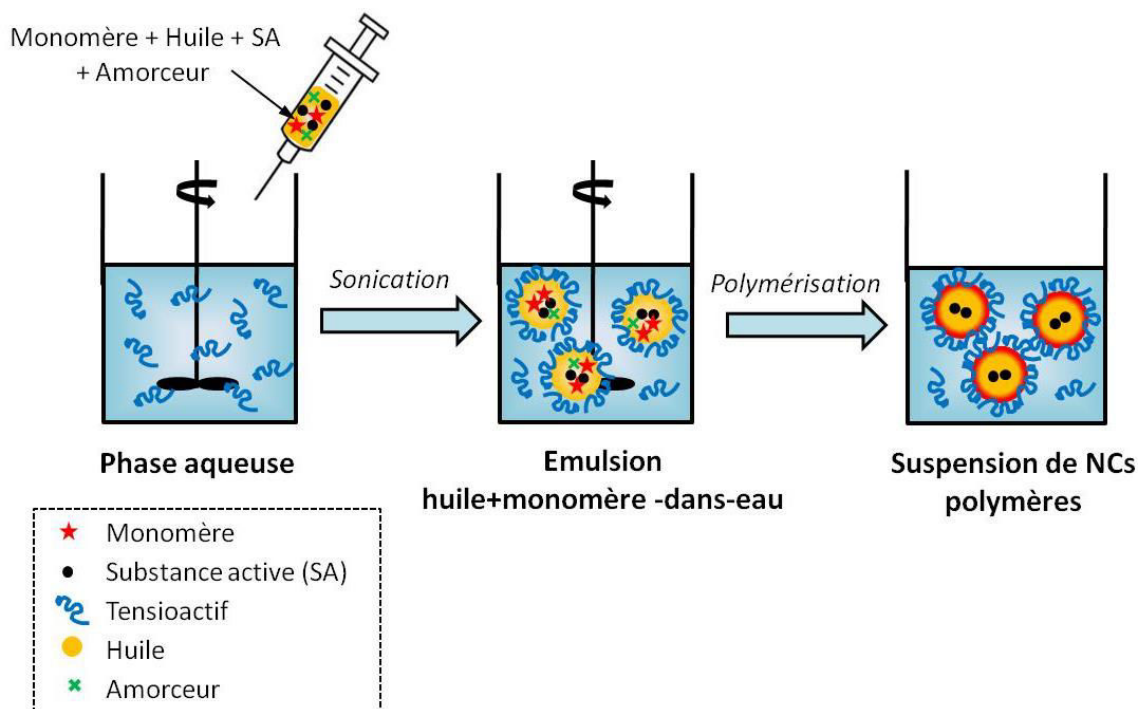


Schéma I.6. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé de polymérisation en chaîne en miniémulsion directe

III.1.6. Problèmes de contrôle de la morphologie des capsules

Les procédés basés sur la précipitation du polymère à l'interface posent souvent des problèmes de contrôle de la morphologie des objets finaux. Ceci est dû à la complexité du processus de ségrégation de phases entre le polymère et l'huile. Ainsi, différents types de morphologies peuvent être obtenus (Figure I.5).

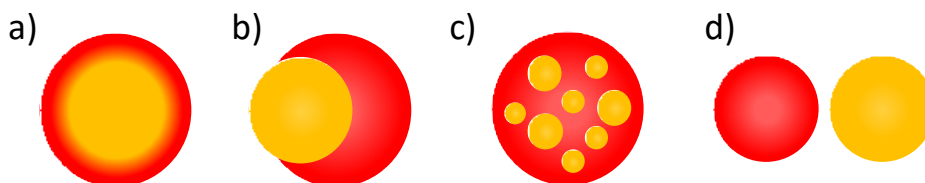


Figure I.5. Différentes morphologies des capsules: a) cœur/écorce, b) « gland », c) poreuse, d) nanosphère et nano-gouttelette d'huile séparées

Plusieurs travaux ont été menés afin d'étudier la ségrégation de phases entre le polymère (qu'il soit préformé ou obtenu *in situ* au cours d'une polymérisation) et l'huile. Par exemple, Pisani *et al.*⁷⁰ ont étudié plusieurs paramètres de procédé d'émulsion-évaporation de solvant tels que la concentration du polymère préformé ou la vitesse d'évaporation de solvant volatil afin de favoriser l'obtention d'objets de morphologie contrôlée. Cependant, dans

chaque cas, ces auteurs signalent la coexistence de différentes morphologies au sein d'un même lot de nano-objets. Finalement, le choix d'un tensioactif approprié qui est à la fois un bon stabilisant de l'interface phase organique/phase aqueuse et de l'interface huile/phase aqueuse s'est avéré être le paramètre crucial permettant d'obtenir une morphologie cœur/écorce (Figure I.5a). Dans une autre étude, Loxley *et al.*¹¹⁰ ont montré que la réduction trop importante de la tension interfaciale phase organique/phase aqueuse (grâce à l'utilisation de tensioactifs ioniques tels que le bromure de cétyltriméthylammonium ou le dodécyl sulfate de sodium (SDS)) mène à l'obtention de capsules de morphologie de type « gland » (Figure I.5b). En outre, la tension superficielle entre l'huile et l'air¹¹¹ ainsi que la compatibilité (miscibilité) entre le polymère et l'huile¹¹² sont aussi des paramètres importants à prendre en compte et qui influencent la morphologie et la porosité de l'écorce entourant le cœur liquide. Par exemple, dans le cas des objets à écorce PMMA, l'utilisation d'huiles de tension superficielle élevée ($\geq 30 \text{ mN m}^{-1}$) (comme par exemple l'acétate de benzyle, le géraniol ou le xylène) a permis d'obtenir des capsules avec une écorce homogène et lisse, tandis que l'emploi d'huiles de tension superficielle plus basse ($\leq 25 \text{ mN m}^{-1}$) (par exemple le Miglyol®812 ou le dodécane) a abouti à la formation de capsules avec des membranes poreuses¹¹¹. De plus, l'utilisation de l'huile peu miscible avec le polymère favorise l'obtention d'une structure cœur/écorce liée à la démixtion rapide entre ces deux composants, tandis que l'emploi d'une huile plus miscible avec le polymère conduit à la formation de capsules poreuses (Figure I.5c)¹¹².

De même, dans le cas d'une polymérisation en miniémulsion, le choix judicieux de tensioactifs appropriés et de l'huile, ainsi que la polarité du monomère, jouent sur la tension interfaciale entre ces composants et influencent donc la morphologie des objets obtenus^{50, 113, 114}.

Enfin, Yan *et al.*¹¹⁵ ont exploité des diagrammes de phases polymère/solvant 1/solvant 2 et huile/solvant 1/solvant 2 pour établir des conditions optimales en termes de formulation utilisée lors du procédé de nanopréciipitation. Il s'agit de favoriser la précipitation du polymère à l'interface de gouttelettes d'émulsion et ainsi promouvoir la formation de capsules bien définies.

Le contrôle de la morphologie des capsules est donc lié à la complexité du processus de séparation de phases. Au contraire, les méthodes employant des templates (cœurs sacrificiels) (voir Paragraphe III.2) ou ayant recours à une réaction à l'interface d'une

gouttelette (voir Paragraphe III.3) facilitent l'obtention de la morphologie de type cœur/écorce.

III.2. EMULSION TEMPLATE

Parmi les techniques basées sur l'émulsion template²⁶, l'adsorption couche-par-couche de polyélectrolytes de charges opposées^{116, 117} sur un cœur sacrificiel est la plus couramment utilisée. Mais, dans certains cas, le polymère préformé peut aussi simplement être déposé à la surface d'une nano-gouttelette d'une émulsion qui sert de template⁶².

III.2.1. Méthode couche-par-couche

La synthèse des NCs par une méthode couche-par-couche nécessite l'utilisation d'un cœur sacrificiel qui peut être de nature solide (template dur) ou de nature liquide (template mou)¹¹⁸⁻¹²¹. L'utilisation d'un template dur nécessite au final son élimination, ce qui mène à l'obtention de NCs ayant un cœur vide. Ces dernières peuvent devenir des NCs à cœur liquide après avoir rempli leur cavité par du liquide contenant la SA¹²² (imprégnation). Au contraire, l'emploi d'un template mou tel que les gouttelettes d'une émulsion permet d'obtenir directement des NCs à cœur liquide avec la SA directement encapsulée à l'intérieur. La formation de l'écorce polymère peut se faire par exemple par adsorption de polyélectrolytes de charges opposés¹²³⁻¹²⁵, par adsorption des polymères par liaisons hydrogènes¹²² ou encore par réaction à partir de la surface¹²⁶⁻¹²⁸.

III.2.1.1. Templating « dur »

La préparation de NCs à cœur liquide par « templating dur » comprend plusieurs étapes (illustrées au Schéma I.7) : 1°) obtention d'un cœur dur (par exemple nanoparticule de silice^{123, 129}, de polymère¹³⁰, de métaux ou d'oxydes métalliques¹¹⁸ ou encore de carbonate de cadmium, de manganèse ou de calcium ($\text{CdCO}_3, \text{MnCO}_3, \text{CaCO}_3$ ^{118, 124, 125}), 2°) fonctionnalisation éventuelle de la surface du cœur, 3°) formation couche-par-couche de l'écorce polymère autour du template dur, 4°) élimination du cœur sacrificiel, 5°) remplissage du cœur par une solution contenant la SA par imprégnation, et finalement 6°) redispersion des NCs dans l'eau.

L'avantage de la méthode de déposition couche-par-couche est la grande diversité de cœurs utilisables. Certains cœurs durs sont disponibles commercialement dans une large

gamme de taille alors que d'autres sont faciles à synthétiser. De plus, l'utilisation du template d'un diamètre choisi facilite le contrôle de la taille des capsules obtenues et de leur cœur. Enfin, les propriétés des capsules ainsi obtenues peuvent être modulées en variant l'épaisseur et la nature de l'écorce^{118, 131}.

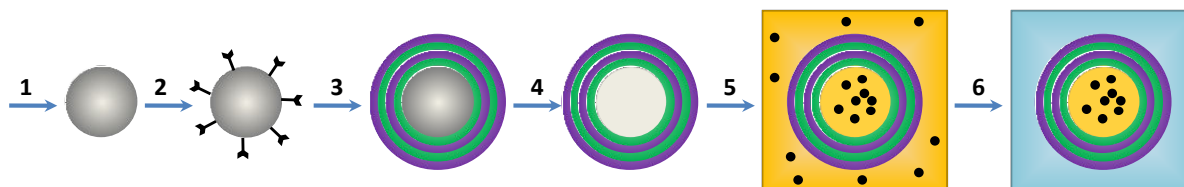


Schéma I.7. Elaboration des NCs à cœur liquide par le procédé couche-par-couche à partir d'un cœur sacrificiel dur : 1°) synthèse d'un cœur dur, 2°) fonctionnalisation éventuelle de la surface du cœur, 3°) formation couche-par-couche de l'écorce polymère autour du template dur, 4°) élimination du cœur sacrificiel, 5°) remplissage du cœur par une solution contenant la SA par imprégnation, 6°) redispersion des NCs dans l'eau

Pour illustrer plus en détails cette technique « templating dur », on peut citer par exemple les travaux de Huang *et al.*¹²⁶ (Schéma I.8). Dans leur cas, des particules de silice ont été utilisées comme templates et fonctionnalisées au préalable. Grâce à deux polymérisations successives contrôlées par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT), des chaînes de poly(méthacrylate de *tert*-butyle-*co*-méthacrylate de 2,3-diméthylimidopropyle-*b*-*N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide) sont produites à partir des fonctions thioester en surface et constituent l'écorce polymère. Cette écorce est ensuite réticulée sous UV. Finalement, le cœur de silice entouré de cette écorce polymère est éliminé par dissolution dans une solution de fluorure d'ammonium afin d'obtenir des NCs creuses.

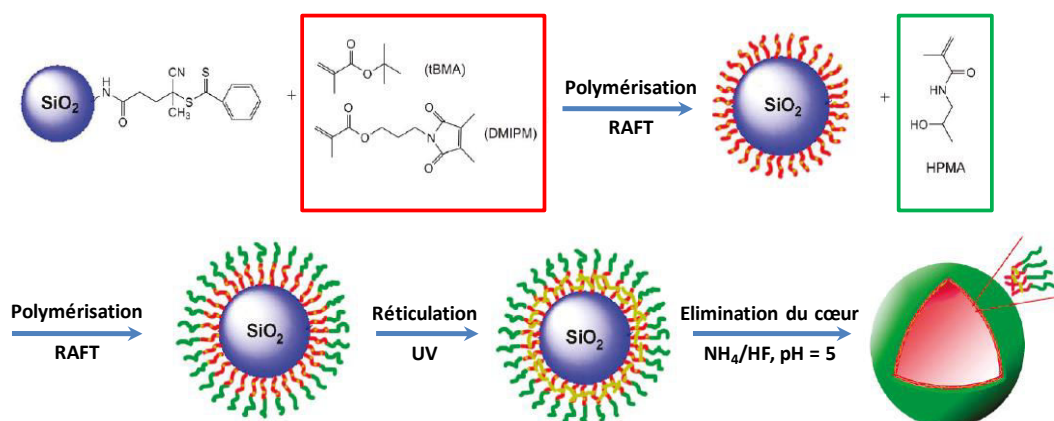


Schéma I.8. Synthèse de NCs vides par le procédé couche-par-couche par réaction de polymérisation RAFT à partir de la surface en utilisant des nanosphères de silice comme templates (adapté de la référence¹²⁶). tBMA = méthacrylate de *tert*-butyle, DMIPM = méthacrylate de 2,3-diméthylimidopropyle, HPMA = *N*-(2-hydroxypropyle) méthacrylamide

Concernant le remplissage de la cavité des capsules vides, on peut citer les travaux de Sivakumar *et al.*¹²² sur l'imprégnation de microcapsules (MCs) formées en employant des particules de silice comme un cœur sacrificiel et en déposant divers couples de polyélectrolytes : soit le poly(styrène sulfonate)/poly(chlorhydrate d'allylamine), soit le poly(acide méthacrylique)/poly(vinylpyrrolidone). Après l'élimination du cœur de silice, ces MCs vides sont remplies par une huile de silicone, une huile de paraffine ou encore par des cristaux liquides. Si ces études ont été réalisées sur des MCs, les auteurs soulignent toutefois la possibilité d'employer cette méthode afin d'obtenir des capsules de tailles submicroniques¹²². Dans une autre étude, le même couple de polyélectrolytes de charge opposées poly(styrène sulfonate)/poly(chlorhydrate d'allylamine) a été déposé couche-par-couche à la surface de cellules sanguines humaines (érythrocytes), qui ont été ultérieurement éliminées par déprotéinisation, ce qui conduit à l'obtention de MCs vides¹³². Celles-ci ont été ensuite remplies par du décane, en diminuant progressivement la polarité du solvant externe de la suspension de MCs vides (du plus polaire au moins polaire).

Malheureusement, tous ces procédés utilisant un template dur présentent également quelques inconvénients. L'élimination du cœur dur est le plus souvent réalisée dans des conditions agressives, par exemple par dissolution du cœur par un acide ou par thermolyse. Ceci peut générer différents problèmes, y compris la destruction éventuelle de la capsule formée¹¹⁸. Le procédé de formation de l'écorce par méthode couche-par-couche nécessite souvent le lavage de l'objet formé après chaque étape d'adsorption ou de réaction, ce qui réduit considérablement le rendement de production des capsules. L'encapsulation d'une SA par imprégnation et le remplissage du cœur vide de la NC avec un liquide sont des opérations qui peuvent s'avérer délicates, surtout si la SA et le liquide ne sont pas compatibles avec l'écorce de la NC¹³¹.

III.2.1.2. Templating « mou »

Dans le cas du templating « mou », la formation de NCs se fait essentiellement par adsorption couche-par-couche, le plus souvent de polyélectrolytes de charges opposées. On utilise alors des cœurs sacrificiels mous tels que des gouttelettes d'émulsion^{71, 73, 117, 133-136}, des vésicules^{137, 138} ou des liposomes^{139, 140}.

Ces systèmes présentent différents avantages par rapport aux procédés utilisant des templates durs. D'une part, ces templates peuvent être éliminés du système dans les

conditions beaucoup plus douces que celles nécessaires pour éliminer des templates durs (par exemple par évaporation)¹¹⁸. D'autre part, il est possible d'encapsuler directement la SA dans un liquide constituant le cœur mou pendant la synthèse de la capsule. Dans le cas des travaux de Bazylińska *et al.*⁷³, une nano-émulsion chargée positivement est d'abord préparée en utilisant un tensioactif cationique. Le palmitate d'isopropyle ou un acide oléique sont employés comme huiles non-volatiles pour constituer le cœur liquide ; une SA lipophile (colorants : cyanine ou Oil Red) est dissoute dans l'huile. La présence d'une charge résiduelle en surface des nano-gouttelettes permet d'adsorber directement une première couche de polymère anionique – le poly(styrène sulfonate). Ensuite, le poly(chlorure de diallyldiméthylammonium) est utilisé comme polycation afin d'obtenir des NCs multicouches (Schéma I.9). Suivant le dernier polyélectrolyte utilisé, la surface des NCs finales est chargée positivement ou négativement.

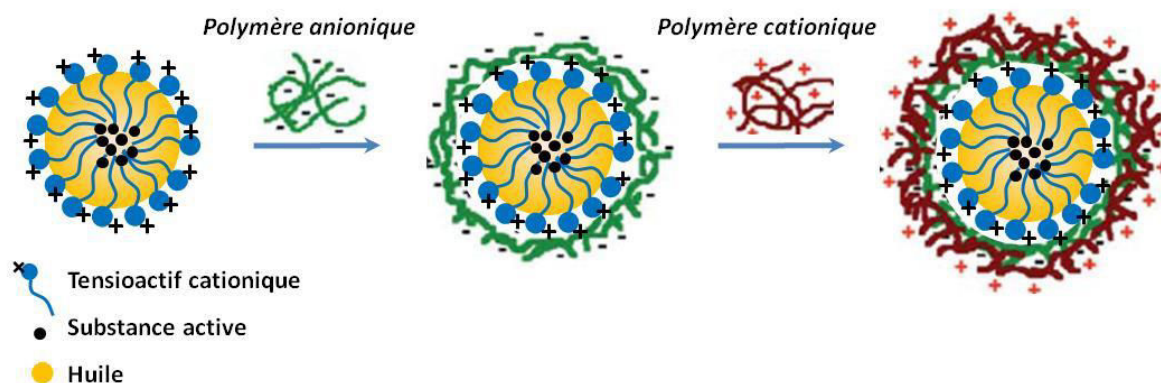


Schéma I.9. Synthèse de NCs à cœur huileux par le procédé couche-par-couche à partir de la surface d'une nano-gouttelette d'émulsion chargée positivement (adapté de la référence⁷³)

Malheureusement, les templates mous contrairement aux cœurs durs, du fait de leur nature molle, peuvent subir des déformations. De plus, le contrôle de taille des NCs et de leur uniformité semble être plus difficile que dans le cas d'utilisation des cœurs durs^{118, 139}. La nécessité d'utiliser de grandes quantités de tensioactif pour stabiliser l'émulsion peut également être un des inconvénients majeurs de ce procédé.

III.2.2. Dépôt d'une couche polymère ou « polymer-coating »

Cette méthode est une modification apportée aux procédés classiques de nanoprécipitation et d'émulsion-double²⁸. Elle consiste à précipiter un polymère préformé à la surface d'une nano-gouttelette d'une émulsion, cette dernière servant de template mou. Tout d'abord, une nano-émulsion est formée par l'ajout d'une phase dispersée (solvant 1) dans une

phase continue (solvant 2) suivie d'une homogénéisation, par exemple par ultrasons. L'émulsion est de type huile-dans-eau ou eau-dans-huile, selon le type de cœur liquide souhaité. Si l'obtention de NCs à cœur huileux est envisagée, le solvant 1 est une huile non-volatile et le solvant 2 est l'eau. Le polymère est dissous dans un solvant 3 miscible au solvant 2, puis ajouté goutte-à-goutte dans la phase continue lors de l'étape suivante. L'évaporation du solvant 3 entraîne la précipitation du polymère à la surface des nano-gouttelettes de l'émulsion. Ceci permet alors d'obtenir des NCs à cœur liquide et écorce polymère²⁶ (Schéma I.10).

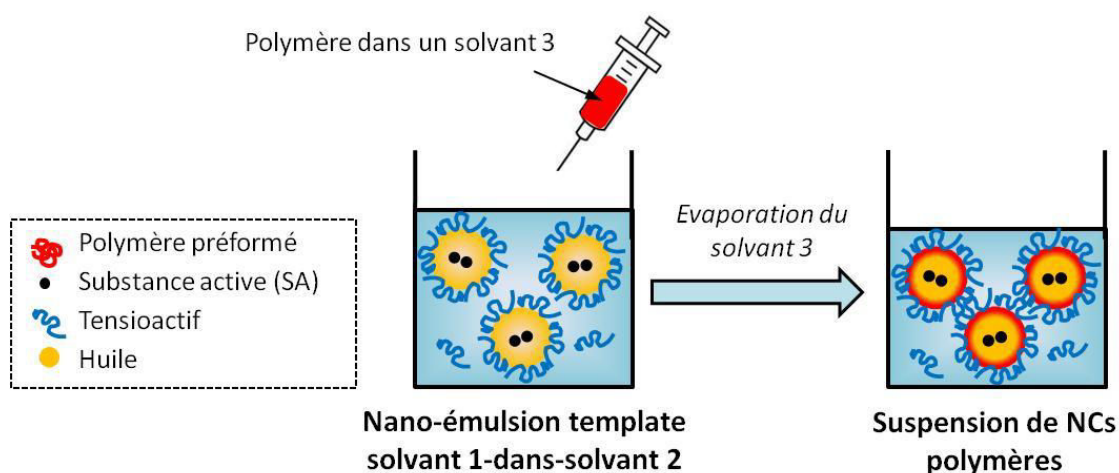


Schéma I.10. Elaboration des NCs à cœur huileux par le procédé de dépôt d'une couche polymère (« polymer coating »)

Par exemple, Paiphansiri *et al.*⁶² ont encapsulé un agent antiseptique hydrophile dans le cœur aqueux des NCs par la méthode de « polymer coating ». Pour ce faire, des nano-gouttelettes aqueuses de la SA sont dispersées dans la phase organique continue (CH_2Cl_2 mélangé au cyclohexane) par sonication. Ensuite, une solution de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA), de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) ou de poly(acrylate de méthyle) (PMA) dans du CH_2Cl_2 est ajoutée goutte-à-goutte dans la phase continue. Le polymère précipite en surface des nano-gouttelettes lors de l'évaporation progressive du CH_2Cl_2 , ce qui permet de former des NCs à cœur aqueux.

Prego *et al.*¹⁴¹⁻¹⁴³ ont quant à eux utilisé une stratégie de déposition du polymère en surface des nano-gouttelettes huileuses servant de templates afin d'obtenir des NCs à cœur huileux. Pour cela, une phase organique composée d'une huile triglycéride d'acides caprique/caprylique (Miglyol[®]812), d'une lécithine (solubilisée dans l'éthanol et utilisée comme tensioactif stabilisant l'émulsion) et de l'acétone, a été émulsifiée dans une phase

aqueuse contenant un tensioactif (Poloxamer 188). Ainsi, une nano-émulsion huile-dans-eau a été préparée. Après évaporation des solvants organiques, la suspension obtenue a été introduite dans une solution aqueuse contenant du polymère (chitosane ou chitosane-g-PEG selon le cas), ce qui a conduit à formation d'une couche de polymère en surface des nanogouttelettes.

III.3. REACTIONS A L'INTERFACE LIQUIDE/LIQUIDE

Concernant les réactions à l'interface liquide/liquide, les polymérisations en miniémulsion (polymérisation par étapes ou polymérisation en chaîne) sont les plus couramment utilisées. Mais d'autres réactions interfaciales peuvent aussi être employées, comme par exemple celles de chimie « click ».

III.3.1. Polymérisation à l'interface

La polymérisation de monomères localisée à l'interface des gouttelettes est une autre technique pour obtenir des capsules à cœur liquide. Comme décrit dans le Paragraphe III.1.5 du présent chapitre, la technique de polymérisation en miniémulsion est l'une des plus appropriées pour obtenir des capsules de tailles inférieures à 500 nm.

Les différents mécanismes de polymérisation peuvent être utilisés en miniémulsion. Par exemple, la polymérisation par étapes a permis l'obtention de NCs à écorce en polyester¹⁴⁴, de polyamide¹⁴⁵ ou de polyuréthane^{38, 109, 145, 146}. La polymérisation en chaîne quant à elle a été couramment utilisée pour la synthèse de NCs de polystyrène (PS)¹⁴⁷, ou encore de polyacrylates^{64, 148} tels que par exemple poly(acrylate de butyle) (PBA), poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) ou poly(méthacrylate de butyle) (PBMA).

Contrairement aux procédés d'élaboration de capsules par précipitation à l'interface d'un polymère préformé (voir Paragraphe III.1), la méthode de polymérisation localisée à l'interface permet de prévoir plus facilement la morphologie de capsules formées, puisque l'émulsion sert elle-même de template mou. L'efficacité d'encapsulation d'une SA peut dans ce cas être très élevée. Cependant, la SA et le(s) monomère(s) doivent être choisis avec précautions afin de limiter le risque des réactions secondaires entre la SA et le(s) monomère(s)²⁷. De plus, le risque d'avoir des traces de monomère (souvent toxique) dans les objets finaux peut malheureusement limiter les applications des NCs obtenues par cette méthode.

III.3.1.1. Polymérisation par étapes : Polycondensation/Polyaddition

Il s'agit de réactions ayant lieu à l'interface liquide/liquide entre deux monomères bifonctionnels: l'un hydrosoluble, par exemple une diamine (ou un diol) et l'autre organosoluble, par exemple un dichlorure d'acide (ou un diisocyanate). Ainsi, la polymérisation à l'interface phase organique/phase aqueuse permet de former l'écorce polymère rigide à la surface des gouttelettes de la miniémulsion (Schéma I.11). Gaudin *et al.*³⁸ ont ainsi préparé des NCs biocompatibles de polyuréthane pour l'encapsulation d'ibuprofène. Pour cela, une miniémulsion a été préparée à partir d'un monomère lipophile (diisocyanate cyclique) solubilisé dans une huile triglycéride non-volatile (Miglyol®812). Cette phase est dispersée dans la phase aqueuse (phase continue) contenant un tensioactif, le SDS. Ensuite, un deuxième monomère – hydrophile (1,6-hexanediol) – est ajouté goutte-à-goutte dans la miniémulsion préalablement formée. Il faut noter que l'émulsification doit être très rapide pour éviter que la polymérisation ne commence afin d'obtenir des nano-gouttelettes régulières¹⁴⁵. Ensuite, l'augmentation de la température du milieu jusqu'à 40°C permet d'accélérer la polyaddition. Le polymère se forme à l'interface et comme il est insoluble dans l'huile et dans l'eau, génère une écorce rigide ce qui permet l'obtention de NCs à cœur huileux. Cette méthode de polymérisation par étapes peut aussi être appliquée à une miniémulsion inverse afin d'obtenir des NCs à cœur aqueux¹⁴⁹⁻¹⁵².

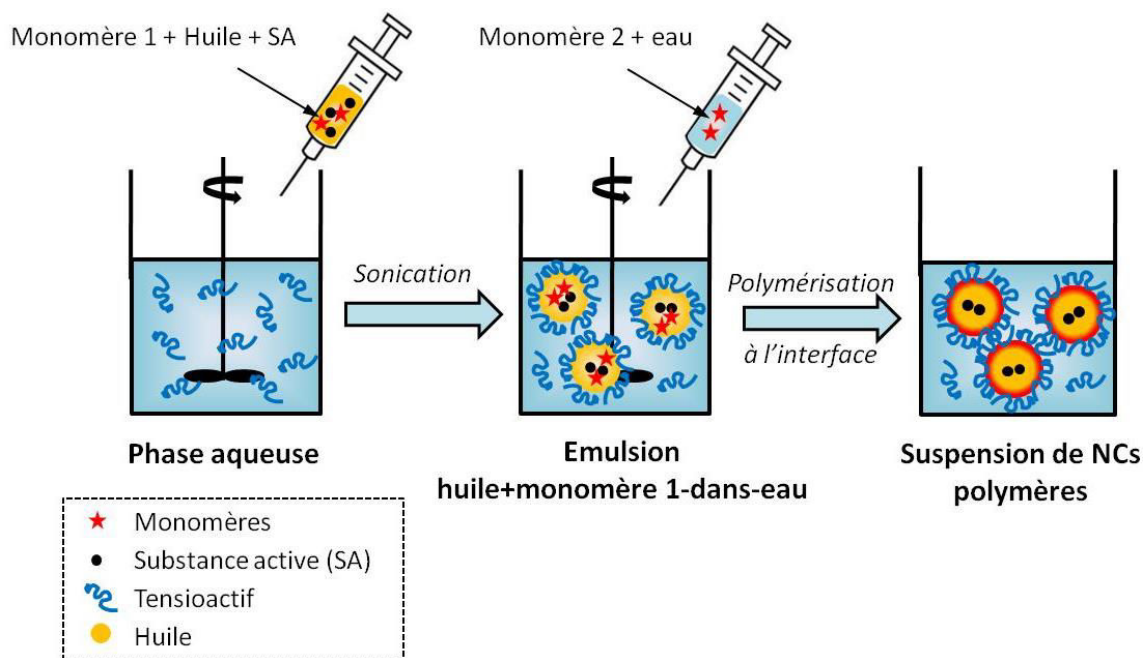


Schéma I.11. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé de polymérisation par étapes à l'interface d'une gouttelette de miniémulsion

Siebert *et al.*¹⁵³ quant à eux ont développé un nouveau concept de polymérisation par étapes utilisant une réaction de chimie « click » CuAAC (cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu(I)) à l'interface (la chimie « click » CuAAC est détaillé dans le Paragraphe IV.2.). Pour cela, un monomère comportant deux fonctions azide (2,2-bis(azidométhylène)-1,3-propanediol) est dissous en phase aqueuse. Le second monomère dialcyne organosoluble (octa-1,7-diyne, 1,4-diéthynyl-benzène ou dipropiolate de 1,6-hexanediol) est dissous dans le cyclohexane. Ces deux monomères réagissent en miniémulsion inverse à l'interface eau/cyclohexane, ce qui aboutit à former des NCs de polytriazole à cœur aqueux. Le même concept a été utilisé par Roux *et al.*¹⁵⁴ pour obtenir des NCs à cœur huileux. Cette fois-ci, la réaction à l'interface a lieu entre un 6,6'-diazido-6,6'-didéoxysucrose solubilisé en phase aqueuse et un bis(propargyloxy) butane dissous dans la phase huileuse dispersée et constituée de Miglyol®812.

III.3.1.2. Polymérisation en chaîne

Afin de localiser la polymérisation à l'interface, l'un des composants du système d'amorçage (ou l'amorceur lui-même) ou encore un réactif qui permet de catalyser la polymérisation, doit être introduit dans la phase opposée à celle qui contient le monomère à polymériser. Ceci favorise la localisation de la polymérisation à la surface des gouttelettes de monomère. Plusieurs systèmes ont ainsi été développés. D'une part, on peut localiser des amorceurs classiques à la surface de la gouttelette du monomère. Par exemple, un système redox, soit initialement hydrosoluble tel que le système peroxyde d'hydrogène/acide ascorbique³⁹, soit contenant un oxydant organosoluble et un réducteur hydrosoluble (par exemple peroxyde de benzoyle/sulfoxylate de formaldéhyde de sodium¹⁵⁵), a été utilisé pour amorcer la polymérisation en chaîne à l'interface d'une miniémulsion. Des composés tensioactifs réactifs peuvent également être employés. Ils peuvent être à la fois stabilisants de miniémulsion et amorceurs de la polymérisation, c'est pourquoi sont appelés inisurfs (Schéma I.12). Par exemple, des copolymères amphiphiles à bloc ont permis d'obtenir des NCs par ATRP en miniémulsion¹⁵⁶. D'autre part, des dérivés tensioactifs du dextrane rendus macro-amorceurs par l'introduction de groupements bromoesters ont déjà été employés par notre équipe pour l'obtention de NSs¹⁵⁷. De même, le tensioactif réactif peut aussi servir de comonomère (surfmer)^{158, 159} ou d'agent de transfert (transurf) lors d'une polymérisation, comme dans le cas d'une polymérisation RAFT¹⁶⁰⁻¹⁶².

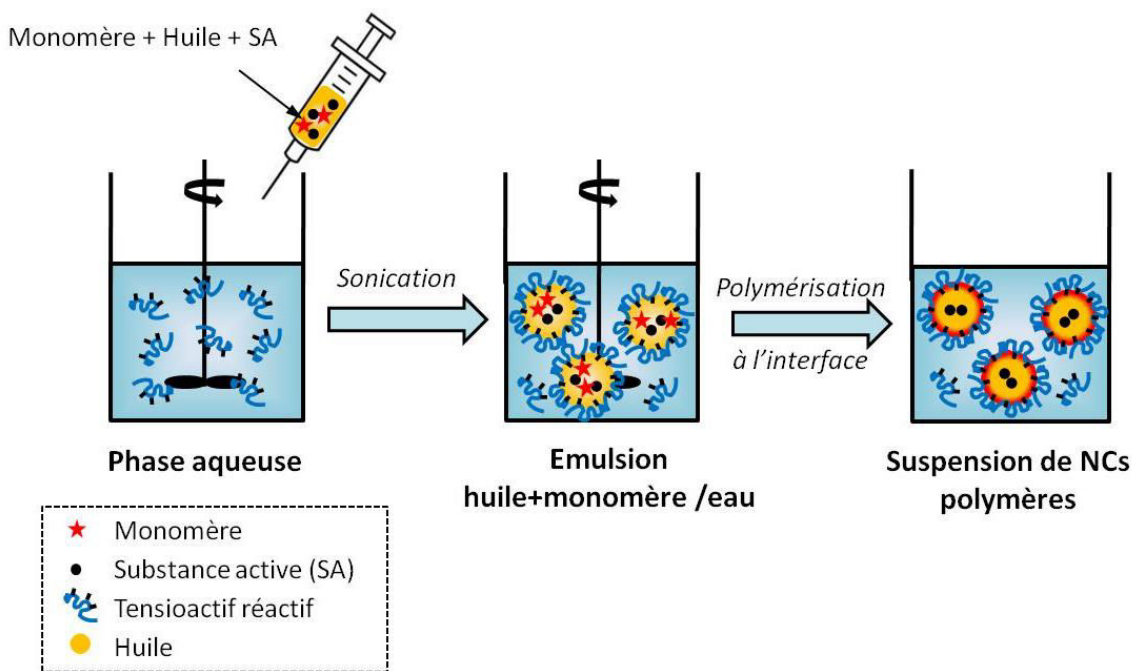


Schéma I.12. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé de polymérisation en chaîne à l'interface d'une gouttelette de miniémulsion

III.3.2. Réactions de chimie « click » à l'interface

Afin d'éviter certains inconvénients des méthodes précédentes, notamment le risque d'avoir des traces de monomères résiduels souvent toxiques, les procédures laborieuses de lavages des NCs ou encore les problèmes du contrôle de la morphologie des nano-objets formés, il est possible de combiner deux types de procédés. Ainsi, une réaction interfaciale entre deux polymères préformés (ou entre un polymère préformé et une petite molécule) peut être réalisée pour élaborer des capsules en plus d'un procédé par ségrégation de phases. Afin d'assurer le couplage efficace entre ces deux polymères préformés, la chimie « click » est le plus souvent utilisée.

Les réactions de chimie « click » sont connues dans la littérature pour leurs grandes efficacités, leurs forts rendements, leur sélectivité, leur temps de réactions courts et les conditions douces employées^{163, 164} (voir Paragraphe IV pour plus de détails sur la chimie « click »). Cependant, malgré ces avantages, il y a peu de travaux sur l'emploi de ces réactions à l'interface pour élaborer des capsules à cœur liquide¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ et encore moins pour préparer des capsules à cœur vide¹⁶⁸. Ceci est probablement dû aux difficultés liées à l'accessibilité des fonctions réactives et/ou du catalyseur à l'interface. Ces travaux sont détaillés ci-dessous.

La réaction de chimie « click » CuAAC entre un azide et un alcyne a été utilisée par Kai *et al.*^{165, 166} lors de la préparation des MCs à cœur chloroforme (CHCl_3). Deux copolymères préformés, un poly(styrène sulfonate de sodium-*co*-acrylate de propargyle) solubilisé dans la phase aqueuse et un poly(styrène-*co*-acrylate de 2-azidoéthyle) organosoluble sont mis en réaction à l'interface CHCl_3 /eau (Schéma I.13). La présence de catalyseur cuivreux dans la phase aqueuse (CuSO_4 /acide ascorbique – AAsc) assure le couplage entre les fonctions azide et alcyne complémentaires.

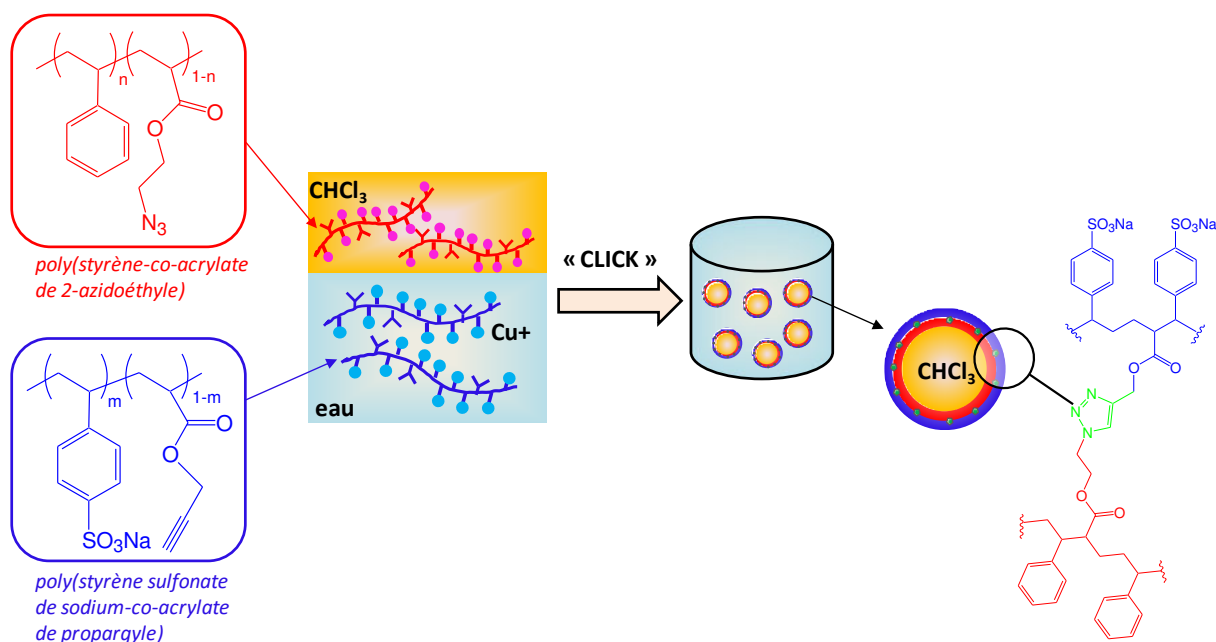


Schéma I.13. Elaboration des MCs à cœur CHCl_3 par réaction « click » CuAAC à l'interface CHCl_3 /eau

Un autre type de réaction « click », dite thiol-ène, a été employé par Paiphansiri *et al.*¹⁶⁷ à l'interface d'une miniémulsion inverse, dans le but de former des NCs à cœur aqueux. Pour cela, un oligonucléotide d'acide désoxyribonucléique (DNA) porteur des fonctions thiol terminales, présent dans les gouttelettes de la phase aqueuse, réagit à l'interface eau/ CH_2Cl_2 avec une molécule fluorescente fonctionnalisée par des groupements maléimide et dissoute dans la phase organique. Ceci conduit au final à la formation de l'écorce de la NC de DNA entourant le cœur aqueux et stabilisée par du poly(éthylène-*co*-butylène)-*b*-poly(oxyde d'éthylène) (Schéma I.14).

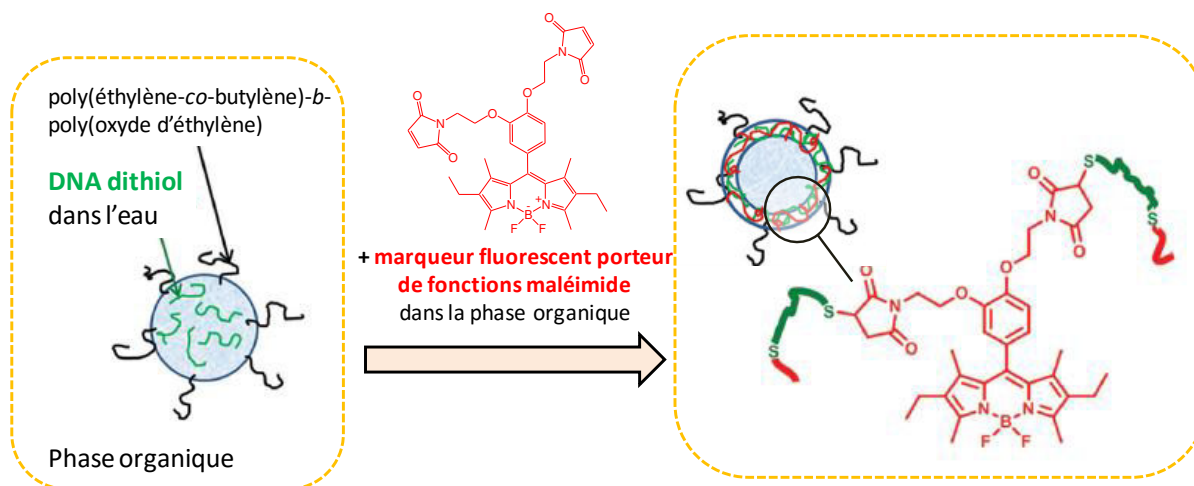


Schéma I.14. Elaboration des NCs à cœur aqueux par réaction « click » thiol-ène à l'interface eau/CH₂Cl₂ (adapté de la référence¹⁶⁷)

Chen *et al.*¹⁶⁸ ont également utilisé le couplage thiol-ène, mais cette fois-ci pour préparer des NCs à cœur vide. Pour cela, la phase organique contenant un dithiol de petite masse molaire (bis-3-mercaptopropionate de 1,4-butanediol), un photo-amorceur (2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone, DMPA) et éventuellement une SA (SA₁, doxorubicine) dans le CHCl₃ est dispersée dans la phase aqueuse. Cette phase aqueuse contient un PLA sous forme cationique (hydrosoluble) et porteur de fonctions alcènes. La réaction à l'interface CHCl₃/eau est amorcée par irradiation sous rayonnement UV. L'évaporation ultérieure du CHCl₃ aboutit à la formation des NCs à cœur vide. Ensuite, l'ajout de solution aqueuse d'une autre SA (SA₂, un acide ribonucléique siRNA) permet son adsorption à la surface de NCs via des interactions électrostatiques (Schéma I.15).

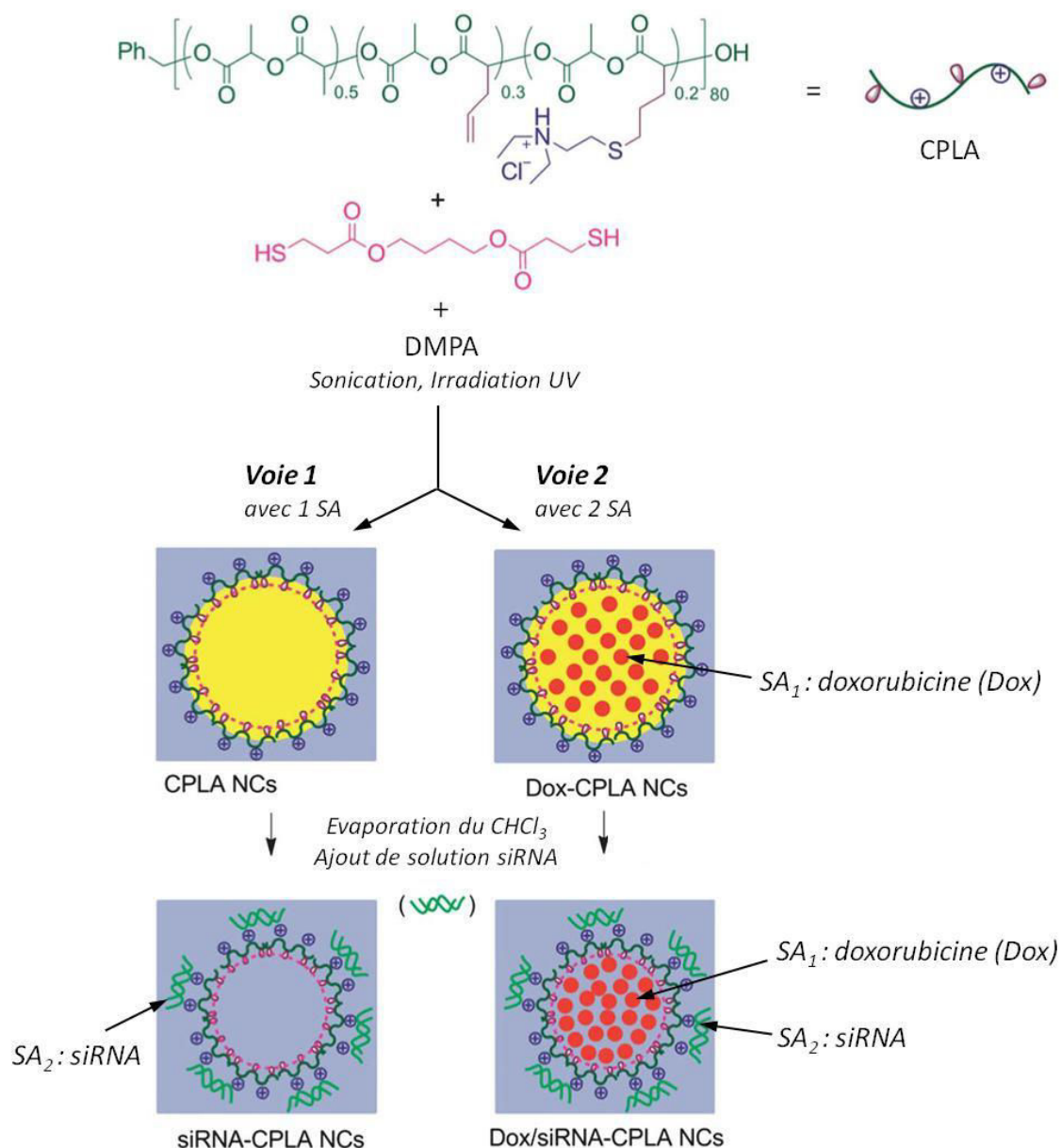


Schéma I.15. Elaboration des NCs vides par réaction « click » thiol-ène photo-amorcée à l'interface CHCl₃/eau (adapté de la référence¹⁶⁸)

IV. REACTIONS DE CHIMIE « CLICK »

IV.1. GENERALITES

La chimie « click » est un terme général introduit en 2001 par Sharpless *et al.*¹⁶⁴ afin de regrouper des réactions de chimie organique utilisables dans une large gamme d'applications, qui présentent de rendements élevés, des temps de réaction courts et des conditions réactionnelles douces. Ces réactions doivent également être hautement sélectives,

ce qui permet d'éviter la formation de produits secondaires. Les solvants utilisés pour la réaction sont idéalement non-toxiques, et de préférence facilement éliminables. De même, s'ils existent des produits secondaires, leur élimination doit être simple et ne pas nécessiter de techniques chromatographiques. De nombreux types de réactions de chimie organique remplissent plusieurs de ces conditions, comme les cycloadditions des composés insaturés (en particulier la cycloaddition azide-alcyne de Huisgen et la réaction de Diels-Alder), les additions à liaison multiple carbone-carbone (par exemple époxydation, dioxhydroxylation ou addition de Michael), l'ouverture de cycle d'électrophiles hétérocycliques tendus (par exemple les cycles époxydes ou aziridines) ou les réactions de carbonyle de type non-aldéhyde (par exemple la formation d'urées ou d'hydrazones)¹⁶⁴.

Dans la présente étude, les réactions de chimie « click » les plus répandues, et qui seront employées lors de cette thèse, sont détaillées à savoir la cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu(I) (CuAAC) et la réaction thiol-ène.

IV.2. CYCLOADDITION AZIDE-ALCYNE CATALYSEE PAR Cu(I)

La cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azide et un alcyne, développée initialement par Huisgen et ses collaborateurs dans les années 60, était menée à température élevée et conduisait à un mélange de deux 1,2,3-triazoles (1,4- et 1,5-disubstitué, voir Schéma I.16a). Les travaux indépendants des équipes de Sharpless¹⁶⁹ et de Meldal¹⁷⁰ ont ensuite permis d'améliorer la régiosélectivité de cette réaction et d'accélérer sa vitesse (jusqu'à 10^5 fois plus rapide que la cycloaddition de Huisgen¹⁷¹), tout en éliminant la nécessité d'utiliser les températures élevées. Pour cela, un catalyseur cuivreux a été employé. La réaction a ainsi été nommée cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu(I) (« Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition », CuAAC) et a conduit à l'obtention d'un seul produit, triazole 1,4-disubstitué (Schéma I.16b) avec une grande efficacité et une purification minimale.

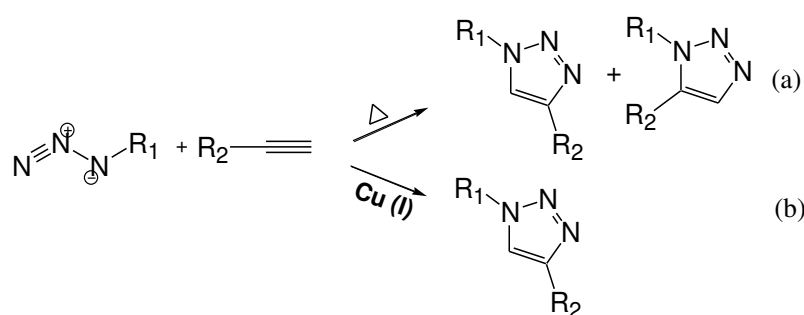


Schéma I.16. Réactions de cycloaddition azide-alcyne : a) non-catalysée, b) catalysée par Cu(I)

IV.2.1. Avantages

La réaction CuAAC possède plusieurs avantages comme par exemple un grand choix d'alcynes et d'azides organiques commerciaux pendant que d'autres peuvent être facilement synthétisés. De plus, cette réaction est inerte vis-à-vis de nombreuses fonctions, vis-à-vis de l'eau, de l'oxygène et peut être réalisée dans la plupart des conditions de synthèse organique et dans des milieux biologiques. La réaction peut ainsi être menée dans différents solvants, dans une large gamme de pH et de température^{169, 172} et peut encore être accélérée par des microondes¹⁷³ ou des ultrasons¹⁷⁴. Cependant, il faut noter que certains azides ont des propriétés explosives et se décomposent rapidement par le moindre apport d'énergie extérieure tel qu'un choc, la pression ou la chaleur ; ce qui limite l'emploi de cette réaction CuAAC à certaines applications industrielles. Ces composés explosifs sont en particulier les azides de métaux lourds ou les azides liés de façon covalente à des petites molécules organiques¹⁷⁵. En fait, pour ces derniers, c'est le rapport entre les atomes d'azote et de carbone qui est crucial ; le nombre d'atomes d'azote dans la molécule (N_N) ne doit pas dépasser le nombre d'atomes de carbone (N_C). De plus, la relation suivante entre les atomes doit être respectée : $(N_C + N_O)/N_N \geq 3$, avec N_O correspondant au nombre d'atomes d'oxygène dans la molécule¹⁷⁵.

En outre, compte tenu du caractère orthogonal de la réactivité des réactions de chimie « click », des transformations multi-étapes de type « one-pot multi-step » impliquant une étape de la chimie « click » CuAAC peuvent être réalisées dans un seul réacteur sans purification intermédiaire. Par exemple, dans le cas des sucres, les différents monosaccharides (D-glucose, D-galactose, D-mannose) ont été directement modifiés en 4 étapes, pour obtenir des glycoconjugués de triazole (Schéma I.17)¹⁷⁶. La première étape consiste à protéger des groupes hydroxyle du monosaccharide par acétylation avec de l'anhydride acétylique catalysée par des traces d'iode. Elle est suivie dans une seconde étape d'une bromolyse de l'acétate en position anomère. Ensuite, dans la troisième étape, la réaction avec l'azidure de sodium (NaN_3) conduit à la génération de la fonction azide. Finalement, lors de la dernière étape, l'ajout d'acétylène de phényle et du catalyseur cuivreux (CuSO_4 /ascorbate de sodium (NaAsc)) aboutit à la formation du triazole souhaité. Pour les trois monosaccharides utilisés, le rendement après 4 étapes de synthèse reste élevé et varie de 71% à 98%. Les auteurs ont montré également la possibilité d'obtenir des glycoconjugués plus complexes, en utilisant des alcynes multi-substitués¹⁷⁶. Une revue sur l'utilisation de réactions CuAAC pour des

transformations de type « one-pot multi-step » en chimie de polymères a été écrite par Lundberg *et al.*¹⁷⁷.

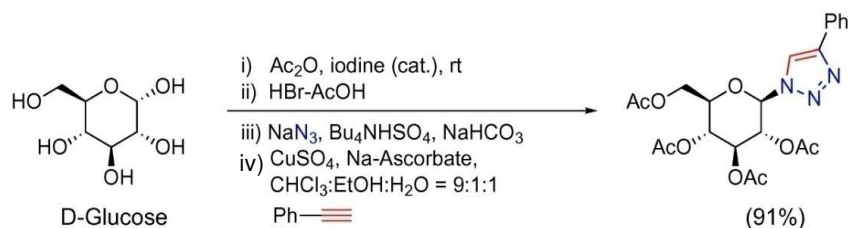


Schéma I.17. Modification de D-glucose via une transformation « one-pot multi-step » impliquant la réaction de chimie « click » CuAAC¹⁷⁶

IV.2.2. Méthodes de génération de Cu(I)

Différentes conditions catalytiques peuvent être utilisées afin de réaliser la réaction CuAAC^{172, 178, 179}. Le Cu(I) est le catalyseur de la réaction (voir mécanisme au Schéma I.18) et peut être généré de plusieurs façons : (i) utilisation directe des sels de Cu(I), (ii) formation *in situ* du Cu(I) à partir de sels de Cu(II) (soit par réduction, soit par dismutation avec Cu(0)), (iii) formation *in situ* par oxydation de Cu(0) métallique. De plus, des ligands organiques sont parfois employés afin de mieux stabiliser l'état d'oxydation du cuivre. Concernant le mécanisme proposé de la réaction « click » CuAAC^{172, 180}, il induit la formation d'un acétylure de cuivre (I) (Schéma I.18) dont la structure n'a pas pu être élucidée à cause de plusieurs interactions possibles¹⁷¹. L'abaissement de la barrière d'activation de l'alcyne, grâce à la formation de cet acétylure, induit une accélération de la réaction.

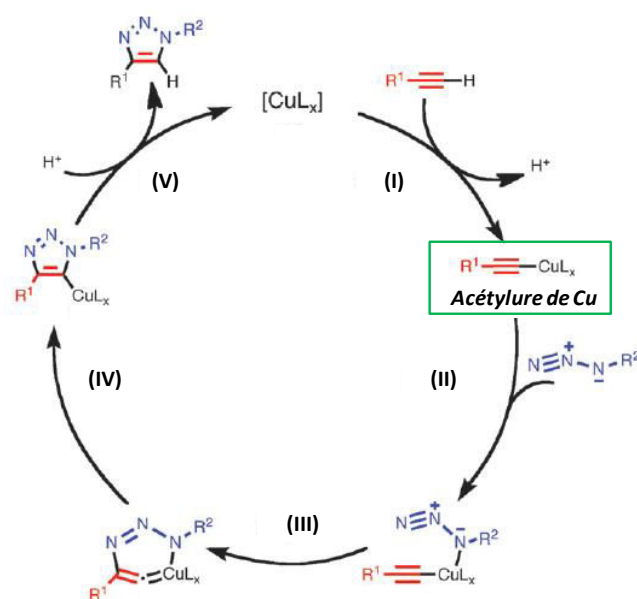


Schéma I.18. Mécanisme proposé de la réaction CuAAC¹⁸⁰

IV.2.2.1. Utilisation des sel de Cu(I)

Les sels de Cu(I) les plus couramment utilisés sont le bromure (CuBr) ou l'iodure de cuivre (CuI). Avec ce type de système catalytique, les donneurs d'électrons comme par exemple des bases azotées (telles que la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA), la *N,N,N',N',N''*-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA), la 2,2'-bipyridine, la 2,6-diméthylpyridine (2,6-lutidine)) (Figure I.6) sont souvent ajoutées pour stabiliser l'état d'oxydation du Cu(I) en le protégeant contre la dismutation ou l'oxydation. Ceci augmente alors la vitesse et le rendement de la réaction¹⁷⁹. Dans le même but, on privilège si possible l'emploi de certains solvants comme l'acétonitrile (CH₃CN).

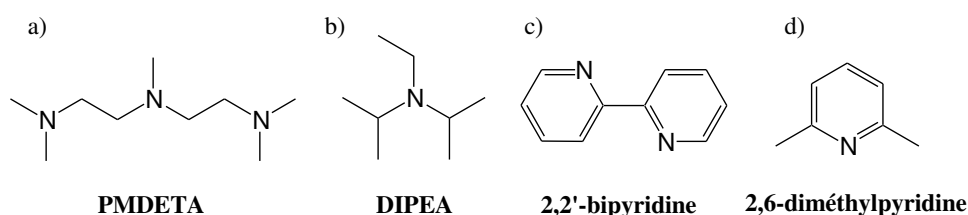


Figure I.6. Exemples de bases utilisées dans la réaction de chimie « click » CuAAC : a) *N,N,N',N',N''*-pentaméthyl-diéthylène-triamine, b) *N,N*-diisopropyléthylamine, c) 2,2'-bipyridine, d) 2,6-diméthylpyridine

Par exemple, différents alcynes terminaux ont été couplés à différents nucléosides^a substitués et porteurs de fonctions azide (voir Schéma I.19) en présence de CuI et de DIPEA, dans le mélange de solvants *t*-BuOH/H₂O/CH₃CN 1 : 1 : 1 (v/v/v). Divers composés possédant des propriétés antivirales, notamment anti-HIV, ont ainsi été obtenus¹⁸¹.

Bien que les réactions avec l'emploi de sels de Cu(I) soient le plus souvent réalisées en solution homogène, c'est-à-dire dans un seul solvant (par exemple tétrahydrofurane (THF), CH₃CN ou diméthylsulfoxyde (DMSO) ou dans un mélange de solvants miscibles (par exemple CH₃CN/H₂O), les réactions peuvent aussi être conduites à l'interface entre deux solvants non-miscibles. Par exemple, Laville *et al.*⁹¹ ont préparés des NPs polymères biodégradables en faisant réagir à l'interface CH₂Cl₂/H₂O (1 : 10, v/v) un PLA fonctionnalisé par un groupe alcyne à son extrémité (PLA α -alcyne solubilisé dans du CH₂Cl₂) et un dextrane porteur de fonctions azide (DexN₃ solubilisé en phase aqueuse). Le DexN₃ alors tensioactif se localise à l'interface de l'émulsion où se déroule la réaction entre les fonctions

^a Les nucléosides sont des glycosamines constituées d'une base azotée liée à un ribose ou à un désoxyribose via une liaison glycosidique.

azide et les fonctions alcyne du PLA. Pour cela, le CuBr (sans emploi de ligand supplémentaire) est ajouté directement à l'émulsion pour agir comme catalyseur.

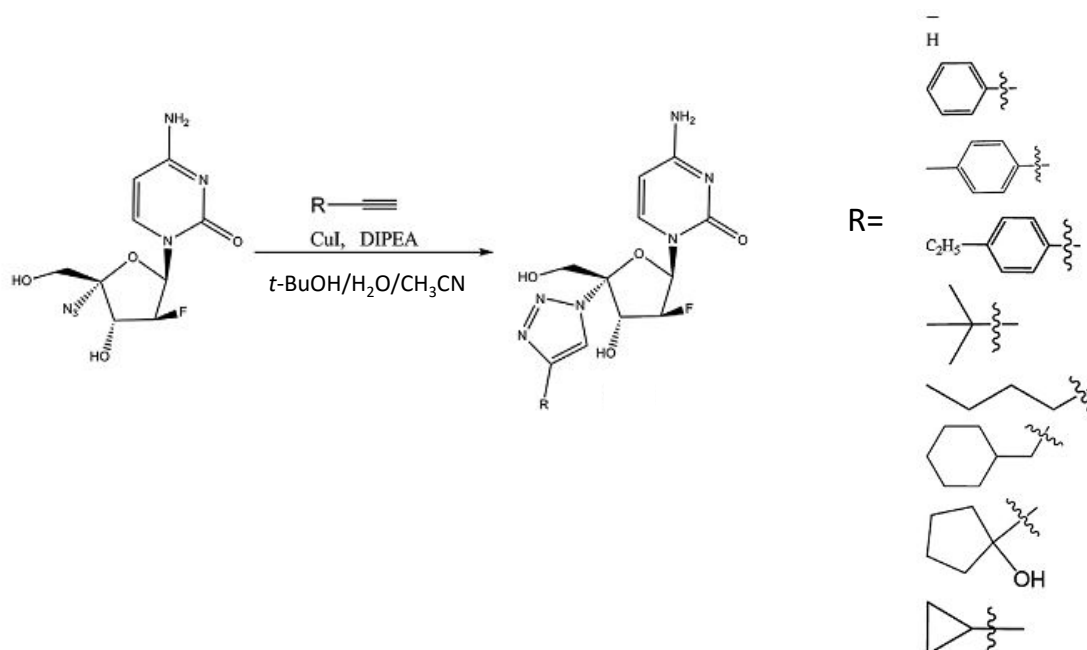


Schéma I.19. Réaction de chimie « click » CuAAC entre des alcynes terminaux et un nucléoside (1-(4'-azido-2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl) cytosine)¹⁸¹

IV.2.2.2. Génération *in situ* de Cu(I) à partir de sels de Cu(II)

La génération *in situ* de Cu(I) à partir de sels de Cu(II) peut être réalisée de deux façons : soit par réduction du Cu(II) avec un agent réducteur¹⁶⁹, soit par dismutation du Cu(II) avec du Cu(0) métallique¹⁸² (Schéma I.20).

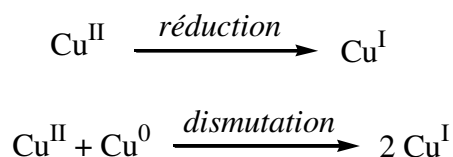


Schéma I.20. Génération de Cu(I) à partir de sels de Cu(II)

Le système sel de cuivre (II)/réducteur le plus largement utilisé est le sulfate de cuivre pentahydraté associé à l'ascorbate de sodium (NaAsc) employé comme réducteur ($CuSO_4 \cdot 5H_2O/NaAsc$)^{169, 178} (Figure I.7a). Les réactions CuAAC sont alors le plus souvent conduites dans le mélange eau/alcool, mais les mélanges eau/solvant organique (par exemple DMSO, THF ou DMF) peuvent aussi être employés et conduisent à des efficacités de réactions élevées^{172, 178}. Dans le cas de réactions en milieu biologique, NaAsc est souvent remplacé par le chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP) (Figure I.7b) comme réducteur¹⁷². Ce dernier, en plus de ses propriétés réductrices vis-à-vis du Cu(II), protège les

protéines, et plus précisément des fonctions $-SH$ de la cystéine, contre leur couplage oxydant¹⁸³.

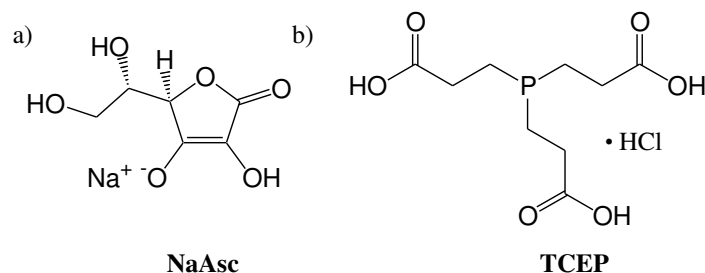


Figure I.7. Agents réducteurs utilisés dans la réaction de chimie « click » CuAAC : a) ascorbate de sodium, b) chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyle) phosphine

L'avantage des systèmes sel de cuivre(II)/réducteur est leur moindre sensibilité à l'air : le Cu(II) est en effet beaucoup moins sensible à l'air que le Cu(I) et un excès molaire de réducteur assure une réduction continue du Cu(II) en Cu(I) lors de la réaction. Tout comme la réaction CuAAC qui utilise directement les sels de Cu(I), l'emploi du système sel de Cu(II)/réducteur a le plus souvent lieu en milieu homogène comme des mélanges eau/alcool^{172, 178} mais aussi à l'interface d'une émulsion. Dans ce cas, chaque phase de l'émulsion contient des composés correctement fonctionnalisés. Ainsi, Sun *et al.*¹⁸⁴ ont obtenu un polymère greffé en faisant réagir trois polymères fonctionnels en présence de CuSO₄/NaAsc : un poly(méthacrylate de glycidyle) porteur de nombreuses fonctions azide (PGMA-N₃), un poly(éthylène glycol) éther de méthyle porteur d'une fonction alcyne terminale (MPEG-C≡CH) et un polystyrène doté lui aussi d'un alcyne terminal (PS-C≡CH) à l'interface cyclohexane/MeOH (1:4, v/v) ou cyclohexane/DMF (1:1, v/v) ou encore CH₂Cl₂/H₂O (2:1, v/v) (Schéma I.21).

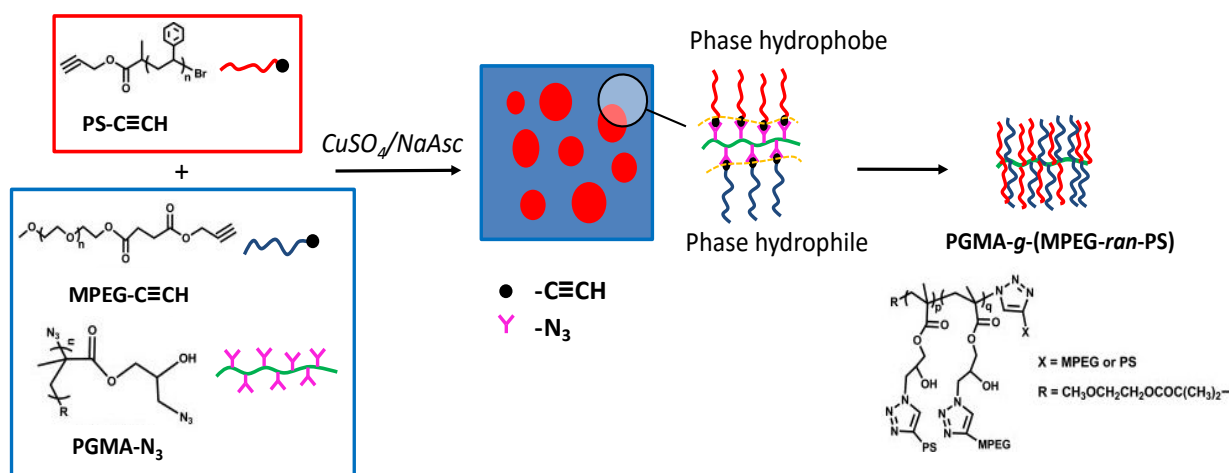


Schéma I.21. Réaction de chimie « click » CuAAC réalisée à l'interface entre deux solvant non-miscibles et catalysée par CuSO₄/NaAsc (inspiré de¹⁸⁴)

IV.2.2.3. Oxydation de Cu(0) métallique

Dans ce cas, la génération de Cu(I) se produit en général par dissolution oxydante du Cu(0) métallique (sous forme de tournures, poudre ou fil)¹⁷⁸ dans un sel chlorhydraté d'amine (par exemple du chlorhydrate de triéthylamine)¹⁸⁵ ou par dismutation avec un sel de Cu(II) (par exemple CuSO₄)¹⁸² (Schéma I.20).

Bien que la méthode d'oxydation du cuivre métallique nécessite d'utiliser des quantités plus importantes de cuivre et requiert un temps de réaction plus élevé que dans le cas précédent, des triazoles peuvent être obtenus avec des efficacités élevées¹⁸⁵. Cependant, une légère acidification du milieu réactionnel (si les sels chlorhydratés d'amine sont utilisés) peut nécessiter la protection d'autres fonctions sensibles aux conditions acides. De plus, le cuivre métallique est beaucoup plus cher que les autres sources de cuivre ce qui peut limiter son utilisation¹⁷².

IV.3. REACTIONS THIOL-ENE

Parmi les réactions de chimie « click » qui ne nécessitent pas d'utilisation de catalyseurs métalliques (« Copper-free reactions »)^{163, 186, 187}, les réactions thiol-ène sont les plus connues. Elles reposent sur le couplage entre une fonction thiol (-SH) et une double liaison C=C. Ces réactions peuvent être menées selon deux principaux mécanismes (Schéma I.22)¹⁸⁸⁻¹⁹¹: (i) un mécanisme nucléophile (ou basique ; selon la nucléophilie ou basicité du catalyseur) et (ii) un mécanisme radicalaire (photo- ou thermo-amorcé). Le premier mécanisme fait intervenir un nucléophile (ou une base) qui réagit sur une double liaison appauvrie en électrons (par exemple des monomères (méth)acrylates, maléimides, cinnamates...) (voir Paragraphe IV.3.1 à suivre). Le second mécanisme consiste en une addition radicalaire de thiols sur des doubles liaisons enrichies en électrons (voir Paragraphe IV.3.2 à suivre).

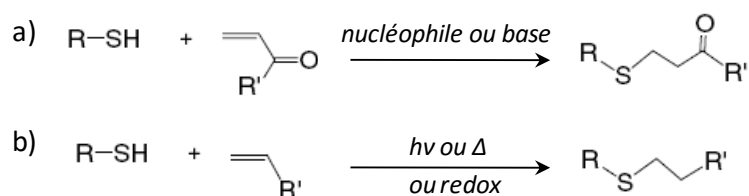


Schéma I.22. Deux principaux mécanismes de la réaction thiol-ène: a) nucléophile ou basique, b) radicalaire

Les molécules comportant des triples liaisons $C\equiv C$ peuvent également réagir avec des thiols, surtout par le mécanisme radicalaire, en présence d'un photo-amorceur. Ce type de réaction est nommé « thiol-yne » et peut conduire à l'obtention d'un produit 1,2-disubstitué si deux équivalents de thiol sont utilisés¹⁹². Les thiols peuvent aussi réagir efficacement avec d'autres types de composés¹⁸⁸ comme par exemple les époxydes (réaction thiol-époxy)¹⁹³, isocyanates (réaction thiol-isocyanate)¹⁹⁴ ou halogènes (réaction thiol-halogène)¹⁹⁵. Néanmoins, dans le présent paragraphe, notre intérêt s'est majoritairement porté sur des réactions entre les thiols et les doubles liaisons $C=C$, c'est-à-dire les réactions thiol-ène.

IV.3.1. Mécanisme nucléophile (ou basique)

Les réactions thiol-ène conduites selon le mécanisme nucléophile (également appelées réactions thiol-Michael) peuvent être catalysées par des amines (primaires ou secondaires) ou certaines phosphines tertiaires. Généralement, le nucléophile réagit sur la double liaison $C=C$ activée, en générant un fort carbanion intermédiaire qui déprotone ensuite le thiol. Ainsi un anion thiolate est formé. Ce dernier réagit sur la double liaison activée en régénérant un carbanion qui déprotone à son tour une autre molécule thiol avec la formation simultanée du produit de la réaction thiol-ène (Schéma I.23)¹⁸⁸.

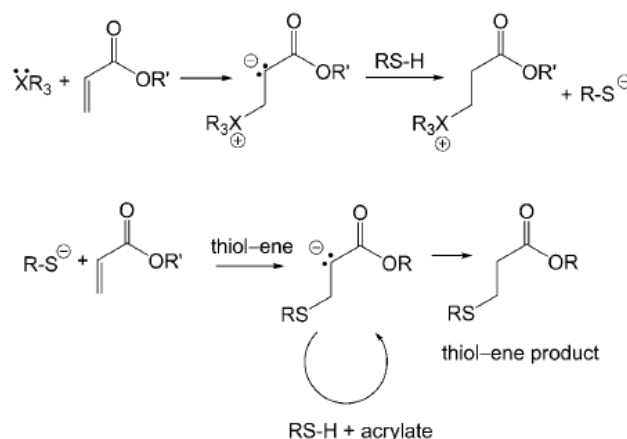


Schéma I.23. Mécanisme de la réaction thiol-ène catalysée par une molécule nucléophile (XR_3)¹⁸⁹

Le mécanisme proposé (Schéma I.23) a été confirmé par exemple par Chan *et al.*¹⁹⁶ qui ont réalisé une réaction équimolaire entre l'acrylate d'hexyle et l'hexanethiol. Trois amines différentes : primaire (hexylamine), secondaire (di-*n*-propylamine) ou tertiaire (triéthylamine) ont été testées en tant que catalyseur de la réaction conduite à température ambiante. L'amine primaire s'est avérée être le catalyseur le plus efficace (95% de rendement) par rapport à l'amine secondaire (60%) ou tertiaire (0%). Bien que les amines

utilisées soient aussi des bases, ce type de réaction ne se déroule pas selon un mécanisme basique (Schéma I.24). En effet, la réaction devrait alors être influencée par la constante de dissociation acide/base de l'amine utilisée (pK_a). Hors, cette dernière ne varie pas beaucoup entre les trois classes d'amines. L'explication des différences d'efficacité entre ces amines repose donc sur leur nucléophilie¹⁹⁶. Ces constatations ont été confirmées en parallèle par les travaux de Li *et al.*¹⁹⁷ qui ont comparé des amines primaires et tertiaires. Notons cependant que des bases plus fortes sont aussi couramment utilisées pour des réactions thiol-Michael selon le mécanisme basique comme par exemple le méthoxyde de sodium ou l'hydroxyde de benzyltriméthylammonium¹⁸⁸.

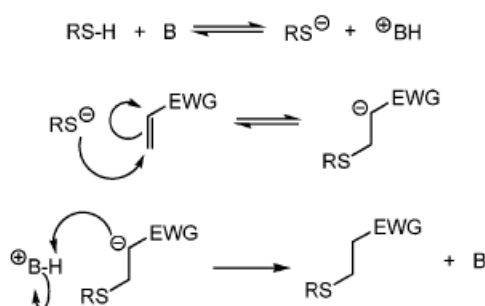


Schéma I.24. Mécanisme de la réaction thiol-ène catalysée par une base¹⁸⁸. B correspond à une base et EWG aux groupes attracteurs d'électrons (ang. Electron Withdrawing Groups)

Les phosphines tertiaires sont également de très bons catalyseurs de la réaction thiol-Michael¹⁸⁸. Des exemples de phosphines sont donnés dans la Figure I.8. Celles-ci sont moins basiques que les amines, mais plus nucléophiles. Elles engendrent donc elles aussi un mécanisme nucléophile (Schéma I.23).

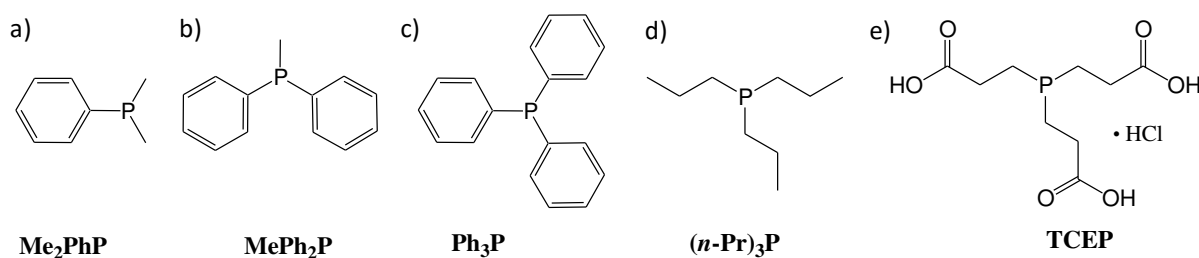


Figure I.8. Phosphines utilisées en tant que catalyseurs nucléophiles dans la réaction thiol-ène : a) diméthylphénylphosphine, b) méthyldiphénylphosphine, c) triphénylphosphine, d) tri-*n*-propylphosphine, e) chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl) phosphine

Il faut noter que l'efficacité de la réaction thiol-Michael dépend non seulement du type de catalyseur mais aussi de sa quantité. En effet, la vitesse de la réaction thiol-Michael

catalysée par une amine primaire augmente avec la concentration de l'amine¹⁹⁷. Deuxièmement, la déprotonation du thiol, notamment liée à son pK_a (le pK_a varie par exemple de 4,13 pour le 2,4,6-trinitrothiophénol jusqu'à 11,2 pour le *tert*-pentylmercaptan), est un de paramètres déterminant la vitesse de la réaction¹⁹⁸. Enfin, plus la double liaison est appauvrie en électrons, plus elle est réactive, ce qui accélère la réaction. On trouve alors le classement suivant par ordre de réactivité décroissante: maléimides > fumarates > maléates > acrylates/acrylamides > crotonate > cinnamate > méthacrylates/méthacrylamides¹⁸⁸ (Figure I.9).

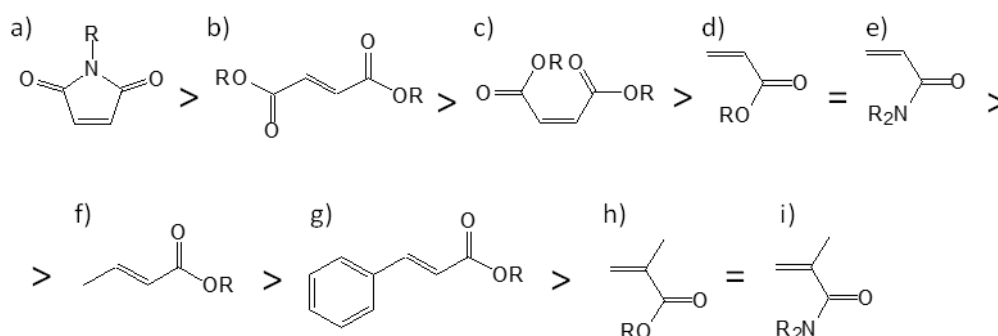


Figure I.9. Exemples de composés avec une double liaison activée utilisés dans la réaction thiol-Michael (classés selon la réactivité décroissante): a) maléimide, b) fumarate, c) maléate, d) acrylate, e) acrylamide, f) crotonate, g) cinnamate, h) méthacrylate, i) méthacrylamide

Les réactions thiol-ène nucléophiles peuvent également être menées en milieux aqueux avec des efficacités élevées¹⁹⁸. Par exemple, la *n*-hexylamine a été utilisée comme catalyseur de la réaction entre des fonctions thiol du cysteamine ou du glutathion et des fonctions méthacrylate des oligomères PEG-méthyléther méthacrylate¹⁹⁷. Dans d'autres travaux, le TCEP a été tout d'abord employé pour réduire des ponts disulfure d'un peptide. Dans une deuxième étape, réalisée dans le même réacteur, ce TCEP a servi de catalyseur nucléophile de la réaction entre des fonctions thiol du peptide et des fonctions acrylate du PEG-méthyléther acrylate^{232, 233}.

IV.3.2. Mécanisme radicalaire

Les réactions thiol-ène radicalaires consistent en l'addition radicalaire de thiols sur des doubles liaisons de préférence enrichies en électrons (par exemple alcènes ou éthers allyliques non encombrés stériquement), contrairement aux monomères utilisés pour le mécanisme thiol-ène nucléophile. Le mécanisme consiste dans un premier temps, à créer des radicaux. Ces radicaux peuvent être générés par exposition à la lumière (généralement UV, en présence d'un

photo-amorceur)¹⁹⁹, à la chaleur (en présence d'un amorceur thermique)²⁰⁰ ou encore à un système redox (oxydant/réducteur)²⁰¹. Ces différents types d'amorçage vont être discutés par la suite. Un radical réagit avec le thiol ($R_1 - SH$) et lui arrache un atome d'hydrogène pour générer un nouveau radical à centre de sulfure, dit radical thiyle ($R_1 - S^\bullet$). Ce radical peut alors réagir avec la double liaison $C=C$, en formant un radical libre à centre de carbone. Ensuite, les radicaux carbonés peuvent eux-mêmes réagir avec $R_1 - SH$ pour former le produit désiré et régénérer de nouveaux radicaux thiyles, ce qui assure la poursuite du processus. Notons que des terminaisons peuvent aussi se produire par couplage entre deux radicaux (Schéma I.25)^{188, 190}.

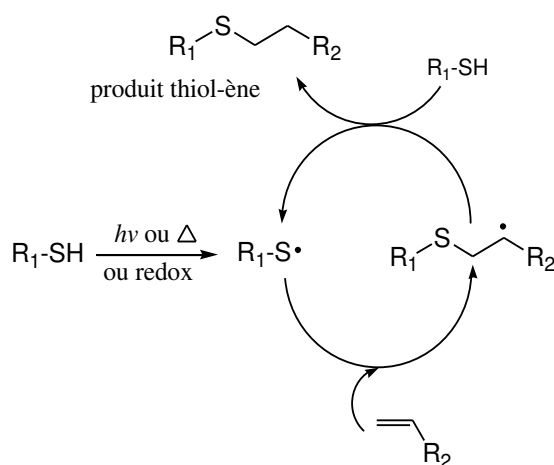


Schéma I.25. Mécanisme radicalaire de la réaction thiol-ène¹⁹¹

IV.3.2.1. Photo-amorceurs

La plupart de photo-amorceurs disponibles dans le commerce absorbe la lumière UV, c'est-à-dire entre 200 et 400 nm. Un des groupements chromophores les plus efficaces pour l'absorption de rayonnement UV est le groupement cétone aromatique (Figure I.10). La substitution de cette cétone aromatique par les groupes R_1 et R_2 influence les propriétés de ce type de photo-amorceur et le mécanisme de formation de radicaux. D'une part, selon la nature du groupe R_1 , ces radicaux peuvent être obtenus soit par clivage de l'amorceur (photo-amorceurs de type I), soit par transfert d'hydrogène du thiol (photo-amorceurs de type II). Par exemple, la substitution du R_1 par un groupement alkyle conduit aux photo-amorceurs de type I alors que celle par un groupement aromatique conduit à des photo-amorceurs de type II (voir Tableau I.5). D'autre part, le remplacement d'un hydrogène en position R_2 influence la longueur d'onde (λ) à laquelle le composé va absorber la lumière²⁰². Il est à noter que la

réaction thiol-ène peut aussi être amorcée par l'excitation directe du thiol, sans utilisation d'un photo-amorceur²⁰³. Cependant ce type d'amorçage est moins efficace que lorsqu'un photo-amorceur est ajouté au milieu réactionnel¹⁹⁰.

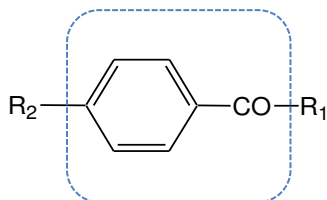


Figure I.10. Un groupement chromophore cétone aromatique

Tableau I.5. Exemples de photo-amorceurs de type cétone aromatique utilisés et disponibles dans le commerce (d'après les références^{199, 202, 204})

	Photo-amorceur	Nom commercial	Structure chimique
Type I	2,2-Diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA)	Irgacure®651 (I651)	
	2-Méthyl-1[4-méthylthio]phényl]-2-morpholinopropanone	Irgacure®907 (I907)	
	1-[4-(2-Hydroxyéthoxy)-phényl]-2-hydroxy-2-méthylpropanone	Irgacure®2959 (I2959)	
Type II	Benzophénone	Benzophénone	
	Isopropylthioxanthone	Isopropylthioxanthone	

Photo-amorceurs de type I

Dans le cas des photo-amorceurs de type I, l'exposition à la lumière suivie de l'absorption du photon provoque le clivage de la liaison CO-alkyle et conduit à deux radicaux réactifs. Dans le cas de la 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA) (voir Schéma I.26), un réarrangement du radical tertiaire provoque la formation d'un radical méthyle et de benzoate de méthyle¹⁹⁰.

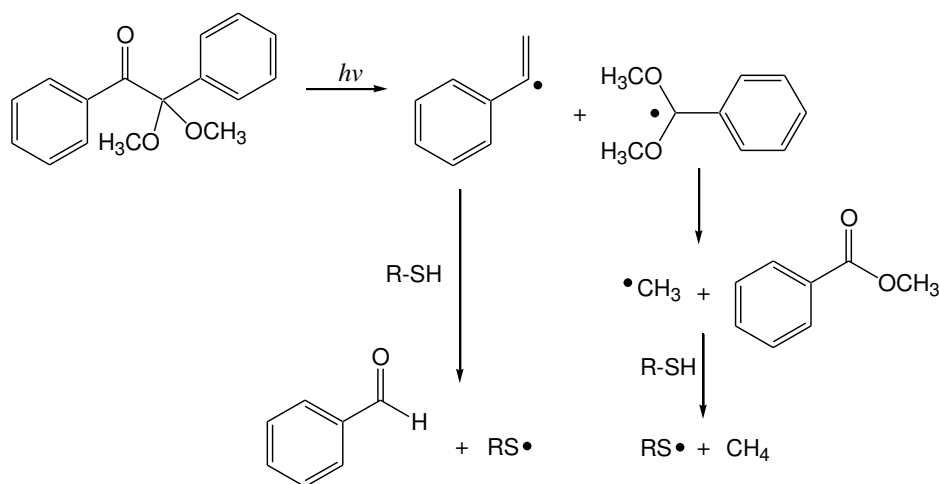


Schéma I.26. Mécanisme d'amorçage de la réaction thiol-ène en utilisant un photo-amorceur de type I, dans l'exemple du DMPA¹⁹⁰

Photo-amorceurs de type II

Pour les photo-amorceurs non-clivables (type II), des radicaux thiyles réactifs et des radicaux cétyles non-réactifs sont générés par réaction du thiol avec l'amorceur dans son état excité, notamment par le transfert d'un hydrogène du thiol à l'amorceur. Par la suite, seul le radical thiyle est suffisamment réactif. La non-réactivité des radicaux cétyles vis-à-vis la double liaison provient de leur stabilité due à leur encombrement stérique et à la délocalisation des électrons célibataires sur le noyau benzénique¹⁹⁹. L'amorçage de la réaction thiol-ène en utilisant un amorceur de type II est illustré au Schéma I.27, avec la benzophénone (BP) comme exemple. Cependant, ces photo-amorceurs de type II sont moins efficaces que ceux de type I. En effet, dans le cas des amorceurs de type II, les radicaux sont produits par réaction bimoléculaire, ce qui mène à un rendement quantique inférieur à celui obtenu avec les amorceurs de type I. D'ailleurs, dans ce deuxième cas, la durée de vie de l'amorceur à l'état excité est très courte ce qui limite l'extinction par le thiol¹⁹⁹.

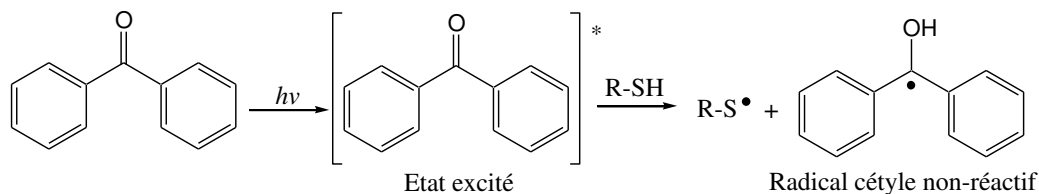


Schéma I.27. Mécanisme d'amorçage de la réaction thiol-ène en utilisant un photo-amorceur de type II. Cas de la benzophénone¹⁹⁹

IV.3.2.2. Amorceurs thermiques

Un amorceur thermique doit être relativement stable à température ambiante mais doit se décomposer rapidement à température élevée. Un paramètre caractéristique de l'amorceur thermique est son temps de demi-vie ($t_{1/2}$). Il correspond au temps nécessaire pour décomposer 50% de la quantité initiale d'amorceur à une température donnée. Parmi les amorceurs thermiques, le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) est le plus couramment utilisé pour la réaction thiol-ène^{199, 200, 205}. Cependant, d'autres composés ont aussi été employés²⁰⁰. Le Tableau I.6 présente les amorceurs thermiques courants et leur température de décomposition correspondant à un $t_{1/2}$ de 10h.

IV.3.2.3. Amorceurs redox

Les systèmes redox sont les moins utilisés dans l'amorçage des réactions thiol-ène^{201, 206} alors qu'ils sont très utilisés en polymérisation classique (par exemple dans la polymérisation des méthacrylates pour des ciments osseux ou résines dentaires²⁰⁷). Le plus souvent, le système redox est constitué d'un peroxyde organique (oxydant, par exemple le peroxyde de benzoyle, BPO) combiné avec une amine tertiaire (réducteur). La Figure I.11 présente les amines tertiaires les plus couramment employées dans ces systèmes BPO/amine.

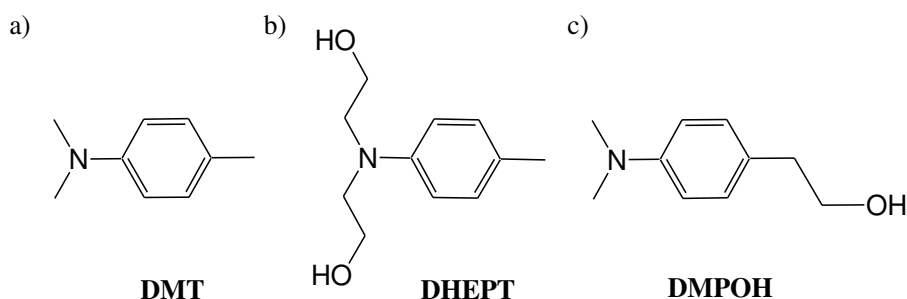


Figure I.11. Exemples d'amines tertiaires utilisées comme réducteurs dans les réactions redox : a) *N,N*-diméthyle-*p*-toluidine, b) *N,N*-bis-(2-hydroxyéthyle)-*p*-toluidine, c) alcool 4-*N,N*-diméthylaminophénylique

Tableau I.6. Exemples d'amorceurs thermiques utilisés dans la réaction thiol-ène. Les températures pour un $t_{1/2}$ de 10h sont issues du site de Sigma-Aldrich (http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Aldrich/General_Information/thermal_initiators.pdf; Accès on-line le 23 avril 2015)

Amorceur	Structure chimique et nature des radicaux formés	Température de décomposition pour $t_{1/2}=10h$ (°C)
2,2'-Azobisisobutyronitrile (AIBN)		65
1,1-Azobis(cyclohexanenitrile)		88
Peroxyde de benzoyle (BPO)		70
Peroxyde de dicumyle		115

Le mécanisme de génération de radicaux par un système BPO/amine tertiaire commence par la formation d'un complexe cyclique intermédiaire entre le BPO et l'amine. Ceci conduit à la formation d'acide benzoïque ainsi qu'à des radicaux benzoyloxy et des radicaux d'aminométhyle (Schéma I.28). Les deux types de radicaux produits peuvent démarrer la réaction thiol-ène²⁰⁷.

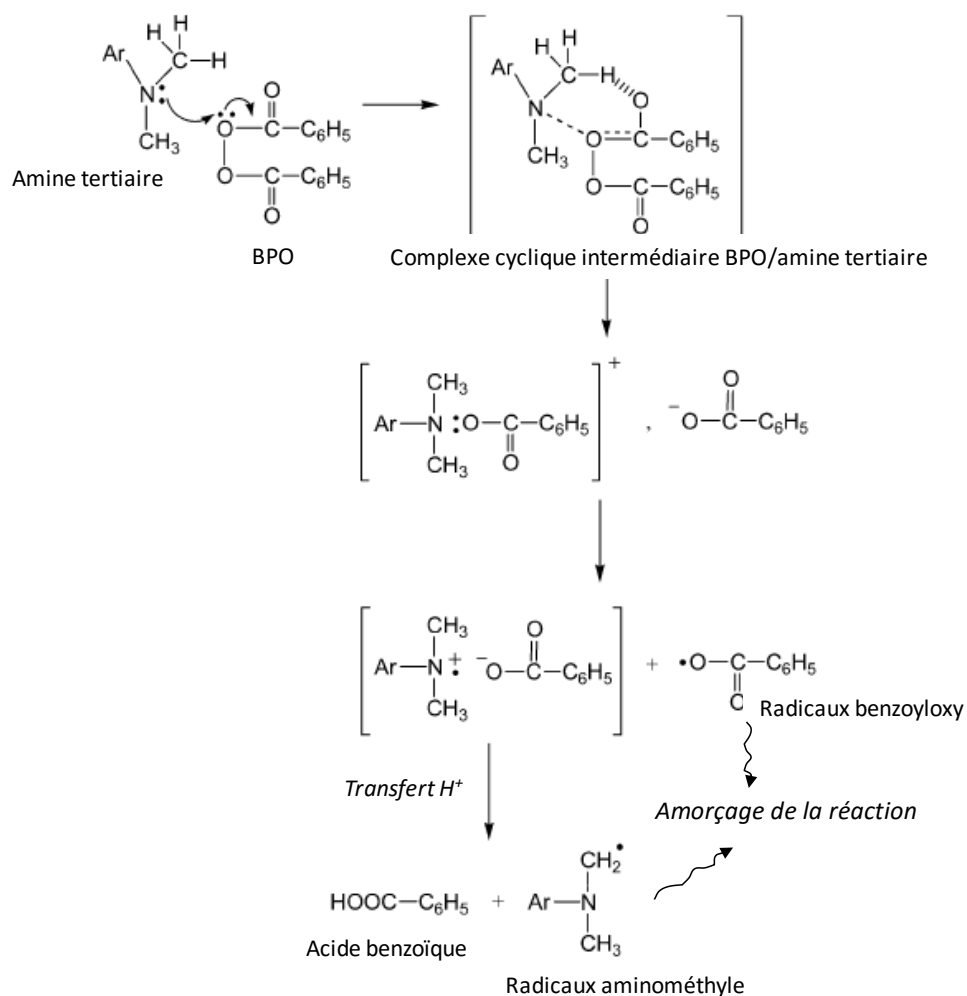


Schéma I.28. Mécanisme de formation de radicaux par un système BPO/amine tertiaire²⁰⁷

IV.4. APPLICATIONS DES REACTIONS DE CHIMIE « CLICK » A LA PREPARATION ET/OU FONCTIONNALISATION DE PARTICULES POLYMERES

De nombreuses revues ont été publiées concernant l'utilisation des réactions de chimie « click » en ingénierie macromoléculaire pour l'élaboration de : (i) matériaux polymères^{163, 171, 179, 188, 198, 208-212}, (ii) biomatériaux^{210, 213-217}, (iii) en pharmacologie^{216, 218-220} ou (iv) en nano/micro-ingénierie^{220, 221}. Ce paragraphe est focalisé surtout sur l'application de la chimie

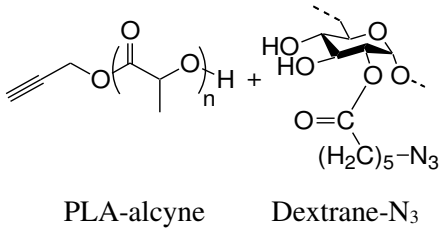
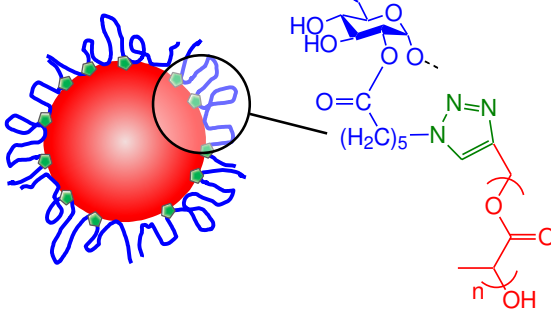
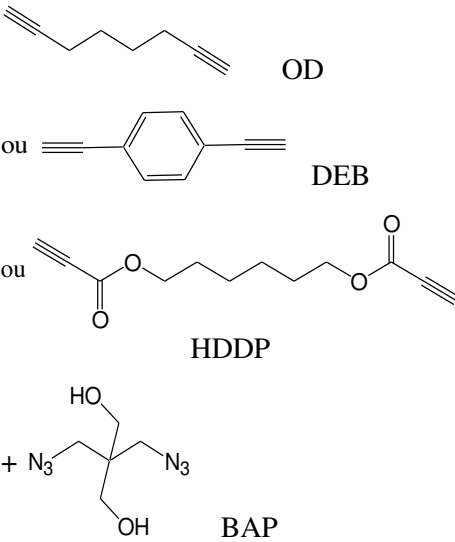
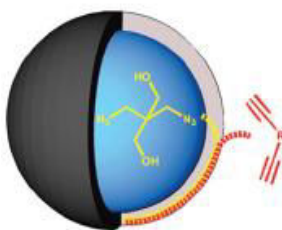
« click » (notamment des réactions CuAAC et thiol-ène) pour la synthèse et/ou la fonctionnalisation de nano/microparticules polymères.

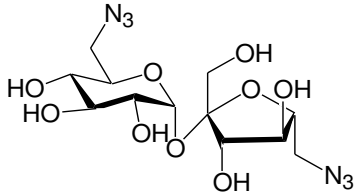
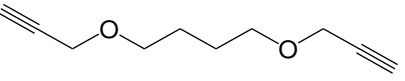
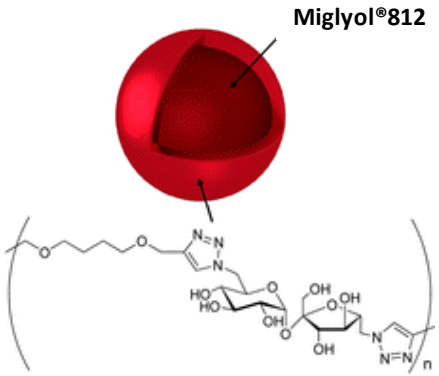
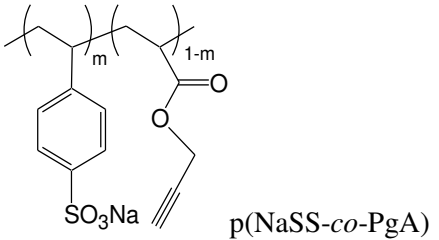
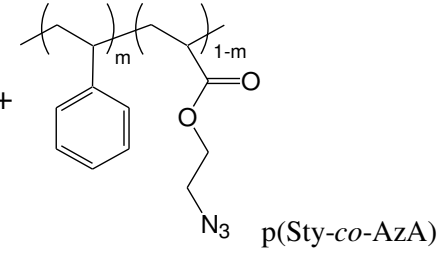
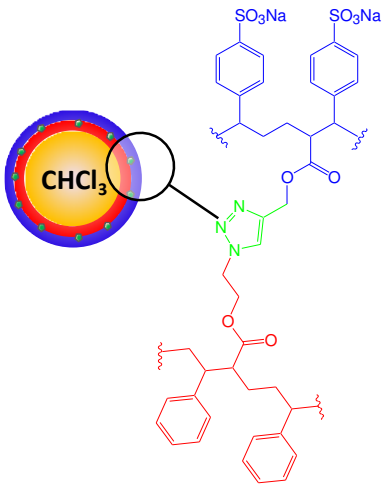
Certaines particules ont été obtenues en réalisant une réaction de chimie « click » à l'interface, c'est-à-dire entre deux solvants non-miscibles. Cependant, ces travaux sont peu nombreux car mener la réaction à l'interface pose certaines difficultés, notamment liées à l'accessibilité des fonctions réactives ou du catalyseur à l'interface. Dans les Paragraphes III.3.1.1. et III.3.2, nous avons déjà cité les travaux sur élaboration de capsules en réalisant une réaction de chimie « click » à l'interface^{153, 154, 165-168} ; et à notre connaissance cette recherche bibliographique était exhaustive. Ces références peuvent être complétées par les recherches de Laville *et al.*⁹¹ sur l'utilisation de réaction « click » CuAAC lors de l'élaboration de NSs. Tous ces travaux mentionnés ci-dessus sont présentés dans le Tableau I.7.

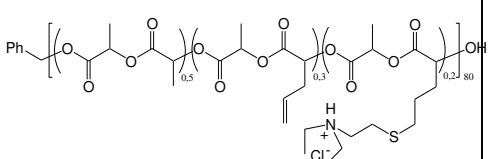
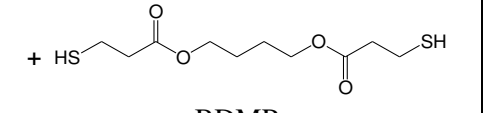
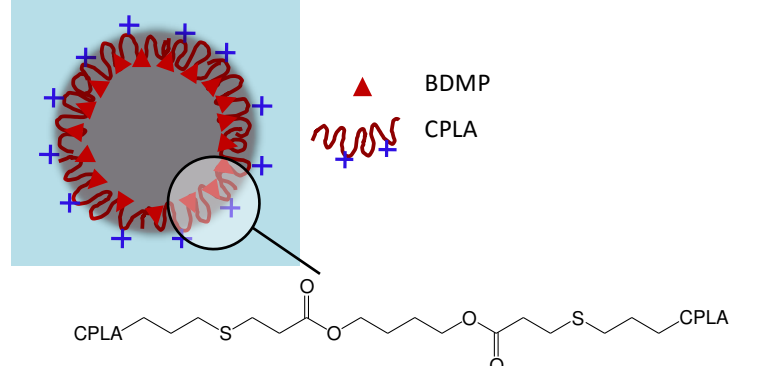
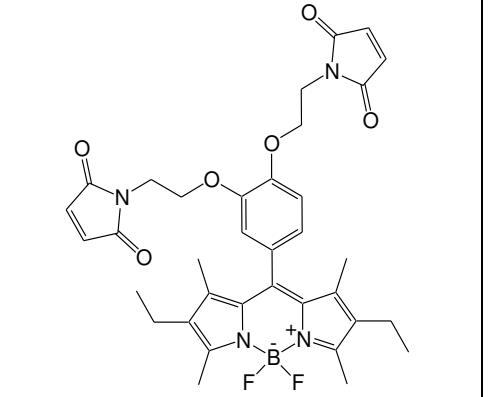
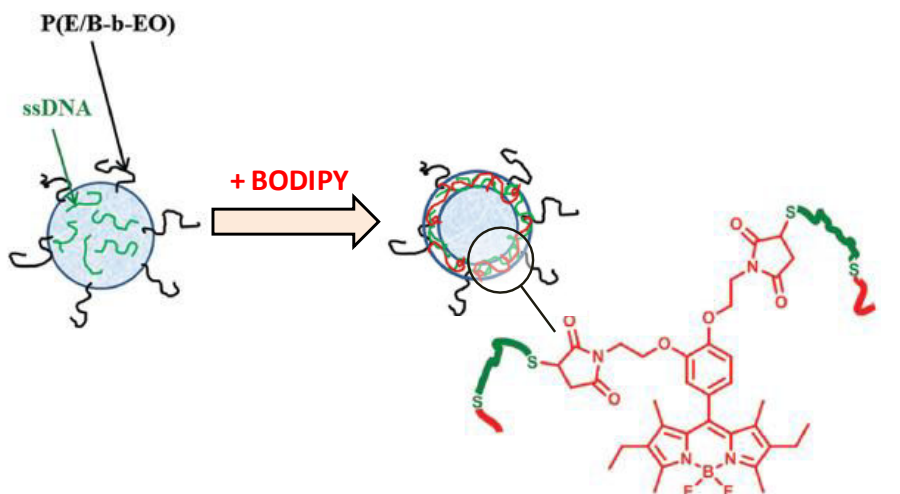
Pour l'élaboration de particules polymères, l'utilisation des réactions « click » entre deux composés présents dans la même phase, c'est-à-dire menées en milieu homogène^{128, 222-225}, est plus courante que l'emploi de ces réactions à l'interface (voir des exemples dans le Tableau I.7). Les réactions « click » sont plus particulièrement utilisées au cours d'un procédé d'élaboration de capsules couche-par-couche sur des templates dur^{128, 225-227} car elles permettent d'éviter l'emploi de polyélectrolytes dont certains sont potentiellement cytotoxiques¹²⁸.

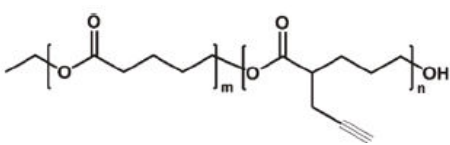
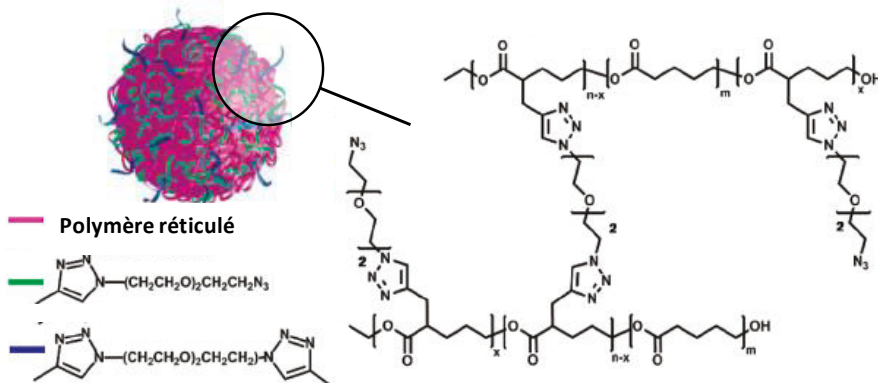
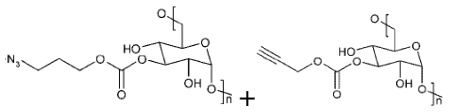
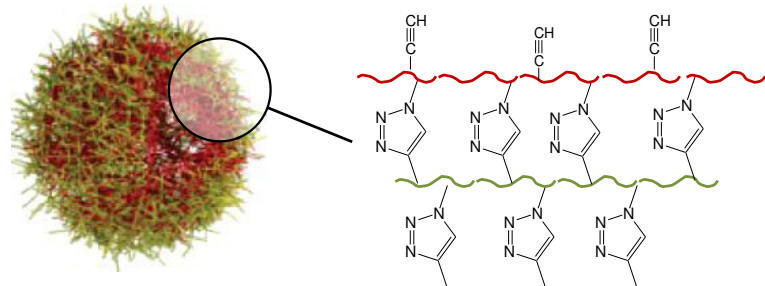
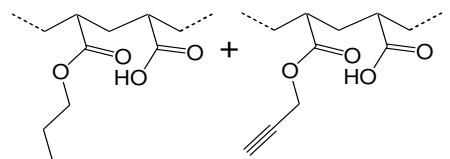
De même, les réactions « click », surtout de type CuAAC, sont largement employées dans la post-fonctionnalisation de particules (voir quelques exemples dans le Tableau I.7). Les objets sont fonctionnalisés par exemple par des molécules fluorescentes¹⁵⁰, des ligands bioactifs (par exemple des vitamines²²⁸, anticorps²²⁹ ou peptides²³⁰) ou des nanoparticules métalliques²²⁸. Néanmoins, les réactions de type thiol-ène ont aussi été employées par exemple pour fonctionnaliser des NSs polymères avec des molécules de ciblage pour des applications thérapeutiques²³¹.

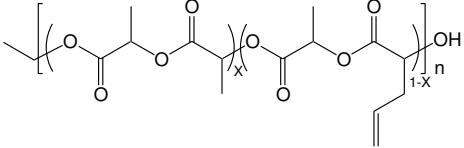
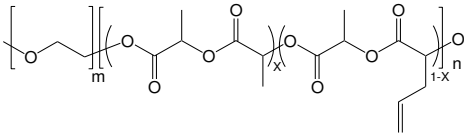
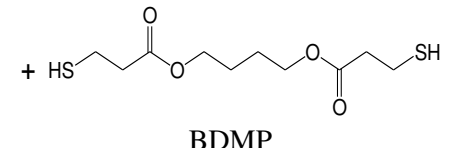
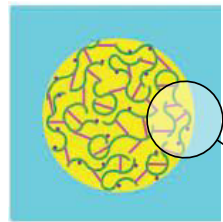
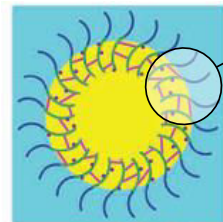
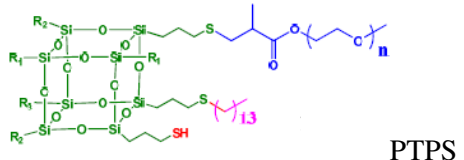
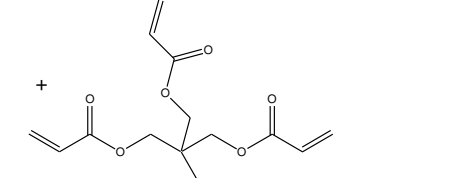
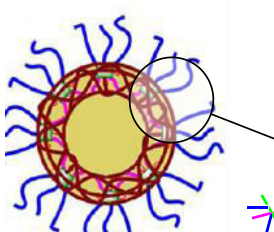
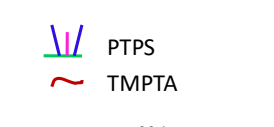
Tableau I.7. Application des réactions de chimie « click » à la synthèse et/ou la fonctionnalisation de particules polymères (NSs = nanosphères, NCs = nanocapsules, MCs = microcapsules)

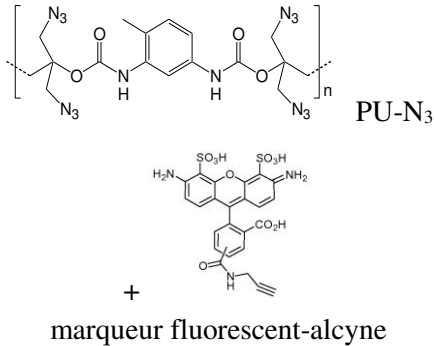
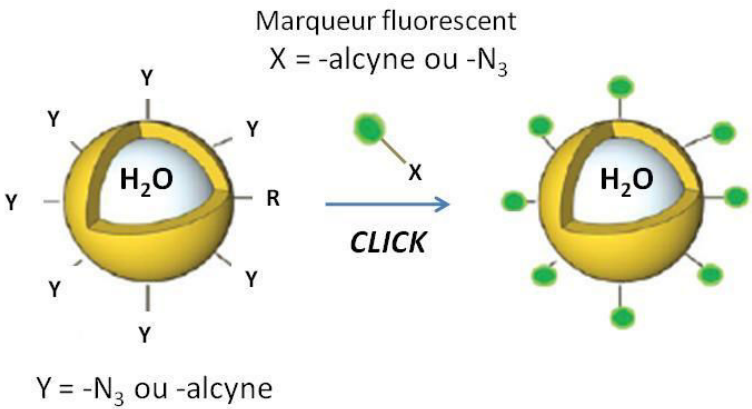
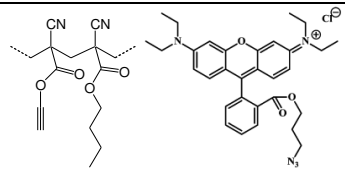
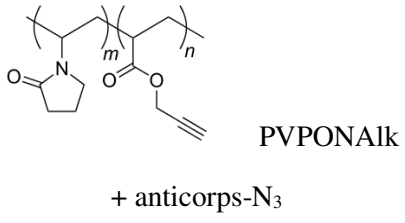
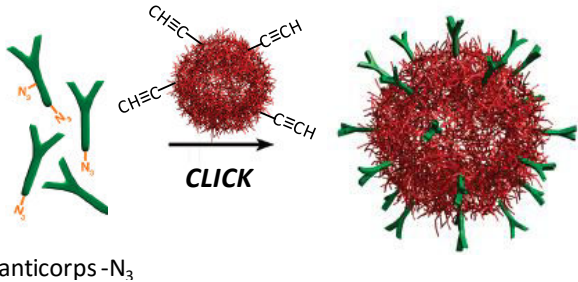
	Polymères utilisés	Produit formé	Objets formés	Chimie « click », catalyseur, milieu réactionnel	Réf.
CLICK à l'interface	 PLA-alkyne Dextrane-N₃		NSs	CuAAC CuBr CH ₂ Cl ₂ /eau	91
	 OD ou DEB ou HDDP + BAP	 Référence¹⁵³	NCs à cœur aqueux	CuAAC CuBr ₂ /BA ₆ TREN utilisé comme ligand/SnOct ₂ Eau/cyclohexane	153

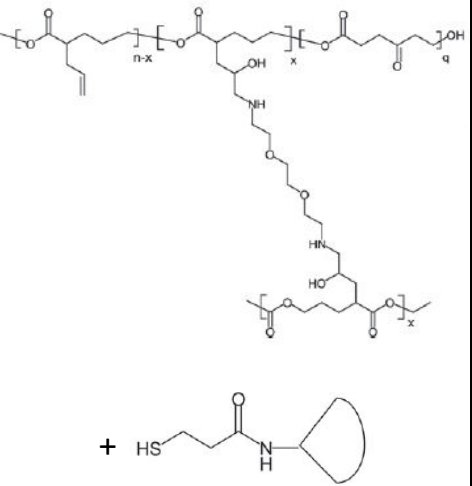
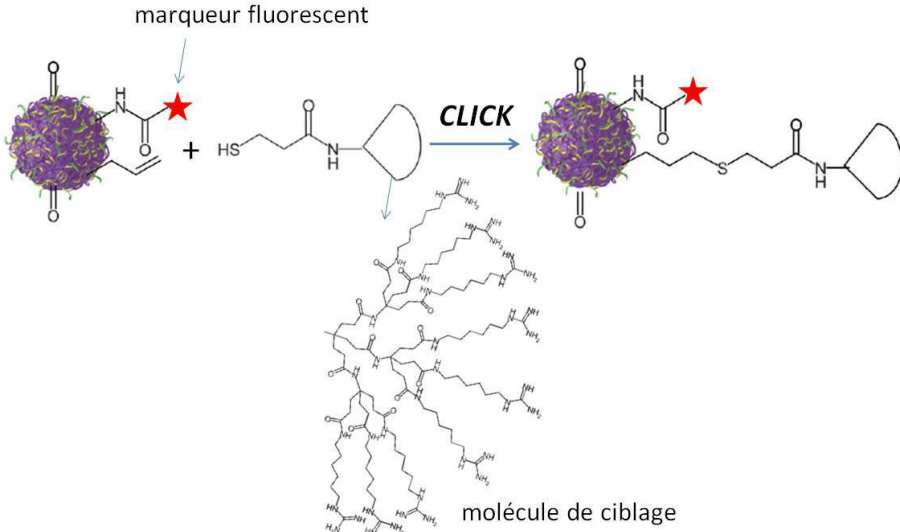
	Polymères utilisés	Produit formé	Objets formés	Chimie « click », catalyseur, milieu réactionnel	Réf.
CLICK à l'interface	 6,6'-diazido-6,6'-dideoxysucrose +  bis(propargyloxy) butane	 Miglyol®812 Référence¹⁵⁴	NCs à cœur Miglyol®812	CuAAC CuSO ₄ /AAsc Miglyol®812/eau	154
	 p(NaSS-co-PgA) +  p(Sty-co-AzA)	 CHCl₃	MCs à cœur CHCl ₃	CuAAC CuSO ₄ /AAsc CHCl ₃ /eau	165, 166

	Polymères utilisés	Produit formé	Objets formés	Chimie « click », catalyseur, milieu réactionnel	Réf.
CLICK à l'interface	 CPLA + BDMP 	 BDMP CPLA CPLA-CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂-C(=O)-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(=O)-S-CH₂-CH₂-CPLA	NCs à cœur vide	Thiol-ène DMPA, UV CHCl ₃ /eau	168
	 marqueur fluorescent BODIPY-maleimide + HS-DNA-SH	 P(E/B-b-EO) ssDNA + BODIPY Adapté de la référence¹⁶⁷	NCs à cœur aqueux	Thiol-ène Sans catalyseur Eau/CH ₂ Cl ₂	167

	Polymères utilisés	Produit formé	Objets formés	Chimie « click », catalyseur, milieu réactionnel	Réf.
CLICK en milieu homogène	 P(VL-co-PVL) + 1,8-diazide-3,5-dioxaoctane	 Polymère réticulé Adapté de la référence²²²	NSs	CuAAC CuBr DMF	222
	 Dextrane-N₃ Dextrane-alkyne	 Dextrane-N₃ ou PAA-N₃ Dextrane-alkyne ou PAA-alkyne Adapté de la référence²²⁵	MCs à cœur vide	CuAAC CuSO ₄ /NaAsc Eau	225, 128
	 PAA-N₃ PAA-alkyne				

CLICK en milieu homogène	 PLA-alcène ou  ou (PLA-<i>b</i>-PEO)-alcène  BDMP	  Adapté de la référence²²³	NSs et NCs à cœur hexadécane	Thiol-ène DMPA, UV (Acétate de <i>n</i> -butyle + hexadécane)/eau (Réaction dans la phase organique)	223
	 PTPS  TMPTA	  Adapté de la référence²²⁴	MCs à cœur vide	Thiol-ène Irgacure®907, UV Toluène/eau (Réaction dans la phase organique)	224

	Polymères utilisés	Produit formé	Objets formées	Chimie « click », catalyseur, milieu réactionnel	Réf.
FONCTIONNALISATION de NPs	 PU-N₃ + marqueur fluorescent-alkyne	 Marqueur fluorescent X = -alkyne ou -N₃ Y = -N₃ ou -alkyne <i>Adapté de la référence¹⁵⁰</i>	NCs à cœur aqueux	CuAAC CuBr ₂ /PMDETA/AAAsc EtOH/eau	150
	 P(BCA-co-PCA) + marqueur fluorescent-N₃	<i>Adapté de la référence²²⁹</i>			
	 PVPONAik + anticorps-N₃	 anticorps-N₃ <i>Adapté de la référence²²⁹</i>	NCs à cœur vide	CuAAC CuSO ₄ / NaAsc PBS	229

	Polymères utilisés	Produit formé	Objets formés	Chimie « click », catalyseur, milieu réactionnel	Réf.
FONCTIONNALISATION de NPs	 transporteur moléculaire dendritique	 marqueur fluorescent CLICK molécule de ciblage Adapté de la référence²³¹	NSs	Thiol-ène 37°C Méthanol	231

PLA : polylactide, BODIPY : marqueur fluorescent, DNA : acide désoxyribonucléique, OD : 1,7-octadiyne, DEB : 1,4-diethynyl benzene, HDDP : 1,6-hexanediol dipropiolate, BAP : 2,2-bis(azidométhylène)-1,3-propanediol, CPLA : polylactide sous forme cationique, BDMP : 1,4-butanediol bis(3-mercaptopropionate), p(NaSS-co-PgA) : poly(styrène sulfonate de sodium-co-acrylate de propargyl), p(Sty-co-AzA) : poly(styrène-co-acrylate de 2-azidoéthyle), P(VL-co-PVL) : poly(α -allyl- δ -valerolactone-co- α -propargyl- α -valerolactone), PLA-b-PEO : polylactide-b-poly(oxyde d'éthylène), PAA : poly(acide acrylique), PTPS : silsesquioxane oligomère polyédrique amphiphile contenant des groupes thiol, TMPTA : triacrylate de triméthylolpropane, PU : polyuréthane, P(BCA-co-PCA) : poly(cyanoacrylate de butyle -co- cyanoacrylate de propargyle), PVPONAlk : poly(N-vinylpyrrolidone-ran-acrylate de propargyle), PBS : un tampon phosphate salin.

V. CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Deux types de nanoparticules (NPs) polymères peuvent être distingués selon leur morphologie : les nanosphères (NSs) de structure matricielle et les nanocapsules (NCs) de type cœur (liquide, solide ou vide)/écorce.

Dans cette étude bibliographique, notre intérêt s'est majoritairement porté sur les NCs et particulièrement sur celles à cœur liquide. Ces dernières, grâce à une grande capacité d'encapsulation de substances actives (SA) de différentes polarités, sont largement employées pour la délivrance par exemple de médicaments, de parfums, de pesticides, d'huiles essentielles ou alimentaires, etc. Plusieurs procédés ont été développés pour élaborer des NCs polymères à cœur liquide. Ces méthodes peuvent être classées en trois groupes principaux : (i) ségrégation de phases entre le cœur liquide et le polymère (généralement préformé ou formé *in situ* par polymérisation), qui constituera au final l'écorce de la NC. Ceci aboutit à la précipitation du polymère autour du cœur liquide ; (ii) déposition (ou précipitation) d'un polymère préformé en surface d'un nano-template dur ou mou et (iii) réactions à l'interface liquide/liquide de nanogouttelettes d'une émulsion.

Afin d'éviter certains inconvénients des méthodes précédemment citées, notamment le risque d'avoir des traces de monomères souvent toxiques (cas de polymérisation menée *in situ*), les procédures laborieuses nécessitant plusieurs lavages (cas de l'adsorption couche-par-couche de polyélectrolytes de charges opposées) ou encore les problèmes de contrôle de la morphologie de nano-objets (formés par ségrégation de phases entre l'huile et le polymère), il est possible de combiner deux types de procédés. Ainsi, une réaction interfaciale, menée entre deux polymères préformés (ou entre un polymère préformé et une petite molécule) peut être réalisée au cours d'un procédé d'élaboration de capsules par ségrégation de phases. Afin d'assurer un couplage efficace entre ces polymères, la chimie « click » est le plus souvent utilisée.

Dans la suite de cette étude bibliographique, nous nous sommes donc intéressés à la chimie « click » qui regroupe différentes réactions de chimie organique caractérisées par leur haute sélectivité, leurs rendements élevés, leur courte durée de réaction et des conditions douces d'utilisation. Nous avons particulièrement détaillé deux grands types de réactions de chimie « click », les cycloadditions azide-alcyne catalysées par Cu(I) (CuAAC) et les réactions de type thiol-ène.

Enfin, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'utilisation de la chimie « click » pour la préparation et la fonctionnalisation de différents objets particuliers. Ainsi, cette étude bibliographique a montré l'intérêt d'utilisation de réactions de chimie « click » menées *in situ*, à l'interface lors d'un procédé classique d'élaboration de nano-objets.

Par la suite, nous allons donc chercher à développer des NCs à cœur huileux/écorce polymère biodégradable (PLA) et recouvertes de polysaccharide (dextrane) en combinant un procédé d'émulsion-évaporation de solvant avec une réaction de chimie « click » réalisée *in situ* à l'interface liquide/liquide.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Moinard-Checot, D.; Chevalier, Y.; Briancon, S.; Fessi, H.; Guinebretiere, S., Nanoparticles for drug delivery: Review of the formulation and process difficulties illustrated by the emulsion-diffusion process. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2006**, 6, (9-10), 2664-2681.
2. Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* **2001**, 70, 1-20.
3. Matalanis, A.; Jones, O. G.; McClements, D. J., Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids* **2011**, 25, (8), 1865-1880.
4. Saravanakumar, G.; Jo, D. G.; Park, J. H., Polysaccharide-Based Nanoparticles: A Versatile Platform for Drug Delivery and Biomedical Imaging. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, 19, (19), 3212-3229.
5. Liu, Z.; Jiao, Y.; Wang, Y.; Zhou, C.; Zhang, Z., Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, 60, (15), 1650-1662.
6. Elzoghby, A. O.; Samy, W. M.; Elgindy, N. A., Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2012**, 161, (1), 38-49.
7. Elzoghby, A. O., Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *Journal of Controlled Release* **2013**, 172, (3), 1075-1091.
8. Dash, T. K.; Konkimalla, V. B., Poly-E-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release* **2012**, 158, (1), 15-33.
9. Chiellini, E.; Covolan, V. L.; Orsini, L. M.; Solaro, R., Polymeric nanoparticles based on polylactide and related copolymers. *Macromolecular Symposia* **2003**, 197, (1), 345-354.
10. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J. M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Preat, V., PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* **2012**, 161, (2), 505-522.
11. Nicolas, J.; Couvreur, P., Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2009**, 1, (1), 111-127.
12. Pinto Reis, C.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2006**, 2, (1), 8-21.
13. Vauthier, C.; Bouchemal, K., Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* **2009**, 26, (5), 1025-1058.
14. Keum, C.-G.; Noh, Y.-W.; Baek, J.-S.; Lim, J.-H.; Hwang, C.-J.; Na, Y.-G.; Shin, S.-C.; Cho, C.-W., Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *International Journal of Nanomedicine* **2011**, 6, 2225-2234.
15. Gavory, C.; Durand, A.; Six, J. L.; Nouvel, C.; Marie, E.; Leonard, M., Polysaccharide-covered nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 84, (1), 133-140.

16. Konan, Y. N.; Cerny, R.; Favet, J.; Berton, M.; Gurny, R.; Allemann, E., Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2003**, 55, (1), 115-124.
17. Wilson, B.; Ambika, T. V.; Dharmesh Kumar Patel, R.; Jenita, J. L.; Priyadarshini, S. R. B., Nanoparticles based on albumin: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, 51, (5), 874-878.
18. Landfester, K.; Musyanovych, A.; Mailaender, V., From Polymeric Particles to Multifunctional Nanocapsules for Biomedical Applications Using the Miniemulsion Process. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **2010**, 48, (3), 493-515.
19. Rao, J. P.; Geckeler, K. E., Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* **2011**, 36, (7), 887-913.
20. Moraes, C. M.; de Matos, A. P.; de Paula, E.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F., Benzocaine loaded biodegradable poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. *Materials Science and Engineering: B* **2009**, 165, (3), 243-246.
21. Kshirsagar, S. J.; Bhalekar, M. R.; Patel, J. N.; Mohapatra, S. K.; Shewale, N. S., Preparation and characterization of nanocapsules for colon-targeted drug delivery system. *Pharmaceutical Development And Technology* **2012**, 17, (5), 607-613.
22. Woranuch, S.; Yoksan, R., Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 96, (2), 578-585.
23. Hosseini, S. F.; Zandi, M.; Rezaei, M.; Farahmandghavi, F., Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 95, (1), 50-56.
24. Zambrano-Zaragoza, M. L.; Mercado-Silva, E.; Gutierrez-Cortez, E.; Castano-Tostado, E.; Quintanar-Guerrero, D., Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion-diffusion method for food applications. *Lwt-Food Science and Technology* **2011**, 44, (6), 1362-1368.
25. Choi, M.-J.; Ruktanonchai, U.; Sootitawat, A.; Min, S.-G., Morphological characterization of encapsulated fish oil with B-cyclodextrin and polycaprolactone. *Food Research International* **2009**, 42, 989-997.
26. Anton, N.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P., Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. *Journal of Controlled Release* **2008**, 128, (3), 185-199.
27. Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C., Nanocapsule technology: A review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **2002**, 19, (2), 99-134.
28. Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A., Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, 385, (1-2), 113-142.
29. Anton, N.; Saulnier, P.; Gaillard, C.; Porcher, E.; Vrignaud, S.; Benoit, J. P., Aqueous-Core Lipid Nanocapsules for Encapsulating Fragile Hydrophilic and/or Lipophilic Molecules. *Langmuir* **2009**, 25, (19), 11413-11419.
30. Nordstierna, L.; Abdalla, A. A.; Nordin, M.; Nyden, M., Comparison of release behaviour from microcapsules and microspheres. *Progress in Organic Coatings* **2010**, 69, (1), 49-51.
31. Dowding, P. J.; Atkin, R.; Vincent, B.; Bouillot, P., Oil core-polymer shell microcapsules prepared by internal phase separation from emulsion droplets. I. Characterization and release rates for microcapsules with polystyrene shells. *Langmuir* **2004**, 20, (26), 11374-11379.
32. Vrignaud, S.; Benoit, J. P.; Saulnier, P., Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, 32, (33), 8593-8604.
33. Zhu, Y. Y.; Zhang, G. Y.; Hong, X. L.; Dong, J. F.; Xia, B. L., Influence of emulsifiers on the synthesis of insulin-loaded nanocapsules in double emulsion. *Chinese Journal of Chemistry* **2006**, 24, (1), 109-113.
34. Khoei, S.; Yaghoobian, M., An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 44, (6), 2392-2399.
35. Keawchaon, L.; Yoksan, R., Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, 84, (1), 163-171.

36. Lertsutthiwong, P.; Noomun, K.; Jongaroonngamsang, N.; Rojsitthisak, P.; Nimmannit, U., Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers* **2008**, 74, (2), 209-214.
37. Strickley, R., Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharmaceutical Research* **2004**, 21, (2), 201-230.
38. Gaudin, F.; Sintez-Zydowicz, N., Core-shell biocompatible polyurethane nanocapsules obtained by interfacial step polymerisation in miniemulsion. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, 331, (1-2), 133-142.
39. Romio, A. P.; Bernardy, N.; Senna, E. L.; Araujo, P. H. H.; Sayer, C., Polymeric nanocapsules via miniemulsion polymerization using redox initiation. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2009**, 29, (2), 514-518.
40. Romio, A. P.; Sayer, C.; Araujo, P. H. H.; Al-Haydari, M.; Wu, L. B.; da Rocha, S. R. P., Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization with Biodegradable Surfactant and Hydrophobe. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2009**, 210, (9), 747-751.
41. Grillo, R.; dos Santos, N. Z. P.; Maruyama, C. R.; Rosa, A. H.; de Lima, R.; Fraceto, L. F., Poly(E-caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials* **2012**, 231-232, 1-9.
42. Clemente, Z.; Grillo, R.; Jonsson, M.; Santos, N. Z. P.; Feitosa, L. O.; Lima, R.; Fraceto, L. F., Ecotoxicological Evaluation of Poly(epsilon-Caprolactone) Nanocapsules Containing Triazine Herbicides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2013**, 14, (7), 4911-4917.
43. Zili, Z.; Sfar, S.; Fessi, H., Preparation and characterization of poly-E-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, 294, (1-2), 261-267.
44. Cauchetier, E.; Deniau, M.; Fessi, H.; Astier, A.; Paul, M., Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, 250, (1), 273-281.
45. Esmaeili, A.; Saremnia, B., Preparation of extract-loaded nanocapsules from Onopordon leptolepis DC. *Industrial Crops and Products* **2012**, 37, (1), 259-263.
46. Esmaeili, A.; Saremnia, B.; Koochian, A.; Rezazadeh, S., Mechanism of nanocapsules of Matricaria recutita L. extract formation by the emulsion-diffusion process. *Superlattices and Microstructures* **2011**, 50, (4), 340-349.
47. Steinmacher, F. R.; Bernardy, N.; Moretto, J. B.; Barcelos, E. I.; Araujo, P. H. H.; Sayer, C., Kinetics of MMA and VAc Miniemulsion Polymerizations Using Miglyol and Castor Oil as Hydrophobe and Liquid Core. *Chemical Engineering & Technology* **2010**, 33, (11), 1877-1887.
48. Benita, S.; Martini, M.-C.; Orecchioni, A.-M.; Seiller, M., *Microencapsulation: methods and industrial applications. Chapter 8: Manufacture, Characterization, and Applications of Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems*. 2 nd ed.; Taylor & Francis Group: New York, London, 2006; Vol. 158, p 213-267.
49. Wang, Y.; Zhang, Y.; Xia, T.; Zhao, W.; Yang, W., Effects of fabricated technology on particle size distribution and thermal properties of stearic-eicosanoic acid/polymethylmethacrylate nanocapsules. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **2014**, 120, Part B, (0), 481-490.
50. Luo, Y. W.; Zhou, X. D., Nanoencapsulation of a hydrophobic compound by a miniemulsion polymerization process. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **2004**, 42, (9), 2145-2154.
51. Almeida, J. S.; Jezur, L.; Fontana, M. C.; Paese, K.; Silva, C. B.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Beck, R. C. R., Oil-Based Nanoparticles Containing Alternative Vegetable Oils (Grape Seed Oil and Almond Kernel Oil): Preparation and Characterization. *Latin American Journal of Pharmacy* **2009**, 28, (2), 165-172.
52. Bouchemal, K.; Briancon, S.; Perrier, E.; Fessi, H., Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 280, (1-2), 241-251.
53. Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barratt, G., Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of pharmaceutical sciences* **2000**, 89, (5), 614-626.

54. Kothamasu, P.; Kanumur, H.; Ravur, N.; Maddu, C.; Parasuramrajam, R.; Thangavel, S., Nanocapsules: The Weapons for Novel Drug Delivery Systems. *BioImpacts* **2012**, 2, (2), 71-81.
55. Benita, S.; Martini, M.-C.; Orecchioni, A.-M.; Seiller, M., *Microencapsulation: methods and industrial applications. Chapter 21: Cosmetic Applications of Colloidal Delivery Systems*. 2nd ed.; Taylor & Francis Group: New York, London, 2006; Vol. 158, p 707-747.
56. Kakran, M.; Antipina, M. N., Emulsion-based techniques for encapsulation in biomedicine, food and personal care. *Current Opinion in Pharmacology* **2014**, 18, 47-55.
57. Sekhon, B. S., Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science and Applications* **2014**, 7, 31-53.
58. Peteu, S. F.; Oancea, F.; Sicuia, O. A.; Constantinescu, F.; Dinu, S., Responsive Polymers for Crop Protection. *Polymers* **2010**, 2, (3), 229-251.
59. Cosco, D.; Paolino, D.; De Angelis, F.; Cilurzo, F.; Celia, C.; Di Marzio, L.; Russo, D.; Tsapis, N.; Fattal, E.; Fresta, M., Aqueous-core PEG-coated PLA nanocapsules for an efficient entrapment of water soluble anticancer drugs and a smart therapeutic response. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, 89, 30-39.
60. Santos, S. S.; Lorenzoni, A.; Pegoraro, N. I. S.; Denardi, L. B.; Alves, S. H.; Schaffazick, S. R.; Cruz, L., Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, 116, (0), 270-276.
61. Deda, D. K.; Uchoa, A. F.; Carita, E.; Baptista, M. S.; Toma, H. E.; Araki, K., A new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for PDT treatment. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, 376, 76-83.
62. Paiphansiri, U.; Tangboriboonrat, P.; Landfester, K., Polymeric nanocapsules containing an antiseptic agent obtained by controlled nanoprecipitation onto water-in-oil miniemulsion droplets. *Macromolecular Bioscience* **2006**, 6, (1), 33-40.
63. Hu, J.; Deng, W. J.; Liu, L. Q.; Xiao, Z. B., Synthesis and Application of Polyacrylate Nanocapsules Loaded with Lilial. *Journal of Applied Polymer Science* **2014**, 131, (8).
64. Hofmeister, I.; Landfester, K.; Taden, A., pH-Sensitive Nanocapsules with Barrier Properties: Fragrance Encapsulation and Controlled Release. *Macromolecules* **2014**, 47, (16), 5768-5773.
65. Teixeira, Z.; Dreiss, C. A.; Lawrence, M. J.; Heenan, R. K.; Machado, D.; Justo, G. Z.; Guterres, S. S.; Duran, N., Retinyl palmitate polymeric nanocapsules as carriers of bioactives. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, 382, 36-47.
66. Olvera-Martinez, B. I.; Cazares-Delgadillo, J.; Calderilla-Fajardo, S. B.; Villalobos-Garcia, R.; Ganem-Quintanar, A.; Quintanar-Guerrero, D., Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique : Penetration across the stratum corneum (English). *Journal of pharmaceutical sciences* **2005**, 94, (7), 1552-1559.
67. Diou, O.; Tsapis, N.; Giraudeau, C.; Valette, J.; Gueutin, C.; Bourasset, F.; Zanna, S.; Vauthier, C.; Fattal, E., Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by (FMRI)-F-19. *Biomaterials* **2012**, 33, (22), 5593-5602.
68. Diou, O.; Fattal, E.; Delplace, V.; Mackiewicz, N.; Nicolas, J.; Meriaux, S.; Valette, J.; Robic, C.; Tsapis, N., RGD decoration of PEGylated polyester nanocapsules of perfluorooctyl bromide for tumor imaging: Influence of pre or post-functionalization on capsule morphology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2014**, 87, (1), 170-177.
69. Diaz-Lopez, R.; Tsapis, N.; Santin, M.; Bridal, S. L.; Nicolas, V.; Jaillard, D.; Libong, D.; Chaminade, P.; Marsaud, V.; Vauthier, C.; Fattal, E., The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent. *Biomaterials* **2010**, 31, (7), 1723-1731.
70. Pisani, E.; Fattal, E.; Paris, J.; Ringard, C.; Rosilio, V.; Tsapis, N., Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide: Influence of polymer adsorption at the dichloromethane-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 326, (1), 66-71.
71. Bazylińska, U.; Pietkiewicz, J.; Saczko, J.; Nattich-Rak, M.; Rossowska, J.; Garbiec, A.; Wilk, K. A., Nanoemulsion-templated multilayer nanocapsules for cyanine-type photosensitizer delivery to human breast carcinoma cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, 47, (2), 406-420.

72. Lobato, K. B. d. S.; Paese, K.; Forgearini, J. C.; Guterres, S. S.; Jablonski, A.; Rios, A. d. O., Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chemistry* **2013**, 141, 3906-3912.
73. Bazylińska, U.; Skrzela, R.; Szczepanowicz, K.; Warszynski, P.; Wilk, K. A., Novel approach to long sustained multilayer nanocapsules: influence of surfactant head groups and polyelectrolyte layer number on the release of hydrophobic compounds. *Soft Matter* **2011**, 7, (13), 6113-6124.
74. Choi, M.-J.; Soottitantawat, A.; Nuchuchua, O.; Min, S.-G.; Ruktanonchai, U., Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method. *Food Research International* **2009**, 42, (1), 148-156.
75. Woranuch, S.; Yoksan, R., Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 96, (2), 586-592.
76. Lertsutthiwong, P.; Rojsitthisak, P.; Nimmannit, U., Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2009**, 29, (3), 856-860.
77. Wang, J. C.; Chen, S. H.; Xu, Z. C., Synthesis and properties research on the nanocapsulated capsaicin by simple coacervation method. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2008**, 29, (5), 687-695.
78. Habib, S.; Amr, A.; Hamadneh, I., Nanoencapsulation of Alpha-linolenic Acid with Modified Emulsion Diffusion Method. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2012**, 89, (4), 695-703.
79. Teixeira, Z.; Zanchetta, B.; Melo, B. A. G.; Oliveira, L. L.; Santana, M. H. A.; Paredes-Gamero, E. J.; Justo, G. Z.; Nader, H. B.; Guterres, S. S.; Duran, N., Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: Characterization and permeation studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, 81, (1), 374-380.
80. Esmaeili, A.; Niknam, S., Characterization of nanocapsules containing *Elaeagnus angustifolia* L. extract prepared using an emulsion-diffusion process. *Flavour and Fragrance Journal* **2013**, 28, (5), 309-315.
81. Choi, M.-J.; Soottitantawat, A.; Nuchuchua, O.; Min, S.-G.; Ruktanonchai, U., Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method (English). *Food research international* **2009**, 42, (1), 148-156.
82. Osterberg, E.; Bergstrom, K.; Holmberg, K.; Riggs, J. A.; Vanalstine, J. M.; Schuman, T. P.; Burns, N. L.; Harris, J. M., Comparison of Polysaccharide and Poly(Ethylene Glycol) Coatings for Reduction of Protein Adsorption on Polystyrene Surfaces. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **1993**, 77, (2), 159-169.
83. Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P., Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 24-36.
84. Beduneau, A.; Saulnier, P.; Anton, N.; Hindre, F.; Passirani, C.; Rajerison, H.; Noiret, N.; Benoit, J. P., Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: Evaluation of their stealth properties. *Pharmaceutical Research* **2006**, 23, (9), 2190-2199.
85. Lemarchand, C.; Gref, R.; Couvreur, P., Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 58, (2), 327-341.
86. Lemarchand, C.; Gref, R.; Lesieur, S.; Hommel, H.; Vacher, B.; Besheer, A.; Maeder, K.; Couvreur, P., Physico-chemical characterization of polysaccharide-coated nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2005**, 108, (1), 97-111.
87. 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* **2009**, 330, (2), 337-343.
88. Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J., Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid and Polymer Science* **1997**, 275, (1), 46-53.
89. 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* **2003**, 32, (2), 125-135.
90. Rouzes, C.; Gref, R.; Leonard, M.; Delgado, A. D.; Dellacherie, E., Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 50, (4), 557-565.

91. Laville, M.; Babin, J.; Londono, I.; Legros, M.; Nouvel, C.; Durand, A.; Vanderesse, R.; Leonard, M.; Six, J.-L., Polysaccharide-covered nanoparticles with improved shell stability using click-chemistry strategies. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 93, (2), 537-546.
92. Rodriguez-Emmenegger, C.; Jager, A.; Jager, E.; Stepanek, P.; Bologna Alles, A.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Brynda, E., Polymeric nanocapsules ultra stable in complex biological media. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2011**, 83, (2), 376-381.
93. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N.; Benita, S., Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *International Journal of Pharmaceutics* **1989**, 55, (1), R1-R4.
94. Moinard-Checot, D.; Chevalier, Y.; Briancon, S.; Beney, L.; Fessi, H., Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 317, (2), 458-468.
95. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. 1988.
96. Stella, B.; Arpicco, S.; Rocco, F.; Marsaud, V.; Renoir, J. M.; Cattel, L.; Couvreur, P., Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 344, (1-2), 71-77.
97. Limayem Blouza, I.; Charcosset, C.; Sfar, S.; Fessi, H., Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 325, (1-2), 124-131.
98. Khayata, N.; Abdelwahed, W.; Chehna, M. F.; Charcosset, C.; Fessi, H., Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, 423, (2), 419-427.
99. Barichello, J.; Morishita, M.; Takayama, K.; Nagai, T., Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Development & Industrial Pharmacy* **1999**, 25, (4), 471.
100. Quintanar-Guerrero, D.; Allemann, E.; Doelker, E.; Fessi, H., Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research* **1998**, 15, (7), 1056-1062.
101. Surassmo, S.; Min, S.-G.; Bejrapha, P.; Choi, M.-J., Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. *Food Research International* **2010**, 43, (1), 8-17.
102. Guinebretiere, S.; Briancon, S.; Lieto, J.; Mayer, C.; Fessi, H., Study of the emulsion-diffusion of solvent: Preparation and characterization of nanocapsules. *Drug Development Research* **2002**, 57, (1), 18-33.
103. Garti, N., Double emulsions - Scope, limitations and new achievements. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **1997**, 123, 233-246.
104. Vettor, M.; Bourgeois, S.; Fessi, H.; Pelletier, J.; Perugini, P.; Pavanetto, F.; Bolzinger, M. A., Skin absorption studies of octyl-methoxycinnamate loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles: Estimation of the UV filter distribution and release behaviour in skin layers. *Journal Of Microencapsulation* **2010**, 27, (3), 253-262.
105. Markus, A.; Linder, C., *Microencapsulation: methods and industrial applications. Chapter 2: Advances in the Technology for Controlled-Release Pesticide Formulations*. 2nd ed.; Taylor & Francis Group: New York, London, 2006; Vol. 158, p 55-77.
106. Zhu, Y.; An, X.; Li, S.; Yu, S., Nanoencapsulation of B-Cypermethrin by Complex Coacervation in a Microemulsion. *Journal of Surfactants & Detergents* **2009**, 12, (4), 305.
107. Lv, Y.; Yang, F.; Li, X.; Zhang, X.; Abbas, S., Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation. *Food Hydrocolloids* **2014**, 35, (0), 305-314.
108. Ach, D.; Briancon, S.; Broze, G.; Puel, F.; Rivoire, A.; Galvan, J. M.; Chevalier, Y., Formation of Microcapsules by Complex Coacervation. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **2015**, 93, (2), 183-191.
109. Jagielski, N.; Sharma, S.; Hombach, V.; Mailander, V.; Rasche, V.; Landfester, K., Nanocapsules synthesized by miniemulsion technique for application as new contrast agent materials. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2007**, 208, (19-20), 2229-2241.

110. Loxley, A.; Vincent, B., Preparation of poly(methylmethacrylate) microcapsules with liquid cores. *Journal of Colloid and Interface Science* **1998**, 208, (1), 49-62.
111. Lavergne, F.-M.; Cot, D.; Ganachaud, F., Polymer microcapsules with "foamed" membranes. *Langmuir* **2007**, 23, (12), 6744-6753.
112. Wagdare, N. A.; Marcelis, A. T. M.; Boom, R. M.; van Rijn, C. J. M., Microcapsules with a pH responsive polymer: Influence of the encapsulated oil on the capsule morphology. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2011**, 88, (1), 175-180.
113. Tiarks, F.; Landfester, K.; Antonietti, M., Preparation of polymeric nanocapsules by miniemulsion polymerization. *Langmuir* **2001**, 17, (3), 908-918.
114. van Zyl, A. J. P.; Sanderson, R. D.; de Wet-Roos, D.; Klumperman, B., Core/shell particles containing liquid cores: Morphology prediction, synthesis, and characterization. *Macromolecules* **2003**, 36, (23), 8621-8629.
115. Yan, X.; Delgado, M.; Fu, A.; Alcouffe, P.; Gouin, S. b. G.; Fleury, E.; Katz, J. L.; Ganachaud, F. o.; Bernard, J., Simple but precise engineering of functional nanocapsules through nanoprecipitation. *Angewandte Chemie (International Ed. In English)* **2014**, 53, (27), 6910-6913.
116. Shchukina, E. M.; Shchukin, D. G., LbL coated microcapsules for delivering lipid-based drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, 63, (9), 837-846.
117. Preetz, C.; Rube, A.; Reiche, I.; Hause, G.; Mader, K., Preparation and characterization of biocompatible oil-loaded polyelectrolyte nanocapsules. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2008**, 4, (2), 106-114.
118. Lou, X. W.; Archer, L. A.; Yang, Z., Hollow Micro-/Nanostructures: Synthesis and Applications. *Advanced Materials* **2008**, 20, (21), 3987-4019.
119. Adamczak, M.; Hoel, H. J.; Gaudernack, G.; Barbasz, J.; Szczepanowicz, K.; Warszynski, P., Polyelectrolyte multilayer capsules with quantum dots for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 90, (0), 211-216.
120. Cui, J. W.; van Koeveden, M. P.; Mullner, M.; Kempe, K.; Caruso, F., Emerging methods for the fabrication of polymer capsules. *Advances in Colloid and Interface Science* **2014**, 207, 14-31.
121. De Koker, S.; Hoogenboom, R.; De Geest, B. G., Polymeric multilayer capsules for drug delivery. *Chemical Society Reviews* **2012**, 41, (7), 2867-2884.
122. Sivakumar, S.; Gupta, J. K.; Abbott, N. L.; Caruso, F., Monodisperse emulsions through templating polyelectrolyte multilayer capsules. *Chemistry of Materials* **2008**, 20, (6), 2063-2065.
123. Imoto, T.; Kida, T.; Matsusaki, M.; Akashi, M., Preparation and Unique pH-Responsive Properties of Novel Biodegradable Nanocapsules Composed of Poly(gamma-glutamic acid) and Chitosan as Weak Polyelectrolytes. *Macromolecular Bioscience* **2010**, 10, (3), 271-277.
124. Vasilieva, E.; Ibragimova, A.; Mirgorodskaya, A.; Yackevich, E.; Dobrynin, A.; Nizameev, I.; Kadirov, M.; Zakharova, L.; Zuev, Y.; Konovalov, A., Polyelectrolyte micro- and nanocapsules with varied shell permeability controlling the rate of esters hydrolysis. *Russian Chemical Bulletin* **2014**, 63, (1), 232-238.
125. Biswas, A.; Nagaraja, A. T.; McShane, M. J., Fabrication of Nanocapsule Carriers from Multilayer-Coated Vaterite Calcium Carbonate Nanoparticles. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2014**, 6, (23), 21193-21201.
126. Huang, X.; Appelhans, D.; Formanek, P.; Simon, F.; Voit, B., Synthesis of Well-Defined Photo-Cross-Linked Polymeric Nanocapsules by Surface-Initiated RAFT Polymerization. *Macromolecules* **2011**, 44, (21), 8351-8360.
127. Cui, L.; Wang, R.; Ji, X.; Hu, M.; Wang, B.; Liu, J., Template-assisted synthesis of biodegradable and pH-responsive polymer capsules via RAFT polymerization for controlled drug release. *Materials Chemistry and Physics* **2014**, 148, (1-2), 87-95.
128. De Geest, B. G.; Van Camp, W.; Du Prez, F. E.; De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Hennink, W. E., Degradable multilayer films and hollow capsules via a 'Click' strategy. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, 29, (12-13), 1111-1118.

129. Liu, Y.; Yang, J.; Zhao, Z.; Li, J.; Zhang, R.; Yao, F., Formation and characterization of natural polysaccharide hollow nanocapsules via template layer-by-layer self-assembly. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, 379, (1), 130-140.
130. Wang, W. J.; Luo, C.; Shao, S. J.; Zhou, S. B., Chitosan hollow nanospheres fabricated from biodegradable poly-D,L-lactide-poly(ethylene glycol) nanoparticle templates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2010**, 76, (3), 376-383.
131. De Cock, L. J.; De Koker, S.; De Geest, B. G.; Grooten, J.; Vervaet, C.; Remon, J. P.; Sukhorukov, G. B.; Antipina, M. N., Polymeric Multilayer Capsules in Drug Delivery. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, 49, (39), 6954-6973.
132. Moya, S.; Sukhorukov, G. B.; Auch, M.; Donath, E.; Mohwald, H., Microencapsulation of Organic Solvents in Polyelectrolyte Multilayer Micrometer-Sized Shells. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, 216, (2), 297-302.
133. Guzey, D.; McClements, D., Influence of Environmental Stresses on O/W Emulsions Stabilized by B-Lactoglobulin-Pectin and B-Lactoglobulin-Pectin-Chitosan Membranes Produced by the Electrostatic Layer-by-Layer Deposition Technique. *Food Biophysics* **2006**, 1, (1), 30.
134. Grigoriev, D. O.; Bukreeva, T.; Moehwald, H.; Shchukin, D. G., New method for fabrication of loaded micro- and nanocontainers: Emulsion encapsulation by polyelectrolyte layer-by-layer deposition on the liquid core. *Langmuir* **2008**, 24, (3), 999-1004.
135. Adamczak, M.; Krok, M.; Pamula, E.; Posadowska, U.; Szczepanowicz, K.; Barbasz, J.; Warszynski, P., Linseed oil based nanocapsules as delivery system for hydrophobic quantum dots. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2013**, 110, 1-7.
136. Adamczak, M.; Para, G.; Simon, C.; Warszynski, P., Natural oil nanoemulsions as cores for layer-by-layer encapsulation. *Journal Of Microencapsulation* **2013**, 30, (5), 479-489.
137. Cuomo, F.; Lopez, F.; Miguel, M. G.; Lindman, B. r., Vesicle-templated layer-by-layer assembly for the production of nanocapsules. *Langmuir: The ACS Journal Of Surfaces And Colloids* **2010**, 26, (13), 10555-10560.
138. Kepczynski, M.; Lewandowska, J.; Romek, M.; Zapotoczny, S.; Ganachaud, F.; Nowakowska, M., Silicone nanocapsules templated inside the membranes of catanionic vesicles. *Langmuir* **2007**, 23, (13), 7314-7320.
139. Cuomo, F.; Lopez, F.; Ceglie, A.; Maiuro, L.; Miguel, M. G.; Lindman, B., pH-responsive liposome-templated polyelectrolyte nanocapsules. *Soft Matter* **2012**, 8, (16), 4415-4420.
140. Fujimoto, K.; Toyoda, T.; Fukui, Y., Preparation of bionanocapsules by the layer-by-layer deposition of polypeptides onto a liposome. *Macromolecules* **2007**, 40, (14), 5122-5128.
141. Prego, C.; Fabre, M.; Torres, D.; Alonso, M. J., Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. *Pharmaceutical Research* **2006**, 23, (3), 549-556.
142. Prego, C.; Torres, D.; Fernandez-Megia, E.; Novoa-Carballal, R.; Quinoa, E.; Alonso, M. J., Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery - Effect of chitosan pegylation degree. *Journal of Controlled Release* **2006**, 111, (3), 299-308.
143. Prego, C.; Garcia, M.; Torres, D.; Alonso, M. J., Transmucosal macromolecular drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2005**, 101, 151-162.
144. Barrere, M.; Landfester, K., Polyester synthesis in aqueous miniemulsion. *Polymer* **2003**, 44, (10), 2833-2841.
145. Bouchemal, K.; Briancon, S.; Fessi, H.; Chevalier, Y.; Bonnet, I.; Perrier, E., Simultaneous emulsification and interfacial polycondensation for the preparation of colloidal suspensions of nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C* **2006**, 26, 472-480.
146. Bouchemal, K.; Briancon, S.; Perrier, E.; Fessi, H.; Bonnet, I.; Zydowicz, N., Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 269, (1), 89-100.
147. Liu, W. J.; He, Z. C.; Zhang, Z. C., Preparation of polymer nanocapsules for use as carriers via one-step redox interfacially initiated miniemulsion polymerization. *Journal of Polymer Research* **2011**, 18, (2), 305-310.

148. Hu, J.; Deng, W. J.; Liu, L. Q.; Xiao, Z. B., Synthesis and Application of Polyacrylate Nanocapsules Loaded with Lilial. *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, 131, (8), 1-7.
149. Baier, G.; Musyanovych, A.; Dass, M.; Theisinger, S.; Landfester, K., Cross-Linked Starch Capsules Containing dsDNA Prepared in Inverse Miniemulsion as "Nanoreactors" for Polymerase Chain Reaction. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (4), 960-968.
150. Baier, G.; Siebert, J. M.; Landfester, K.; Musyanovych, A., Surface Click Reactions on Polymeric Nanocapsules for Versatile Functionalization. *Macromolecules* **2012**, 45, (8), 3419-3427.
151. Rosenbauer, E. M.; Landfester, K.; Musyanovych, A., Surface-Active Monomer as a Stabilizer for Polyurea Nanocapsules Synthesized via Interfacial Polyaddition in Inverse Miniemulsion. *Langmuir* **2009**, 25, (20), 12084-12091.
152. Crespy, D.; Stark, M.; Hoffmann-Richter, C.; Ziener, U.; Landfester, K., Polymeric nanoreactors for hydrophilic reagents synthesized by interfacial polycondensation on miniemulsion droplets. *Macromolecules* **2007**, 40, (9), 3122-3135.
153. Siebert, J. M.; Baier, G.; Musyanovych, A.; Landfester, K., Towards copper-free nanocapsules obtained by orthogonal interfacial "click" polymerization in miniemulsion. *Chemical Communications* **2012**, 48, (44), 5470-5472.
154. Roux, R.; Sallet, L.; Alcouffe, P.; Chambert, S.; Sintès-Zydowicz, N.; Fleury, E.; Bernard, J., Facile and Rapid Access to Glyconanocapsules by CuAAC Interfacial Polyaddition in Miniemulsion Conditions. *ACS Macro Letters* **2012**, 1, (8), 1074-1078.
155. Chen, C. M.; Chen, Z. H.; Zeng, X. R.; Fang, X. M.; Zhang, Z. G., Fabrication and characterization of nanocapsules containing n-dodecanol by miniemulsion polymerization using interfacial redox initiation. *Colloid and Polymer Science* **2012**, 290, (4), 307-314.
156. Li, W.; Matyjaszewski, K.; Albrecht, K.; Moller, M., Reactive Surfactants for Polymeric Nanocapsules via Interfacially Confined Miniemulsion ATRP. *Macromolecules* **2009**, 42, (21), 8228-8233.
157. Wu, M.; Forero Ramirez, L. M.; Rodriguez Lozano, A.; Quémener, D.; Babin, J.; Durand, A.; Marie, E.; Six, J.-L.; Nouvel, C., First multi-reactive dextran-based inisurf for atom transfer radical polymerization in miniemulsion. **2015**, 130, 141-148.
158. Li, W. W.; Matyjaszewski, K., Cationic Surface-Active Monomers as Reactive Surfactants for AGET Emulsion ATRP of n-Butyl Methacrylate. *Macromolecules* **2011**, 44, (14), 5578-5585.
159. Crespy, D.; Musyanovych, A.; Landfester, K., Synthesis of polymer particles and nanocapsules stabilized with PEO/PPO containing polymerizable surfactants in miniemulsion. *Colloid and Polymer Science* **2006**, 284, (7), 780-787.
160. Luo, Y.; Gu, H., Nanoencapsulation via interfacially confined reversible addition fragmentation transfer (RAFT) miniemulsion polymerization. *Polymer* **2007**, 48, (11), 3262-3272.
161. Pham, B. T. T.; Nguyen, D.; Ferguson, C. J.; Hawket, B. S.; Serelis, A. K.; Such, C. H., Miniemulsion polymerization stabilized by amphipathic macro RAFT agents. *Macromolecules* **2003**, 36, (24), 8907-8909.
162. Bernard, J.; Save, M.; Arathoon, B.; Charleux, B., Preparation of a xanthate-terminated dextran by click chemistry: Application to the synthesis of polysaccharide-coated nanopartides via surfactant-free ab initio emulsion polymerization of vinyl acetate. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **2008**, 46, (8), 2845-2857.
163. Sumerlin, B. S.; Vogt, A. P., Macromolecular Engineering through Click Chemistry and Other Efficient Transformations. *Macromolecules* **2010**, 43, (1), 1-13.
164. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40, (11), 2004-2021.
165. Kai, S.; Ashaduzzaman, M.; Uemura, S.; Kunitake, M., Composite Polymer Materials Consisting of Nanofilms Formed by Click Reaction between Polymers at an Oil-Water Interface. *Chemistry Letters* **2011**, 40, (3), 270-272.
166. Md. Ashaduzzaman; Shuhei Kai; Kunitake, M., Investigation of Click Reaction at an Oil-Water Interface Using Hydrophobic and Hydrophilic Polymers. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy* **2013**, 6, 31-39.

167. Paiphansiri, U.; Baier, G.; Kreyes, A.; Yiamsawas, D.; Koynov, K.; Musyanovych, A.; Landfester, K., Glutathione-Responsive DNA-Based Nanocontainers Through an "Interfacial Click" Reaction in Inverse Miniemulsion. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2014**, 215, (24), 2457-2462.
168. Chen, C. K.; Law, W. C.; Aalinkel, R.; Yu, Y.; Nair, B.; Wu, J. C.; Mahajan, S.; Reynolds, J. L.; Li, Y. K.; Lai, C. K.; Tzanakakis, E. S.; Schwartz, S. A.; Prasad, P. N.; Cheng, C., Biodegradable cationic polymeric nanocapsules for overcoming multidrug resistance and enabling drug-gene co-delivery to cancer cells. *Nanoscale* **2014**, 6, (3), 1567-1572.
169. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, 41, (14), 2596-2599.
170. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, (9), 3057-3064.
171. Binder, W. H.; Sachsenhofer, R., 'Click' chemistry in polymer and material science: An update. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, 29, (12-13), 952-981.
172. Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H., Cu-I-catalyzed alkyne-azide "click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, (1), 51-68.
173. Hu, X. L.; Yan, L. S.; Xiao, H. H.; Li, X. Y.; Jing, X. B., Application of microwave-assisted click chemistry in the preparation of functionalized copolymers for drug conjugation. *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, 127, (5), 3365-3373.
174. Cintas, P.; Palmisano, G.; Cravotto, G., Power ultrasound in metal-assisted synthesis: From classical Barbier-like reactions to click chemistry. *Ultrasonics Sonochemistry* **2011**, 18, (4), 836-841.
175. Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V., Organic azides: An exploding diversity of a unique class of compounds. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, (33), 5188-5240.
176. Chittaboina, S.; Xie, F.; Wang, Q., One-pot synthesis of triazole-linked glycoconjugates. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46, (13), 2331-2336.
177. Lundberg, P.; Hawker, C. J.; Hult, A.; Malkoch, M., Click assisted one-pot multi-step reactions in polymer science: Accelerated synthetic Protocols. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, 29, (12-13), 998-1015.
178. Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chemical Reviews* **2008**, 108, (8), 2952-3015.
179. Binder, W. H.; Sachsenhofer, R., 'Click' chemistry in polymer and materials science. *Macromolecular Rapid Communications* **2007**, 28, (1), 15-54.
180. Hein, J. E.; Fokin, V. V., Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, (4), 1302-1315.
181. Wu, J.; Yu, W. Q.; Fu, L. X.; He, W.; Wang, Y.; Chai, B. S.; Song, C. J.; Chang, J. B., Design, synthesis, and biological evaluation of new 2'-deoxy-2'-fluoro-4'-triazole cytidine nucleosides as potent antiviral agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 63, 739-745.
182. Brik, A.; Muldoon, J.; Lin, Y. C.; Elder, J. H.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Wong, C. H., Rapid diversity-oriented synthesis in microtiter plates for in situ screening of HIV protease inhibitors. *Chembiochem* **2003**, 4, (11), 1246-1248.
183. Berg, R.; Straub, B. F., Advancements in the mechanistic understanding of the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 2715-2750.
184. Sun, J. P.; Hu, J. W.; Liu, G. J.; Xiao, D. S.; He, G. P.; Lu, R. F., Efficient Synthesis of Well-Defined Amphiphilic Cylindrical Brushes Polymer with High Grafting Density: Interfacial "Click" Chemistry Approach. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2011**, 49, (5), 1282-1288.
185. Orgueira, H. A.; Fokas, D.; Isome, Y.; Chan, P. C. M.; Baldino, C. M., Regioselective synthesis of [1,2,3]-triazoles catalyzed by Cu(I) generated in situ from Cu(0) nanosize activated powder and amine hydrochloride salts. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46, (16), 2911-2914.

186. Becer, C. R.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S., Click Chemistry beyond Metal-Catalyzed Cycloaddition. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, 48, (27), 4900-4908.
187. Lutz, J. F., Copper-free azide-alkyne cycloadditions: New insights and perspectives. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47, (12), 2182-2184.
188. Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N., Thiol-click chemistry: a multifaceted toolbox for small molecule and polymer synthesis. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, (4), 1355-1387.
189. Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, 49, (9), 1540-1573.
190. Hoyle, C. E.; Lee, T. Y.; Roper, T., Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2004**, 42, (21), 5301-5338.
191. Kade, M. J.; Burke, D. J.; Hawker, C. J., The Power of Thiol-ene Chemistry. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2010**, 48, (4), 743-750.
192. Lowe, A. B., Thiol-yne 'click'/coupling chemistry and recent applications in polymer and materials synthesis and modification. *Polymer* **2014**, 55, (22), 5517-5549.
193. De, S.; Khan, A., Efficient synthesis of multifunctional polymers via thiol-epoxy "click" chemistry. *Chemical Communications* **2012**, 48, (25), 3130-3132.
194. Hensarling, R. M.; Rahane, S. B.; LeBlanc, A. P.; Sparks, B. J.; White, E. M.; Locklin, J.; Patton, D. L., Thiol-isocyanate "click" reactions: rapid development of functional polymeric surfaces. *Polymer Chemistry* **2011**, 2, (1), 88-90.
195. Wang, X.-Y.; Li, Y.-G.; Mu, H.-L.; Pan, L.; Li, Y.-S., Efficient synthesis of diverse well-defined functional polypropylenes with high molecular weights and high functional group contents via thiol-halogen click chemistry. *Polymer Chemistry* **2015**, 6, (7), 1150-1158.
196. Chan, J. W.; Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, M., Nucleophile-Initiated Thiol-Michael Reactions: Effect of Organocatalyst, Thiol, and Ene. *Macromolecules* **2010**, 43, (15), 6381-6388.
197. Li, G. Z.; Randev, R. K.; Soeriyadi, A. H.; Rees, G.; Boyer, C.; Tong, Z.; Davis, T. P.; Becer, C. R.; Haddleton, D. M., Investigation into thiol-(meth)acrylate Michael addition reactions using amine and phosphine catalysts. *Polymer Chemistry* **2010**, 1, (8), 1196-1204.
198. Lowe, A. B., Thiol-ene "click" reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry* **2010**, 1, (1), 17-36.
199. Uygun, M.; Tasdelen, M. A.; Yagci, Y., Influence of Type of Initiation on Thiol-Ene "Click" Chemistry. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, 211, (1), 103-110.
200. Cook, W. D.; Chen, F.; Pattison, D. W.; Hopson, P.; Beaujon, M., Thermal polymerization of thiol-ene network-forming systems. *Polymer International* **2007**, 56, (12), 1572-1579.
201. Cole, M. A.; Jankousky, K. C.; Bowman, C. N., Redox initiation of bulk thiol-ene polymerizations. *Polymer Chemistry* **2013**, 4, (4), 1167-1175.
202. Green, A. W., *Industrial Photoinitiators. A Technical Guide*. Taylor & Francis Group: 2010.
203. Cramer, N. B.; Scott, J. P.; Bowman, C. N., Photopolymerizations of thiol-ene polymers without photoinitiators. *Macromolecules* **2002**, 35, (14), 5361-5365.
204. Bryant, S. J.; Nuttelman, C. R.; Anseth, K. S., Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2000**, 11, (5), 439-457.
205. Campos, L. M.; Killops, K. L.; Sakai, R.; Paulusse, J. M. J.; Damiron, D.; Drockenmuller, E.; Messmore, B. W.; Hawker, C. J., Development of thermal and photochemical strategies for thiol-ene click polymer functionalization. *Macromolecules* **2008**, 41, (19), 7063-7070.
206. Cole, M. A.; Jankousky, K. C.; Bowman, C. N., Thiol-ene functionalized siloxanes for use as elastomeric dental impression materials. *Dental Materials* **2014**, 30, (4), 449-455.
207. Sideridou, I. D.; Achilias, D. S.; Karava, O., Reactivity of benzoyl peroxide/amine system as an initiator for the free radical polymerization of dental and orthopedic dimethacrylate monomers: Effect of the amine and monomer chemical structure. *Macromolecules* **2006**, 39, (6), 2072-2080.

208. Tasdelen, M. A., Diels-Alder "click" reactions: recent applications in polymer and material science. *Polymer Chemistry* **2011**, 2, (10), 2133-2145.
209. Lowe, A. B., Thiol-ene "click" reactions and recent applications in polymer and materials synthesis: a first update. *Polymer Chemistry* **2014**, 5, (17), 4820-4870.
210. Lallana, E.; Fernandez-Trillo, F.; Sousa-Herves, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E., Click Chemistry with Polymers, Dendrimers, and Hydrogels for Drug Delivery. *Pharmaceutical Research* **2012**, 29, (4), 902-921.
211. Golas, P. L.; Matyjaszewski, K., Marrying click chemistry with polymerization: expanding the scope of polymeric materials. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, (4), 1338-1354.
212. Meldal, M., Polymer "Clicking" by CuAAC reactions. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, 29, (12-13), 1016-1051.
213. Dirks, A. J.; Cornelissen, J.; van Delft, F. L.; van Hest, J. C. M.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; Rutjes, F., From (bio)molecules to biohybrid materials with the click chemistry approach. *Qsar & Combinatorial Science* **2007**, 26, (11-12), 1200-1210.
214. Le Droumaguet, B.; Velonia, K., Click chemistry: A powerful tool to create polymer-based macromolecular chimeras. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, 29, (12-13), 1073-1089.
215. Hvilsted, S., Facile design of biomaterials by click' chemistry. *Polymer International* **2012**, 61, (4), 485-494.
216. Kolb, H. C.; Sharpless, K. B., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, 8, (24), 1128-1137.
217. Lutz, J. F.; Zarafshani, Z., Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne "click" chemistry. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, 60, (9), 958-970.
218. Hein, C. D.; Liu, X. M.; Wang, D., Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharmaceutical Research* **2008**, 25, (10), 2216-2230.
219. van Dijk, M.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E., Synthesis and Applications of Biomedical and Pharmaceutical Polymers via Click Chemistry Methodologies. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, 20, (11), 2001-2016.
220. Lallana, E.; Sousa-Herves, A.; Fernandez-Trillo, F.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E., Click Chemistry for Drug Delivery Nanosystems. *Pharmaceutical Research* **2012**, 29, (1), 1-34.
221. Such, G. K.; Johnston, A. P. R.; Liang, K.; Caruso, F., Synthesis and functionalization of nanoengineered materials using click chemistry. *Progress in Polymer Science* **2012**, 37, (7), 985-1003.
222. van der Ende, A. E.; Harrell, J.; Sathiyakumar, V.; Meschievitz, M.; Katz, J.; Adcock, K.; Harth, E., "Click" Reactions: Novel Chemistries for Forming Well-defined Polyester Nanoparticles. *Macromolecules* **2010**, 43, (13), 5665-5671.
223. Zou, J.; Hew, C. C.; Themistou, E.; Li, Y. K.; Chen, C. K.; Alexandridis, P.; Cheng, C., Clicking Well-Defined Biodegradable Nanoparticles and Nanocapsules by UV-Induced Thiol-Ene Cross-Linking in Transparent Miniemulsions. *Advanced Materials* **2011**, 23, (37), 4274-4277.
224. Liu, D. D.; Yu, B.; Jiang, X. S.; Yin, J., Responsive Hybrid Microcapsules by the One-Step Interfacial Thiol-Ene Photopolymerization. *Langmuir* **2013**, 29, (17), 5307-5314.
225. Such, G. K.; Tjipto, E.; Postma, A.; Johnston, A. P. R.; Caruso, F., Ultrathin, responsive polymer click capsules. *Nano Letters* **2007**, 7, (6), 1706-1710.
226. Huang, C. J.; Chang, F. C., Using Click Chemistry To Fabricate Ultrathin Thermoresponsive Microcapsules through Direct Covalent Layer-by-Layer Assembly. *Macromolecules* **2009**, 42, (14), 5155-5166.
227. Connal, L. A.; Kinnane, C. R.; Zelikin, A. N.; Caruso, F., Stabilization and Functionalization of Polymer Multilayers and Capsules via Thiol-Ene Click Chemistry. *Chemistry of Materials* **2009**, 21, (4), 576-578.
228. Krovi, S. A.; Smith, D.; Nguyen, S. T., "Clickable" polymer nanoparticles: a modular scaffold for surface functionalization. *Chemical Communications* **2010**, 46, (29), 5277-5279.
229. Kamphuis, M. M. J.; Johnston, A. P. R.; Such, G. K.; Dam, H. H.; Evans, R. A.; Scott, A. M.; Nice, E. C.; Heath, J. K.; Caruso, F., Targeting of Cancer Cells Using Click-Functionalized Polymer Capsules. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, (45), 15881-15883.

230. Welser, K.; Perera, M. D. A.; Aylott, J. W.; Chan, W. C., A facile method to clickable sensing polymeric nanoparticles. *Chemical Communications* **2009**, (43), 6601-6603.
231. van der Ende, A.; Croce, T.; Hamilton, S.; Sathiyakumar, V.; Harth, E., Tailored polyester nanoparticles: post-modification with dendritic transporter and targeting units via reductive amination and thiol-ene chemistry. *Soft Matter* **2009**, 5, (7), 1417-1425.
232. Jones, M. W.; Mantovani, G.; Ryan, S. M.; Wang, X.; Brayden, D. J.; Haddleton, D. M., Phosphine-mediated one-pot thiol-ene "click" approach to polymer-protein conjugates. *Chem. Commun.* **2009**, 5272-5274.
233. Jones, M. W.; Gibson, M. I.; Mantovani, G.; Haddleton, D. M., Tunable thermo-responsive polymer-protein conjugates via a combination of nucleophilic thiol-ene "click" and SET-LRP. *Polym. Chem.* **2011**, 2, 572-574.

PARTIE II

RESULTATS ET DISCUSSION

OBJECTIFS ET STRATEGIE DE SYTNHESE

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet soutenu par la Région Lorraine qui vise à développer des traitements biocides à moindre impact sur l'environnement, notamment en minimisant l'emploi de composés écotoxiques. L'objectif de cette thèse porte plus précisément sur la conception et la synthèse de nanocapsules (NCs) biodégradables permettant l'encapsulation de substances actives (SA) algicides/algistatiques. Ces NCs sont constituées d'une écorce en polymère hydrophobe, d'un cœur liquide et d'une couronne hydrophile polysaccharide, et sont susceptibles de libérer la SA encapsulée à l'intérieur (Figure 1). Le polylactide (PLA; un polymère bio-sourcé et biodégradable) a été choisi pour former l'écorce de NCs, tandis que le Miglyol®810 (M810 ; une huile triglycérider^a) a été sélectionnée comme cœur liquide. Les objets sont recouverts d'une couronne hydrophile en dextrane (polysaccharide neutre et biodégradable) qui assure leur bonne stabilité colloïdale.

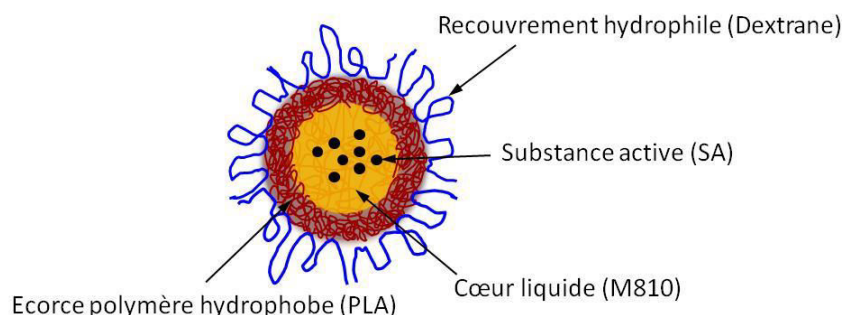


Figure 1. Nanocapsule de PLA à cœur M810 et recouverte d'une couronne en dextrane

^a Voir plus de détails dans la Partie I, Paragraphe II.1.2.2.1., Tableau I.2., p. 16.

Suite à l'étude bibliographique décrite dans la partie précédente, la méthode que nous avons choisie pour formuler ces NCs de morphologie contrôlée a été de combiner une réaction de couplage par chimie « click » à un procédé classique d'élaboration de NCs par ségrégation de phases. Ainsi, le procédé d'émulsion-évaporation de solvant, bien connu au LCPM, a été choisi afin d'induire une ségrégation de phases entre l'huile et le PLA préformé. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à une réaction « click » de type CuAAC (Cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu (I)) qui est très répandue dans la littérature¹ (voir Partie I, Paragraphe IV.2., p. 45). La réaction CuAAC avait déjà été employée au LCPM en milieu homogène² et les premiers essais de cette réaction CuAAC à l'interface liquide/liquide pour élaborer des nanosphères (NSs) ont été effectués dans le cadre de la thèse de Maxime Laville³. Il s'agit ici de poursuivre ces études sur la réaction CuAAC à l'interface d'une émulsion, mais cette fois pour obtenir des NCs de PLA recouvertes d'une couronne hydrophile en dextrane. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à optimiser un autre type de réaction « click » à l'interface, qui ne nécessite pas l'emploi de catalyseurs métalliques. Pour cela, la réaction thiol-ène⁴ (voir plus de détails dans la Partie I, Paragraphe IV.3., p. 51) a été choisie.

Pour mener ces réactions interfaciales, l'émulsion huile-dans-eau (o/w) est préparée d'une part avec un PLA préformé correctement fonctionnalisé à son extrémité par une fonction X (appelé PLA-X) et dissous dans la phase organique. La fonction X est soit une fonction alcyne (CuAAC), soit une fonction thiol (thiol-ène). Cette phase organique est constituée d'un bon solvant du PLA, volatil et non-miscible à l'eau (dichlorométhane – CH₂Cl₂ ou dans certains cas acétate d'éthyle – AcOEt) mélangé à une huile non-volatile qui est non-solvant du polymère (Miglyol®810, M810) et qui constituera le cœur liquide des NCs. L'huile et le solvant volatil sont miscibles en forte proportion. D'autre part, la phase aqueuse contient du dextrane modifié par des chaînes latérales hydrophobes fonctionnalisées à leur extrémité par des groupements Y (appelé Dex-Y) complémentaires aux fonctions X. Dans le cas de la chimie CuAAC, Y est un groupe azide alors que c'est une double liaison C=C dans le cas de la réaction thiol-ène. Dex-Y, grâce à ses groupements hydrophobes, permet de stabiliser l'émulsion o/w et, par la présence de fonctions réactives, d'assurer la réaction de couplage « click » entre PLA-X et Dex-Y à l'interface liquide/liquide de l'émulsion. L'évaporation du solvant volatil qui se produit ensuite entraîne la précipitation du PLA à l'interface. Ceci aboutit à l'obtention de NCs de PLA à cœur M810 et recouvertes de dextrane, couronne qui est alors fixée de façon covalente à l'écorce PLA (Schéma 1).

Le premier chapitre de ce manuscrit présente les synthèses des polymères précurseurs qui seront employés lors des réactions de chimie « click » CuAAC et thiol-ène. Dans le deuxième chapitre, ces réactions CuAAC et thiol-ène sont étudiées sans emploi de M810 (pour obtenir des NSs), puis en employant du M810 dans le but d'obtenir des NCs de PLA recouvertes d'une couronne en dextrane. Le troisième chapitre, quant à lui, est particulièrement consacré à la caractérisation des nano-objets obtenus en termes de taille, taux de recouvrement en dextrane et épaisseur de cette couronne, morphologie, stabilité colloïdale en milieu salin aussi qu'en présence d'un tensioactif compétitif. Enfin, le dernier chapitre présente l'encapsulation d'une SA modèle au sein de ces nano-objets et le suivi de sa libération.

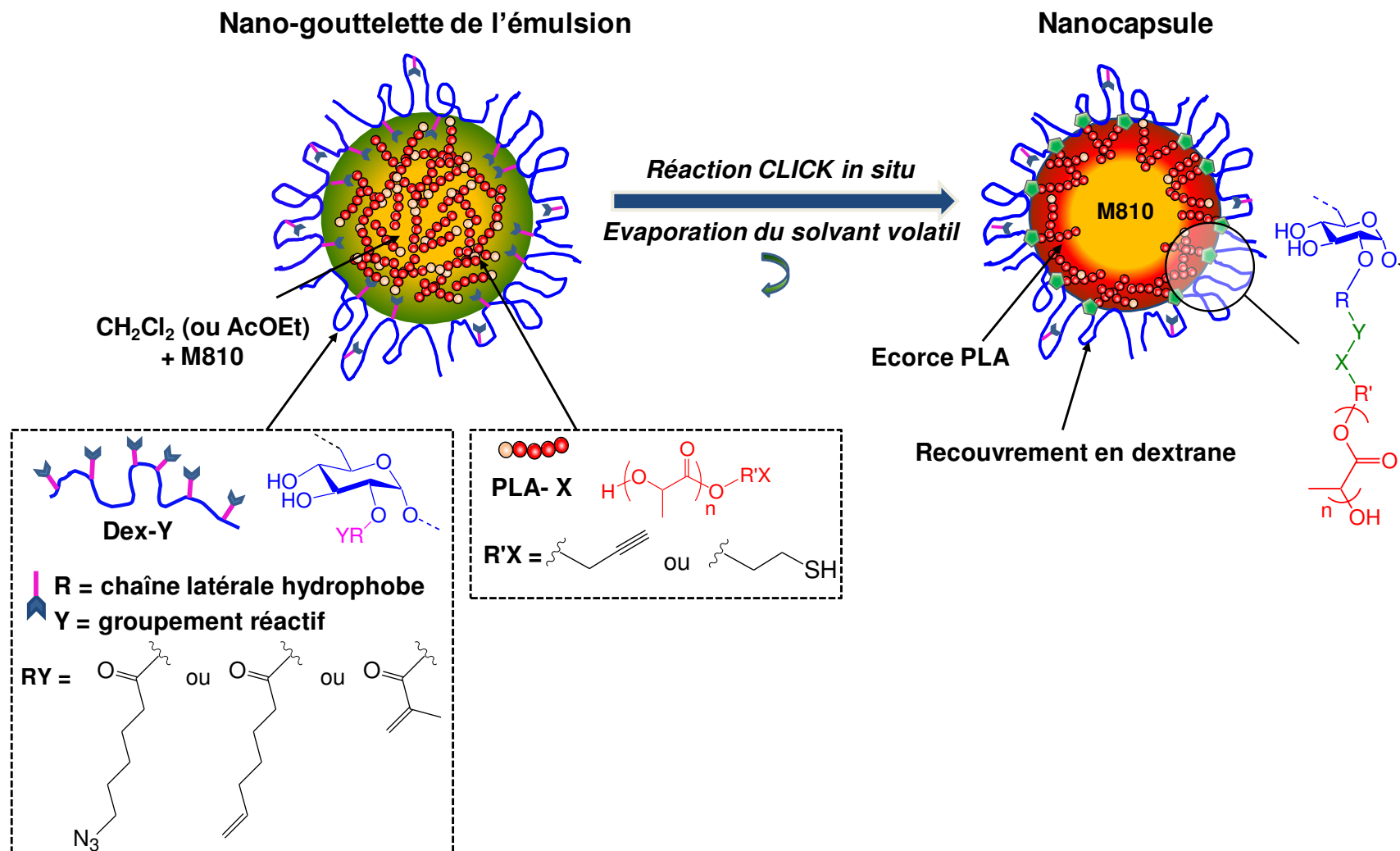


Schéma 1. Synthèse des NCs de PLA à cœur M810 et recouvertes de dextrane obtenues par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » à l'interface de l'émulsion huile-dans-eau entre le PLA-X et le Dex-Y

CHAPITRE I

SYNTHESE ET CARACTERISATION DE POLYMERES PRECURSEURS POUR LA CHIMIE « CLICK »

CHAPITRE I

Ce chapitre présente la synthèse des polymères précurseurs qui seront employés pour mener les réactions « click » interfaciales, c'est-à-dire les polylactides fonctionnalisés à leur extrémité par un alcyne (PLA α -alcyne) ou par un thiol (PLA α -SH), ainsi que les dextrans porteurs de chaînes latérales fonctionnalisées par des azides ou des doubles liaisons C=C.

I. SYNTHÈSE DES POLYLACTIDES

I.1. Généralités

Le polylactide fait partie de la famille des polyesters aliphatiques. Il est généralement obtenu par deux méthodes : polycondensation de l'acide lactique ou polymérisation par ouverture de cycle (POC) du lactide (dimère cyclique de l'acide lactique) (Schéma II.1)⁵.

La première méthode est peu onéreuse mais présente beaucoup d'inconvénients tels que la nécessité de recourir à des températures élevées (supérieures à 180°C), des longues durées de synthèse ou l'obligation d'éliminer l'eau qui est le sous-produit de la réaction afin d'obtenir des masses molaires assez élevées. De plus, il est difficile de contrôler la masse molaire et la dispersité du produit obtenu.

La POC du lactide se déroule dans des conditions plus douces que la polycondensation de l'acide lactique. Selon l'amorceur et le type de catalyseur employés ainsi que les conditions opératoires utilisées, la distribution de masses molaires du polymère obtenu peut être contrôlée. La POC du PLA est bien connue au LCPM^{2, 6-8} et a été optimisée à partir de différents types d'amorceurs^{2, 7} ou macroamorceurs⁶ comportant une (des) fonction(s) alcool. Elle peut être catalysée par différents composés organométalliques parmi lequel le

2-éthylhexanoate d'étain encore appelé octoate d'étain (SnOct_2) est très couramment utilisé. Le SnOct_2 possède en effet l'avantage d'être agréé par la FDA (Food and Drug Administration) en tant que stabilisant alimentaire pour des teneurs ne dépassant pas 100 ppm⁹. Cependant, pour contourner les critiques de certains détracteurs, le bismuth subsalicylate⁸ a été testé comme catalyseur de cette POC. Ce catalyseur est réputé pour être beaucoup moins toxique que SnOct_2 pour des applications biomédicales.

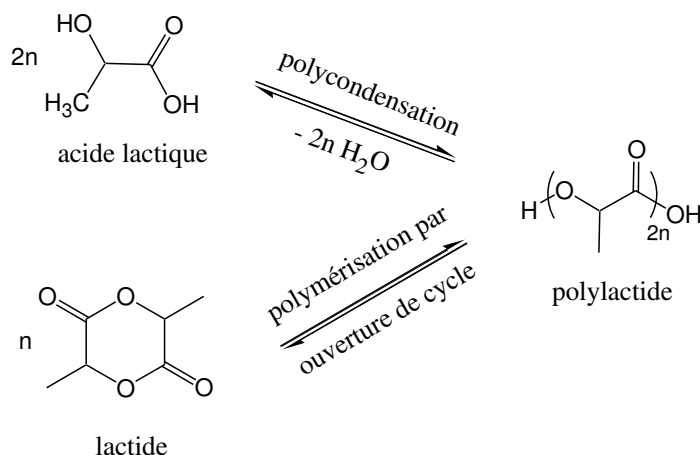


Schéma II.1. Voies de synthèse du polylactide

Dans ces travaux de thèse, les polylactides fonctionnalisés à leur extrémité par des alcynes (PLA α -alcyne) seront utilisés pour le couplage de chimie « click » CuAAC avec le dextrane porteur de fonctions azide. Parallèlement, les polylactides fonctionnalisés à leur extrémité par un thiol (PLA α -SH) serviront de réactifs dans les réactions thiol-ène avec le dextrane porteur de doubles liaisons. Ainsi, nous allons tout d'abord présenter brièvement la synthèse de ces deux types de PLA et leur caractérisation par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) et par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière multi-angle (SEC-MALLS).

I.2. Conditions de synthèse du PLA α -alcyne

Des PLA fonctionnalisés à leur extrémité par des fonctions alcyne ont été obtenus par polymérisation contrôlée par ouverture de cycle (POC) du D,L-lactide (D,L-LA) dans du toluène à 100°C , en présence de SnOct_2 (catalyseur) et de l'alcool propargylique (amorceur) (Schéma II.2). Ce dernier contient une fonction alcyne ce qui assure la présence de cette fonctionnalité à l'extrémité des chaînes des PLA. Pour ces synthèses, nous avons repris les conditions précédemment optimisées au laboratoire : un faible rapport molaire entre le catalyseur et l'amorceur ($R = \text{SnOct}_2/\text{OH} = 0,03$) est volontairement utilisé afin d'éviter des

réactions de transestérification et ainsi de mieux contrôler la polymérisation⁶. La conversion en monomère (D,L-LA) peut être déterminée à partir du spectre RMN ^1H (dans CDCl_3) du milieu réactionnel brut (avant purification du polymère – voir détails dans la Partie III, p. 192). Pour les deux lots du PLA synthétisés au cours de cette thèse, la conversion a été égale ou supérieure à 94% après 18h de polymérisation. Ceci correspond à la conversion maximale pour limiter les réactions de transestérifications, comme nous avons pu le vérifier au cours de précédentes thèses, compte tenu des équilibres thermodynamiques en jeu dans ce type de polymérisation¹⁰.

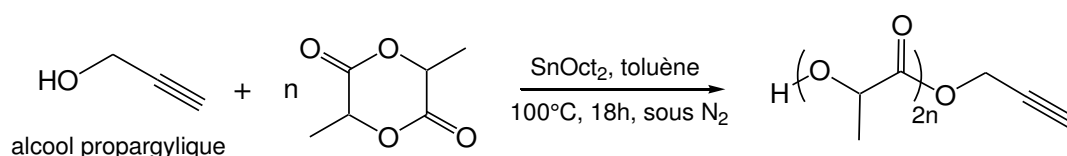


Schéma II.2. Synthèse du PLA α -alcyne par polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide catalysée par SnOct_2 et amorcée par l'alcool propargylique

I.3. Conditions de synthèse du PLA α -SH

La synthèse des polylactides contenant une fonction $-\text{SH}$ en bout de chaîne (PLA α -SH) se déroule en deux étapes (Schéma II.3). Tout d'abord, le D,L-LA a été polymérisé par ouverture de cycle en présence de SnOct_2 (catalyseur) et d'un amorceur contenant un pont disulfure, le 2-hydroxyéthyl disulfide. Cette première étape a conduit à la formation du PLA porteur d'une liaison disulfure au milieu de chaîne (PLA-SS-PLA). Dans un deuxième temps, un agent réducteur (le dithiotréitol, DTT) a été employé pour réduire ces liaisons $-\text{SS}-$ du PLA-SS-PLA. Il en résulte alors la formation de chaînes PLA α -SH.

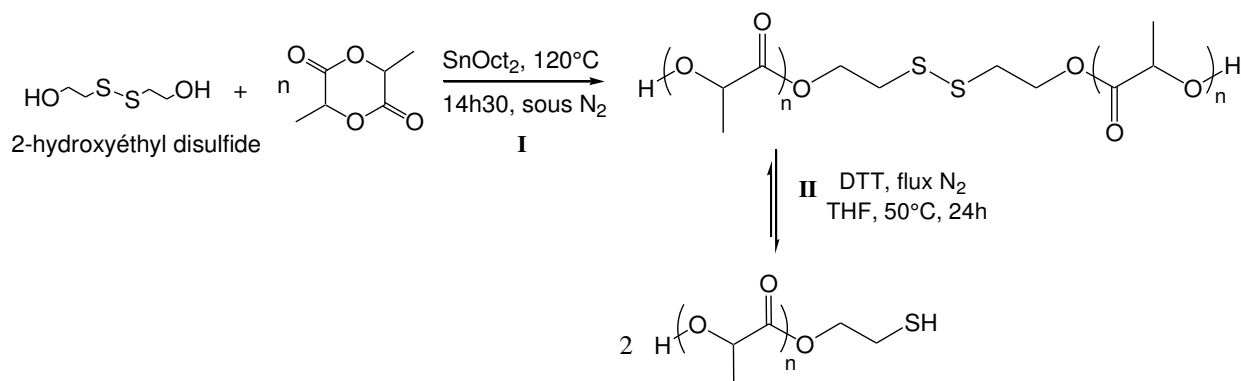


Schéma II.4. Synthèse du PLA α -SH : I) Synthèse du PLA-SS-PLA par polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide, II) Réduction des liaisons disulfure en thiol

I.3.1. Etape I : Synthèse du PLA-SS-PLA

Le protocole que nous avons adopté pour la POC du D,L-LA catalysée par le SnOct_2 et amorcée par le 2-hydroxyéthyl disulfide est inspiré des travaux de Sourkahi *et al.*¹¹. Ces auteurs avaient réalisé la POC du D,L-LA à partir d'un amorceur bifonctionnel (OH-SS-iBuBr), en présence de SnOct_2 dans le toluène dans le but d'obtenir un macroamorceur d'ATRP (Schéma II.5). Dans notre cas, le protocole est plus simple car le 2-hydroxyéthyl disulfide peut être utilisé directement comme amorceur de la POC. Aussi, nous avons adapté les conditions précédemment utilisées pour la synthèse du PLA α -alcyne.

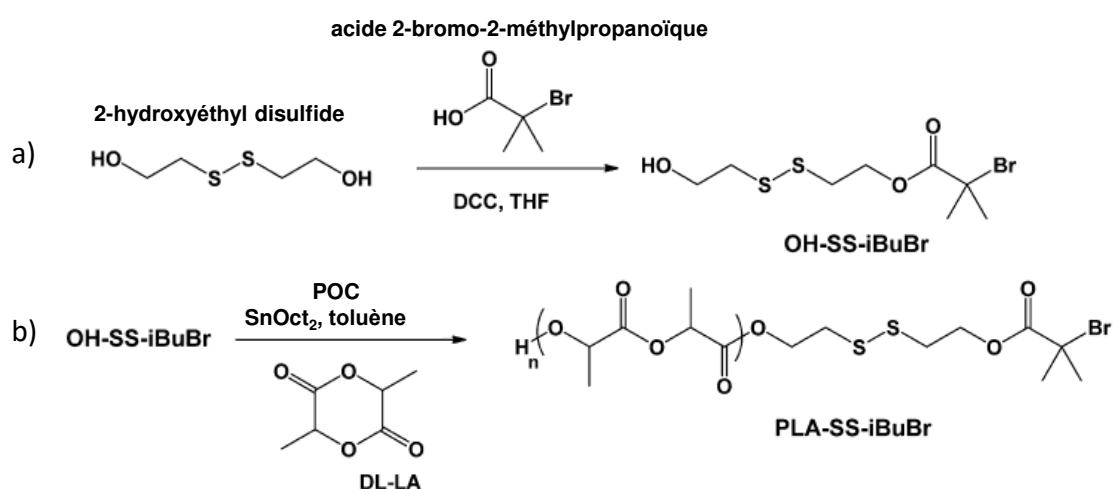


Schéma II.5. Synthèse d'un macroamorceur PLA d'ATRP : a) synthèse de l'amorceur fonctionnel, b) POC du D,L-LA¹¹

Puisque l'amorceur n'est pas soluble dans le toluène (solvant le plus couramment employé dans la POC du lactide), nous avons choisi de mener cette polymérisation en masse. Aussi, et comme lors des travaux précédemment menés au LCPM¹², la température du milieu a été alors augmentée jusqu'à 120°C afin d'assurer la fusion entière du D,L-lactide. Cependant, il faut éviter les températures trop élevées car elles favorisent, en général, les réactions de transestérification.

Le taux de conversion du monomère est obtenu à partir du spectre RMN ^1H (dans CDCl_3) du milieu réactionnel brut obtenu après polymérisation (voir détails dans la Partie III, p. 191). Pour chaque lot de PLA, la conversion du monomère obtenue a été supérieure à 97%.

I.3.2. Etape II : Réduction des liaisons disulfure

Dans le but d'obtenir des chaînes PLA α -SH, chacune fonctionnalisée par un thiol (-SH) à leur extrémité, des liaisons disulfure des PLA-SS-PLA ont été réduites en utilisant un thiol de petite masse molaire – le dithiothréitol (DTT, réactif de Cleland)¹³. Ce dernier est le plus couramment utilisé pour réduire les liaisons -SS- et peut être employé dans une large gamme de solvants tels que l'eau, le THF, l'acétone ou le chloroforme. D'autres thiols sont également disponibles dans le commerce, comme par exemple la cystéine, le glutathion, le mercaptoéthanol, le 2,3-dimercaptopropanol, le thioglycolate ou la tris(2-carboxyéthyle) phosphine et peuvent aussi être employés dans la réduction de liaisons disulfure. Le mécanisme de la réduction par le DTT comporte deux étapes, avec l'oxydation du DTT en un disulfide cyclique (Schéma II.6).

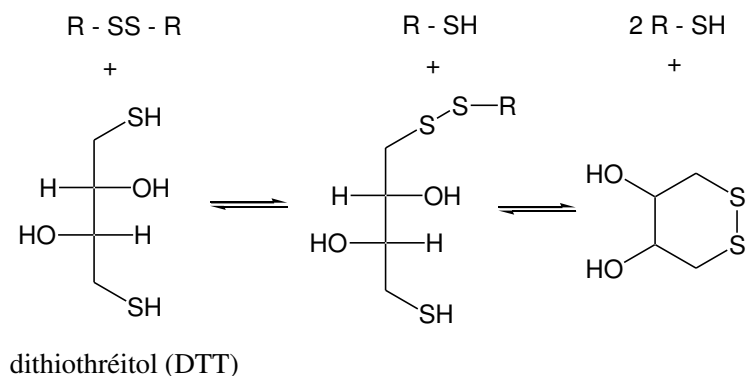


Schéma II.6. Réduction d'une liaison disulfure à l'aide du DTT¹³

Afin de réduire nos PLA-SS-PLA, nous avons utilisé le protocole proposé par Cai *et al.*¹⁴. Dans ces travaux, un poly(*N*-isopropylacrylamide) porteur d'une liaison disulfure en milieu de chaîne (PNIPAM-SS-PNIPAM) a été réduit en PNIPAM-SH en utilisant 50 éq. de DTT par chaîne de PNIPAM-SS-PNIPAM dans le THF, sous flux d'argon et pendant 24h à 50°C. Un excès important d'agent réducteur avait été employé afin de déplacer l'équilibre de la réaction vers la formation du PNIPAM-SH. Nous avons essayé d'optimiser ce protocole dans le but de diminuer la quantité du DTT nécessaire pour la réduction de nos PLA-SS-PLA, sans diminuer l'efficacité de la réduction (voir plus de détails dans le Paragraphe I.4.2.).

I.4. Caractérisation par RMN ^1H et SEC-MALLS

I.4.1. PLA α -alcyne et PLA-SS-PLA

L'analyse RMN ^1H (dans CDCl_3) (Figure II.1) des polylactides obtenus par POC du D,L-LA, réalisée après précipitation des polymères par de l'éthanol froid, permet d'une part de vérifier la fonctionnalisation des chaînes PLA à leur extrémités et d'autre part, d'estimer le nombre d'unités de répétition du polymère (n)^b. Ainsi, afin de déterminer n , l'aire A_c du pic correspondant aux protons méthyne des chaînes du PLA (protons c vers 5,2 ppm, Figure II.1) est comparée à l'aire A_b ou A_a des protons méthylène provenant de l'amorceur fonctionnel employé (protons b vers 4,8 ppm dans le cas du PLA α -alcyne, Figure II.1, spectre II, et protons a vers 2,9 ppm pour le PLA-SS-PLA, Figure II.1, spectre III). Ainsi, n est obtenu grâce aux Equations 1 et 2 dans le cas du PLA α -alcyne et du PLA-SS-PLA, respectivement.

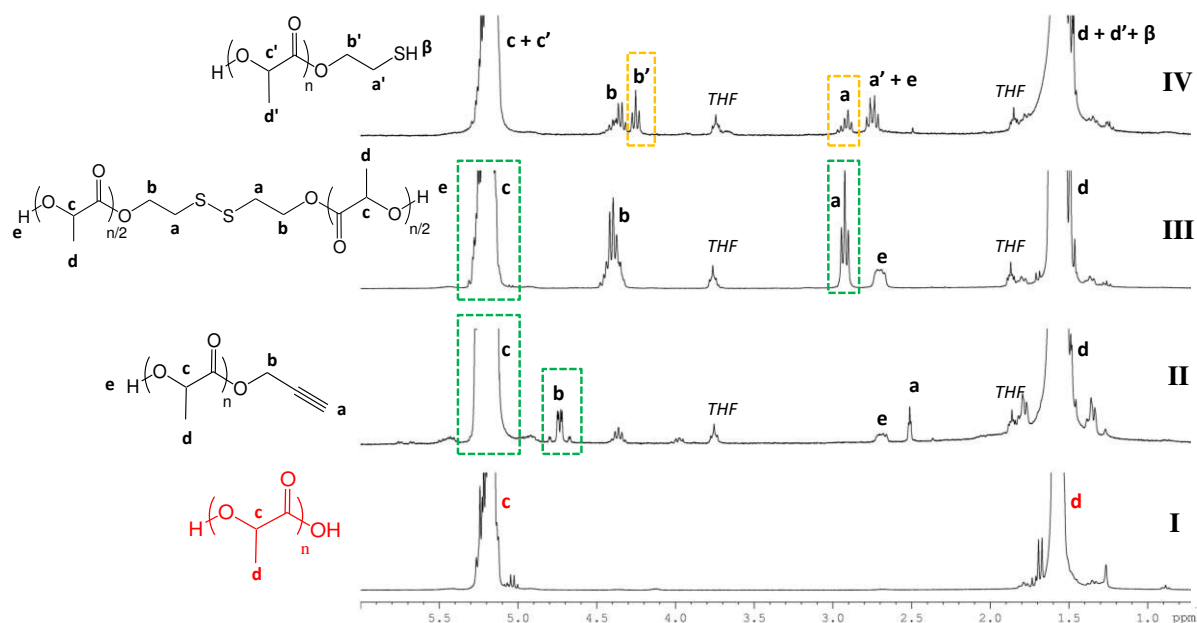


Figure II.1. Spectres RMN ^1H (dans CDCl_3) des différents polylactides utilisés dans ces travaux : PLA α,ω -dihydroxy (commercial) (I), PLA α -alcyne (II), PLA-SS-PLA (III) et mélange PLA-SS-PLA/PLA α -SH (IV)

^b Une molécule de lactide donne deux unités de répétition. Dans ce cas, ne pas confondre unité de répétition et unité monomère.

$$\text{PLA } \alpha\text{-alcyne :} \quad n = \frac{A_c}{A_b:2} \quad [1]$$

$$\text{PLA-SS-PLA :} \quad n = \frac{A_c}{A_a:2} \cdot 2 \quad [2]$$

A partir de n , la masse molaire moyenne en nombre ($\overline{M}_n \text{ RMN}$) est ensuite estimée à l'aide de l'Equation 3 et peut être comparée à la masse moyenne en nombre théorique ($\overline{M}_n \text{ théo}$) obtenue à partir de la conversion et des quantités des réactifs introduites initialement en utilisant l'Equation 4 (Tableau II.1). La distribution massique des PLA obtenus a également été évaluée par SEC-MALLS en utilisant le THF comme éluant.

$$\overline{M}_n \text{ RMN} = n \cdot M_0 + M_{ext} \quad [3]$$

avec : M_0 – masse molaire d'une unité de répétition du PLA (72 g/mol),

M_{ext} – masse molaire de l'extrémité de chaîne. Dans le cas du PLA α -alcyne, $M_{ext} = 56$ g/mol et dans le cas du PLA-SS-PLA $M_{ext} = 152$ g/mol.

$$\overline{M}_n \text{ théo} = \frac{m_{lactide}}{n_{OH}} \cdot \text{conversion} \quad [4]$$

avec : $m_{lactide}$ – masse introduite du lactide (g),

n_{OH} – nombre de mol des fonctions –OH de l'amorceur employé,

conversion – calculée à partir du spectre RMN ^1H (voir Eq. 1, Partie III, p. 192).

Les spectres RMN ^1H des produits purifiés (Figure II.1) peuvent aussi être utilisés pour évaluer le nombre (f) de fonctions alcyne en extrémité de chaînes, ou de fonctions –SH potentielles (Tableau II.1). Pour cela, les Equations 5 à 7 sont utilisées :

$$f = \frac{n_{fonctions}}{n_{chaînes}} \quad [5]$$

$$\text{pour PLA } \alpha\text{-alcyne :} \quad f = \frac{A_a}{A_c/n_{SEC}} \quad [6]$$

$$\text{pour PLA-SS-PLA :} \quad f = \frac{A_a/2}{A_c/n_{SEC}} \cdot \frac{1}{2} \quad [7]$$

avec: A_a, A_c – voir protons correspondant (Figure II.1 spectres II et III),

n_{SEC} – nombre d'unités de répétition du polymère évalué par SEC-MALLS grâce à

l'équation suivante : $n_{SEC} = \frac{\overline{M}_n \text{ SEC} - M_{extr}}{M_0}$ avec M_0 – masse molaire d'une unité de

répétition du PLA (72 g/mol), M_{ext} – masse molaire de l'extrémité de chaîne dans le cas du PLA α -alcyne (56 g/mol) ou de l'amorceur difonctionnel dans le cas du PLA-SS-PLA (152 g/mol).

Tableau II.1. Caractéristiques des PLA fonctionnels obtenus par polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide catalysée par le SnOct₂ et en utilisant l'alcool propargylique ou le 2-hydroxyéthyl disulfide comme amorceur. * Polymérisé en solution toluène (100°C, 18h), ** Polymérisé en masse (120°C, 14h30)

Polymère	$\overline{M}_n$ théo ^(a) (g/mol)	$\overline{M}_n$ RMN ^(b) (g/mol)	$\overline{M}_n$ SEC ^(c) (g/mol)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$ ($\overline{D}$) (c)	Fonctionnalité potentielle ^(d)
PLA α -alcyne 1*	2 800	3 900	3 500	1,2	0,92
PLA α -alcyne 2*	3 900	3 700	3 900	1,2	0,96
PLA-SS-PLA 1**	2 900	2 700	2 500	1,2	0,95
PLA-SS-PLA 2**	3 500	3 900	3 400	1,1	0,89
PLA-SS-PLA 3**	6 300	6 300	5 400	1,3	0,82

$\overline{M}_n$ – masse molaire moyenne en nombre, $\overline{M}_w$ – masse molaire moyenne en masse, $\overline{D}$ – dispersité

(a) Calculée à partir de la conversion réelle et des quantités des réactifs utilisées initialement (voir Eq.4).

(b) Calculée à partir d'un spectre RMN ¹H (voir Eq. 3).

(c) Obtenue par SEC-MALLS en THF en utilisant le $dn/dc = 0,054$ mL/g, correspondant au PLA dans le THF.

(d) Calculée à partir d'un spectre RMN ¹H (voir Eq. de 5 à 7).

Les distributions massiques des polymères obtenus sont monomodales (voir Partie III, p. 193) et relativement étroites comme le prouvent leur dispersités ($\overline{D}$) (entre 1,1 et 1,3). Les masses molaires moyennes en nombre estimées par RMN ¹H ($\overline{M}_n$ RMN) correspondent à celles obtenues par SEC-MALLS ($\overline{M}_n$ SEC) et sont en relativement bon accord avec les masses molaires théoriques ($\overline{M}_n$ théo) (Tableau II.1). Tous ces résultats témoignent d'un bon contrôle de la polymérisation dans les conditions utilisées et de l'obtention des PLA α -alcyne et PLA-SS-PLA de masses molaires bien définies.

La présence de pics caractérisant des protons issus de l'amorceur : alcool propargylique (protons **a** et **b**, vers 2,5 et 4,8 ppm, respectivement, Figure II.1, spectre II) ou 2-hydroxyéthyl disulfide (protons **a** et **b**, vers 2,9 et 4,4 ppm, respectivement, Figure II.1, spectre III) témoignent de la présence des fonctionnalités souhaitées dans les PLA obtenus (alcyne et pont disulfure). De plus, même si cela n'est pas crucial pour notre étude, les valeurs de ces fonctionnalités (f), c'est-à-dire le nombre de fonctions (alcyne ou thiol potentielles) par chaînes du PLA (Tableau II.1), sont relativement élevées (généralement proche de 1), ce

qui montre que la polymérisation a bien été amorcée à partir des amorceurs fonctionnels utilisés. On remarque cependant que cette fonctionnalité n'est pas quantitative, probablement liée à la présence d'impuretés protiques en faible quantité dans le milieu de polymérisation.

I.4.2. PLA α -SH

Le spectre RMN ^1H (dans CDCl_3) du PLA-SS-PLA après réduction par le DTT (Figure II.1, spectre IV) montre l'apparition de nouveaux pics nommés **a'** et **b'** de la chaîne PLA réduite, correspondant à l'extrémité thiol. Cependant, comme on peut le voir, la réduction du PLA-SS-PLA est partielle. En effet, les pics **a** et **b** correspondants aux protons issus de l'amorceur difonctionnel sont encore observés. Le pourcentage de la forme réduite dans le mélange, ce qui correspond à l'efficacité de la réduction (% réduction, voir Tableau II.2), peut être calculé à l'aide de l'Equation 8.

$$\% \text{ Réduction} = \frac{A_{b'}}{A_{b'} + A_a/2} \cdot 100 \quad [8]$$

avec : A_a – aire des protons méthylène issus de l'amorceur difonctionnel (vers 2,9 ppm),

$A_{b'}$ – aire des protons méthylène de la chaîne PLA réduite (vers 4,25 ppm).

Dans les conditions opératoires utilisées¹⁴, c'est-à-dire en employant 50 éq. de DTT par chaîne PLA-SS-PLA dans le THF, sous flux d'azote et pendant 24h à 50°C, nous avons estimé l'efficacité de réduction à 92% (voir entrée 1, Tableau II.2). Ainsi, dans ces conditions, 92% du produit obtenu est alors sous forme réduite PLA α -SH et 8% restent sous forme de PLA-SS-PLA non réduit. Cette réduction a aussi été confirmée par analyse SEC-MALLS du PLA α -SH par rapport à celle du PLA-SS-PLA de départ (Figure II.2). Le chromatogramme du PLA α -SH alors obtenu est nettement décalé vers les forts volumes d'élution, par rapport à celui du PLA-SS-PLA de départ. Ceci témoigne d'une diminution des masses molaires de l'échantillon et donc bien la réduction du pont $-\text{S}-\text{S}-$ du PLA-SS-PLA. Cependant, nous n'avons pas pu calculer les masses molaires des PLA réduits, car étant très petites, elles étaient dans la gamme limite de la colonne utilisée.

Dans un deuxième temps, nous avons ensuite essayé d'optimiser ces conditions opératoires en variant le temps de la réaction, la quantité du DTT utilisé, mais aussi en vérifiant s'il est nécessaire de travailler sous flux d'azote pour réaliser la réduction. Malheureusement, l'augmentation du temps de la réaction ne permet pas d'améliorer

l'efficacité de la réduction qui reste pourtant assez élevée à 92% (comparer les entrées 1 et 2, Tableau II.2). De plus, la diminution de la quantité du DTT de 50 à 30 éq./PLA-SS-PLA entraîne la diminution du % réduction (comparer les entrées 2 et 3, Tableau II.2). Enfin, le maintien du flux d'azote en continu semble nécessaire pour empêcher l'oxydation du thiol obtenu et la reformation de la liaison disulfure. En effet, l'efficacité de la réduction est bien moindre lorsque la réaction a lieu sous N₂ statique (comparer les entrées 3 et 4, Tableau II.2).

Tableau II.2. Conditions et résultats de réduction des PLA-SS-PLA à l'aide du DTT.

N° expérience	n _{DTT} /n _{PLA-SS-PLA}	Temps [h]	Flux de N ₂ en continu	% Réduction ^(a)
1	50	24	+	92
2	50	48	+	92
3	30	48	+	69
4	30	72	–	25

(a) Calculé à partir du spectre RMN ¹H (Figure II.1, spectre IV) par l'Eq. 8, p. 96.

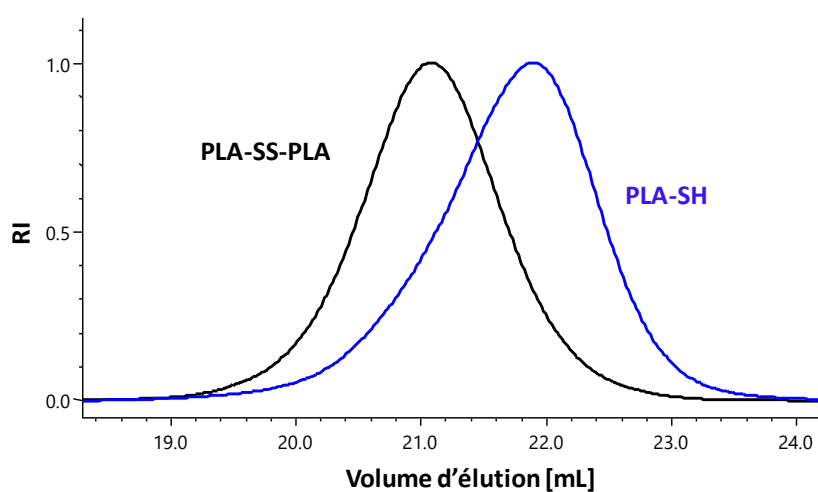


Figure II.2. Superposition de chromatogrammes SEC-MALLS obtenus dans le THF (détection réfractométrique) du polymère de départ (PLA-SS-PLA) et du polymère après la réduction (PLA α-SH)

II. SYNTHÈSES DES DÉRIVÉS DU DEXTRANE

II.1. Généralités

Le dextrane (appelé dans ce manuscrit dextrane natif) est un polysaccharide de structure quasi-linéaire produit par des microorganismes. Il est constitué majoritairement par l'enchaînement d'unités glucopyranose liées en α -1,6 et présentant un nombre variable de liaisons α -1,2, α -1,3 et α -1,4¹⁵ (Figure II.3). Le dextrane le plus couramment utilisé en pharmacie est produit par la bactérie *Leuconostoc Mesenteroides* et contient 95% de liaisons α -1,6¹⁶. Grâce à sa biodégradabilité et biocompatibilité, il est utilisé sous forme modifiée pour de nombreuses applications surtout dans les domaines thérapeutiques et médicaux, par exemple comme le substitut de plasma sanguin. Il est un polymère très hydrophile et donc soluble dans l'eau, mais il n'est soluble que dans quelques solvants organiques polaires comme le DMSO, l'éthylène glycol, le glycérol ou le formamide.

Les dextrans sont généralement désignés par l'intermédiaire de leur masse molaire moyenne en masse ($\overline{M}_w$) sous le nom générique $T_{\overline{M}_w}$ avec la masse molaire exprimée en kg/mol. Le dextrane que nous avons utilisé au cours de cette thèse est de T_{40} .

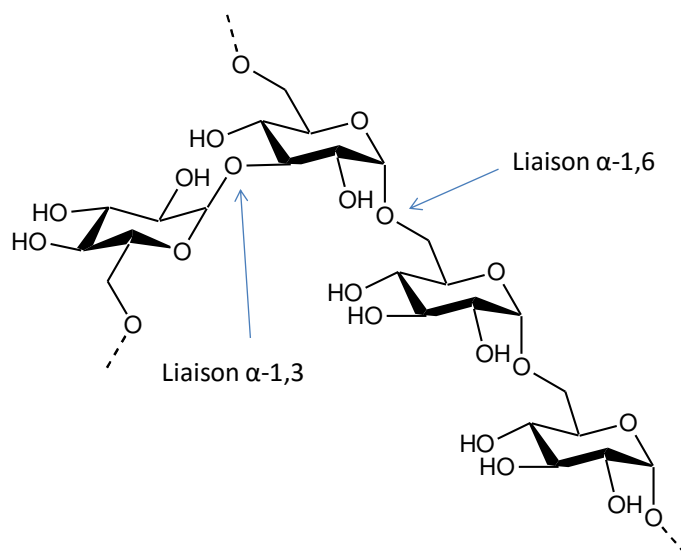


Figure II.3. Structure quasi-linéaire du dextrane

Depuis des années, le LCPM travaille avec les dérivés du dextrane T_{40} comportant différents chaînes hydrophobes (Figure II.4) : par exemple phénoxy (DexP), hexyle (DexC₆), décyle (DexC₁₀)¹⁷ et récemment des chaînes fonctionnalisées par des azides (DexN₃)² ou

doubles liaisons méthacrylate ou alcène (DexC=C ou DexC₆C=C, respectivement), que nous avons synthétisés dans le cadre de cette thèse.

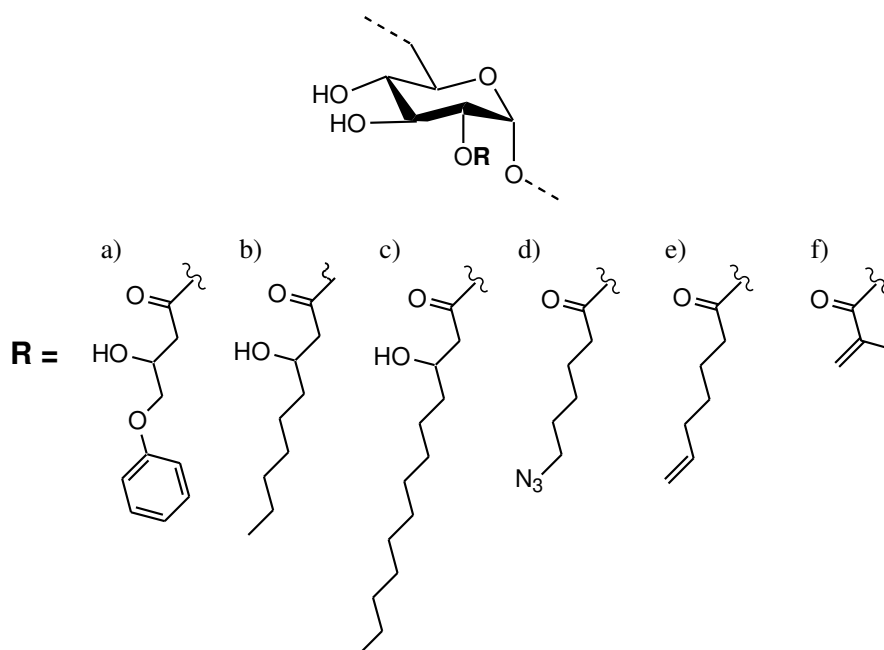


Figure II.4. Différents dérivés du dextrane utilisés au LCPM: a) phénoxy (DexP), b) hexyle (DexC₆), c) décyle (DexC₁₀), d) azide (DexN₃), e) alcène (DexC₆C=C), f) méthacrylate (DexC=C)

Dans ces travaux de thèse, les groupements fixés sur dextrane sont également hydrophobes afin que les dérivés obtenus puissent servir de tensioactifs lors de préparation de nano-objets. Pour que les dérivés du dextrane soient aussi réactifs lors du processus, ces groupements comportent des fonctions susceptibles de réagir par la chimie « click ». Il s'agit de groupements alkyle N₃ (DexN₃) qui peuvent réagir lors du couplage de type CuAAC avec le PLA α -alcyne ou de groupements comportant des doubles liaisons méthacrylate (DexC=C) ou alcène (DexC₆C=C) pour le couplage thiol-ène. La synthèse de ces dérivés est discutée ci-dessous.

II.2. Conditions de synthèse du dextrane porteur de fonctions azide (DexN₃)

La synthèse des dérivés DexN₃ a été effectuée selon le protocole déjà établi au laboratoire² (voir Partie III, p. 195). Brièvement, un dérivé de l'acide 6-azidohexanoïque activé par l'imidazole a été synthétisé à partir de l'acide 6-bromohexanoïque commercial, puis réagit sur le dextrane dans le DMSO (Schéma II.7). En variant la quantité de l'acide activé

utilisé, il est possible d'obtenir les DexN₃ avec différents taux de substitution en chaînes alkyle fixées.

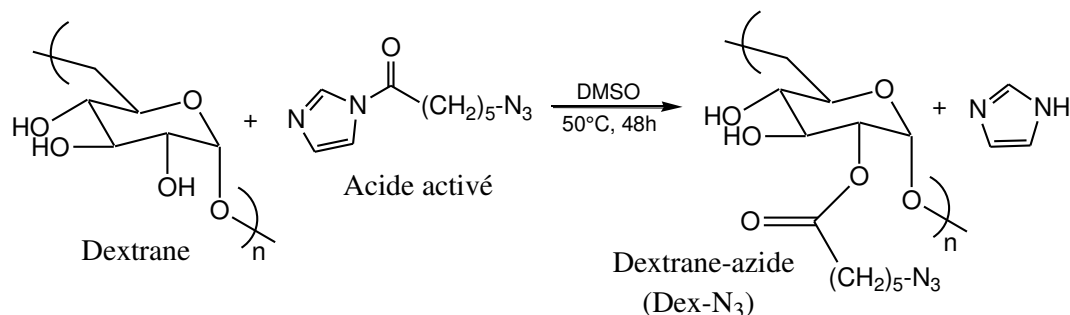


Schéma II.7. Synthèse du dextrane-azide (DexN₃) par réaction entre le dextrane natif et l'acide 6-azidohexanoïque activé

II.3. Conditions de synthèse des dextranes porteurs de doubles liaisons

Afin de pouvoir réaliser une réaction de chimie « click » thiol-ène avec le PLA α -SH, des dérivés du dextrane porteurs des doubles liaisons ont été synthétisés. Selon le mécanisme choisi pour la réaction thiol-ène, c'est-à-dire nucléophile ou radicalaire, les doubles liaisons C=C doivent être appauvries en électrons (liaisons C=C activées) ou enrichies en électrons (liaisons C=C non-activées). Pour plus d'informations, voir Partie I, Paragraphe IV.3., p.51). C'est pourquoi, deux types de dérivés du dextrane ont été envisagés : un dextrane porteur de fonctions méthacrylate (DexC=C) et un dextrane porteur de fonctions alcène (DexC₆C=C).

II.3.1. Synthèse du DexC=C

Afin d'obtenir un dérivé du dextrane porteur de doubles liaisons activées (méthacrylate), nous avons utilisé un protocole de synthèse connu au laboratoire qui consiste à estérifier le dextrane avec un anhydride, en une seule étape^{18, 19} (voir Partie III, p. 196). Dans le DMSO, l'anhydride a été activé par une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine (DMAP), en présence de la triéthylamine (Et₃N) employée comme base. Ce protocole déjà optimisé avec l'anhydride acétique dans le DMSO¹⁸ a été adapté avec de l'anhydride méthacrylique (Schéma II.8) dans le cadre de cette thèse.

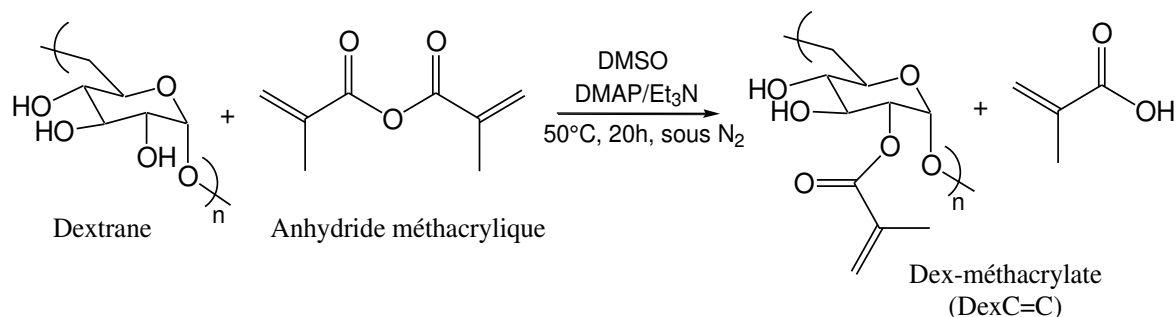


Schéma II.8. Synthèse du dextrane-méthacrylate (DexC=C) par réaction entre le dextrane natif et l'anhydride méthacrylique

II.3.2. Synthèse du DexC₆C=C

Afin d'obtenir un dérivé du dextrane porteur de doubles liaisons non-activées (alcène), nous avons estérifié le dextrane avec un dérivé de l'acide hexenoïque, en utilisant un protocole similaire à celui pour la synthèse du DexN₃²⁰. Pour cela, dans une première étape, l'acide hex-5-énoïque a été activé par la réaction avec du 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) (voir Partie III, p. 197). Ensuite, cet acide activé a été mis à réagir avec le dextrane natif dans le DMSO, afin d'obtenir le produit souhaité, c'est-à-dire le dextrane modifié par des chaînes alkyle à 6 carbones comportant à leur extrémité une fonction alcène (Schéma II.9). Comme précédemment, il est possible d'obtenir les DexC₆C=C avec différents taux de substitution en variant la quantité d'acide activé utilisé.

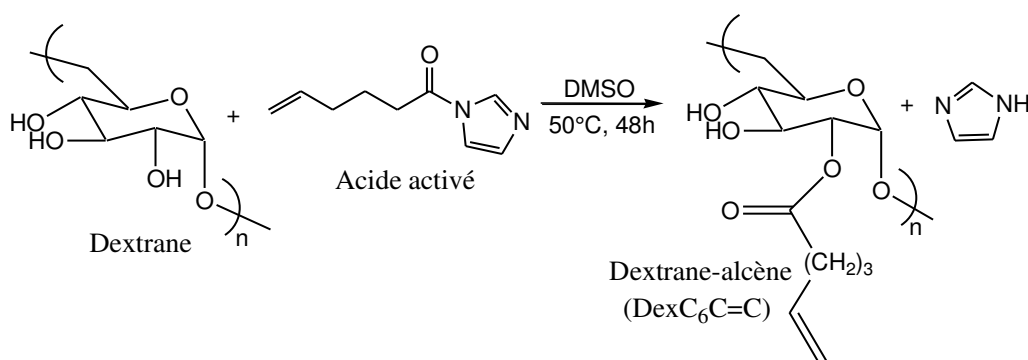


Schéma II.9. Synthèse du dextrane-alcène (DexC₆C=C) par réaction entre le dextrane natif et l'acide hex-5-énoïque activé

II.4. Caractérisation des dérivés du dextrane

II.4.1. RMN ^1H

Tous les dérivés du dextrane obtenus ont été caractérisés par RMN ^1H dans le DMSO- d_6 après leur purification par de l'éthanol froid. Leur taux de modification en chaînes latérales (Figure II.5), encore appelé taux de substitution (τ), a été évalué grâce à ces spectres RMN ^1H . Ce taux correspond au nombre moyen de groupements hydrocarbonés fixés pour 100 motifs glucopyranose. Sachant que chaque motif glucopyranose comporte trois fonctions hydroxyle, le taux τ peut varier de 0 à 300%. Ce τ peut être calculé par l'Equation 9.

$$\tau (\%) = \frac{A:x}{B:4} \cdot 100 \quad [9]$$

avec : A – aire de certains protons aliphatiques des chaînes latérales (entourés sur la Figure II.5 : DexN₃ – protons **c**, **d** et **e** entre 1,3 et 1,7 ppm ; DexC=C – protons **c**₁ et **c**₂ entre 5,5 et 6,2 ppm ; DexC₆C=C – protons **c**, **d** et **e** à 1,6 ppm, 2,1 ppm et 5,7 ppm, respectivement),

x – nombre de protons aliphatiques des chaînes latérales : pour DexN₃, DexC=C et DexC₆C=C $x = 6, 2$ et 5 , respectivement,

B – aire des protons –OH et anomère des unités glucopyranose entre 4,3 et 5,2 ppm pour le dextrane natif. Quel que soit le τ , l'aire **B** reste invariable et égale à 4. En effet, comme nous l'avons montré précédemment^{18, 19}, l'introduction de groupements ester sur le dextrane (modification de la fonction –OH² par exemple) entraîne le déplacement du protons –CH² glucosidique, résonnant initialement dans la zone de 3 à 3,9 ppm, vers la zone de 4,4 à 5,2 ppm (Figure II.5).

Dans le cas du DexC₆C=C (Figure II.5, spectre IV), l'aire **B** est cependant faussée par la présence de protons **f** et **g** provenant des chaînes latérales. C'est pourquoi, dans ce cas précis, nous utiliseront seulement l'aire des protons anomère pour le calcul du taux τ .

Pour que les dérivés du dextrane présentent un nombre suffisant de groupements réactifs des propriétés tensioactives appropriées, nous nous sommes fixés l'objectif d'obtenir des τ supérieurs ou égaux à 15%. Cependant, afin que ces dérivés demeurent solubles dans l'eau, nous avons décidé de limiter ces τ à 30%. Dans le Tableau II.3, les τ réellement obtenus pour les dextrans modifiés utilisés au cours de cette thèse sont indiqués. Par la suite, ces

dérivés seront nommés DexN₃- τ , DexC=C- τ ou DexC₆C=C- τ où τ est le taux réel de modification du dextrane en chaînes latérales.

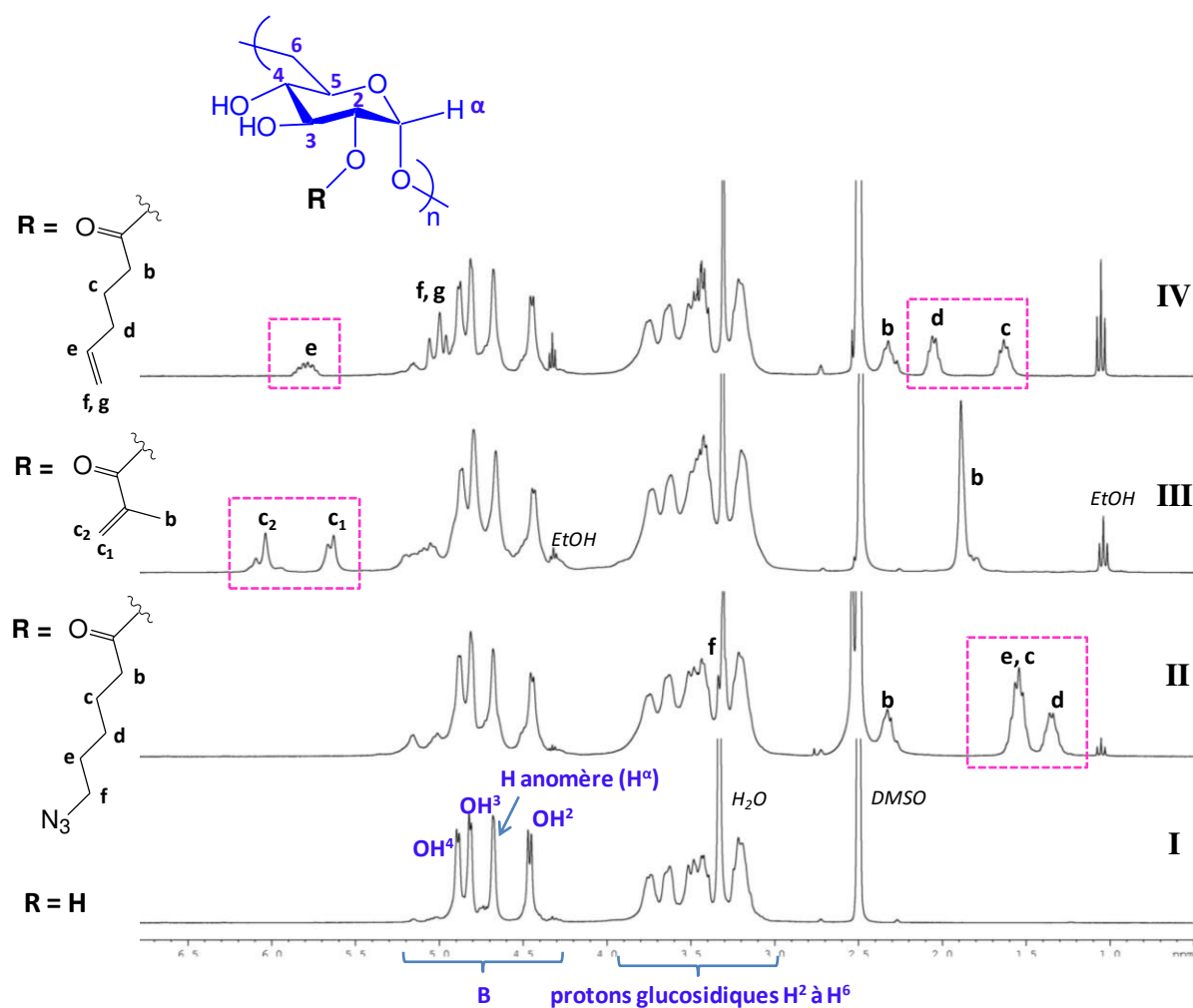


Figure II.5. Spectres RMN ¹H (dans DMSO-*d*₆) du dextrane et de ses dérivés : I) Dextrane natif, II) DexN₃, III) DexC=C, IV) DexC₆C=C

Tableau II.3. Degrés de substitution de dérivés du dextrane utilisés au cours de cette thèse

Dérivé du dextrane	τ (%) ^(a)
DexN ₃	17-23
DexC=C	20-28
DexC ₆ C=C	21

(a) Calculé à partir du spectre RMN ¹H (Figure II.5) et par l'Eq. 9.

II.4.2. SEC-MALLS

Tous les dérivés du dextrane synthétisés au cours de cette thèse ont été analysés par SEC-MALLS en utilisant le DMSO, contenant du 0,1 M de NaNO_3 , comme éluant. Ce sel facilite la solubilisation des dextrans modifiés en écrantant les interactions hydrophobes. On observe que les volumes d'élution des dérivés du dextrane sont légèrement décalés vers les volumes d'élution plus faibles, c'est-à-dire vers la zone de plus forts volumes hydrodynamiques par rapport à celui du dextrane natif (Figure II.6). Ceci témoigne que le greffage de chaînes latérales modifie légèrement le volume hydrodynamique des dextrans obtenus par rapport à celui du dextrane natif. Les masses molaires expérimentales ($\overline{M}_n^{exp}$) évaluées avec un $dn/dc = 0,07 \text{ mL/g}$ sont légèrement plus grandes que celle du dextrane natif et correspondent bien aux estimations théoriques ($\overline{M}_n^{théo}$) (Tableau II.4). Ceci confirme de plus que les conditions opératoires utilisées pendant la synthèse de ces dérivés ne dégradent pas significativement les chaînes du dextrane.

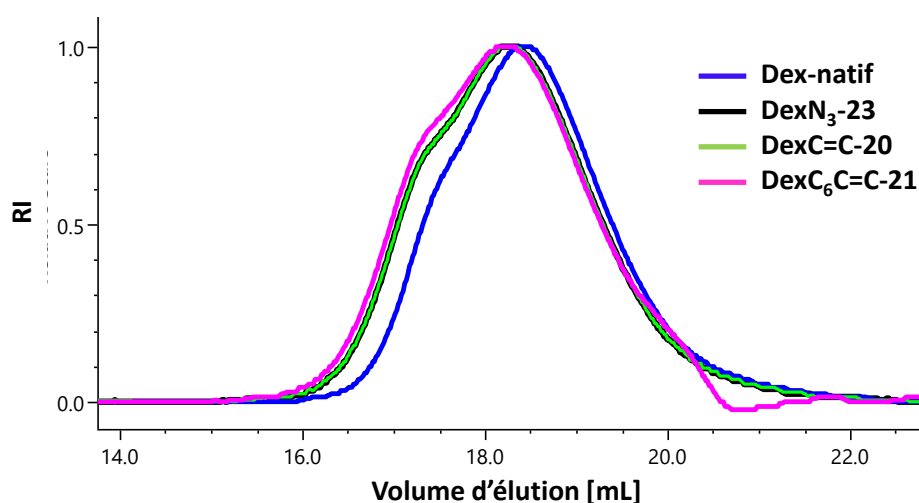


Figure II.6. Chromatogrammes SEC-MALLS obtenus dans le DMSO/ NaNO_3 0,1 M (détection réfractométrique) du dextrane natif (Dex-natif), du DexN₃-23, du DexC=C-20 et du DexC₆C=C-21

Tableau II.4. Caractéristiques du dextrane et de ses dérivés obtenus

N° dextrane	$\overline{M}_n$ théo ^(a) (g/mol)	$\overline{M}_n$ exp ^(b) (g/mol)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$ (Đ) ^(b)
Dex-natif	-	26 000	1,4
DexN ₃ -23	31 000	28 500	1,5
DexC=C-20	28 000	28 500	1,5
DexC ₆ C=C-21	29 000	28 500	1,5

$\overline{M}_n$ – masse molaire moyenne en nombre, $\overline{M}_w$ – masse molaire moyenne en masse, $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ – dispersité

(a) Calculée en utilisant la valeur de $\overline{M}_n$ du dextrane natif évaluée par SEC-MALLS et à l'aide de l'équation suivante : $\overline{M}_n \text{ théo} = \frac{\overline{M}_n \text{ exp Dex-natif} \cdot \overline{M}_{u.g. \text{ modifiée}}}{M_{u.g.}}$ avec $M_{u.g.}$ (masse de l'unité glucopyranose) correspondant

à 162 g/mol et $\overline{M}_{u.g. \text{ modifiée}} = (1 - DS) \cdot M_{u.g.} + DS \cdot (M_{u.g.} + M_{\text{chaîne hydrophobe}})$ correspondant à 195, 175 et 181,5 g/mol pour le DexN₃-23, le DexC=C-20 et le DexC₆C=C-21, respectivement.

(b) Obtenue par SEC-MALLS dans le DMSO/NaNO₃ 0,1M en utilisant le $dn/dc = 0,07 \text{ mL/g}$.

II.4.3. Propriétés tensioactives

Les propriétés tensioactives des différents dérivés du dextrane ont été évaluées par suivi de la tension superficielle de leur solutions aqueuses en utilisant la méthode de l'anneau Du Noüy²¹. Les valeurs de tension superficielle sont ensuite tracées en fonction de la concentration en chaîne alkyle ce qui donne l'isotherme de Gibbs. La Figure II.7 présente les résultats pour le DexN₃-17, le DexC=C-28 et le DexC₆C=C-21. Plusieurs observations peuvent être faites :

- Alors que le dextrane natif ne présente pas de propriétés tensioactives, la tension superficielle de solution aqueuse de dextrane modifié est abaissée au-delà d'une certaine concentration en chaîne hydrophobe quel que soit le type de chaîne latérale hydrophobe introduite. Dans une première zone, l'interface est saturée en motifs hydrophobes adsorbés et l'abaissement traduit uniquement la variation du potentiel chimique : plus la concentration en chaîne hydrophobe augmente, plus le travail à fournir pour augmenter la surface diminue. La tension de surface varie alors de façon linéaire au logarithme de la concentration en chaîne hydrophobe. A partir d'une concentration plus élevée en chaîne hydrophobe (appelée concentration critique), la tension de surface reste constante. Ce comportement typique des polymères amphiphiles confirme la capacité de ces dérivés du

dextrane à s'accumuler à l'interface air/solution aqueuse par organisation de leurs chaînes latérales hydrophobes et démontre ainsi leur caractère tensioactif.

- Les résultats trouvés dans le cas des dérivés DexN₃ sont conformes à ceux obtenus par M. Laville au cours de sa thèse^{2, 3}. Il avait de plus montré que la pression de surface de ces dérivés (c'est-à-dire la réduction de tension de surface maximale par rapport à la tension de surface de l'eau) augmente avec le taux de substitution τ du DexN₃ utilisé. De fait, ce comportement est beaucoup plus général et se retrouve dans le cas de tous les dérivés amphiphiles du dextrane précédemment étudiés au laboratoire²².
- On observe que la pression de surface est similaire pour les dérivés DexN₃-17 et DexC₆C=C-21. De fait, ces dérivés sont relativement similaires avec des chaînes latérales à 6 carbones et des τ voisins. Cependant, le DexC=C-28 est nettement moins tensioactif que les deux autres dérivés du dextrane étudiés. Bien que son taux de substitution en chaînes hydrophobes soit supérieur, sa pression de surface est plus faible. Ceci est lié à des chaînes latérales moins hydrophobes car plus courtes – 4 carbones, au lieu de 6 carbones. Néanmoins, comme on pourra le voir plus loin (Chapitre II), il est suffisamment tensioactif pour stabiliser des émulsions huile-dans-eau (o/w) lors de préparation des nano-objets.

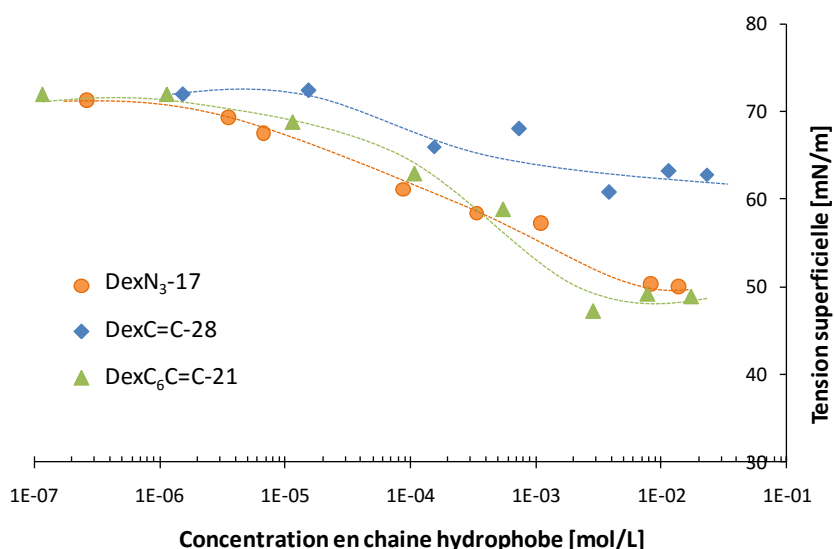


Figure II.7. Evolution de la tension superficielle des différents dérivés du dextrane solubilisés dans le milieu aqueux en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes. Les mesures ont été réalisées à 25 °C par méthode de l'anneau Du Noüy

Ce caractère tensioactif des dérivés du dextrane peut aussi être observé par un abaissement de l'interface CH₂Cl₂/solution aqueuse de polymère. Cependant, par manque du

temps, nous n'avons pu étudier que le cas du DexN₃-17 (Figure II.8). Là encore, on observe un abaissement de la tension interfaciale dès que la concentration en chaînes hydrophobes en solution est suffisante. On remarque que la chute de la tension interfaciale est moins bien définie comme cela a déjà été observé précédemment au LCPM pour d'autres dérivés du dextrane. Quoi qu'il en soit, un plateau minimum est obtenu pour la tension interfaciale au-delà de 10⁻³ mol/L en chaîne hydrophobe comme dans le cas de la tension superficielle.

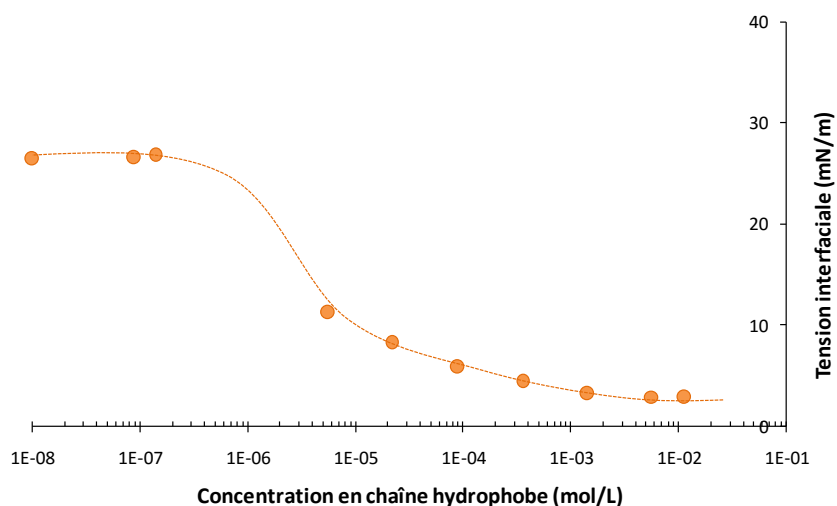


Figure II.8. Etudes de la tension interfaciale CH₂Cl₂/solution aqueuse du DexN₃-17 en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes. Les mesures ont été réalisées à 25 °C par méthode de l'anneau Du Noüy

Pour conclure, les dérivés du dextrane synthétisés (DexN₃-17, DexC=C-28 et DexC₆C=C-21) ont montré une capacité à abaisser la tension superficielle air/solution aqueuse ainsi que dans le cas du DexN₃-17, la tension interfaciale CH₂Cl₂/solution aqueuse. Nous verrons par la suite que ce caractère tensioactif est suffisant pour leur permettre de stabiliser des émulsions o/w lors de la préparation des nano-objets (Chapitre II).

III. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Nous avons montré dans ce chapitre la synthèse des polymères précurseurs aux paramètres macromoléculaires contrôlés qui seront utilisés dans le prochain chapitre pour mener des réactions « click » *in situ* lors d'élaboration de nanoparticules NPs (nanosphères – NSs et nanocapsules – NCs).

- Des polylactides fonctionnels (PLA α -alcyne ou PLA α -SH) ont été synthétisés par polymérisation par ouverture de cycle (POC) catalysée par le SnOct₂ et amorcée par l'alcool propargylique ou le 2-hydroxyéthyl disulfide, respectivement.
- Les dérivés du dextrane porteurs de fonctions azide (DexN₃) ou de doubles liaisons (DexC=C ou DexC₆C=C) ont été obtenus par estérification des fonctions hydroxyle du dextrane natif soit avec un acide activé, soit avec un anhydride.
- Ces dérivés du dextrane ont montré une capacité à abaisser la tension superficielle air/solution aqueuse de ces polymères ainsi que, dans le cas de DexN₃-17, la tension interfaciale CH₂Cl₂/solution aqueuse. Ce caractère tensioactif leur permettra de stabiliser des émulsions huile-dans-eau lors de la préparation des nano-objets (Chapitre II).

Par la suite, ces dérivés PLA et du dextrane pourront être couplés par chimie « click » à l'interface liquide/liquide d'une émulsion o/w. D'une part, le PLA α -alcyne pourra réagir lors d'une cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu(I) (CuAAC) avec le DexN₃ pour former des cycles triazole. D'autre part, les fonctions thiol, présentes en bout de chaînes du PLA α -SH, pourront se coupler avec les doubles liaisons des DexC=C ou des DexC₆C=C selon les diverses conditions employées.

CHAPITRE II

***OPTIMISATION DE LA REACTION « CLICK »
A L'INTERFACE AFIN D'OBTENIR
DES NANO-OBJETS POLYMERES***

CHAPITRE II

Après avoir synthétisé les différents précurseurs PLA-X et les dérivés amphiphiles du dextrane (Dex-Y), nous avons cherché à optimiser les réactions de couplage « click » entre ces composés. Ces réactions se dérouleront lors d'un procédé d'élaboration de nano-objets par émulsion-évaporation de solvant et plus précisément, à l'interface de l'émulsion. Pour réaliser une telle réaction, d'une part, un PLA-X fonctionnalisé à son extrémité par une fonction X (alcyne ou thiol) est solubilisé dans la phase organique qui est constituée d'un solvant volatil (CH_2Cl_2) et de quantités variables d'une huile non-volatile (M810). D'autre part, les dérivés du dextrane (Dex-Y) porteurs de fonctions Y complémentaires à X, c'est-à-dire des fonctions azide (DexN_3) ou des doubles liaisons ($\text{DexC}=\text{C}$ ou $\text{DexC}_6\text{C}=\text{C}$), sont solubilisés dans la phase aqueuse. L'émulsification de ces deux phases non-miscibles est obtenue grâce à l'énergie fournie par des ultrasons, ce qui permet l'obtention d'une dispersion de nano-gouttelettes stabilisées par les dérivés Dex-Y. En présence d'un catalyseur approprié, une réaction a lieu entre les fonctionnalités complémentaires du PLA et du dextrane à l'interface liquide/liquide de ces nano-gouttelettes. Par la suite, l'évaporation du solvant volatil permet l'obtention de NPs de PLA recouvertes de dextrane (Schéma II.10). Dans ce chapitre, nous présentons d'abord les études menées sur la chimie « click » CuAAC, puis les résultats obtenus en menant une chimie « click » thiol-ène.

Dans le cadre de ces travaux, nous avons cherché à comparer l'efficacité de différents systèmes catalytiques à savoir : CuBr, CuI, CuSO₄ associé à l'acide ascorbique (AAsc) comme réducteur (CuSO₄/AAsc) en présence ou non d'un ligand lipophile, la *N,N*-bis(2-pyridylméthyl)octadécylamine (BPMODA) (CuSO₄/AAsc/BPMODA). L'influence des conditions expérimentales sur l'efficacité de la réaction « click », telles que la puissance et le temps de sonication ont également été étudiés.

La réaction CuAAC a déjà été étudiée au LCPM tout d'abord en milieu homogène, puis les premiers essais à l'interface liquide/liquide ont été effectués pour obtenir des NSs² en utilisant le CuBr comme catalyseur. Ainsi, dans ce chapitre nous poursuivons les études de la réaction CuAAC interfaciale (Schéma II.11) dans le but d'obtenir des NSs de PLA recouvertes d'une couronne hydrophile en dextrane. Dans un premier temps, nous avons utilisé un protocole simplifié afin de déterminer les conditions optimales de la réaction « click » CuAAC interfaciale. Ainsi, le CH₂Cl₂ a tout d'abord été employé comme solvant constituant la phase organique. Puis, les réactions ont été testées en ajoutant progressivement du M810 dans la phase organique pour obtenir, *in fine*, des NCs.

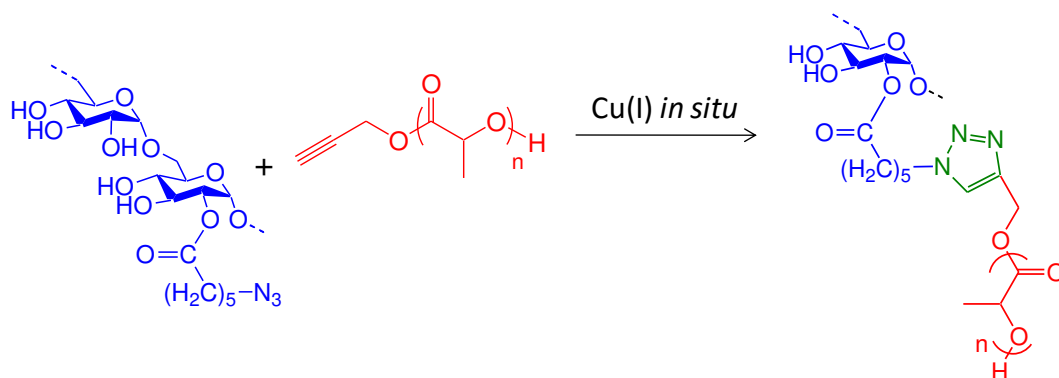


Schéma II.11. Réaction « click » CuAAC entre un DexN₃ et un PLA α-alkyne

I.1. Mise en évidence de la formation du copolymère

Après obtention des nano-objets, ceux-ci ont été lyophilisés, puis étudiés par RMN ¹H. Le spectre RMN ¹H (Figure II.9, spectres II et III) montre alors la présence de pics caractéristiques du PLA, notamment des protons méthyne *c* (vers 5,2 ppm) et méthyle *d* (vers 1,5 ppm) ainsi que ceux du dextrane (protons –OH et –H des unités glucopyranose). L'apparition d'un nouveau pic *T* vers 8,16 ppm, correspondant aux protons du cycle triazole, est une preuve directe du fait que la réaction « click » a eu lieu. En effet, ce pic n'est pas

présent dans le spectre RMN ^1H d'un simple mélange physique PLA α -alcyne + DexN₃ réalisé en utilisant les mêmes proportions massiques PLA/dextrane que dans les NPs finales. Le spectre des NCs (Figure II.9, spectre III) est quant à lui plus complexe à cause de la présence de M810.

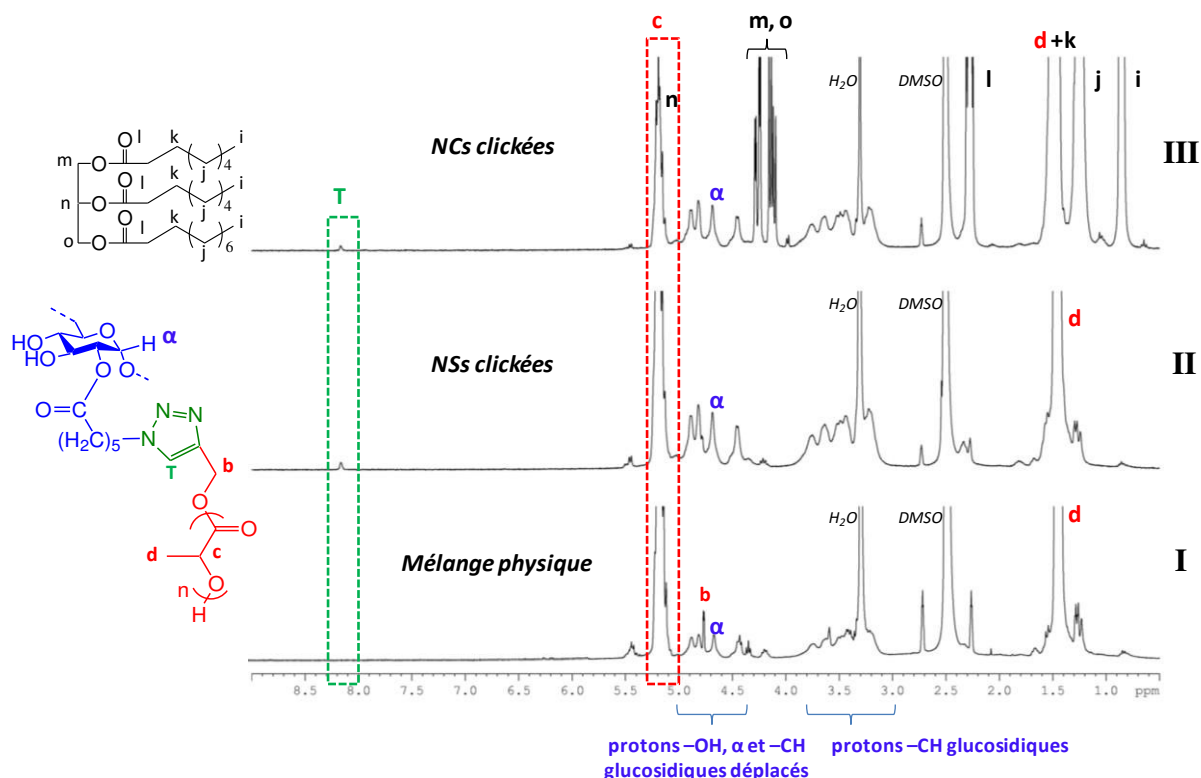


Figure II.9. Spectres RMN ^1H (DMSO- d_6) : (I) mélange physique PLA α -alcyne + DexN₃, (II) NSs et (III) NCs lyophilisées après avoir réalisé une réaction « click » CuAAC entre un PLA α -alcyne solubilisé dans la phase organique (25 g/L) et un DexN₃ présent dans l'eau (5g/L) lors du procédé d'émulsion-évaporation de solvant

En plus de la RMN ^1H , l'analyse SEC-MALLS des nano-objets obtenus en réalisant la chimie « click » interfaciale (que nous nommerons par la suite objets clickés) confirme la formation du copolymère. A titre d'exemple, les NCs obtenues avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale et en utilisant 5,5 éq. de CuSO₄ par fonctions alcyne associé à 10 éq. d'AAsc par CuSO₄ ont été dissoutes dans le DMSO (+0,1 M NaNO₃) puis injectées en chromatographie (Figure II.10). On voit clairement un décalage du chromatogramme correspondant aux NCs clickées vers les volumes d'élution plus faibles, c'est-à-dire vers les plus grands volumes hydrodynamiques. Ceci témoigne de la formation d'un copolymère greffé dextrane-g-PLA. Les épaulements présents sur ce pic et situés vers les volumes

d'élution élevés prouvent que les nano-objets contiennent également du PLA α -alcyne et du DexN₃ résiduel, n'ayant pas réagi entre eux.

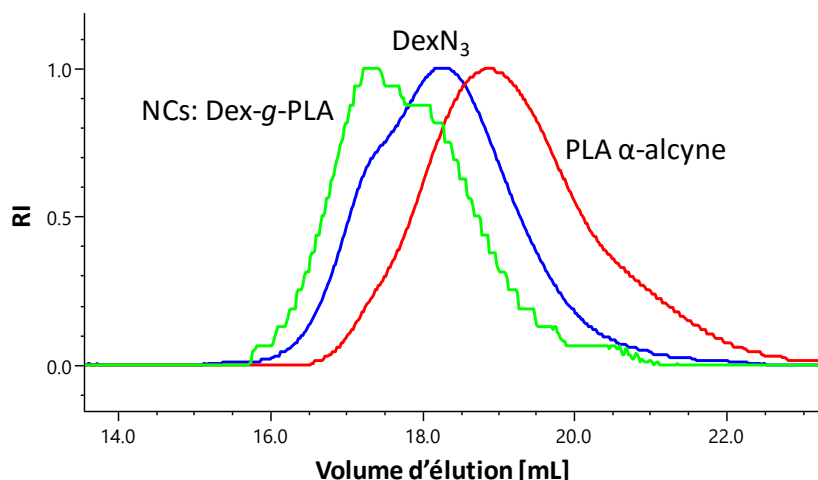


Figure II.10. Chromatogrammes SEC-MALLS (détection réfractométrique) du PLA α -alcyne, du DexN₃-23 et des NCs obtenues avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale et dissoutes dans du DMSO. Eluant : DMSO + 0,1 M NaNO₃

I.2. Efficacité de la réaction « click » CuAAC

Dans les conditions opératoires utilisées pour réaliser les réactions de chimie « click » CuAAC à l'interface (CH₂Cl₂ ± M810)/eau, les fonctions azide du DexN₃ sont employées en grand excès molaire par rapport aux fonctions alcyne du PLA (ratio molaire azide/alcyne égal à 9,6). Ainsi, l'efficacité de la réaction CuAAC (% click) est définie par le pourcentage des fonctions alcyne qui ont réagi pour former un cycle triazole. Ce % click est estimé à partir du spectre RMN ¹H des particules lyophilisées (Figure II.9) dissoutes dans le DMSO-*d*₆, en utilisant l'Equation 10 :

$$\% Click = \frac{100 \cdot T \cdot n}{A_c} \quad [10]$$

avec : A_c – aire du pic des protons méthyne du PLA (vers 5,2 ppm). Dans le cas de NCs, il faut tenir compte de la contribution des protons *f* du M810 dont le pic est très proche de 5,2 ppm),

T – aire du pic des protons triazole (vers 8,16 ppm),

n – nombre des unités de répétition du PLA-alcyne utilisé.

I.3. Elaboration de NSs. Influence des conditions opératoires sur l'efficacité de la réaction CuAAC

L'efficacité de la réaction CuAAC a été étudiée dans différentes conditions de sonication (durée et puissance d'irradiation) ainsi qu'en présence de différents catalyseurs : CuBr, CuI, CuSO₄/AAsc et CuSO₄/AAsc/BPMDA (Tableau II.5).

Tableau II.5. Influence de différents paramètres sur l'efficacité de la réaction « click » CuAAC à l'interface CH₂Cl₂/eau entre un PLA α -alcyne ($\overline{M}_n \sim 4\,000$ g/mol) solubilisé dans la phase organique (25 g/L) et un DexN₃-23 présent dans l'eau (5 g/L). Elaboration des NSs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant

N°	Conditions de sonication (puissance, durée)	Système catalytique	Ratio molaire alcyne:azide :catalyseur	% Click ^(c)
NS 1	45W, 120s	CuBr	1 : 9,6 : 5,5	30±2
NS 2	180W, 120s	CuBr	1 : 9,6 : 5,5	28±2
NS 3	45W, 240s	CuBr	1 : 9,6 : 5,5	24±1
NS 4	45W, 120s	CuI	1 : 9,6 : 5,5	15±3
NS 5	45W, 120s	CuSO₄/AAsc^(a)	1 : 9,6 : 5,5	51±8
NS 6	45W, 120s	CuSO ₄ /AAsc ^(a)	1 : 9,6 : 1	8±1
NS 7	45W, 120s	CuSO ₄ /AAsc/BPMDA ^(b)	1 : 9,6 : 1	37±5

(a) 10 éq. d'AAsc par CuSO₄ ont été ajoutés.

(b) 10 éq. d'AAsc et 1 éq. de BPMDA par CuSO₄ ont été ajoutés.

(c) Calculé à partir d'un spectre RMN ¹H (voir Eq. 10). Les erreurs expérimentales correspondent à la déviation standard calculée grâce aux Eq. 3 et 4 (voir Partie III, p. 205) avec $n \geq 3$ sauf NS4 et NS6 où $n=2$.

Le Tableau II.5 montre que l'augmentation de la puissance de sonication (de 45 W à 180 W, expériences NS1 et NS2, respectivement) ou le doublement du temps de la réaction (de 120 s à 240 s, expériences NS1 et NS3, respectivement) n'améliorent pas l'efficacité de la réaction « click » CuAAC, laquelle demeure proche de 25%. L'utilisation de sels de cuivre (I) comme CuBr (NS1) ou CuI (NS4) conduit à des % click moins élevés qu'en employant le sel de cuivre (II) (CuSO₄, NS5) réduit *in situ* en cuivre (I) à l'aide de l'AAsc. On peut expliquer ces résultats en considérant que même si le milieu réactionnel est dégazé, l'étape de sonication se déroule à l'air pendant 2 min. Ainsi, ces résultats sont probablement dûs à la sensibilité du Cu(I) à l'oxygène présent dans l'air qui cause sa désactivation partielle quand le sel de Cu(I) est utilisé directement. Dans le système catalytique CuSO₄/AAsc, l'agent

réducteur (AAsc) utilisé 10 fois en excès par rapport au sel Cu(II) assure ainsi sa réduction continue *in situ* en Cu(I), même en présence de l'air. Ceci conduit alors à des efficacités de réaction plus élevées (51 ± 8)% (NS5). On peut d'ailleurs noter que le % click est fortement influencé par la quantité de catalyseur utilisé car la diminution de la quantité de CuSO₄ réduit de façon importante l'efficacité de la réaction (expériences NS6 et NS5). En utilisant uniquement 1 éq. de CuSO₄ par alcyne, l'efficacité chute alors à 8% (expérience NS6). Cependant, l'emploi d'un ligand lipophile, tel que le BPMODA permet de diminuer la quantité de cuivre nécessaire pour mener la réaction sans réduction importante de l'efficacité de la réaction « click » (NS7). Ceci est probablement lié à la formation d'un complexe lipophile entre le Cu(I) et le ligand qui facilite la solubilisation du Cu(I) dans la phase organique, ce qui le rend plus accessible aux fonctions alcyne présents dans cette phase organique et catalyse d'autant mieux la réaction.

I.4. Elaboration de NCs. Influence du M810 sur l'efficacité de la réaction CuAAC

L'étude de la réaction « click » CuAAC à l'interface d'une émulsion a été poursuivie en présence de quantités variables de M810 dans la phase organique initiale (de 5 à 20% vol). L'influence de l'ajout de M810 dans la formulation initiale sur le % click est résumée dans le Tableau II.6.

On observe une augmentation significative de l'efficacité de la réaction en présence de M810 quand le système CuSO₄/AAsc est employé comme catalyseur (expériences NC2, NC3, NC4 ~70%) par rapport à l'expérience NS5 menée sans huile (~51%). Plus précisément, le % click semble ne pas être influencé par la quantité d'huile ajoutée dans la phase organique initiale (entre 5 et 20% vol). Ces résultats peuvent être dus à la séparation de phases entre le PLA et le M810 résultant de leur faible miscibilité et se produisant progressivement lors de l'évaporation du CH₂Cl₂ (bon solvant du PLA) (voir Chapitre III, Paragraphe IV.1., p. 154). Ainsi, le polymère se séparant de l'huile (non-solvant du PLA) est progressivement déplacé en surface des gouttelettes d'émulsion. Ceci doit sans doute contribuer à une meilleure accessibilité des fonctions alcyne du PLA vis-à-vis du catalyseur à base de cuivre et des fonctions azide du DexN₃ présents dans la phase aqueuse. Grâce à cette meilleure accessibilité, l'activation des alcynes par le catalyseur (formation d'un acétylure de cuivre (I)) responsable de la vitesse de réaction (voir Partie I, Paragraphe IV.2.2., p.47) est favorisée.

Ceci conduit à de meilleures efficacités de réaction, par rapport au cas où la ségrégation de phases n'a pas lieu, c'est-à-dire en l'absence d'huile non-miscible au PLA (M810).

Tableau II.6. Influence du M810 sur l'efficacité de la réaction « click » CuAAC à l'interface (CH₂Cl₂ +M810)/eau entre un PLA α -alcyne ($\overline{M}_n \sim 4\,000$ g/mol) solubilisé dans la phase organique (25 g/L) et un DexN₃-23 présent dans l'eau (5 g/L) lors de l'élaboration des NCs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant

N°	%vol. de M810 ^(a)	Conditions de sonication (puissance, durée)	Système catalytique	Ratio molaire alcyne:azide :catalyseur	% Click ^(d)
NS 1	0	45W, 120s	CuBr	1 : 9,6 : 5,5	30±2
NC 1	10	45W, 120s	CuBr	1 : 9,6 : 5,5	29±4
NS 5	0	45W, 120s	CuSO₄/AAsc^(b)	1 : 9,6 : 5,5	51±8
NC 2	5	45W, 120s	CuSO ₄ /AAsc ^(b)	1 : 9,6 : 5,5	68±1
NC 3	10	45W, 120s	CuSO₄/AAsc^(b)	1 : 9,6 : 5,5	69±4
NC 4	20	45W, 120s	CuSO ₄ /AAsc ^(b)	1 : 9,6 : 5,5	70±1
NS 7	0	45W, 120s	CuSO ₄ /AAsc/BPMODA ^(c)	1 : 9,6 : 1	37±5
NC 5	10	45W, 120s	CuSO ₄ /AAsc/BPMODA ^(c)	1 : 9,6 : 1	38±1

(a) Quantité volumique initialement introduite dans la phase organique (volume total de la phase organique = 1mL).

(b) 10 éq.d'AAsc par CuSO₄ ont été ajoutés.

(c) 10 éq. d'AAsc et 1 éq. de BPMODA par CuSO₄ ont été ajoutés.

(d) Calculé à partir d'un spectre RMN ¹H (voir Eq. 10). Les erreurs expérimentales correspondent à la déviation standard calculée grâce aux Eq. 3 et 4 (voir Partie III, p. 205) avec $n \geq 3$ sauf NC2 et NC5 où $n=2$.

En ce qui concerne les autres catalyseurs testés (CuBr et CuSO₄/AAsc/BPMODA), seules les formulations avec l'ajout de 10% vol de M810 dans la phase organique initiale ont été rapportées dans le Tableau II.6. On n'observe cependant aucune influence de l'ajout de M810 sur l'efficacité de la réaction « click » CuAAC dans ces cas (comparer les expériences NS1 avec NC1 et les expériences NS7 avec NC5). Lorsque du CuBr est utilisé, celui n'est soluble ni dans la phase organique ni dans la phase aqueuse. Le fait que PLA α -alcyne migre de la phase organique vers l'interface lorsque du M810 est employé ne favorise alors pas l'accessibilité de fonctions alcyne par rapport au catalyseur. En effet, contrairement au CuSO₄, le CuBr n'est pas dissous en phase aqueuse et est situé à l'interface phase organique/eau quelle que soient les conditions expérimentales (avec ou sans M810). Le %

click reste donc inchangé par rapport aux expériences sans ajout de M810. Dans le cas du système $\text{CuSO}_4/\text{AAsc}/\text{BPMODA}$, comme dit précédemment, l'utilisation du BPMODA (ligand lipophile) permet de complexer le Cu(I) en formant un composé organosoluble. Ainsi, quelle que soit la composition de la phase organique (sans ou avec M810), ce système catalytique migre dans cette phase organique et sa capacité à réagir vis-à-vis des fonctions alcyne du PLA est toujours la même, que le M810 soit utilisé ou non. Par conséquent, le % click ne varie pas non plus dans ce cas-là.

I.5. Elimination du cuivre résiduel

La présence de cuivre résiduel dans les produits finaux peut limiter l'emploi de ces NPs dans le cadre de certaines applications, par exemple environnementale (traitement de milieux aqueux) ou pharmaceutique. C'est pourquoi, nous avons vérifié qu'il était possible de réduire au maximum la quantité résiduelle de catalyseur à base de cuivre présente dans ces NPs. Cette thèse était essentiellement focalisée sur l'obtention de NCs, nous avons mené ce test avec les NCs préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale qui ont été alors purifiées par traitement avec de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) connu pour ces propriétés chélatantes, notamment du cuivre. Pour cela, la suspension de NCs a été mise sous agitation en présence d'environ 5 éq. d'EDTA par mol de cuivre à température ambiante et pendant une nuit (voir plus de détails dans la Partie III, p. 215).

La quantité du cuivre résiduel dans les NCs finales a ensuite été déterminée par spectroscopie par source plasma à couplage inductif et absorption optique (ang. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES). Nous avons analysé les NCs clickées qui ont été obtenues en utilisant les principaux systèmes catalytiques de notre étude (Tableau II.7). Ces résultats montrent l'efficacité de la méthode de purification avec l'EDTA. En effet, quel que soit le système catalytique employé, plus de 95% du cuivre initialement introduit dans le milieu réactionnel est éliminé des objets finaux.

La quantité de cuivre résiduel dans les NCs varie ainsi entre 15 et 153 mg par kg de NCs (c'est-à-dire entre 15 et 153 ppm). Or, selon la législation européenne concernant la quantité de cuivre autorisée dans des plans d'eaux²⁸, basée sur les résultats des tests d'écotoxicité, une quantité de cuivre inférieure à 2,7 $\mu\text{g/L}$ n'induit aucun effet néfaste. Cependant, une concentration dix fois plus importante (27 $\mu\text{g/L}$) entraîne un risque d'effet

léta1 sur les espèces les plus sensibles ce qui conduit à une diminution de leur population. Ainsi, en tenant compte de la quantité de cuivre résiduel dans nos NCs après leur purification avec de l'EDTA, la quantité maximale de NCs autorisée pour traiter 1 m³ d'eau est comprise entre 17 et 180 g de NCs selon le système catalytique utilisé lors de leur formulation (Tableau II.7).

Le catalyseur CuSO₄ (expérience NC3, Tableau II.7) semble être le plus facile à éliminer, vraisemblablement en raison de sa bonne solubilité dans l'eau contrairement au CuBr (NC1) qui, quant à lui, n'est soluble ni dans l'eau ni dans la phase organique. Enfin, l'utilisation du ligand lipophile BPMODA associé au CuSO₄ (NC5) rend l'élimination du cuivre plus difficile, malgré sa quantité initiale 5 fois moins importante que dans le cas des expériences NC3 ou NC1 (voir Tableau II.6), sans doute à cause de la formation d'un complexe qui devient alors peu soluble dans l'eau.

Tableau II.7. Détermination de la quantité du cuivre résiduel dans les NCs (préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale) par méthode d'ICAP-OES

N°	Système catalytique utilisé	Quantité du cuivre résiduel dans les NCs [ppm] ^(a)	Fraction massique du cuivre éliminé [%] ^(b)	Quantité maximale des NCs autorisée [en g] pour traiter 1m ³ d'eau ^(c)
NC 3	CuSO ₄ /AAAsc	15	99,9	180
NC 5	CuSO ₄ /AAAsc/BPMODA	144	95,5	18
NC 1	CuBr	153	99,2	17

(a) 1 ppm = 10⁻⁶, ce qui correspond par exemple à 1mg de cuivre dans 1kg de nanocapsules.

(b) Déterminé par rapport à la quantité initialement introduite.

(c) Calculé en tenant compte de la quantité maximale de cuivre autorisée par la législation européenne dans les plans d'eaux égale à 2,7 µg/L (= 2,7 mg/m³)

Pour conclure, le système CuSO₄/AAAsc (sans ligand) semble être le plus « propre » parmi les trois systèmes testés. De plus, il s'est avéré être le plus efficace dans nos conditions opératoires pour réaliser les réactions « click » CuAAC, avec ou sans M810 dans la phase organique. Ces principales raisons nous ont conduits à le sélectionner pour la suite de nos études.

II. OPTIMISATION DE LA REACTION « CLICK » THIOL-ENE A L'INTERFACE

Le couplage de type thiol-ène, c'est-à-dire entre un thiol et une molécule porteuse d'une double liaison $C=C$, est une des réactions de chimie « click » qui attire actuellement l'intérêt de la communauté scientifique. Dans le cas de cette réaction, l'ajout de catalyseur métallique n'est pas nécessaire ce qui est un avantage important par rapport à la chimie CuAAC.

Selon la littérature (voir Partie I, Paragraphe IV.3, p.51), les réactions thiol-ène peuvent être catalysées par des molécules nucléophiles ou basiques ou encore peuvent être menées selon un mécanisme radicalaire. Au cours de cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à des réactions menées selon le mécanisme nucléophile que nous appellerons réactions « thiol-ène nucléophile ». Ainsi, dans ce paragraphe, nous présentons dans un premier temps des résultats préliminaires de ce type de réaction en milieu homogène. Ensuite, en tirant profit des résultats obtenus grâce à ces expériences préliminaires, nous avons pu réaliser cette réaction thiol-ène nucléophile à l'interface d'une émulsion lors de l'élaboration de NPs. Finalement, nous décrirons quelques résultats préliminaires de réactions thiol-ène conduites à l'interface d'une émulsion selon le mécanisme radicalaire.

II.1. Réaction thiol-ène nucléophile

Cette réaction a été réalisée en utilisant le dextrane porteur de doubles liaisons méthacylates ($DexC=C$) appauvries en électrons et susceptibles de réagir avec la fonction thiol de la chaîne PLA ($PLA \alpha-SH$), en présence d'un catalyseur nucléophile (Schéma II.12). Après réaction, un copolymère dextrane-g-PLA est alors formé.

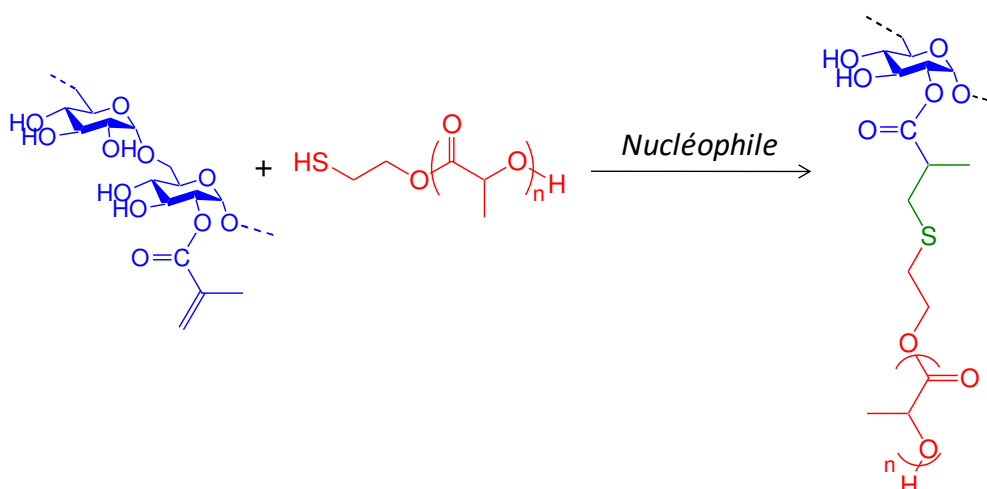


Schéma II.12. Réaction « click » thiol-ène nucléophile entre un DexC=C et un PLA α -SH

II.1.1. Expériences préliminaires menées en milieu homogène

Afin de déterminer des conditions efficaces de couplage entre le DexC=C et le PLA α -SH nous avons tout d'abord effectué des expériences en milieu homogène. Pour cela, il a été nécessaire d'utiliser un solvant commun aux deux réactifs – le DMSO. Nous avons choisi de tester deux catalyseurs nucléophiles (la *n*-hexylamine (HexAm) et la triéthylamine (Et₃N)).

Rappelons tout d'abord que l'efficacité de la réduction du PLA-SS-PLA est de 92% (voir Chapitre I, Paragraphe I.4.2., p. 96) et qu'il est tout à fait possible que les fonctions thiol se recombinent en pont disulfure durant le couplage thiol-ène, ce qui conduit à leur inactivation vis-à-vis la double liaison C=C. Pour ces raisons, nous avons décidé d'utiliser un excès molaire de PLA (1,5 éq.) par rapport aux doubles liaisons du DexC=C dans ces expériences préliminaires.

II.1.1.1. Mise en évidence de la formation du copolymère

Le spectre RMN ¹H (dans DMSO-*d*₆) du copolymère dextrane-*g*-PLA formé par couplage thiol-ène (catalyse HexAm) entre le DexC=C et le PLA α -SH, et purifié par précipitation par l'éthanol froid, a été réalisé afin de vérifier le bon déroulement de la réaction (Figure II.11, spectre II). Il peut être comparé au spectre du mélange physique PLA α -SH + DexC=C (Figure II.11, spectre I) réalisé en utilisant les mêmes proportions massiques PLA/dextrane que dans l'échantillon précédent. Les pics caractéristiques du PLA (*c* ou *c'* et *d* ou *d'*) et ceux des unités glucopyranose du dextrane sont bien observés sur la Figure II.11, spectre II. Cependant, les pics correspondant aux chaînes latérales du DexC=C, c'est-à-dire

aux protons vinylique (**C₁**, **C₂**) ainsi que les protons méthyle (**B**) de la fonction méthacrylate ne sont plus visibles sur la Figure II.11, spectre II. Ceci confirme la conversion totale de la double liaison (% click = 100). De plus, par rapport au spectre du mélange physique PLA α -SH + DexC=C de nouveaux pics apparaissent. Ils correspondent aux protons **a**, **g**, **e** (entre 2,6 et 3 ppm) et aux protons **f** (entre 1,2 et 1,4 ppm). Ceci confirme la formation d'un copolymère dextrane-g-PLA.

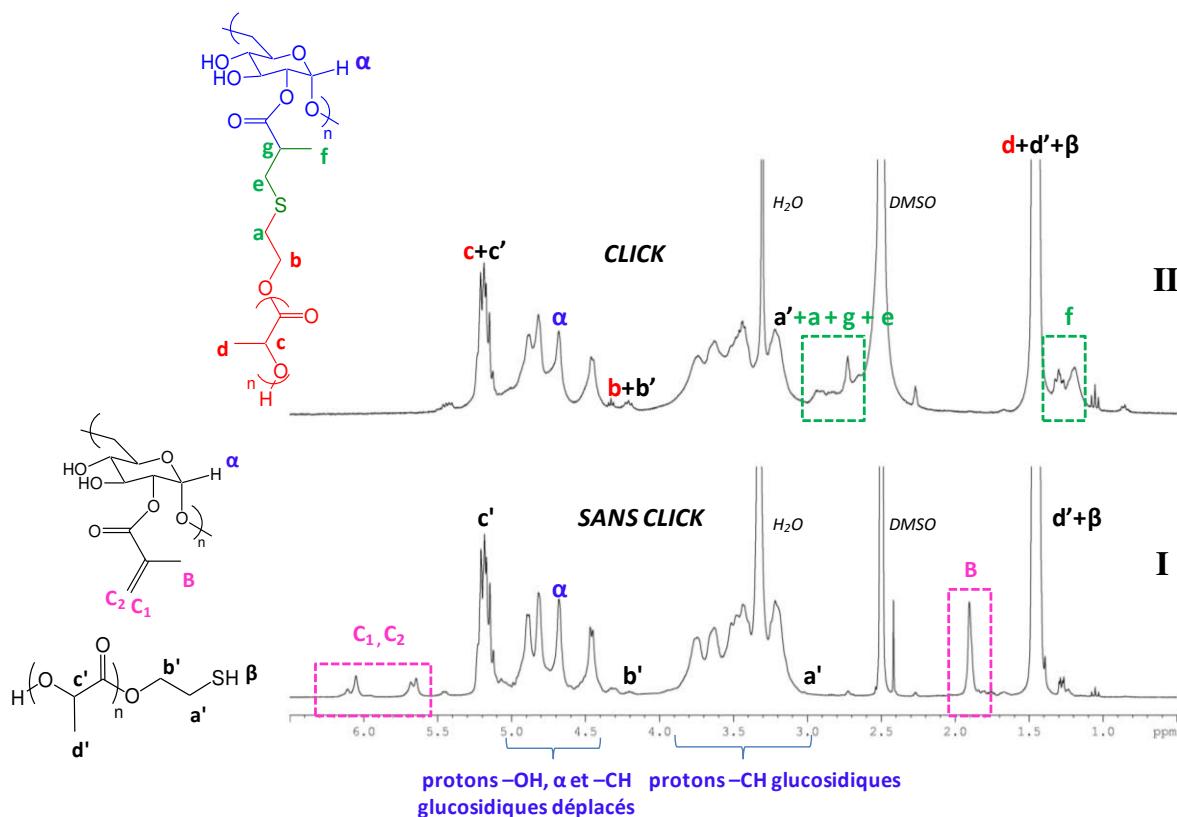


Figure II.11. Spectres RMN ¹H (dans DMSO-*d*₆) du mélange physique PLA α -SH + DexC=C (I) et du copolymère dextrane-g-PLA purifié et produit par la réaction thiol-ène (II) entre le DexC=C-20 (1 éq. de C=C) et le PLA α -SH ($\overline{M}_n \sim 3\,100$ g/mol, 1,5 éq. SH /C=C) dans le DMSO (% click = 100)

Pour confirmer la formation du copolymère dextrane-g-PLA, un spectre RMN 2D ¹H-¹³C (HSQC, dans DMSO-*d*₆) du produit de la réaction thiol-ène entre le DexC=C-20 et le PLA α -SH (% click = 100%) a été réalisé. Ce spectre peut également être comparé à celui effectué pour un mélange physique PLA α -SH + DexC=C de composition équivalente à celle du copolymère (Figure II.12). Sur les deux spectres, on observe bien les signaux correspondants aux couplages proton-carbone des unités de répétition du PLA, ainsi que ceux provenant des unités glucopyranose du DexC=C. Sur le spectre du mélange physique PLA α -SH + DexC=C (Figure II.12, spectre I), on note la présence des signaux correspondant à la

double liaison du DexC=C (signaux C₁, C₂ et B) tandis qu'ils ne sont plus observés sur le spectre du copolymère dextrane-g-PLA (Figure II.12, spectre II). Ceci confirme encore une fois que les doubles liaisons du DexC=C ont totalement réagit. De plus, on note l'apparition de nouveaux signaux (signaux *a*, *g*, *e* et *f*) par rapport au spectre du mélange physique PLA α-SH + DexC=C, d'où la formation d'un nouveau produit : le copolymère dextrane-g-PLA.

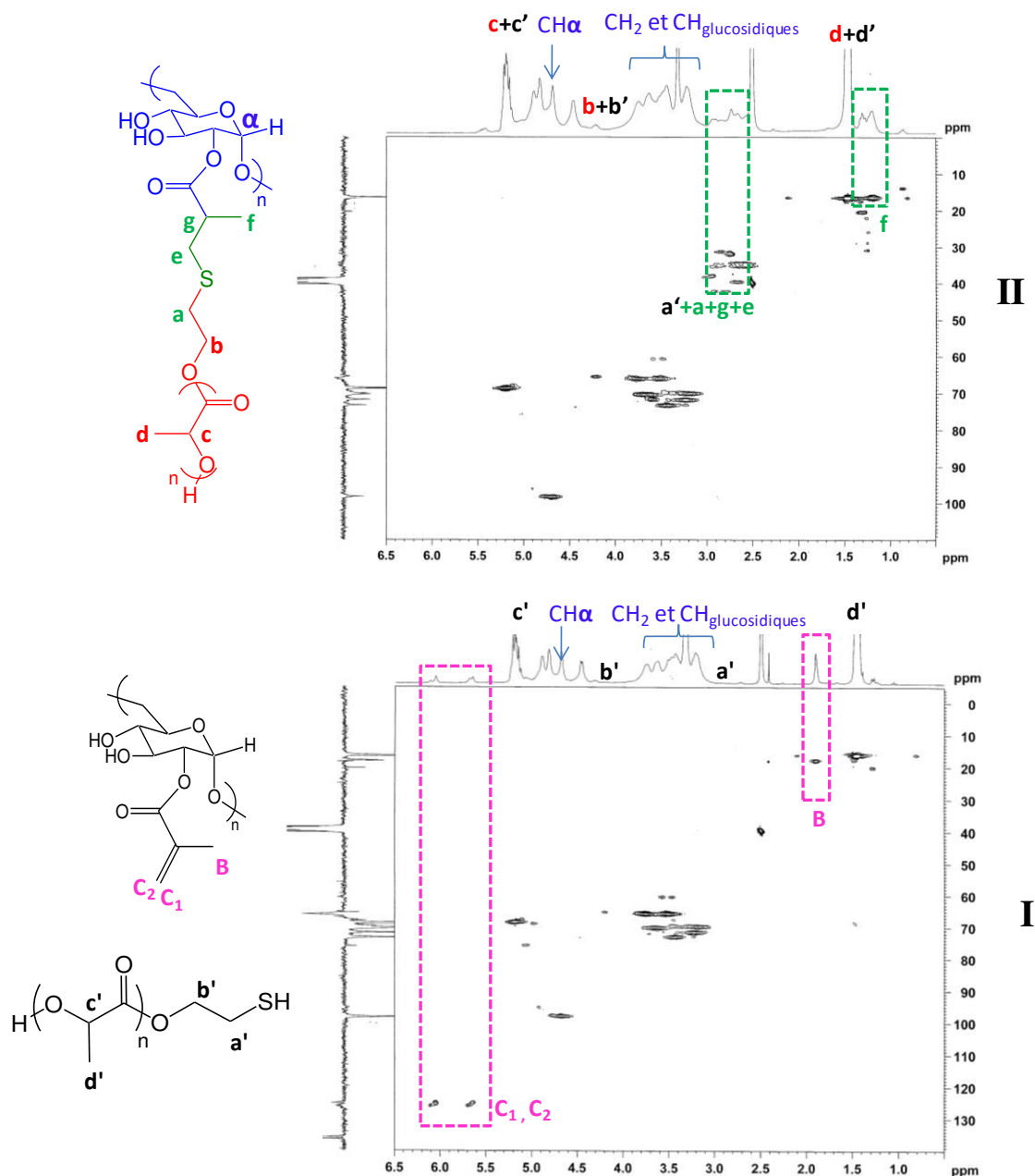


Figure II.12. Spectres RMN 2D ¹H – ¹³C (HSQC) (DMSO-*d*₆) du produit de la réaction thiol-ène entre le DexC=C-20 et le PLA α-SH dans le DMSO (% click = 100) (II) et du mélange physique PLA α-SH + DexC=C dans les mêmes proportions que dans le copolymère (I)

En outre, le produit de la réaction thiol-ène a été injecté en SEC-MALLS et son chromatogramme a été comparé à ceux des substrats utilisés, c'est-à-dire le DexC=C et le PLA α -SH. Le DMSO (+ 0,1M NaNO₃) a été employé comme éluant. La superposition des chromatogrammes obtenus est présentée à la Figure II.13. On observe que le chromatogramme du dextrane-g-PLA est clairement décalé vers les faibles volumes d'élution par rapport à ceux des réactifs de départ. Cependant, un épaulement est visible sur ce chromatogramme vers les grands volumes d'élution. Le % click obtenu pour ce produit (100%) et déterminé précédemment indique vraisemblablement que toutes les fonctions méthacrylate du DexC=C ont réagi. Aussi, cet épaulement correspond probablement à du PLA α -SH résiduel qui avait été utilisé en excès (1,5 éq./C=C) et qui n'a sans doute pas été éliminé lors de précipitation du produit.

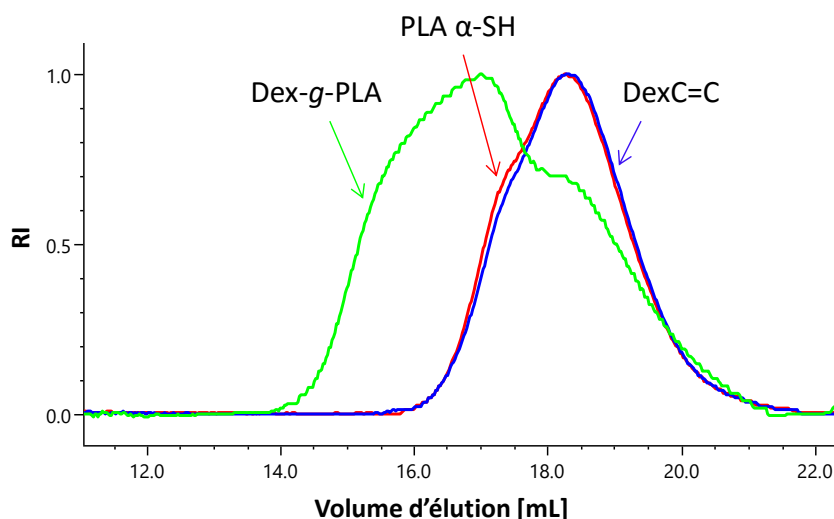


Figure II.13. Superposition des chromatogrammes SEC-MALLS (détection réfractométrique) du PLA α -SH, du DexC=C-20 et du copolymère Dex-g-PLA obtenu par la réaction thiol-ène en DMSO. Eluant : DMSO + 0,1 M NaNO₃

II.1.1.2. Efficacité de la réaction et résultats

L'efficacité de la réaction thiol-ène nucléophile a été évaluée par RMN ¹H (dans DMSO-*d*₆) (Figure II.11, spectre II) en utilisant comme référence les doubles liaisons du DexC=C qui étaient en défaut par rapport aux fonctions –SH du PLA. Ainsi, le taux de substitution du dextrane^c en fonctions méthacrylate après réaction thiol-ène et précipitation du

^c Le τ du DexC=C est calculé à l'aide d'un spectre RMN ¹H (DMSO-*d*₆) (voir Chapitre I, Paragraphe II.4.1., p.102).

produit (τ') est comparé au taux de substitution initial du DexC=C (τ^0) selon l'Equation 11, ce qui nous permet d'évaluer l'efficacité de la réaction.

$$\% Click = \left(1 - \frac{\tau'}{\tau^0}\right) \cdot 100 \quad [11]$$

Différentes conditions réactionnelles ont été testées : réactions sous atmosphère inerte (sous N₂) ou non, avec ou sans agent réducteur (dithiothréitol, DTT) qui favorise la rupture des ponts –SS– et en utilisant deux amines différentes (une amine primaire : HexAm ou tertiaire : Et₃N). Les résultats sont présentés dans le Tableau II.8 ci-dessous.

Tableau II.8. Résultats des réactions thiol-ène entre le DexC=C-28 (1 éq.) ou le DexC=C-20 (1 éq.) et le PLA α -SH ($\overline{M}_n \sim 3\ 100$ g/mol, 1,5 éq./C=C) dans le DMSO

N°	Catalyseur ^(a)	DTT	Sous N ₂	% Click ^(b)
1	HexAm (~3,3éq./SH)	-	+	0
2	HexAm (~3,3éq./SH)	Résiduel dans le PLA (2 à 3% molaire)	+	100
3	Et ₃ N (~3,3éq./SH)	Résiduel dans le PLA (2 à 3% molaire)	+	6
4	HexAm (~3,3éq./SH)	10 éq./SH	+	100
5	HexAm (~3,3éq./SH)	10 éq./SH	–	100
6	HexAm (~3,3éq./SH)	1 éq./SH	–	100

(a) 3,3 éq./SH correspond ici à 5 éq./C=C

(b) Calculé à partir d'un spectre RMN ¹H (voir Eq. 11).

Pour mener les expériences présentées dans le Tableau II.8, nous avons utilisé deux lots différents de PLA α -SH dont un contenait encore du DTT résiduel qui n'avait pas été entièrement éliminé après l'étape de la réduction du PLA-SS-PLA. La quantité résiduelle de DTT dans ce lot a été estimée entre 2 et 3% molaire (entrées 2 et 3 du Tableau II.8). Selon le Tableau II.8, l'expérience 2 menée avec ce lot de PLA α -SH en présence de l'HexAm, a fonctionné à 100%, alors que la même réaction menée avec un lot de PLA α -SH parfaitement purifié (sans DTT résiduel) n'a pas du tout fonctionnée (entrée 1). Afin de comprendre ces résultats et de les confirmer, nous avons réalisé des expériences en utilisant le PLA α -SH purifié et en ajoutant volontairement 10 éq. de DTT par fonctions thiol du PLA dans le milieu réactionnel (comparer les entrées 4 et 2). A nouveau, la conversion totale des liaisons C=C a été atteinte. Ces résultats mettent clairement en évidence la nécessité d'ajouter un agent

réducteur (DTT) pour que la réaction thiol-ène nucléophile se déroule parfaitement. En effet, le DTT empêche la recombinaison éventuelle entre deux fonctions –SH et la formation de ponts disulfure incapables de réagir avec le DexC=C.

De plus, nous avons noté que le dégazage du milieu réactionnel n'est pas nécessaire pour que la réaction fonctionne aussi bien (entrées 5 et 6). Une nouvelle expérience nous a enfin permis de diminuer dix fois la quantité de DTT nécessaire, c'est-à-dire à 1 éq./ –SH sans influencer l'efficacité de la réaction (voir entrée 6). L'amine tertiaire (Et₃N) a également été testée comme catalyseur nucléophile de la réaction thiol-ène. Cependant, la réaction se déroule alors difficilement (% click chute de 100 à 6 %) (Tableau II.8, entrées 3 et 2). Ceci peut être expliqué par la plus faible nucléophilie d'Et₃N par rapport à HexAm²⁹.

Pour conclure, les conditions optimales à employer pour réaliser des expériences ultérieures de réaction thiol-ène nucléophile à l'interface liquide/liquide sont ~ 3,3 éq. d'HexAm par fonction –SH en tant que catalyseur et d'ajouter 1 éq. DTT/PLA α-SH.

II.1.2. Réaction thiol-ène nucléophile à l'interface d'une émulsion pour obtenir des NPs

Après avoir sélectionné les conditions optimales pour mener la réaction thiol-ène nucléophile en solution homogène dans le DMSO (voir Paragraphe II.1.1., p. 120) nous avons réalisé ce couplage à l'interface d'une émulsion employée pour formuler des nano-objets. Ainsi, la solution organique de PLA α-SH dans du CH₂Cl₂ (avec ou sans ajout de M810) et contenant le catalyseur (HexAm) et le réducteur DTT (1 éq./–SH) est dispersée à l'aide des ultrasons dans la phase aqueuse contenant un DexC=C. Comme dans le cas de la réaction « click » CuAAC (Paragraphe I, p. 110), la réaction thiol-ène nucléophile se produit à l'interface liquide/liquide entre ces deux phases non-miscibles. Les concentrations en PLA α-SH et DexC=C ont été fixées à 25 g/L et 5 g/L, respectivement. Le lot de PLA α-SH (PLA-SS-PLA3, voir Tableau II.1, Chapitre I, p. 94) réduit à 92 % et le DexC=C-28 ont été employés pour notre étude d'optimisation de la réaction thiol-ène nucléophile interfaciale.

Nous avons étudié l'influence de la quantité du catalyseur (de 1 à 3,3 éq./SH), ainsi que la présence de l'huile M810 dans la phase organique sur l'efficacité de la réaction thiol-ène nucléophile à l'interface (CH₂Cl₂ ±M810)/eau (Tableau II.9). Contrairement aux réactions conduites en milieu homogène, les fonctions méthacrylate du DexC=C, utilisé à la fois

comme stabilisant de l'émulsion et comme réactif pour le couplage « click », sont ici en large excès (ratio molaire $C=C/SH = 9,5/1$). Il serait donc préférable de ne pas les utiliser comme référence pour déterminer l'efficacité de la réaction (% click). Cependant, à cause des difficultés d'intégration des pics correspondants aux protons caractéristiques du lien covalent qui s'établit entre les fonctions $-SH$ et les doubles liaisons $C=C$, c'est-à-dire les protons **a**, **g**, **e** (entre 2,6 et 3 ppm il y a également un pic « satellite » du DMSO (Figure II.14) et les protons **f** qui résonnent sous le pic correspondant aux protons méthylène **j** du M810 (entre 1,1 et 1,4 ppm, Figure II.14), nous avons utilisé l'intégration du pic des protons des doubles liaisons (**C₁**, **C₂**) comme référence pour évaluer le % click (Tableau II.9). Notons de plus, qu'il est difficile d'observer les pics du PLA α -SH (**a'**, **b'**). Ainsi, l'efficacité de la réaction thiol-ène à l'interface ($CH_2Cl_2 \pm M810$)/eau est calculée par rapport aux taux de substitution de dextrane (τ) initial et final en fonctions méthacrylate, comme cela a été le cas pour les réactions en milieu homogène (voir Paragraphe II.1.1.2., p. 123).

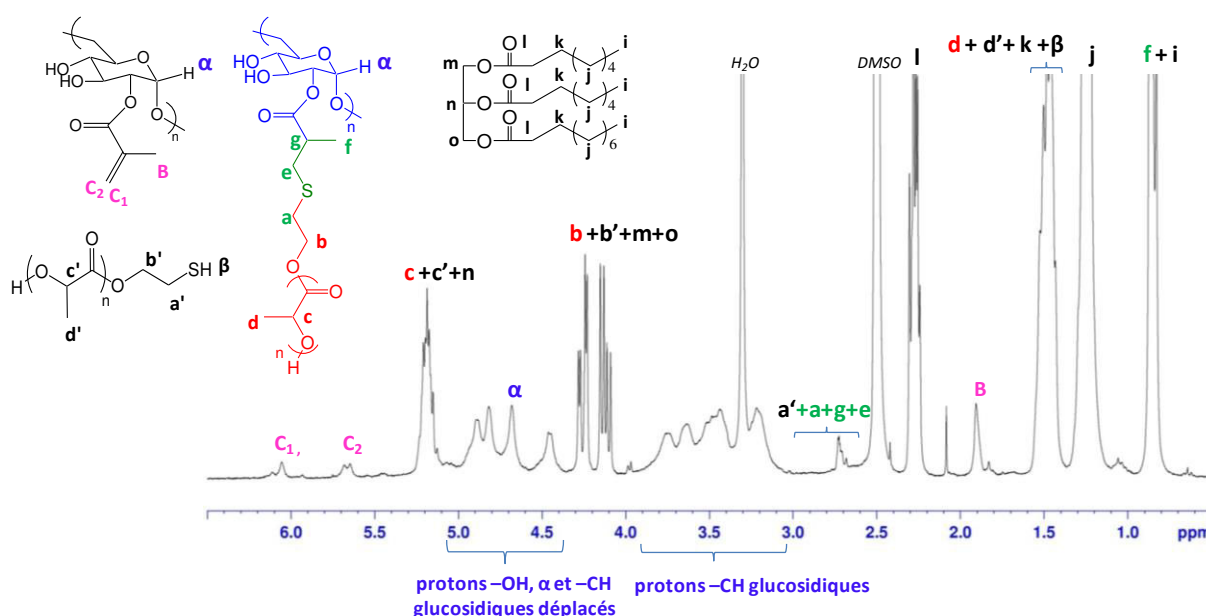


Figure II.14. Spectre RMN 1H (dans $DMSO-d_6$) des NCs lyophilisées avant leurs lavages obtenues par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction thiol-ène *in situ* (voir expérience NC, Tableau II.9)

Tableau II.9. Influence de différents paramètres sur l'efficacité de la réaction « click » thiol-ène nucléophile à l'interface (CH₂Cl₂/M810)/eau entre un PLA α-SH ($\overline{M}_n \sim 3\ 100$ g/mol) solubilisé dans la phase organique (25 g/L) et un DexC=C-28 présent dans l'eau (5 g/L) lors de l'élaboration de NSs et NCs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant

N°	% vol de M810 (a)	Ratio molaire C=C : SH : catalyseur (b)	% Click (c)
NS 1	0	9,5 : 1 : 1	0
NS 2	0	9,5 : 1 : 2	17
NS 3	0	9,5 : 1 : 3,3	22±1
NC	10	9,5 : 1 : 3,3	28±5

(a) Quantité volumique initialement introduite dans la phase organique (volume total de la phase organique = 1mL).

(b) Pour chaque expérience, 1éq. du DTT est ajouté par 1éq. du PLA-SH. Le catalyseur est HexAm.

(c) Valeurs moyennes, évaluées avant lavages de nano-objets grâce à un spectre RMN ¹H (voir Eq. 11, p.124). Les erreurs expérimentales correspondent à la déviation standard calculée grâce à l'Eq. 3 (voir Partie III, p. 205) avec $n = 3$.

Le Tableau II.9 montre que l'augmentation de la quantité d'amine permet d'améliorer l'efficacité de la réaction thiol-ène nucléophile à l'interface CH₂Cl₂/eau (expériences de NS1 à NS2). Compte-tenu des erreurs expérimentales, on observe également que le % click reste du même ordre de grandeur pour des objets obtenus dans les conditions sans ou avec l'ajout de M810 dans la phase organique initiale.

Cependant, certains problèmes ont été rencontrés lors de l'évaluation de ce % click. Le taux de substitution résiduel du dextrane (τ^t) du DexC=C, évalué après lavages des suspensions de nano-objets, est supérieur au τ^0 du DexC=C initial (avant la réaction). Logiquement, le taux de substitution devrait diminuer si les liaisons C=C ont réagi ou rester du même ordre de grandeur si la réaction n'avait pas lieu. Une explication peut être avancée. On peut supposer qu'au cours de l'élaboration des nano-objets, le DexC=C le plus substitué en chaînes latérales (alors avec le τ plus grand) s'adsorbe principalement en surface des nano-gouttelettes de l'émulsion grâce à des interactions hydrophobes avec le PLA, tandis que les chaînes du DexC=C les moins substituées demeurent en phase aqueuse externe et se retrouvent éliminées lors des lavages de la suspension de nano-objets. Si cette hypothèse est juste, le τ du DexC=C évalué selon le spectre RMN ¹H réalisé après lavages serait donc

toujours faussé. L'analyse des eaux de lavages montre effectivement que du DexC=C y est présent et qu'il possède un taux de substitution inférieur au τ du DexC=C initial, ce qui confirme notre hypothèse (Tableau II.10).

C'est pourquoi, pour les calculs de l'efficacité de la réaction thiol-ène à l'interface, nous utilisons les spectres RMN réalisés avant lavages de NPs. Il faut noter que le τ évalué, que ce soit avant ou après lavages, correspond toujours au nombre moyen de chaînes latérales fixées.

Tableau II.10. Taux de substitution moyen (τ) du DexC=C déterminé sur des NSs avant et après leur lavages et dans les eaux de lavages. Les erreurs expérimentales correspondent à la déviation standard calculée grâce à l'Eq. 3 (voir Partie III, p. 205) avec $n=4$.

τ initial	τ avant lavages de la suspension	τ après lavages de la suspension	τ eaux de lavages
28	22 ± 1	31 ± 1	23 ± 1

II.2. Réaction thiol-ène radicalaire à l'interface

II.2.1. Expériences préliminaires

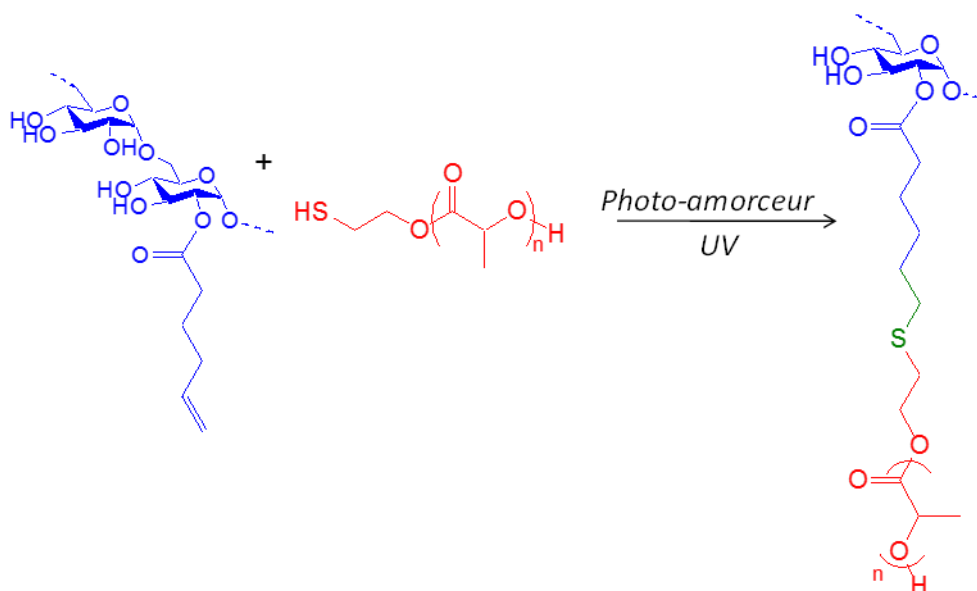


Schéma II.13. Réaction « click » thiol-ène entre un DexC₆C=C et un PLA α -SH dans les conditions radicalaires

Nous avons effectué quelques essais préliminaires de la réaction thiol-ène à l'interface d'une émulsion dans des conditions radicalaires (Schéma II.13), sans avoir testé précédemment cette réaction en milieu homogène. Afin de simplifier notre système, le M810 n'a pas été ajouté dans la phase organique. Pour mener cette réaction, un photo-amorceur 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA), connu dans la littérature pour son efficacité dans ce type de réaction³⁰, a été employé comme catalyseur au lieu d'une molécule nucléophile. Son exposition à la lumière UV (372 mW/cm²) pendant 15 min permet de générer des radicaux libres réactifs. Afin de favoriser la réaction thiol-ène radicalaire avec le PLA α -SH, nous avons choisi d'employer cette fois-ci un dextrane porteur de chaînes alkyle en six carbones avec une fonction alcène à leur extrémité (DexC₆C=C). Cette liaison C=C, enrichie en électrons et moins encombrée stériquement que la fonction méthacrylate du DexC=C, est ainsi plus favorable à des réactions thiol-ène radicalaires. Notons que le DTT n'a pas été ajouté cette fois-ci dans le système afin d'éviter la formation de radicaux issus du DTT qui pourraient éventuellement induire des réactions secondaires.

II.2.2. Efficacité de la réaction et résultats

Comme dans le cas des réactions thiol-ène conduites selon le mécanisme nucléophile, l'efficacité de la réaction a été évaluée par analyse RMN ¹H des NSs lyophilisées avant lavages, dans le DMSO-*d*₆ (Figure II.15). Cependant, cette fois nous avons utilisé une autre méthode pour l'évaluer (voir par la suite).

Après avoir exposé à la lumière UV la suspension brute de NPs (avant lavages) puis lyophilisation (Figure II.15, spectre II) on peut remarquer que le spectre RMN ¹H ne varie pas beaucoup du spectre de la suspension initiale réalisé avant l'irradiation UV (Figure II.15, spectre I). Si le copolymère dextrane-g-PLA était formé, les protons **f**, **g**, **e**, **d** donneraient des signaux avec des déplacements chimiques proches de ceux des protons de la chaîne latérale du DexC₆C=C (protons **B**, **C**). Ainsi, il n'est pas possible d'utiliser ces aires pour calculer le % click comme nous l'avons fait auparavant. En outre, le pic correspondant aux protons anomère des unités glucopyranose (**a** vers 4,7 ppm) semble disproportionné par rapport à ceux des protons des unités glucopyranose du DexC₆C=C sortant dans la même zone (entre 4,3 et 5 ppm) et ne peut donc pas être utilisé. Seuls deux pics semblent utilisables : le pic **D** (vers 2,1 ppm) et le pic **E** (vers 5,8 ppm) correspondant aux protons méthylène et méthyne, respectivement, du DexC₆C=C qui n'aurait pas réagi. Ainsi, l'exploitation de ces spectres

RMN ^1H réalisés avant et après l'irradiation UV permet de calculer l'efficacité de la réaction en utilisant l'Equation 12.

$$\% \text{ Click} = \left[1 - \frac{(E/D)^t}{(E/D)^0} \right] \cdot 100 \quad [12]$$

avec : $(E/D)^t$ et $(E/D)^0$ – ratio des aires correspondants aux protons méthyne de la double liaison du $\text{DexC}_6\text{C}=\text{C}$ (pic *E* vers 5,8 ppm) et aux protons méthylène (pic *D* vers 2,1 ppm) après et avant la réaction, respectivement (déterminé sans lavages des suspensions).

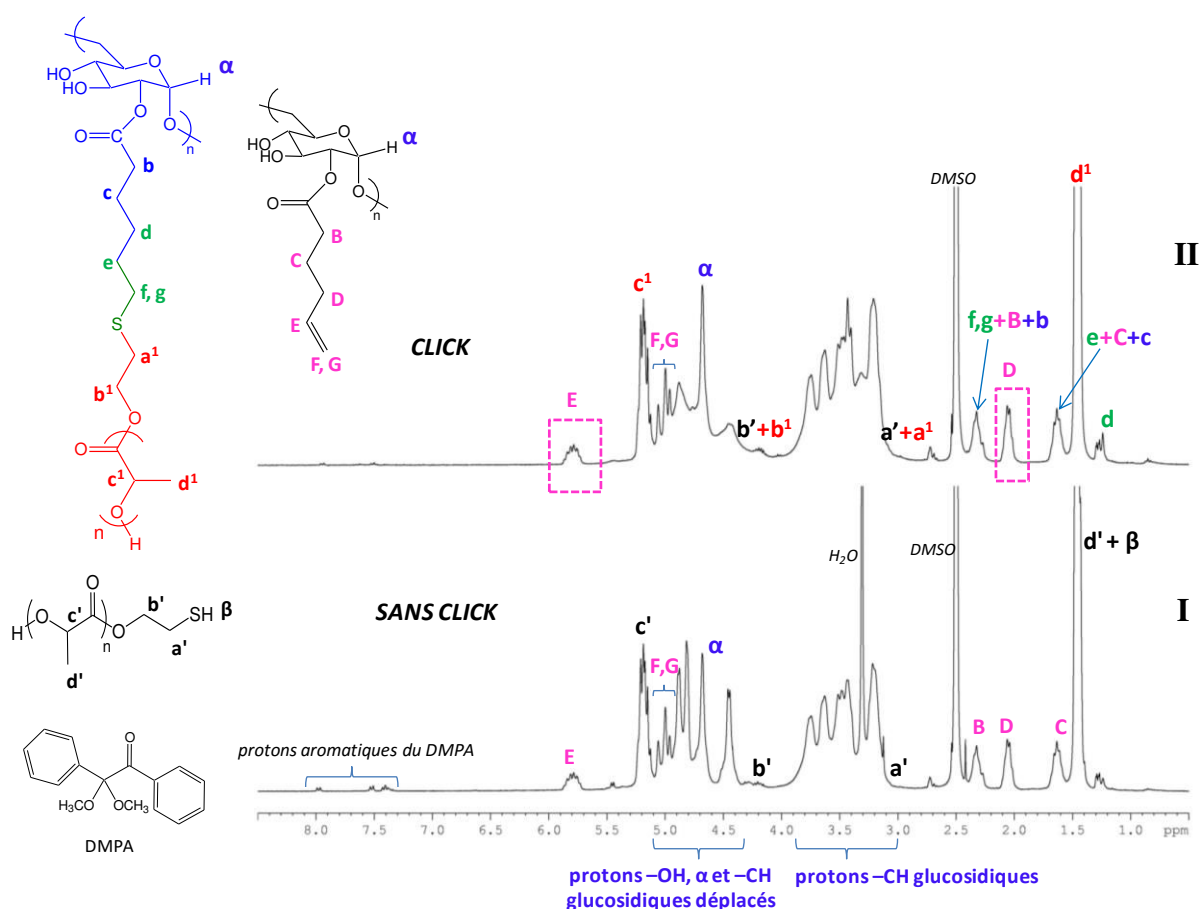


Figure II.15. Spectres RMN ^1H (dans $\text{DMSO}-d_6$) d'une suspension PLA α -SH + $\text{DexC}_6\text{C}=\text{C}$ + DMPA lyophilisée avant l'irradiation UV (I) et du produit de la réaction thiol-ène radicalaire (II) entre le $\text{DexC}_6\text{C}=\text{C}$ -21 et le PLA α -SH ($\overline{M}_n \sim 3\,100$ g/mol) à l'interface d'une émulsion

Tableau II.11. Résultats des essais préliminaires de la réaction « click » thiol-ène radicalaire à l'interface CH₂Cl₂/eau entre un PLA α -SH ($\overline{M}_n \sim 3\ 100$ g/mol) solubilisé dans la phase organique (25 g/L) et un DexC₆C=C-21 présent dans l'eau (5 g/L) au cours d'un procédé d'émulsion-évaporation de solvant (sans M810)

N°	Conditions d'irradiation UV	Ratio molaire C=C : SH : DMPA	% Click ^(b)
NS 1	365 nm, 15 min, 372 mW/cm ² ^(a)	7,2 : 1 : 0,2	15
NS 2			13
NS 3			4

(a) Correspond à 20% de la puissance maximale de la lampe UV utilisée.

(b) Evalués avant lavages de NSs grâce à des spectres RMN ¹H du milieu avant et après irradiation UV (voir l'Eq. 12, p. 48).

Les premiers résultats de couplage radicalaire entre des fonctions alcène du DexC₆C=C et des fonctions thiol du PLA α -SH à l'interface CH₂Cl₂/eau semblent indiquer que la réaction a aussi lieu dans ces conditions (Tableau II.11). Cependant, les résultats ne sont pas très reproductibles car le % click varie de 4 à 15% pour trois expériences réalisées dans les mêmes conditions et avec les mêmes réactifs. De plus, contrairement aux résultats obtenus sur la réaction thiol-ène nucléophile, la catalyse radicalaire de cette réaction « click » thiol-ène ne semble pas être optimale (% click faible). Les conditions expérimentales nécessitent d'être encore optimisées afin d'améliorer leur reproductibilité et l'efficacité de couplage.

III. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Nous avons montré dans ce chapitre qu'il est possible de réaliser une réaction de chimie « click » *in situ*, pendant l'élaboration de nano-objets (NSs et NCs) par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant. La réaction a lieu à l'interface entre deux solvants non-miscibles : le CH₂Cl₂ (sans ou avec l'ajout de M810) et l'eau. Une partie de ces travaux, notamment concernant des objets obtenus avec la réaction CuAAC, fait l'objet d'une publication³¹.

Dans la première partie de ce chapitre, la réaction de chimie « click » CuAAC entre le PLA α -alcyne et le DexN₃ à l'interface d'une émulsion a été étudiée. Afin d'optimiser cette réaction, nous avons testé diverses conditions de sonication (durée et puissance d'irradiation) ainsi que différents catalyseurs : CuBr, CuI et CuSO₄ associé à l'acide ascorbique (AAsc) qui agit comme réducteur en ajoutant ou non un ligand lipophile (BPMODA).

- Le système catalytique CuSO₄/AAsc s'est avéré être le plus efficace des catalyseurs à base de cuivre testés. Son utilisation a conduit à l'obtention de NSs et de NCs avec 50% et 70%, respectivement, des fonctions alcyne ayant réagi (celles-ci étaient en défaut par rapport aux fonctions azide).
- Nous avons observé qu'une variation de la quantité de M810 dans la phase organique initiale (de 5 à 20% vol) n'influence pas l'efficacité de la réaction CuAAC.
- Le CuSO₄, grâce à sa bonne solubilité dans l'eau, s'est aussi révélé être le catalyseur le plus facilement éliminable par traitement avec de l'EDTA. Les NCs ainsi purifiées ne contiennent que 15 ppm de cuivre résiduel.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, les réactions thiol-ène entre le PLA α -SH et des liaisons C=C réparties sur le dextrane ont été étudiées. Ce type de réaction « click » étant nouveau au LCPM, la réaction thiol-ène nucléophile a tout d'abord été testée en milieu homogène, dans un solvant commun du PLA et du dextrane – le DMSO.

- La *n*-hexylamine a été utilisée en tant que catalyseur et le dithiothréitol (DTT) a été ajouté pour empêcher le recouplage éventuel entre les fonctions –SH du PLA et la formation de ponts disulfure non-réactives vis-à-vis de la double liaison méthacrylate.
- Les conditions expérimentales pour mener la réaction thiol-ène nucléophile ont été optimisées et ont permis d'atteindre une conversion totale.
- Ce système catalytique a ensuite été transposé à l'interface (CH₂Cl₂+M810)/eau au cours d'un procédé de préparation de NSs et des NCs par émulsion-évaporation de solvant. Nous sommes parvenus mener la réaction thiol-ène nucléophile et nous avons pu observer que près de 30% de doubles liaisons méthacrylate avaient réagi.

Finalement, nous avons présenté des premiers essais de réaction thiol-ène menée à l'interface de l'émulsion selon le mécanisme radicalaire, en présence d'un photo-amorceur (2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone, DMPA). Cependant, les conditions utilisées nécessitent encore d'être optimisées afin d'améliorer l'efficacité de couplage et sa reproductibilité.

Grâce à ces différentes réactions interfaciales de chimie « click », des nano-objets (NSs et NCs clickées) ont été élaborés. Leurs différentes caractéristiques sont présentées dans le chapitre suivant et comparées aux objets non-clickés : taille, taux de recouvrement en dextrane et épaisseur de ce recouvrement, morphologie. De plus, la stabilité colloïdale de ces nano-objets en présence de sel ainsi qu'en présence d'un tensioactif compétitif va également être étudiée.

CHAPITRE III

CARACTERISATION DES NANO-OBJETS

CHAPITRE III

Dans le présent chapitre, les NPs précédemment obtenues par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à la chimie « click » interfaciale seront caractérisées. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur les nano-objets clickés obtenus par des réactions de chimie « click » CuAAC et thiol-ène nucléophile en employant du PLA α -alcyne ou le PLA α -SH et du DexN₃-23 ou du DexC=C-28, respectivement. Des NPs ont ainsi été préparées avec des quantités variables de M810 (de 0 à 20% vol dans la phase organique initiale) et comparées à leurs homologues non-clickées. Ces dernières ont été préparées avec le PLA non fonctionnalisé (PLA commercial) sans réaliser la réaction interfaciale de chimie « click ». Dans un premier temps, nous avons tout d'abord cherché à déterminer les caractéristiques classiques de ces NPs : distribution de taille, taux de recouvrement en dextrane et épaisseur de la couche superficielle. Dans un deuxième temps, la stabilité colloïdale de ces NPs en fonction de la force ionique ainsi que la stabilité de leur recouvrement dextrane en présence d'un tensioactif compétitif ont été étudiées. Enfin, nous nous sommes intéressés à caractérisation de la morphologie de ces NPs. Une partie du présent chapitre, notamment concernant la caractérisation des objets obtenus avec la réaction CuAAC, fait l'objet d'une publication³¹.

I. DISTRIBUTION DE TAILLE DES NANO-OBJETS

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, les NPs ont été préparées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant. Lors de ce procédé, l'énergie apportée par la sonde à ultrasons permet l'obtention de gouttelettes de tailles submicroniques. Après évaporation du solvant volatil, ces gouttelettes se transforment en NPs. Leur distribution de taille peut être déterminée à l'aide d'un granulomètre laser (voir Partie III, p. 209) à partir des

$d[0,1]$, $d[0,5]$ et $d[0,9]$ qui représentent les diamètres de particules en dessous desquels se trouvent respectivement 10, 50 ou 90% du volume total des particules de l'échantillon. Grâce à ces valeurs, le Span peut être calculé par l'Equation 13. Il nous renseigne sur la largeur de cette distribution de taille. L'appareil donne en plus un diamètre moyen en surface nommé $d[3:2]$ et un diamètre moyen en volume nommé $d[4:3]$.

$$Span = \frac{d[0,9]-d[0,1]}{d[0,5]} \quad [13]$$

Dans un premier temps, nous avons d'abord analysé les NPs élaborées par émulsion-évaporation de solvant sans réaliser la réaction « click » interfaciale. Plus précisément, des NSs ont été obtenues sans ajout de M810 dans la phase organique et des NCs ont été préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale. Deux types de stabilisants de l'émulsion (DexN₃-23 et DexC=C-28) ont été utilisés pour préparer ces NPs.

Avant de rentrer dans les détails, il est important de noter que toutes les NPs obtenues restent stables au cours des lavages pendant le procédé de formation. La distribution de taille déterminée avant et après lavages dans le cas de NCs clickées obtenues avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale et avec le DexN₃-23 comme stabilisant est donnée en exemple dans la Figure II.16a. Pour la suite, nous ne donnerons que les distributions de taille des NPs après lavages.

Cas de NSs

Comme on peut le voir sur les Figure II.16b et 16c, ainsi que dans le Tableau II.12 (valeurs de Span), le procédé d'émulsion-évaporation de solvant permet d'obtenir des NSs de taille submicronique avec une distribution relativement étroite quel que soit le stabilisant utilisé que l'on réalise ou non la réaction « click » interfaciale. Idéalement la valeur de Span devrait être la plus petite possible et inférieure à 1. Cependant, des valeurs de Span jusqu'à 1,5 reflètent une distribution de tailles relativement étroite. Les résultats présentés sont d'ailleurs analogues à ceux obtenus précédemment au LCPM avec d'autres types de dérivés tensioactifs du dextrane^{2, 3, 17}. Ceci montre l'efficacité du DexN₃-23 et du DexC=C-28 à stabiliser la nano-émulsion initiale, liée aux propriétés tensioactives de ces dérivés du dextrane (voir Chapitre I, Paragraphe II.4.3, p.104).

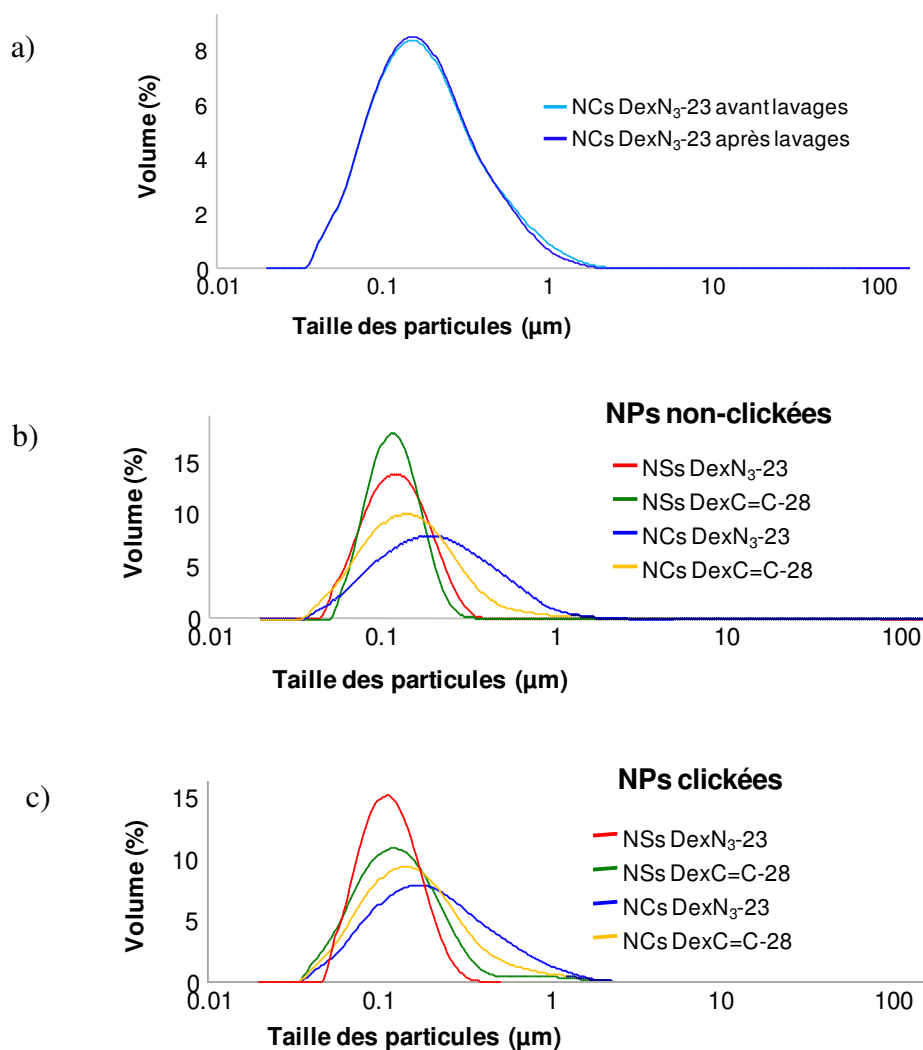


Figure II.16. Distributions de taille obtenue par granulométrie laser : a) NCs clickées avant et après lavages, b) NPs non-clickées, après lavages, c) NPs clickées, après lavages. Les NPs sont préparées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant avec ou sans réaction « click » et en utilisant du PLA α -alcyne, α -SH ou commercial (25 g/L) et le DexN₃-23 ou le DexC=C-28 (5 g/L) (comme stabilisant). Pour les NCs, 10% vol de M810 ont été ajoutés dans la phase organique initiale.

Cas de NCs

Comme on peut le voir sur les Figure II.16b et 16c, la distribution de taille des NCs est plus large que celle des NSs quel que soit le dérivé amphiphile du dextrane utilisé, que les objets soient ou non clickés. Les valeurs de Span (Tableau II.12) sont également bien supérieures pour les NCs (entrées 1 *versus* 2, 3 et 4 et entrées 5 *versus* 6, 7 et 8, Tableau II.12).

En outre, on observe que le $d[3:2]$ des NPs augmente avec la quantité de M810 introduite dans la phase organique initiale (Tableau II.12, Figure II.17) que ces NPs soient clickées ou réalisées sans chimie « click » interfaciale. Nous pouvons supposer que cette augmentation provient de la quantité croissante de matière non-volatile (M810) constituant le cœur hydrophobe des NPs. Le phénomène est cependant moins marqué pour les NPs obtenues avec le DexC=C-28 (« click » thiol-ène) que pour celles obtenues avec le DexN₃-23 (« click » CuAAC).

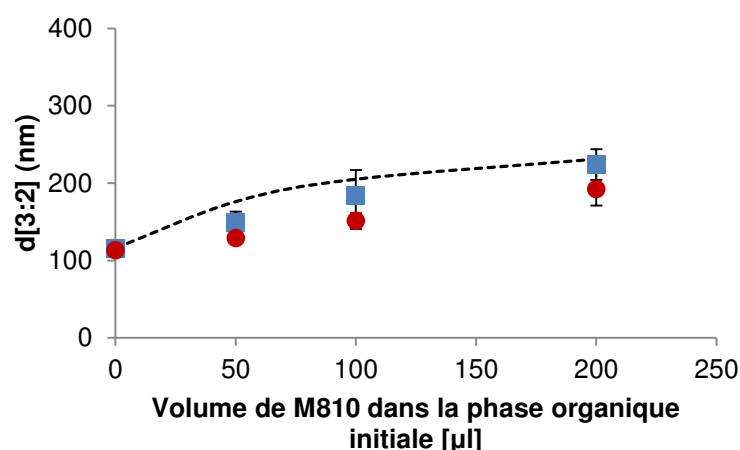


Figure II.17. Influence de la quantité de M810 sur le diamètre moyen en surface $d[3:2]$ des NPs lavées : (●) NPs clickées, (■) NPs non-clickées, --- diamètre moyen en surface théorique (D) calculé par l'Equation 14, p. 139. La quantité du PLA dans la phase organique ainsi que la quantité du DexN₃-23 dans la phase aqueuse sont constantes et égales à 25 g/L et 5 g/L, respectivement.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué les diamètres théoriques moyens (D) des NPs en employant l'Equation 14. Pour cela, nous avons tenu compte du volume réel de M810 ($V_{M810 \text{ final}}$) encapsulé dans les NCs et déterminé par analyse RMN ¹H. Cependant, il faut noter que le $V_{M810 \text{ final}}$ ne correspond pas au volume initialement introduit dans la phase organique (Tableau II.12). On observe globalement que plus la quantité d'huile initialement utilisée est élevée, plus la quantité d'huile perdue après lavages est importante. Par exemple, seulement environ 65% du volume initial de M810 utilisé se retrouve encapsulé dans les NCs finales quand la phase organique initiale est constituée de 20% vol de M810 (entrées 4 et 8 du Tableau II.12). Ces pertes de M810 sont confirmées par la turbidité croissante des surnageants après centrifugation des NPs lors de leurs lavages. La turbidité observée provient de la présence d'huile dans les surnageants. Ceci montre que l'utilisation de volumes élevés de M810 dans la phase organique par rapport au PLA augmente le risque de formation des

gouttelettes d'huile stabilisées par les dextrans modifiés et ne contenant pas de PLA. Ces gouttelettes sont au final éliminées par centrifugation lors des lavages. Nous avons également supposé que le nombre de NPs dans la suspension (N_{part} , calculé par l'Equation 15) était constant, quel que soit le volume de M810 initialement ajouté dans la phase organique. Pour chaque expérience, le volume de la phase organique est constant et égal à 1 mL.

$$D = \sqrt[3]{\frac{3 \cdot \left(\frac{m_{PLA}}{d_{PLA}} + V_{M810\ final} \right) \cdot 8}{4\pi \cdot N_{part}}} \quad [14]$$

$$N_{part} = \frac{3 \cdot m_{PLA}}{d_{PLA} \cdot 4\pi \left(\frac{d[3:2]_{NS}}{2} \right)^3} \quad [15]$$

avec : m_{PLA} – masse du PLA initialement introduite (0,025 g),

d_{PLA} – densité du PLA (1,25 g/mL),

$d[3:2]_{NS}$ – diamètre moyen en surface pour des NSs,

$V_{M810\ final}$ – volume réel du M810 encapsulé à l'intérieur des NCs (Tableau II.12).

Comme on peut le voir sur la Figure II.17, les valeurs théoriques (D) sont assez cohérentes avec les valeurs expérimentales des $d[3:2]$. Ceci confirme que l'augmentation du diamètre des particules est bien majoritairement due à l'encapsulation d'une quantité croissante d'huile M810 à l'intérieur des NCs que les NPs soient clickées ou non.

Tableau II.12. Caractéristiques de NPs clickées et non-clickées, préparées en utilisant le DexN₃-23 ou le DexC=C-28 comme tensioactif, en termes de quantité de M810 encapsulées dans les objets finaux, tailles moyennes en surface (d[3:2]) et valeurs de Span

N°	Type de NPs	% vol. M810 ^(a)	Vol. M810 initial [μl/25mg PLA] ^(b)	Vol. M810 final [μl/25mg PLA] ^(c)		Diamètre d[3:2] [nm] ^(d)		Span ^(e)		Ratio massique M810/PLA ^(f)	
				Avec DexN ₃	Avec DexC=C	Avec DexN ₃	Avec DexC=C	Avec DexN ₃	Avec DexC=C	Avec DexN ₃	Avec DexC=C
1	Clickées	0	0	0	0	113	110	1,2	1,3	0	0
2		5	50	48±3	–	129	–	2,5	–	1,8±0,1	–
3		10	100	88±4	89±6	151	128	2,9	2,2	3,3±0,2	3,3±0,2
4		20	200	129±40	–	192	–	2,8	–	4,9±1,5	–
5	Non-clickées	0	0	0	0	115	112	1,2	0,9	0	0
6		5	50	50±1	–	149	–	2,3	–	1,9±0	–
7		10	100	91±14	114±1	184	122	2,7	1,8	3,4±0,5	4,3±0
8		20	200	138±42	–	224	–	2,4	–	5,2±1,6	–

(a) Pourcentage volumique de M810 introduit initialement dans la phase organique (volume totale de la phase organique = 1 mL).

(b) Volume de M810 introduit dans la phase organique initiale.

(c) Volume de M810 demeurant dans les NPs après évaporation de solvant et lavages. Déterminé par RMN ¹H et calculé grâce à l'Eq. 7 (Partie III, p. 207). Les erreurs expérimentales correspondent à la déviation standard calculée grâce à l'Eq. 3 (Partie III, p. 205) avec $n \geq 3$.

(d) Obtenus par granulométrie Laser.

(e) Obtenus par granulométrie Laser et grâce à l'Eq. 13, p. 136.

(f) Déterminé par RMN ¹H grâce à l'Eq. 5 (Partie III, p. 207)

II. CARACTERISATION DE LA COUCHE EXTERNE HYDROPHILE

Les dérivés du dextrane utilisés lors de la formation de nano-objets (DexN₃-23 et DexC=C-28), ne sont pas solubles ni dans le M810 ni dans le CH₂Cl₂ et restent donc probablement hors de la phase organique tout au long du procédé d'élaboration des NPs. Grâce à leurs propriétés tensioactives (voir Chapitre I, Paragraphe II.4.3, p. 104) provenant des chaînes latérales hydrophobes fixées sur le dextrane, ces dérivés peuvent s'adsorber à l'interface huile/eau et stabiliser les nano-gouttelettes de la suspension de NPs. Ceci d'ailleurs a déjà été observé dans d'autres travaux menés au LCPM sur l'élaboration de NSs non-clickées¹⁷ ou clickées². Nous avons donc cherché à caractériser cette couche de dextrane, hydrophile et neutre, qui se situe en surface des NPs.

Pour rappel, nous avons montré dans le Chapitre II (Paragraphe I.1., p. 111 et II.1., p. 119) que l'ajout de catalyseur approprié (Cu(I) ou amine dans le cas des réactions CuAAC ou thiol-ène, respectivement) dans la formulation permet de lier le dextrane au PLA de façon covalente par chimie « click ». Cependant, sachant que les fonctions Y des dérivés du dextrane Dex-Y (azide pour DexN₃ ou méthacrylate pour DexC=C) sont utilisées en large excès molaire par rapport aux fonctions X du PLA-X (alcyne ou thiol), toutes les fonctions Y ne réagissent pas avec les fonctions X pour former un cycle triazole ou une liaison thiol-carbone, respectivement. De plus, l'efficacité de ces réactions n'a jamais atteint 100% ce qui veut dire par exemple dans le cas de la réaction « click » CuAAC, pour laquelle le % click a été évaluée à maximum 70% des fonctions alcyne initialement présentes dans le milieu, que 30% de chaînes PLA n'ont pas été attachées au dextrane de façon covalente.

II.1. Mise en évidence du recouvrement hydrophile

Afin de mettre en évidence la présence de la couche dextrane en surface de NPs (NSs et NCs) de PLA, la mobilité électrophorétique des objets dispersés dans les solutions de NaCl de concentrations variables (de 10⁻⁶ à 10⁻² M) a été étudiée. Ensuite, les valeurs de potentiel Zêta (ζ) ont été calculées à partir de ces mesures de mobilités électrophorétiques, à l'aide de l'équation de Booth modifiée³² (pour plus de détails, voir Partie III, p. 211).

La Figure II.18 montre les résultats obtenus pour des NPs élaborées avec le DexN₃-23. Ces NPs ont été comparées à des NCs de PLA non recouvertes (dites NCs nues) préparées en utilisant du SDS (3 g/L) au lieu de DexN₃, puis lavées. Un spectre RMN ¹H de ces NCs nues

après lyophilisation a permis de confirmer que les objets ne contenaient plus de tensioactif. On observe que les charges de surface des NPss de PLA sont bien négatives comme lors de nos travaux précédents sur des NSs de PLA^{2, 17}. Cependant, les charges sont écrantées plus efficacement par la présence de NaCl dans le cas des NPs recouvertes (NSs et NCs clickées ou non-clickées) que dans le cas des NCs nues. Ceci met en évidence de façon indirecte la présence d'une couche neutre (dextrane) en surface des objets qui permet d'atténuer la charge négative du PLA en surface des objets.

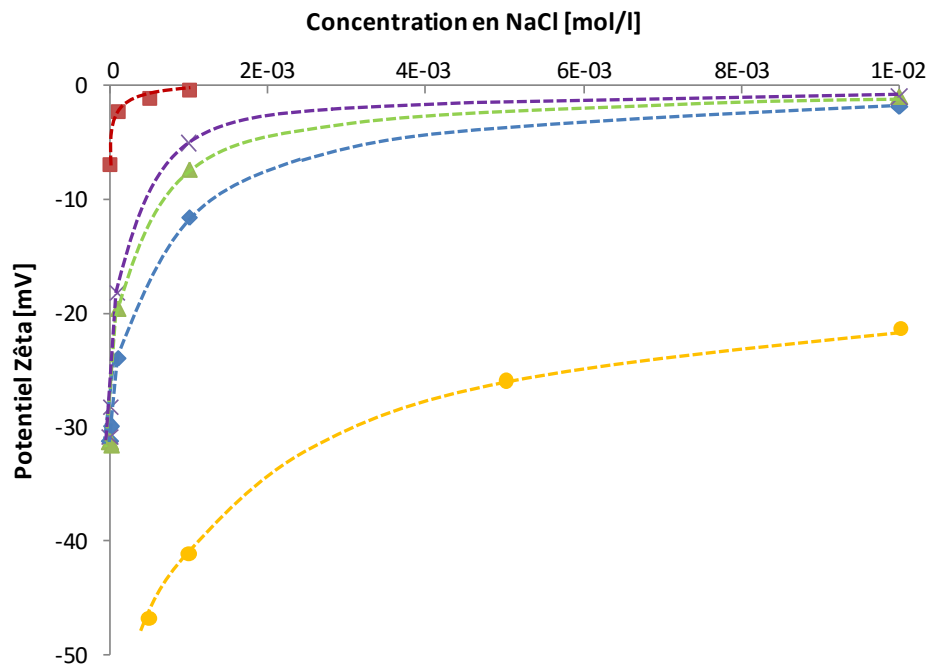


Figure II.18. Evolution du potentiel Zêta de nano-objets clickés ou non dispersés dans une phase aqueuse de NaCl de 10^{-6} à 10^{-2} mol/L. Cas des NPs préparées par procédé d'émulsion-évaporation de solvant en utilisant le DexN₃-23 en tant que stabilisant (sauf NCs nues): (■) NSs clickées, (X) NCs clickées, (▲) NCs non-clickées, (◆) NSs non-clickées, (●) NCs nues. La réaction « click » est réalisée en utilisant 5,5 éq. CuSO₄/alcyne (+10 éq. AAsc/CuSO₄) comme catalyseur. Les NCs sont préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale.

II.2. Détermination de l'épaisseur de la couche externe et du taux de recouvrement

Afin de davantage caractériser ce recouvrement en dextrane, son épaisseur (Δ_{PZ}) peut être estimée pour les différentes NPs. Pour cela, l'évolution du potentiel Zêta ζ versus k_H^d aux faibles concentrations en NaCl peut être approximée par l'équation d'Eversole et de Boardman³³. La valeur absolue de la pente correspond à l'épaisseur Δ_{PZ} (voir Partie III, p.

^d k_H^{-1} correspond à la longueur de Debye liée à la force ionique.

212) (Tableau II.13). Par manque de temps, nous nous sommes focalisés sur les NPs préparées avec du DexN₃-23 en tant que stabilisant. Ainsi, dans le cas de ces NPs, le Δ_{PZ} varie de 13 à 16 nm pour des NPs non-clickées et de 21 à 28 nm pour des NPs clickées.

Tableau II.13. Caractéristiques du recouvrement en dextrane. Cas des NPs clickées et non-clickées obtenues par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant et en utilisant le DexN₃-23 ou le DexC=C-28 en tant que stabilisant de l'émulsion

N°	Type de NPs	%vol M810 ^(a)	Γ_{exp} [mg/m ² NPs] ^(b)		Δ_{PZ} [nm] ^(c) (avec DexN ₃)
			Avec DexN ₃	Avec DexC=C	
1	Clickées	0	9,4±1,6	10,3±0,3	28±1
2		5	5,7±0,2	–	–
3		10	4,2±0,5	4,0±0,1	21±0,5
4		20	4,8±2,2	–	–
5	Non-clickées	0	3,5±0,2	1,3±0,2	13±1
6		5	2,8±0,3	–	–
7		10	2,9±0,5	0,8±0,1	16±1,5
8		20	3,2±0,5	–	–
9	Clickées après	0	3,7	–	–
10	évap. du CH ₂ Cl ₂	10	2,5	–	–

(a) Pourcentage volumique de M810 introduit initialement dans la phase organique (volume totale de la phase organique = 1mL).

(b) Taux de recouvrement des NPs en dextrane déterminé par l'Eq.10 (Partie III, p. 208). Les erreurs expérimentales correspondent à la déviation standard calculée grâce aux Eq. 3 et 4 (Partie III, p. 205) avec $n \geq 3$ sauf expérience n°2 où $n = 2$.

(c) Epaisseur de la couche externe dextrane, obtenue à partir des valeurs de ζ calculées en utilisant l'équation d'Eversole et Boardman et en fonction du paramètre de Debye-Hückel k_H ²². Les erreurs expérimentales sont calculées pour $n = 2$ (Eq. 4, Partie III, p. 205).

De plus, le taux de recouvrement des objets (Γ_{exp}), qui correspond à la masse de dextrane par unité de surface des NPs, a été évalué par RMN ¹H (Tableau II.13) grâce à l'Equation 10 (voir Partie III, p. 208). Ces Γ_{exp} peuvent être comparés aux résultats obtenus précédemment au LCPM concernant l'adsorption de dérivés amphiphiles du dextrane contenant des chaînes latérales hydrophobes (phénoxy, hexyle, decyle) en surface de NSs de PLA formulées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant¹⁷. Dans ces études précédentes, Γ_{exp} variait de 3,2 à 4,6 mg/m² selon les conditions expérimentales. Dans notre

cas, les résultats obtenus avec le DexN₃-23, pour des NPs non-clickées (de 2,8 à 3,5 mg/m², entrées de 5 à 8, Tableau II.13) sont cohérents avec ces valeurs.

Cependant, les taux de recouvrement des NPs non-clickées préparées avec du DexC=C-28 (de 0,8 à 1,3 mg/m², entrées 5 et 8, Tableau II.13) sont significativement inférieures à ces valeurs. Ceci peut être dû à l'affinité moindre du PLA avec les chaînes latérales hydrophobes du DexC=C. Ces dernières sont effectivement plus courtes (4 carbones) que celles du DexN₃ (6 carbones) ou d'autres dérivés utilisés au LCPM (phénoxy, hexyle, decyle). Ainsi, lors de l'évaporation du solvant organique et des lavages, on peut supposer que les chaînes du dérivé dextrane faiblement adsorbées en surface de NPs se désorbent si elles ne sont pas liées de façon covalente (clickées) au PLA.

Quand la réaction « click » est effectuée (quelle que soit cette réaction), c'est-à-dire quand le catalyseur approprié est ajouté à la formulation et que les PLA correctement fonctionnalisés sont utilisés au lieu du PLA commercial (non-fonctionnalisé), on observe une augmentation significative du taux de recouvrement (de 4,2 à 9,4 mg/m² dans le cas de réaction CuAAC et de 4,0 à 10,3 mg/m² dans le cas de thiol-ène, entrées de 1 à 4, Tableau II.13). Ces valeurs de Γ_{exp} , supérieures pour des NPs clickées par rapport aux non-clickées, sont certainement dues à l'immobilisation covalente du dérivé dextrane en surface des objets. Cet ancrage chimique empêche alors la désorption du dérivé dextrane lors de l'évaporation du CH₂Cl₂, c'est-à-dire quand la surface et le volume des particules se contractent (Figure II.19). Les résultats de Γ_{exp} obtenus sont cohérents avec les valeurs de Δ_{PZ} qui sont significativement plus élevées dans le cas des NPs clickées que non-clickées (entrées 1 et 5 ainsi qu'entrées 3 et 7, Tableau II.13). Les valeurs plus grandes de Δ_{PZ} pour des NPs clickées sont alors liées à la densité élevée des chaînes du dextrane à leur surface. Ceci entraîne un encombrement stérique des chaînes dextrane en surface et, en conséquence, l'étirage des boucles de dextrane, de la couche externe et donc une augmentation de l'épaisseur de ce recouvrement.

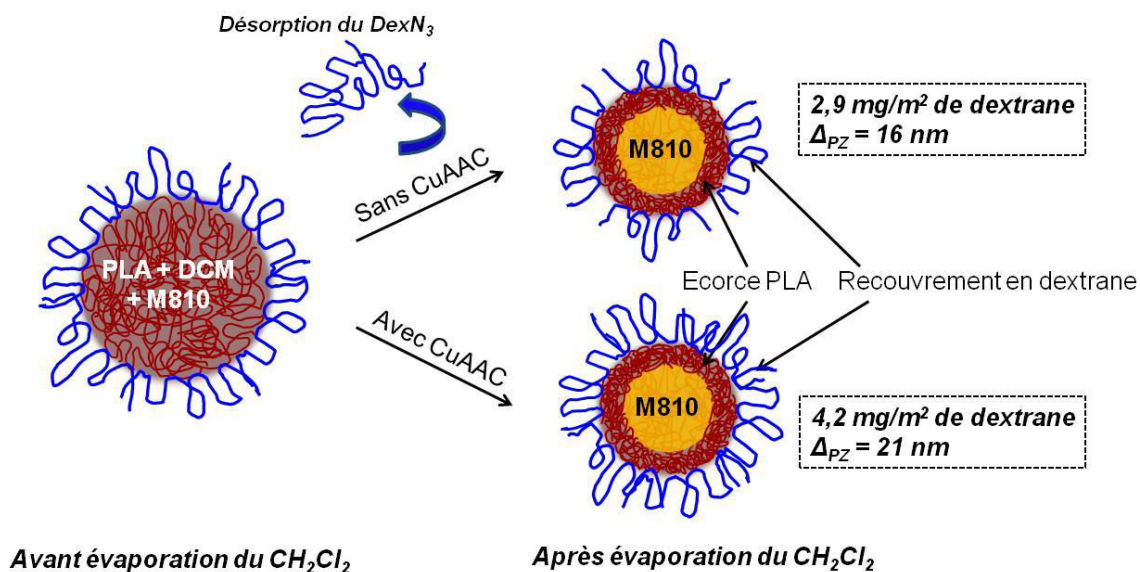


Figure II.19. Représentation schématique de la contraction volumique de NCs clickées ou non-clickées lors de l'évaporation du CH₂Cl₂. Les valeurs de Γ_{exp} et de Δ_{PZ} sont données pour des NCs préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale et en utilisant du DexN₃-23 comme stabilisant

Afin de confirmer nos interprétations, la réaction « click » (par exemple CuAAC) a été réalisée après évaporation du CH₂Cl₂ et lavages des NPs. Ainsi, les NPs sont tout d'abord formées et une fois le CH₂Cl₂ évaporé, le catalyseur à base de cuivre (CuAAC/AAsc) est ajouté à la suspension pour démarrer la réaction. Dans ce cas (entrées 9 et 10, Tableau II.13) les taux de recouvrement sont similaires à ceux obtenus pour des NPs non-clickées (comptenu des erreurs expérimentales) (entrées 5 et 7, Tableau II.13). En effet, quand la réaction « click » n'est pas réalisée, seules les chaînes DexN₃ bien adsorbées en surface de NPs de PLA restent accrochés après évaporation du CH₂Cl₂. Quand la réaction « click » est réalisée après évaporation du CH₂Cl₂, seules les chaînes DexN₃ déjà présentes en surface des NPs sont disponibles pour réagir avec le PLA α -alcyne. Ceci aboutit à un taux de recouvrement similaire à ceux des NPs non-clickées et inférieur à celui des NPs clickées *in situ*.

Finalement, pour vérifier si notre interprétation est quantitativement en accord avec les résultats expérimentaux, nous avons estimé la contraction de surface des NPs au cours de l'évaporation du CH₂Cl₂. Pour cela, nous nous sommes basés sur la composition de la phase organique initiale et sur la composition finale des NCs (déterminée par RMN ¹H, Tableau II.12). En accord avec de précédents résultats du LCPM, nous avons de plus considéré que le taux de recouvrement initial (Γ_{initial}) des gouttelettes de la phase organique par des chaînes DexN₃-23, formées par ultrasons, est de l'ordre de 1 mg/m² juste avant l'évaporation du

CH₂Cl₂, c'est-à-dire avant que la contraction de surface commence³⁴. Cette valeur de $\Gamma_{initial}$ avait précédemment été trouvée grâce aux travaux menés au LCPM pour des émulsions huile-dans-eau préparées dans des conditions similaires. Ceci correspond à une couche dense de polysaccharides amphiphiles dont tous les groupes alkyle sont en contact avec l'interface. Enfin, nous nous sommes placés dans le cas où la réaction de chimie « click » a lieu et nous avons considéré que les chaînes de dextrane adsorbées à la surface des gouttelettes de la phase organique étaient encore présentes à la surface des NCs après évaporation du CH₂Cl₂. En tenant compte des hypothèses précédentes, le taux de recouvrement théorique final ($\Gamma_{théorique}$) peut être calculé à l'aide de l'Equation 16.

$$\Gamma_{théorique} = \Gamma_{initial} \cdot \frac{S_{initiale}}{S_{finale}} \quad [16]$$

avec : $S_{initiale}$ – surface de particule avant l'évaporation du CH₂Cl₂,
 S_{finale} – surface de particule après l'évaporation du CH₂Cl₂.

En utilisant la relation entre la surface (S) et le volume d'une sphère (V) (Eq. 17), le taux de recouvrement théorique ($\Gamma_{théorique}$) peut être calculé par l'Equation 18 ou par l'Equation 19.

$$S = 4\pi \cdot \left(\frac{3V}{4\pi}\right)^{2/3} \quad [17]$$

$$\Gamma_{théorique} = \Gamma_{initial} \cdot \left(\frac{V_{initial}}{V_{finale}}\right)^{2/3} \quad [18]$$

$$\Gamma_{théorique} = \Gamma_{initial} \cdot \left(\frac{\frac{m_{PLA}}{d_{PLA}} + V_{CH_2Cl_2 + M810}}{\frac{m_{PLA}}{d_{PLA}} + V_{M810\ final}}\right)^{2/3} \quad [19]$$

avec : $\Gamma_{initial}$ – taux de recouvrement des gouttelettes de la phase organique avant évaporation du CH₂Cl₂ (= 1 mg/m², comme évalué dans la référence³⁴),
 m_{PLA} – masse de PLA introduite initialement (0,025 g),
 d_{PLA} – densité du PLA (1,25 g/mL),
 $V_{CH_2Cl_2 + M810}$ – volume de la phase organique initiale (= 1 mL),
 $V_{M810\ final}$ – volume de M810 final (évalué par RMN ¹H, voir Tableau II.12).

Les valeurs de taux de recouvrement théorique après évaporation du CH₂Cl₂ ($\Gamma_{théorique}$) sont en accord raisonnable avec les valeurs expérimentales obtenues pour des NPs clickées (Figure II.20). Ainsi, nous pouvons conclure que le phénomène de contraction volumique dû à

l'évaporation de CH_2Cl_2 est bien à l'origine de la désorption des chaînes de DexN_3 non-clickées et faiblement adsorbées à la surface des NPs.

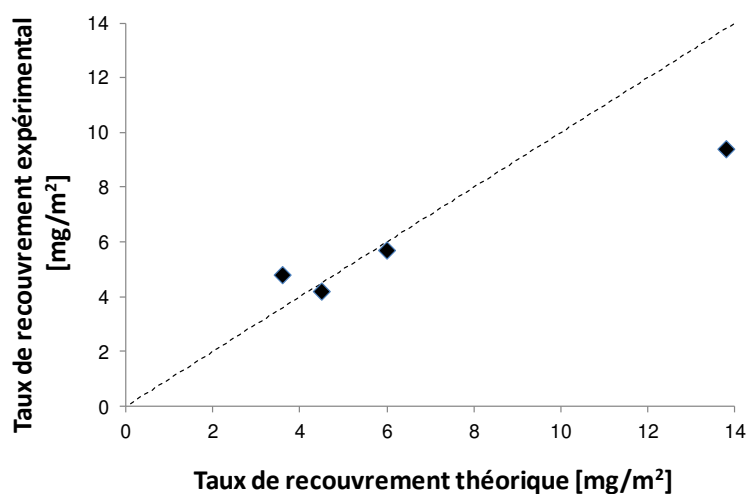


Figure II.20. Comparaison entre le taux de recouvrement expérimental (Γ_{exp} ; calculé par l'Eq. 10, Partie III, p. 208) et théorique ($\Gamma_{\text{théorique}}$; calculé par l'Eq. 19, p. 146) des NCs clickées. La ligne pointillée représente la première diagonale

Pour conclure, le mécanisme de formation du recouvrement hydrophile en dextrane en surface des NPs de PLA se produit comme suit. Pendant la sonication, la phase organique (contenant du CH_2Cl_2 , du PLA et du M810) est dispersée sous forme de nano-gouttelettes suspendues dans l'eau qui sont rapidement couvertes par une couche dense du dextrane modifié. Une grande majorité des chaînes hydrophobes latérales de ce tensioactif se trouve en contact direct avec l'interface phase organique/eau. L'évaporation du CH_2Cl_2 induit la contraction volumique de nano-gouttelettes ce qui résulte en un encombrement stérique des chaînes de dextrane présentes en surface des gouttelettes. Dans le cas des objets non-clickés, cette contraction volumique augmente la densité de la couche superficielle de dextrane jusqu'à la valeur maximale située entre 2,8 et 3,5 mg/m^2 (pour DexN_3 -23), ce qui est en bonne cohérence avec les résultats obtenus précédemment au LCPM en utilisant d'autres dérivés du dextrane. Cette contraction volumique est accompagnée par la désorption de chaînes DexN_3 faiblement adsorbées (c'est-à-dire dont le nombre de points d'ancrage physique est peu élevé) et/ou des chaînes DexN_3 simplement enchevêtrées dans la couche superficielle de dextrane.

Dans le cas de NPs clickées, la réaction « click » peut commencer quand les fonctions azide ou méthacrylate des chaînes latérales des dextrans modifiés se mettent en contact avec leurs fonctions antagonistes portées par le PLA à l'interface phase organique/eau. Grâce à la

formation des liaisons covalentes avec les fonctions alcyne ou thiol du PLA, les chaînes du dextrane restent irréversiblement immobilisées à la surface des NPs. Cet ancrage chimique limite leur désorption lors de l'évaporation du CH_2Cl_2 , c'est-à-dire quand le volume de NPs se contracte. Ainsi la densité superficielle augmente ce qui est confirmé par le taux de recouvrement plus élevé que dans le cas des chaînes de dextrane non-clickées. Cette densité superficielle élevée est à l'origine de l'élongation des boucles de dextrane, due à l'encombrement stérique, ce qui est observée par une augmentation de Δ_{PZ} . Ainsi, on remarque une corrélation directe entre le Γ_{exp} et le Δ_{PZ} , c'est-à-dire plus la densité superficielle en dextrane est élevée, plus l'épaisseur du recouvrement est grande (Figure II.21).

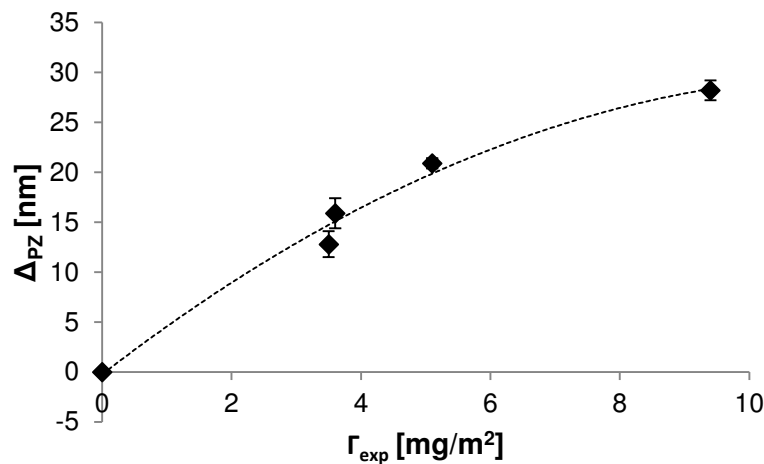


Figure II.21. Variations du taux de recouvrement en dextrane (DexN₃-23) (Γ_{exp}) en fonction de l'épaisseur du recouvrement (Δ_{PZ}) obtenue à partir de valeurs de potentiel Zêta (ζ). Les erreurs expérimentales correspondent à la déviation standard calculée grâce à l'Eq. 4 (Partie III, p. 205)

III. STABILITE COLLOIDALE

La stabilité colloïdale d'une dispersion de NPs dans le milieu aqueux, c'est-à-dire leur résistance contre l'aggrégation, est un paramètre crucial à prendre en compte pour des applications envisagées. Cette stabilité est fortement liée à la structure de surface des particules ainsi qu'à la concentration en électrolyte dans le milieu. Elle résulte d'un équilibre délicat entre des attractions de van der Waals et des forces répulsives (soit stériques, soit électrostatiques) entre les particules³⁵. Afin de maintenir la bonne stabilité du système colloïdal, les forces répulsives doivent être suffisamment fortes. Il existe plusieurs moyens d'assurer la stabilité colloïdale de NPs, mais un recouvrement hydrophile et neutre peut permettre d'assurer cette stabilité. Ce recouvrement est très important afin de conserver la

stabilité colloïdale de NPs, mais aussi dans certains cas pour les protéger contre l'adsorption en surface de molécules indésirables comme certaines protéines par exemple lorsqu'il s'agit des applications biomédicales^{36, 37}.

Compte-tenu des applications visées de nos NCs dans le domaine des traitements des plans d'eaux, un autre paramètre important à prendre en compte est la stabilité de ce recouvrement hydrophile notamment en présence d'autres molécules tensioactives.

C'est pourquoi ces deux aspects ont été successivement étudiés pour les NCs précédemment synthétisées (stabilité colloïdale en milieu salin et stabilité du recouvrement hydrophile en présence d'un tensioactif compétitif).

III.1. Stabilité colloïdale en fonction de la force ionique

La stabilité colloïdale des nano-objets a été étudiée par turbidimétrie (spectroscopie UV-visible entre 450 nm et 650 nm) pour des suspensions de NPs dans des solutions aqueuses de NaCl de différentes forces ioniques (voir Partie III, p. 213). La turbidité des suspensions colloïdales peut être reliée à leur densité optique (DO). Celle-ci a donc été suivie en fonction de la concentration en NaCl dans le milieu dispersant. Cette étude permet de détecter une variation de la taille des particules et éventuellement leur floculation³⁸.

La stabilité colloïdale de NSs du PLA recouvertes de dextrane a déjà été étudiée par notre équipe au LCPM². C'est pourquoi, dans ces travaux de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux cas des différentes NCs que nous avons préparées : avec une réaction « click » soit de type CuAAC (NCs clickées CuAAC), soit de type thiol-ène nucléophile (NCs clickées thiol-ène), sans réaction « click » (NCs non-clickées), clickées et ensuite traitées par le SDS^e (NCs clickées CuAAC_après SDS et NCs clickées thiol-ène_après SDS) et NCs non recouvertes de dextrane (NCs nues^f) (Figure II.22, Tableau II.14).

^e Pour plus de détails, voir le paragraphe suivant.

^f Préparées avec 3 g/L de SDS au lieu de DexN₃ dans la phase aqueuse initiale de la formulation.

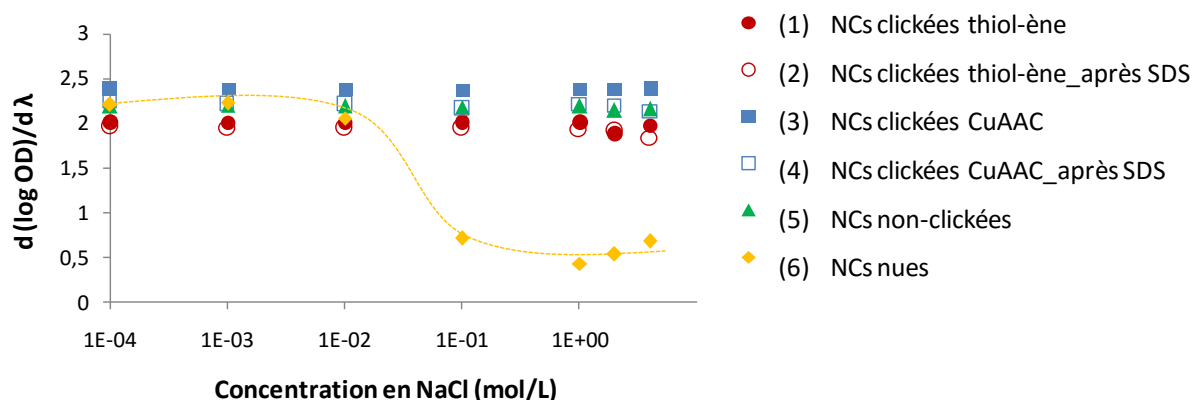


Figure II.22. Stabilité colloïdale de NCs en présence de NaCl. Les NCs ont été préparées par le procédé d'émulsion- évaporation solvant en utilisant 10% vol. de M810 dans la phase organique initiale et en réalisant ou non *in situ* la réaction de chimie « click » CuAAC ou thiol-ène nucléophile (voir détails dans le Tableau II.14)

Tableau II.14. NCs utilisées dans les expériences de stabilité colloïdale. Les NCs ont été préparées en utilisant 10% vol de M810 dans la phase organique initiale, le PLA α -alcyne ou le PLA α -SH (25 g/L) et le DexN₃-23 ou le DexC=C-28 (5 g/L), respectivement

N° de NCs	Type de réaction « click »	Conditions de la réaction « click »	Remarques
1	Thiol-ène nucléophile	3,3 éq. HexAm/SH, 1 éq. DTT/SH	—
2	Thiol-ène nucléophile	3,3 éq. HexAm/SH, 1 éq. DTT/SH	Traitées par SDS
3	CuAAC	5,5 éq. CuSO ₄ /alcyne, 10 éq. AAsc/CuSO ₄	—
4	CuAAC	5,5 éq. CuSO ₄ /alcyne, 10 éq. AAsc/CuSO ₄	Traitées par SDS
5	Sans « click »	—	—
6	Sans « click »	—	Non recouvertes

Dans le cas des NCs clickées (quel que soit le type de réaction de couplage « click ») ou non-clickées, les suspensions sont stables et aucune floculation n'est observée après 1h de mise en suspension dans des milieux salins de concentration variant entre 10^{-4} et 4 mol/L en NaCl (Figure II.22). Au contraire, dans le cas des NCs nues, une floculation des NCs est observée pour des concentrations en NaCl supérieures à 10^{-2} mol/L. Cette floculation se traduit par une chute du $d(\log DO)/d\lambda$ *versus* concentration en électrolyte (Figure II.22). La déstabilisation du système est liée au fait que les charges négatives présentes à la surface des NCs non-recouverts (provenant des fonctions carboxyle du PLA et qui sont à l'origine de répulsions électrostatiques) sont écrantées par l'addition d'électrolyte. Une floculation est

ainsi favorisée lorsque l'on augmente la force ionique du milieu. Au contraire, dans le cas de NCs recouvertes de dextrane (clickées ou non-clickées), une bonne stabilité colloïdale est observée même aux plus fortes concentrations en sel. Elle provient du recouvrement hydrophile en dextrane qui est suffisamment dense pour assurer cette stabilité grâce aux répulsions stériques qui s'ajoutent aux répulsions électrostatiques des charges de surface. Ce comportement a déjà été observé pour des NSs² et permet de confirmer la présence du dextrane en surface des NPs. Nos résultats sur les NCs confirment de plus que la présence de l'huile à l'intérieur des NPs ne perturbe pas leur stabilité colloïdale.

III.2. Stabilité du recouvrement en présence d'un tensioactif compétitif

Nous avons également étudié la stabilité du recouvrement en dextrane à la surface des NCs en présence d'un tensioactif compétitif. D'une part, ces études nous ont permis de vérifier si les chaînes du dextrane clickées sont vraiment ancrées de façon irréversible à la surface de particules. D'autre part, nous avons pu nous assurer de la stabilité de ce recouvrement et donc, *in fine* de la stabilité de nos NCs dans des milieux contenant des composés tensioactifs ou encore des protéines.

Pour cela, les suspensions de NCs ont été agitées pendant 24h en présence d'une solution aqueuse contenant 1% massique d'un tensioactif anionique, le dodécyl sulfate de sodium (SDS). La désorption de polymères par SDS a déjà été étudiée au LCPM² et dans la littérature^{39, 40}. Elle permet d'évaluer l'irréversibilité de l'adsorption de polymères sur des surfaces solides. Effectivement, ce tensioactif peut entrer en compétition avec les dérivés du dextrane amphiphiles tensioactifs utilisés lors de la formulation de NCs et alors s'adsorber à la surface des NCs. Après contact avec le SDS, les nano-objets ont ensuite été lavés à l'eau Milli-Q, lyophilisés, puis dissous dans le DMSO-*d*₆ et enfin caractérisés par RMN ¹H. Un exemple de ces spectres RMN ¹H obtenus dans le cas des NCs formulées avec le DexN₃-23 est présenté sur la Figure II.23.

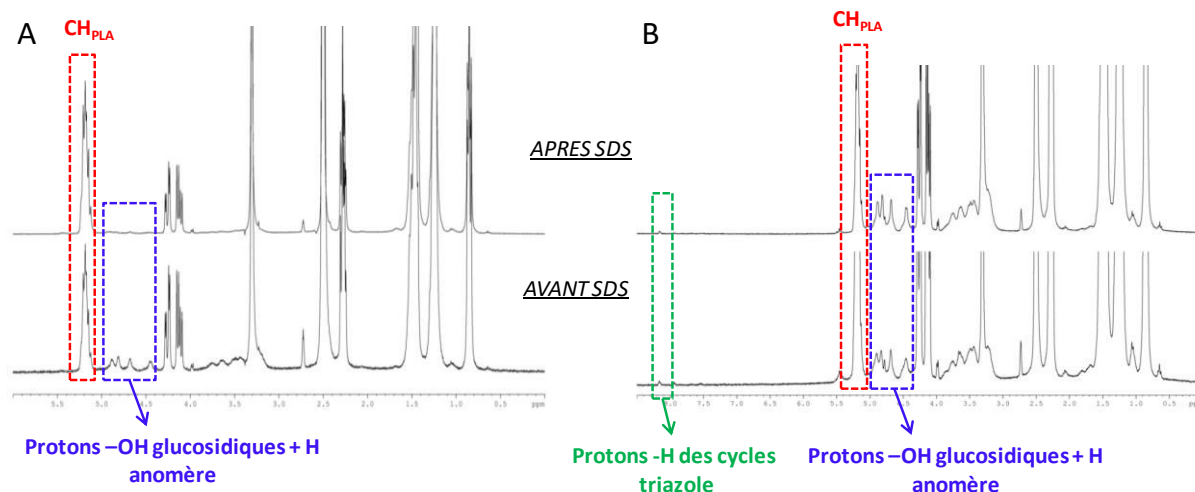


Figure II.23. Comparaison des spectres RMN ^1H (dans $\text{DMSO-}d_6$) des NCs obtenues par émulsion-évaporation de solvant avec le DexN₃-23 comme stabilisant et en réalisant *in situ* la réaction de chimie « click » CuAAC (B) ou non (A). Les spectres sont comparés avant et après traitement par le SDS (1% massique en milieu aqueux)

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau II.15. Dans ces études, les NCs élaborées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale ont été comparées aux NSs, puis nous avons comparé les NPs clickées aux NPs non-clickées.

Tableau II.15. Comparaison des propriétés des NPs (obtenues par émulsion-évaporation de solvant, en réalisant ou non *in situ* la réaction de chimie « click » CuAAC ou thiol-ène) avant et après traitement par SDS (1% massique dans le milieu aqueux)

N°	Type de NPs	% vol M810 ^(a)	R _{initial} (avant SDS) ^(b)		R _{final} (après SDS) ^(b)		% Dex désorbé ^(c)	
			CuAAC	Thiol-ène	CuAAC	Thiol-ène	CuAAC	Thiol-ène
1	Clickées	0	0,187	0,203	0,121	0,116	35	43
2		10	0,334	0,254	0,240	0,130	28	49
3	Non-clickées	0	0,061	0,023	0	0	100	100
4		10	0,189	0,084	0	0	100	100

(a) Pourcentage volumique de M810 initialement introduit dans la phase organique (volume total de la phase organique = 1 mL).

(b) Ratio molaire unité glucopyranose dextrane/unité de répétition PLA (Dex/PLA) évalué par RMN ^1H (voir Eq. 9, Partie III, p. 207).

(c) Calculé à l'aide de l'équation suivante: $\% \text{ Dex désorbé} = \left(1 - \frac{R_{\text{final}}}{R_{\text{initial}}}\right) \cdot 100$

Dans le cas de NPs préparées sans réaction « click » et quel que soit le dérivé du dextrane (DexN₃-23 ou DexC=C-28) utilisé en tant que stabilisant de l'émulsion, on observe sur le spectre RMN ¹H des objets après traitement par le SDS la disparition des pics caractéristiques du dextrane, notamment ceux des protons –OH et H anomère des unités glucopyranose des dérivés du dextrane (entre 4,3 et 5,0 ppm, voir Figure II.23A dans le cas des NCs obtenus avec le DexN₃-23). Ceci témoigne de la désorption totale de la couche de dextrane à la surface des NPs (entrées 3 et 4, Tableau II.15). Au contraire, dans le cas de NPs clickées, quel que soit le type de chimie « click » et quel que soit le type d'objets (NCs ou NSs), le recouvrement en dextrane est beaucoup plus stable. Dans le cas des NCs clickées CuAAC (ou thiol-ène) seulement 28% (à 49%), respectivement, du dextrane initialement présent dans le recouvrement des NCs avant traitement par SDS sont désorbés (Tableau II.15, entrée 2). Les résultats sont similaires dans le cas de NSs (Tableau II.15, entrée 1).

Cependant, quel que soit le type d'objets clickés (NCs ou NSs), cette désorption partielle de chaînes de dextrane par le traitement au SDS ne réduit pas leur stabilité colloïdale en milieu salin (cas des NCs – Figure II.22, paragraphe précédent, p. 150).

Enfin, on observe que, dans le cas des NPs clickées par chimie « click » CuAAC, le % click^g reste inchangé même après le traitement par le SDS. Ainsi, pour des NCs clickées, le % click est entre 70 et 68% avant et après le traitement par le SDS, respectivement. Ceci prouve que seules des chaînes du dextrane physiquement adsorbées ou enchevêtrées entre elles-mêmes, ou encore sur des chaîne de dextrane clickées à la surface ont été éliminées par traitement par le SDS. En revanche, celles accrochées chimiquement (grâce à une réaction « click ») restent immobilisées en surface de NPs. Ces résultats semblent être prometteurs en terme de stabilité de la couche superficielle de dextrane lorsque cette dernière est liée de façon covalente à la surface de NPs par rapport à une simple adsorption physique.

^g Pour rappel : Dans le cas de la réaction CuAAC, le % click est évalué par rapport aux fonctions alcyne ayant réagi (Chapitre II, Paragraphe I.2., p. 113). Dans le cas de la réaction thiol-ène, le % click est évalué par rapport aux fonctions méthacrylate ayant réagi (Chapitre II, Paragraphe II.1.1.2., p. 123). Dans ce cas, ce % click ne peut pas être déterminé après traitement par le SDS : comme nous l'avons observé précédemment (Chapitre II, Paragraphe II.1.2., p. 127), il y a effectivement des problèmes d'évaluation du τ du DexC=C (par RMN ¹H) après lavages des NPs) probablement en raison de l'élimination d'un certain nombre de chaînes DexC=C lors des lavages.

De plus, nous nous sommes interrogés sur l'éventuelle influence de l'efficacité de l'ancrage chimique du dextrane au PLA, c'est-à-dire l'influence du % des réactions « click » sur la quantité du dextrane désorbée (Figure II.24). Pour cette étude, nous nous sommes limités à des NSs préparées avec du DexN₃-23 en tant que stabilisant. La réaction « click » CuAAC réalisée dans différentes conditions catalytiques nous avait permis d'obtenir des % click variés. Ces résultats montrent que même un % click peu élevé (~ 8%) est suffisant pour empêcher la désorption de 60% du dextrane en surface et d'assurer une relativement bonne stabilité du recouvrement en DexN₃ (60% du DexN₃ reste donc immobilisé à la surface du PLA). Cette bonne stabilité du recouvrement superficiel vient certainement du fait que même un petit nombre de liaisons covalentes est suffisant pour ancrer le dextrane de façon irréversible au PLA et donc aux NPs (voir une représentation schématique sur la Figure II.25).

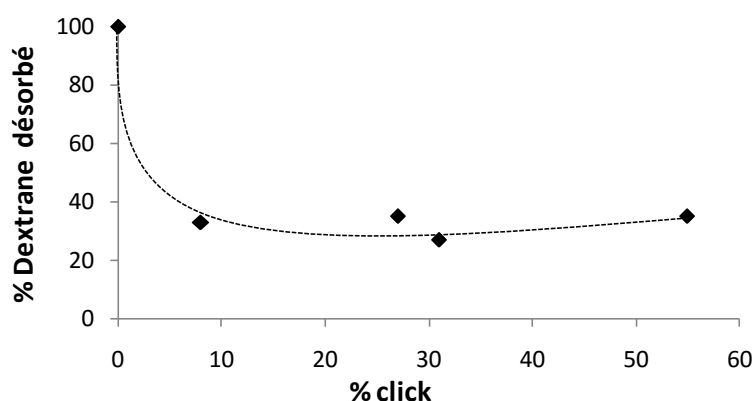


Figure II.24. Influence de l'efficacité de la réaction « click » (% click) sur la désorption du DexN₃-23 dans le cas de NSs préparées par procédé d'émulsion-évaporation de solvant dans des différentes conditions catalytiques. La tendance probable est indiquée par la ligne pointillée

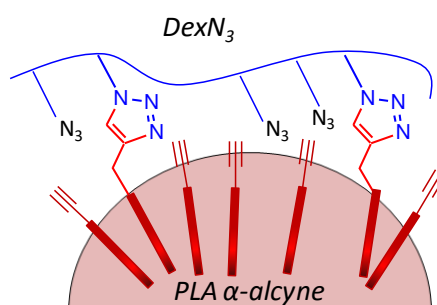


Figure II.25. Représentation schématique de l'immobilisation chimique d'une chaîne de DexN₃ à la surface de NPs de PLA dans le cas d'un couplage « click » CuAAC entre un PLA α-alcyne et un DexN₃

Pour conclure, les résultats présentés dans ce paragraphe confirment que la réaction « click » permet d'améliorer nettement la stabilité du recouvrement en dextrane et que cette bonne stabilité est assurée même par un faible nombre de points d'ancrage chimique.

IV. MORPHOLOGIE DES NANO-OBJETS

IV.1. Analyse thermique (MDSC)

Dans la suite de nos travaux sur la caractérisation des NCs, nous avons voulu étudier la compatibilité entre tous les composants constituant nos NCs, à savoir le PLA, le dextrane et le M810. Pour cela, des analyses de Calorimétrie Différentielle à Balayage Modulé (MDSC) ont été réalisées. Après avoir analysé chaque composant séparément, des mélanges entre les composants (PLA/M810, PLA/dextrane, M810/dextrane) dans des proportions similaires à celles des NCs finales ont été étudiés.

Afin d'évaluer tout d'abord la miscibilité PLA/dextrane, les thermogrammes MDSC d'un mélange des deux composants à une composition similaire à celle dans les NCs finales ont été analysés et comparés à ceux du PLA commercial (PLA_{comm}) et du DexN₃ (Tableau II.16).

Tableau II.16. Résultats des analyses MDSC du DexN₃, M810 et PLA_{comm} (35 000 g/mol) et des mélanges DexN₃/PLA_{comm} et DexN₃/M810. Les valeurs données sont moyennées sur le 2^{ème} et le 3^{ème} cycle de chauffage (voir Partie III, p. 213). L'erreur expérimentale sur les températures de transition est de $\pm 1^\circ\text{C}$ sauf pour des échantillons contenant du DexN₃. Pour ceux-ci, le saut correspondant à la T_g était très peu visible et donc l'erreur est plus grande (donnée dans le tableau)

N°	Composition de l'échantillon	F _{composant 1} ^(a)	F _{composant 2} ^(a)	T _g [°C]	T _f [°C]
1	DexN ₃	100	0	186±6	—
2	PLA _{comm}	100	0	53	—
3	M810	100	0	—	-4
4	DexN ₃ /PLA _{comm}	19	81	53 ; 195±4	
5	DexN ₃ /M810	15	85	195±5	-4

(a) Pourcentage massique (% m).

Le thermogramme du mélange DexN₃/PLA_{comm} 19:81 (m/m) fait apparaître deux températures de transition vitreuse (T_g) correspondant à celle du PLA_{comm} et celle du DexN₃. En effet, les valeurs de ces T_g sont similaires à celles des T_g des composants purs (à l'erreur expérimentale près ; comparer l'entrée 4 avec 1 et 2). Dans le cas d'un mélange DexN₃/M810 15:85 (m/m), en plus d'une transition correspondant à la T_g du DexN₃, il apparaît un phénomène de fusion (T_f) vers -4°C. Cette T_f correspond à celle du M810 (comparer l'entrée 5 avec 1 et 3). Ces deux analyses confirment donc bien que le dextrane n'est miscible ni au PLA ni au M810.

Concernant les mélanges PLA/M810, ceux-ci ont été réalisés avec les différents types de PLA utilisés (PLA_{comm}, PLA α -alcyne ou PLA α -SH) et avec un ratio massique PLA/M810 égal à 20:80. Ce ratio correspond à celui dans les NCs finales formulées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale et qui sont nos objets de référence.

Selon les résultats présentés dans le Tableau II.17, on note que les T_g observées pour des mélanges PLA/M810 (entrées 3, 6 et 9) sont plus basses que la T_g du PLA correspondant utilisé dans le mélange (entrées 2, 5, et 8, respectivement). Par exemple pour le mélange PLA_{comm}/M810, la T_g est abaissée à 45°C contre 53°C pour le PLA_{comm} pur. De plus, quel que soit le PLA, on observe un phénomène de fusion pour chaque mélange avec une T_f vers -4°C caractéristique du M810.

Tout ceci témoigne de la miscibilité partielle entre les différents PLA et le M810. Ainsi, dans chaque mélange, il existe deux phases (l'une contenant le M810 pur et l'autre contenant du PLA plastifié par du M810). Si l'on admet que la T_g expérimentalement obtenue suit la loi de Fox⁴¹ (Equation 20), c'est-à-dire le PLA et le M810 sont entièrement miscibles dans cette dernière phase, la proportion du M810 plastifiant le PLA peut être évaluée à l'aide de la T_g expérimentale. On obtient ainsi une fraction du M810 plastifiant le PLA égale à environ 3 – 4% m quel que soit le type de PLA dans ce mélange (20:80 m/m).

$$\frac{1}{T_g} = \frac{F_{polymère}}{T_{g_{polymère}}} + \frac{F_{plastifiant}}{T_{g_{plastifiant}}} \quad [20]$$

avec : $F_{polymère}$ et $F_{plastifiant}$ – fractions massiques du polymère (ici le PLA) et du plastifiant (ici le M810), respectivement,

$T_{g_{polymère}}$ – température de transition vitreuse du polymère (exprimée en K),

$T_{g\text{plastifiant}}$ – température de transition vitreuse du plastifiant (exprimée en K). Cette dernière peut être déterminée à partir de l'équation suivante⁴² : $T_g = \frac{2 \cdot T_f}{3}$ avec T_f correspond à la température de fusion du plastifiant.

Tableau II.17. Résultats des analyses MDSC des PLA (PLA_{comm} 35 000 g/mol, PLA α -alcyne 4 000 g/mol, PLA α -SH 3 100 g/mol), du M810 et de leurs mélanges. Les valeurs données sont moyennées sur le 2^{ème} et le 3^{ème} cycle de chauffage (voir Partie III, p. 213). L'erreur expérimentale sur les températures de transition $\pm 1^\circ\text{C}$

N°	Composition de l'échantillon	F _{PLA} ^(c)	F _{M810} ^(c)	T _g [°C]	T _f [°C]
1	M810	100	0	–	–4
2	PLA _{comm}	100	0	53	–
3	PLA _{comm} /M810	19	81	45	–5
4	NCs non clickées (PLA _{comm} + M810)	20	80	46	–4
5	PLA α -alcyne	100	0	45	–
6	PLA α -alcyne/M810	23	77	37	–3
7	NCs clickées CuAAC^(a) (PLA α -alcyne + M810)	23	77	46	–4
8	PLA α -SH	100	0	43	–
9	PLA α -SH/M810	23	77	34	–4
10	NCs clickées thiol-ène^(b) (PLA α -SH + M810)	23	77	42	–3

(a) % Click évalué par rapport aux fonctions alcyne = 64% (Eq. 10, Chapitre II, p. 113).

(b) % Click évalué par rapport aux fonctions C=C = 23% (Eq. 11, Chapitre II, p. 124).

(c) Pourcentage massique (% m).

Afin de confirmer ces résultats, nous les avons comparés aux thermogrammes des échantillons de NCs lyophilisées correspondant aux différents mélanges utilisés (comparer les entrées 4 et 3, Tableau II.17). Des résultats similaires concernant la miscibilité partielle PLA/M810 ont été obtenus pour les NCs non-clickées (entrée 4 *versus* 3, Tableau II.17). Cependant, pour les échantillons de NCs clickées (quel que soit le type de couplage « click ») (entrées 7 et 10, Tableau II.17) les T_g observées correspondent aux T_g des PLA purs utilisés dans ces formulations. Ainsi, par exemple pour les NCs préparées avec la réaction CuAAC, la T_g de 46°C est identique (à l'erreur expérimentale près) à celle du PLA α -alcyne seul (45°C).

Dans cet échantillon, le fait d'accrocher le PLA au dextrane devrait entraîner une augmentation de la T_g du produit par rapport à la T_g du PLA non-clické à cause de la moindre mobilité des chaînes PLA dans le copolymère dextrane-g-PLA alors formé. Cependant, il faut noter qu'en plus du copolymère, cet échantillon de NCs contient également du PLA n'ayant pas réagi (% click = 64%). Quand ce dernier est mélangé avec du M810 (PLA α -alcyne/M810 (23:77 m/m), il est plastifié par le M810 à 3% m comme le montre l'expérience n°6 (Tableau II.17). Ainsi la diminution de la T_g par rapport à celle du PLA dans le cas des NCs clickées due à sa plastification par le M810 est compensée par l'augmentation de la T_g provenant de la formation du copolymère dextrane-g-PLA. Ceci peut expliquer pourquoi au final la T_g moyenne des NCs ne varie pas par rapport à la T_g du PLA de départ.

Pour conclure, les résultats MDSC présentés dans ce paragraphe mettent en évidence la non-miscibilité ou une très faible miscibilité (dans le cas des mélanges PLA/M810) entre tous les composants constituant nos objets (i.e. dextrane, PLA et M810) dans des proportions correspondant à celles dans les NCs finales. Ceci semble indiquer que chaque composant tend à se séparer des deux autres, induisant ainsi une ségrégation de phases nécessaire pour la formation de NCs.

En effet, le PLA, s'il est initialement soluble dans la phase organique (dans les proportions M810/CH₂Cl₂ utilisées), se sépare du M810 au cours de l'évaporation de son bon solvant (CH₂Cl₂) et migre progressivement à l'interface pour y réagir avec le dextrane correctement fonctionnalisé. Les dérivés amphiphiles du dextrane (le DexN₃ et le DexC=C), quant à eux, ne sont solubles ni dans le M810 ni dans le CH₂Cl₂. Ils restent donc hors de la phase organique tout au long du processus. Mais grâce à leurs propriétés amphiphiles, ils peuvent s'adsorber à l'interface huile/eau. Ils se retrouvent alors en surface des objets formés assurant leur stabilité colloïdale (voir Paragraphe III.1, p. 149) et écrantant leur charge de surface (voir Paragraphe II.1, p. 141). Ainsi, dans le cas où du M810 est employé, nous imaginons des NPs présentant la morphologie représentée sur la Figure II.26.

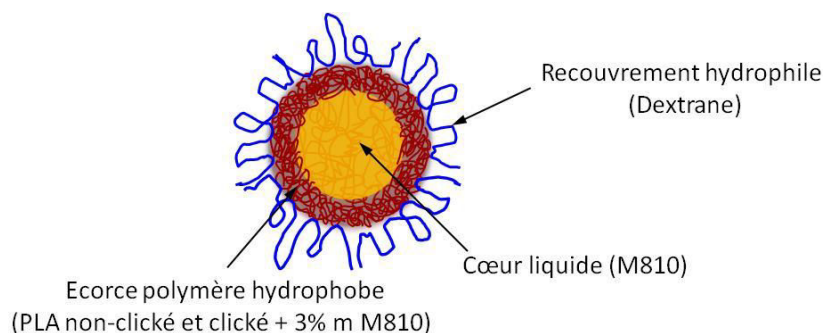


Figure II.26. Nanocapsule clickée à écorce PLA, cœur M810 et recouverte de dextrane

Cependant, tous ces résultats étant des preuves indirectes de la morphologie cœur liquide/écorce solide de NCs, nous avons voulu observer ces NCs par Microscopie Électronique à Transmission (MET).

IV.2. Analyses MET

Des analyses MET à basse température (cryo-MET) ont été effectuées sur trois types d'objets précédemment préparés en suspension dans l'eau : NSs (Figure II.27a), NCs non-clickées (Figure II.27b) et NCs clickées par réaction CuAAC (Figure II.27c). Rappelons que les NCs ont été préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale.

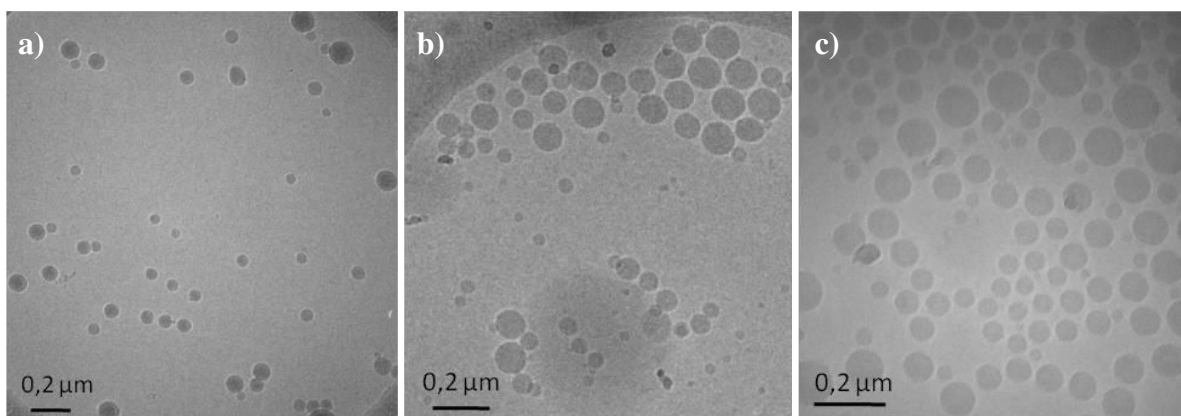


Figure II.27. Micrographies cryo-MET des NPs en suspension dans l'eau : a) NSs, b) NCs non-clickées, c) NCs clickées par réaction CuAAC. Les NCs ont été préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale

Ces images cryo-MET confirment la sphéricité des objets et les valeurs de leur diamètres moyens précédemment estimés par granulométrie (110, 180 et 150 nm respectivement pour les NSs, les NCs non-clickées et les NCs clickées). Cependant, en raison du manque de contraste suffisant entre le cœur huileux (M810) et l'écorce de PLA, la

morphologie de type cœur/écorce des NCs n'a pas pu être prouvée par cette méthode. Nous avons alors utilisé un agent de contraste, le tétraoxyde d'osmium (OsO_4), connu pour se fixer sur les insaturations. Nous espérions alors qu'il s'adsorbe sur la triple liaison du PLA α -alcyne n'ayant pas réagi et ainsi améliore le contraste. Malheureusement, il n'a vraisemblablement pas réussi à pénétrer dans les objets déjà formés pour réagir avec les chaînes PLA α -alcyne qui s'y trouvaient, si bien qu'aucune différence de contraste n'a été observée.

C'est pourquoi, nous nous sommes tournés vers l'utilisation de l'ultramicrotomie à basse température (cryo-ultramicrotomie). Cette méthode permet de réaliser des coupes ultrafines (60-65 nm) des objets après les avoir emprisonnés dans une résine. Ces coupes peuvent être ensuite observées en MET classique. Le procédé de préparation de l'échantillon pour la coupe nécessite de fournir des objets sous forme solide (lyophilisés). Ainsi, deux types de particules ont été préparés : les NCs clickées (préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale) et les NSs. Les NPs lyophilisées ont ensuite été emprisonnées dans une résine appelée Epofix.

La comparaison des images des deux types de NPs, d'une part des NCs (Figure II.28a) et d'autre part des NSs (Figure II.28b) a mis en évidence deux morphologies différentes. Une structure cœur/écorce pour les NCs et une structure pleine pour les NSs. Cependant, les objets observés, qu'il s'agisse de NSs ou de NCs, sont de tailles beaucoup plus élevées que celles déterminées par granulométrie laser (110 et 150 nm respectivement pour les NSs et les NCs) ou observées par cryo-MET sans couper les échantillons (Figure II.27). Le gonflement de ces objets peut être lié au mode de préparation des échantillons et plus précisément à la résine Epofix employée, ce qui a déjà été rapporté dans la littérature⁴³.

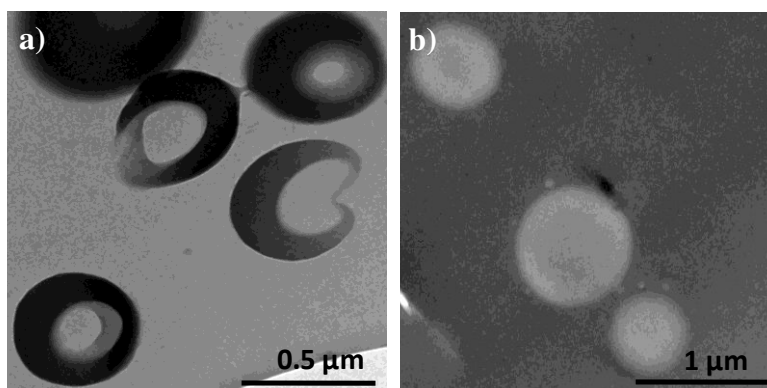


Figure II.28. Micrographies MET après la coupe des NPs lyophilisées : a) NCs clickées préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale, b) NSs

Faute de temps, nous n'avons pas pu poursuivre nos investigations. A l'avenir, il serait intéressant de réaliser d'autres analyses qui pourront prouver la morphologie cœur/écorce de nos NCs sans modifier leur taille. Des cryofractures peuvent être envisagées afin de mieux observer l'intérieur des objets ou l'introduction d'un agent fluorescent permettant d'améliorer le contraste entre le cœur huileux et l'écorce polymère. Eventuellement des analyses de diffusion de neutrons pourraient permettre de moduler le contraste entre les constituants de l'objet en utilisant par exemple des solvants deutérés.

V. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

- Dans ce chapitre, nous avons montré que les objets colloïdaux obtenus sont de diamètres submicroniques. Les NCs sont néanmoins plus grosses que les NSs ce qui provient de l'encapsulation d'huile à l'intérieur des objets en plus du PLA et conduit à l'augmentation de leur volume.
- Les travaux menés précédemment au LCPM ont montré que les dérivés amphiphiles du dextrane pouvaient s'adsorber à l'interface huile/eau et notamment à la surface des NPs. La présence de cette couche neutre en dextrane à la surface des NPs élaborées au cours de cette thèse a été mise en évidence grâce aux mesures de la mobilité électrophorétique des objets dispersés dans les solutions de NaCl de concentrations variables (de 10^{-6} à 10^{-2} M). Ainsi, les charges négatives de surface des NPs sont écrantées plus rapidement par un milieu salin si les NPs ont été formulées avec des dérivés amphiphiles du dextrane (NPs recouvertes) par rapport aux NPs nues. A partir de ces résultats, le potentiel Zêta (ζ) des NPs a pu être estimé, puis l'épaisseur du recouvrement en dextrane (Δ_{PZ}) des NPs a pu être calculée. Cette dernière variait entre 13 et 28 nm pour des NPs non-clickées et clickées, respectivement.
- Nous avons déterminé par RMN ^1H le taux de recouvrement (Γ_{exp}) des NPs préparées en utilisant comme tensioactif deux dérivés du dextrane différents (le DexN₃-23 ou le DexC=C-28). Les résultats obtenus avec le DexN₃-23 pour des NPs non-clickées variaient entre 2,8 et 3,5 mg/m². Ceci est cohérent avec les Γ_{exp} obtenues précédemment au LCPM pour d'autres dérivés tensioactifs du dextrane. Cependant, les Γ_{exp} des NPs préparées avec du DexC=C-28 comme tensioactif (de 0,8 à 1,3 mg/m²) restaient significativement inférieures. Ceci provient probablement de l'affinité moins importante du PLA avec des

chaînes latérales hydrophobes du DexC=C plus courtes (à 4 carbones) par rapport à celles du DexN₃ (à 6 carbones). Au contraire, une augmentation significative de Γ_{exp} a été observée quel que soit le type des NPs clickées, indépendamment du dextrane utilisé (jusqu'à 9,4 mg/m² dans le cas de DexN₃-23 et à 10,3 mg/m² pour DexC=C-28).

- La présence du dextrane en surface des NPs a également été indirectement prouvée par l'amélioration de la stabilité colloïdale par rapport aux NPs non-recouvertes en présence de sel de concentrations variables (entre 10⁻⁴ à 2 mol/L).
- La stabilité du recouvrement hydrophile des NPs a été étudiée en présence d'un tensioactif compétitif – le SDS. La comparaison des spectres RMN ¹H des NPs non-clickées, avant et après le traitement par le SDS, a montré une désorption totale du dextrane, quel que soit le dérivé amphiphile utilisé. Au contraire, dans le cas des NPs clickées, plus que 50% de chaînes dérivés du dextrane sont restées immobilisées à la surface des objets, quel que soit le type de couplage « click » (CuAAC ou thiol-ène nucléophile). Ceci confirme l'avantage de fixer la couche externe de dextrane à la surface de NPs par liaison covalente par rapport à une simple adsorption physique.
- Les analyses MDSC ont prouvé la non-miscibilité (ou la très faible miscibilité) de composants constituant les NCs (i.e. dextrane, PLA et M810) dans les proportions correspondantes à celles dans les NCs finales. Ainsi, l'évaporation du bon solvant du PLA (CH₂Cl₂) au cours du processus d'élaboration de NCs provoque la précipitation du PLA à l'interface huile/eau. Ce dernier se sépare du M810 et migre progressivement à l'interface. Ceci devrait permettre la formation des NPs de type capsule à cœur liquide et écorce polymère solide.
- La morphologie cœur liquide/écorce solide des NCs a été prouvé ultérieurement par des analyses MET réalisées après les avoir coupées par cryo-ultramicrotomie. De plus, des images cryo-MET, ont confirmé la sphéricité des objets et les valeurs de leur diamètres moyens précédemment obtenus par granulométrie.

Dans le chapitre suivant, nous allons présenter les résultats d'encapsulation d'une substance active modèle pour notre application au sein des NCs et du suivi de sa cinétique de libération.

CHAPITRE IV

ENCAPSULATION ET LIBERATION D'UNE SUBSTANCE ACTIVE A PARTIR DES NANO-OBJETS

CHAPITRE IV

Cette thèse fait partie d'un projet visant à traiter des plans d'eau à l'aide d'une substance active (SA) algicide^h. Le but est de minimiser l'emploi des composés écotoxiques et de délivrer la SA de façon progressive et continue sur quelques jours. Dans ce cadre, notre travail consistait à encapsuler une SA au sein de nos NCs, puis à étudier sa cinétique de libération. Le gallate d'octyle (OG) a été choisi comme SA modèle pour notre étude.

Nous avons montré dans les chapitres précédents qu'il était possible de préparer des NCs à cœur huileux, écorce PLA et recouvertes de dextrane par un procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » réalisée *in situ* à l'interface des gouttelettes d'émulsion. Nous avons pu montrer comment la réaction « click » favorise la stabilité et augmente la densité du recouvrement de dextrane en surface en liant chimiquement ce dernier à l'écorce de PLA. Tout ceci assure une bonne stabilité aux NCs en milieu aqueux. Même si nous avons fait varier la teneur d'huile M810 dans nos NCs, celles élaborées en utilisant 10% vol de M810 dans la phase organique initiale ont été choisies comme nos objets de référence pour mener cette étude d'encapsulation/libération de SA. Ces NCs contiennent déjà une forte teneur en huile (M810/PLA m/m ~3,3) et ont été les plus étudiées dans le chapitre précédent. De même, la réaction de chimie « click » CuAAC catalysée par le système CuSO₄/AAsc a été la plus étudiée dans ces travaux de thèse et a donc été utilisée pour réaliser les NCs avec la SA à l'intérieur.

Dans la première partie de ce chapitre, nous présentons quelques généralités sur l'encapsulation et libération d'une SA à partir des particules polymères. Cette dernière peut

^h Une SA algicide peut avoir un double effet : algicide – consistant à détruire la totalité des algues présentes dans le milieu d'analyse, ou algistatique – consistant à arrêter la croissance et/ou le développement des algues.

être modélisée de différentes façons pour des objets de morphologie et géométrie variées. Nous nous sommes particulièrement intéressés à des objets sphériques de type cœur liquide/écorce polymère (capsules) et de matrice polymère (sphères). A la fin de cette première partie, nous présentons la SA modèle choisie dans ces travaux de thèse.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons étudié tout d'abord la solubilité de la SA dans notre formulation. Ensuite, la SA a été encapsulée à l'intérieur des NCs clickées par chimie « click » CuAAC. Ces dernières ont été alors caractérisées en termes de distribution de taille, de quantité de SA et de M810 encapsulés à l'intérieur, de taux de recouvrement et d'efficacité du couplage « click ». Finalement, la cinétique de libération de la SA à partir de ces NCs a été évaluée et comparée à la libération de la SA encapsulée au sein de NSs clickées.

I. GENERALITES

I.1. Encapsulation d'une SA au sein de NCs

Les NCs à cœur huileux sont largement utilisées pour l'encapsulation de différentes SA lipophiles (voir exemples dans la Partie I, Tableau I.4, p. 18). Le taux de charge en SA et l'efficacité d'encapsulation (EE) sont fortement influencés par la solubilité de la SA dans l'huile constituant le cœur de NCs⁴⁴. Généralement plus la SA est soluble dans le cœur huileux et plus le coefficient de partage de cette SA entre l'huile et la phase aqueuse est en faveur de ce cœur, plus il est facile de l'encapsuler avec des efficacités élevées. Si la SA est à la fois miscible au polymère, elle peut également être dissoute dans l'écorce. Ceci permet d'augmenter la quantité totale encapsulée, mais aussi peut accélérer la cinétique de libération.

Cependant, si la SA est une huile elle-même et qu'elle est utilisée en quantité suffisamment élevée par rapport au polymère qui constitue l'écorce, elle peut constituer le cœur de NCs. Dans ce cas, la non-perméabilité de l'écorce polymère vis-à-vis de la SA est cruciale pour augmenter l'EE, surtout s'il s'agit d'une huile volatile. Hofmeister *et al.*⁴⁵ ont cherché à quantifier l'influence de l'écorce polymère sur cette EE. La présence de l'écorce polymère protège la SA et assure une barrière contre sa diffusion à l'extérieur. Cependant, l'épaisseur de l'écorce de NCs est généralement plus fine que celle des microcapsules. Aussi la solubilité de la SA dans l'écorce polymère des NCs doit être faible pour assurer une forte

barrière à la diffusion de la SA et donc faciliter son encapsulation. Les auteurs ont démontré l'existence d'une relation linéaire entre un des paramètres de solubilité de Hansenⁱ (δ_h) (qui traduit ici la solubilité de la SA (huile) dans l'écorce polymère) et l'efficacité d'encapsulation, dans leurs systèmes étudiés (Figure II.29)⁴⁵.

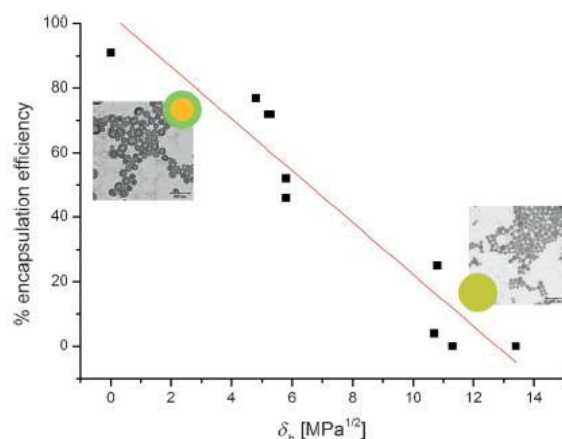


Figure II.29. Relation linéaire entre l'efficacité d'encapsulation et un des paramètres de solubilité de Hansen (δ_h) pour la SA (huile) dans l'écorce polymère et l'efficacité d'encapsulation⁴⁵

Ainsi, plus la valeur du paramètre de solubilité de Hansen δ_h est faible pour un système donné, plus les interactions entre le cœur liquide et l'écorce des NCs (polymère et SA, respectivement) sont faibles et, par conséquent, plus l'efficacité d'encapsulation est élevée (Figure II.29).

I.2. Libération d'une SA à partir des NCs

Lorsque la SA est encapsulée à l'intérieur d'une capsule, il existe plusieurs mécanismes de libération à partir de cette capsule. Ils peuvent être répartis en deux grands types⁴⁷ : (i) libération déclenchée et (ii) libération prolongée.

Dans le cas d'une libération déclenchée, les NCs sont dites « stimulables ». Elles sont préparées de façon à libérer leur contenu par exposition à un stimulus externe. Ce dernier peut être par exemple un changement de pH, de température, de pression (mécanique ou osmotique) ou encore l'application d'ultrasons ou d'un champ magnétique.

ⁱ Solubilité de Hansen peut être décrite par trois paramètres : δ_d , δ_p et δ_h basés sur des forces dispersives, des interactions dipolaires et des interactions de type liaison hydrogène, respectivement⁴⁶.

Dans le cas d'une libération prolongée, deux phénomènes fondamentaux peuvent être distingués : (i) la diffusion de la SA à travers l'écorce polymère et (ii) la dégradation chimique de l'écorce de la capsule (Schéma II.14). Dans le cas (i), la diffusion de la SA est régie par le gradient de sa concentration entre l'intérieur de NCs et son milieu environnant (lois de Fick, voir paragraphe suivant). Cependant, quand la SA est dispersée dans l'écorce polymère à l'état solide, sa libération est précédée par sa dissolution dans l'écorce. Cette dernière se produit par infiltration du milieu de libération par capillarité au sein de l'écorce. Ainsi, la SA présente dans les pores de l'écorce se dissout jusqu'à une concentration de saturation^j, ce qui lui permet de diffuser à travers le réseau poreux jusqu'à la surface de la capsule, puis dans le milieu extérieur. Dans le cas (ii), la dégradation de l'écorce polymère peut se faire par exemple par son hydrolyse en milieu acide ou basique (par exemple cas du PLA) ou suite à l'action d'enzymes comme la dextranase (par exemple cas du dextrane). Ces deux mécanismes peuvent se produire en même temps et contribuer tous les deux à la libération de la SA mais selon les cas, l'un des deux peut être prépondérant.

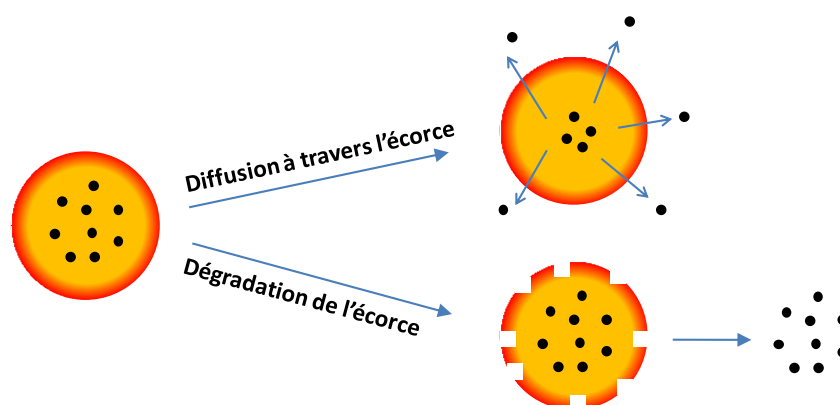


Schéma II.14. Mécanismes principaux de libération prolongée de la SA à partir d'une capsule polymère

Afin de mieux contrôler la libération de la SA à partir des capsules polymères, divers paramètres peuvent être ajustés^{44, 48}, tels que la taille des capsules, la nature du polymère (polarité) et la morphologie (porosité et épaisseur) de l'écorce, la solubilité de la SA dans l'écorce et dans l'huile qui constitue le cœur de capsules, et éventuellement la solubilité de la SA dans le milieu environnant (par exemple dans l'eau).

Généralement, plus la particule polymère est grande, plus la libération de la SA est lente⁴⁸. De plus, dans le cas des capsules, une augmentation de l'épaisseur de l'écorce polymère et une diminution de sa porosité peuvent également retarder la libération de la SA⁴⁹.

^j Solubilité maximale du soluté dans le milieu environnant.

⁵⁰. Cette épaisseur peut être modulée par la quantité du polymère utilisée dans la formulation initiale, tandis que la porosité peut être influencée par exemple en ajustant la vitesse de l'évaporation du solvant volatil lors du procédé d'émulsion-évaporation de solvant ou par une réticulation du polymère constituant l'écorce.

Le coefficient de partage de la SA très en faveur du cœur huileux par rapport au milieu environnant peut également ralentir sa libération^{50, 51}. Le milieu extérieur peut être la force motrice permettant la libération de la SA mais aussi un paramètre la limitant quand la SA y atteint sa concentration de saturation. C'est pourquoi, afin d'éliminer son influence, les cinétiques de libération sont généralement réalisées dans des conditions appelées « sink ». Ces conditions correspondent à un milieu extérieur infiniment dilué, de sorte que la concentration en SA dans le milieu extérieur soit toujours largement inférieure à sa saturation ($\leq 20\text{-}30\%$ de sa solubilité maximale ou $\leq 10\%$ pour « perfect sink »). Ceci correspond d'ailleurs à une libération dans des conditions où un milieu extérieur est en permanence renouvelé (exemples d'une application environnementale avec une introduction dans un cours d'eau ou d'une application biomédicale avec une injection intraveineuse dans le milieu physiologique).

I.3. Modélisation de la cinétique de libération

Selon la géométrie de l'objet encapsulant la SA, plusieurs modèles de cinétique de libération de cette dernière peuvent être établis. Cependant, dans ces travaux de thèse, nous nous intéresserons préférentiellement aux modèles de géométrie sphérique pour deux types des objets : capsules à cœur liquide et sphères (particules matricielles).

Lorsque la diffusion de la SA à travers l'écorce polymère (cas de capsules) ou la matrice (cas de sphères) est le phénomène limitant, la loi de Fick (Equation 21) est la plus souvent utilisée. Cette loi décrit le mécanisme de diffusion et de transport d'un soluté à travers un réseau polymère. En dérivant la première loi de Fick, on obtient la seconde loi de Fick (Equation 22) dont la solution donne le profil de concentration de la SA en fonction du temps (t) et des ordonnées spatiales (x, y, z).

$$F = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad [21]$$

avec : F – flux de la SA par unité de surface [$\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$],

c – concentration de la SA diffusant [mol/m^3],

D – coefficient de diffusion de la SA dans le polymère [m^2/s].

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \quad [22]$$

Il est cependant possible de trouver des modèles mathématiques plus simples⁵². Si on considère que la diffusion de la SA est l'étape cinétiquement déterminante (par rapport aux autres phénomènes tels que dissolution ou dégradation), des hypothèses suivantes peuvent être posées :

- Intégrité de l'écorce polymère tout au long de la cinétique (absence de trous, ruptures ou déformations qui entraîneraient la fuite de la SA).
- Concentration constante en SA à l'extérieur des NCs et proche de zéro (valable notamment dans les conditions « sink »).
- Coefficient de diffusion D constant.
- Résistance au transfert massique au niveau de la couche de liquide du milieu de libération négligeable.

Compte-tenu de ces hypothèses, différents profils de libération de la SA à partir des particules sphériques peuvent être obtenus (Figure II.30)⁴⁷.

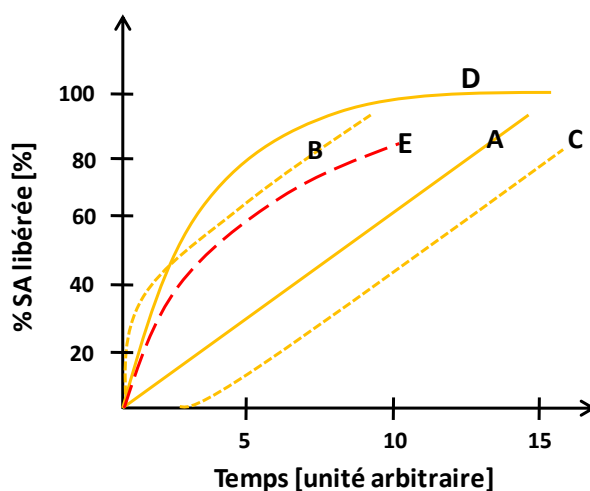


Figure II.30. Représentation des différents profils de libération de la SA à partir des particules polymères : capsules (A-D), sphères (E) (Image inspirée de référence ⁴⁷)

A partir de capsules polymères on peut obtenir des cinétiques d'ordre 0 (profil A), d'ordre 0 modifié (profil B et C) ou encore d'ordre 1 (profil D). La cinétique d'ordre 0 (profil A) correspond à une vitesse de libération de la SA constante au cours du temps (voir cas 1, ci-dessous). Ainsi, cette cinétique reflète une libération progressive et idéalement contrôlée.

Dans le cas de cinétique d'ordre 1 (profil D) (voir cas 2, ci-dessous), la vitesse de libération dépend fortement de la concentration en SA à un instant t . Le profil B correspond à une cinétique accélérée en début de libération par rapport à la cinétique A d'ordre 0, appelée effet « burst ». Ceci peut notamment provenir de la présence de la SA dans l'écorce. Au contraire, le profil C présente une cinétique ralentie au début par rapport au profil A. Ceci peut être par exemple lié à une SA présente à l'état solide dans l'écorce polymère ou dans le cœur. Dans ce cas, le temps de latence au début de la cinétique correspond au temps nécessaire pour dissoudre la SA et pour qu'elle diffuse à travers la membrane avant de se libérer dans le milieu environnant.

Cas de capsules

Cas 1 (profil A, Figure II.30) : La concentration en SA à l'intérieur de la capsule reste constante. Cela est vrai lorsque la saturation de l'huile en SA est maintenue. Lorsque la concentration de la SA décroît, le cas 2 (ci-dessous) s'applique. Pour une géométrie sphérique, la cinétique de libération est d'ordre 0. La masse de la SA libérée à temps t peut se modéliser selon l'Equation 23.

$$M_t = \frac{4\pi DK C_s r_o r_i}{r_o - r_i} \cdot t \quad [23]$$

avec: M_t – quantité de la SA libérée à temps t [g],

r_o, r_i – rayons externe et interne de la capsule [m] (voir Figure II.31a),

C_s – solubilité de la SA dans le cœur de la capsule [g/m³],

$r_o - r_i$ – épaisseur de l'écorce polymère de la capsule [m],

D – coefficient de diffusion de la SA à travers l'écorce polymère [m²/s],

K – coefficient de partage de la SA entre le polymère constituant l'écorce de la capsule et l'huile constituant son cœur,

t – temps [s].

Cas 2 (profil B, Figure II.30) : La concentration en SA à l'intérieur de la capsule varie au cours du temps. Dans ce cas, la cinétique globale est d'ordre 1. La diminution de la concentration de la SA dans le cœur est exponentielle au cours du temps (Equation 24).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp\left(-\frac{3 r_o D K t}{r_i^2 (r_o - r_i)}\right) \quad [24]$$

avec: M_t , M_∞ – quantité de la SA libérée à temps t et quantité totale encapsulée, respectivement [g].

r_o , r_i – rayons externe et interne de la capsule [m] (voir Figure II.31a),

D – coefficient de diffusion de la SA à travers l'écorce polymère [m^2/s],

K – coefficient de partage de la SA entre le polymère constituant l'écorce de la capsule et l'huile constituant son cœur,

t – temps [s].

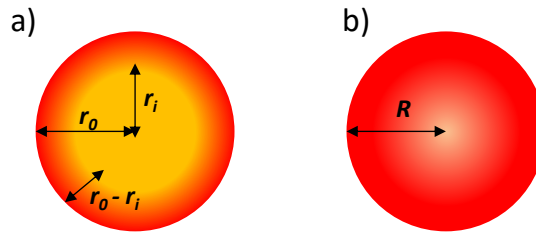


Figure II.31. Représentation de morphologies différentes des objets : a) capsule, b) sphère

Cas de sphères

L'équation 25 peut être utilisée afin de modéliser la cinétique de libération de la SA à partir des sphères polymères si on se limite à la période de libération pendant laquelle la quantité de SA libérée est $\leq$ à 90%.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 6 \left(\frac{Dt}{\pi R^2} \right)^{1/2} - 3 \frac{Dt}{R^2} \quad [25]$$

avec: M_t , M_∞ – quantité de la SA libérée à temps t et quantité totale encapsulée, respectivement [g],

D – coefficient de diffusion de la SA à travers l'écorce polymère [m^2/s],

R – rayon de la sphère [m] (voir Figure II.31b),

t – temps [s].

I.4. SA modèle choisie

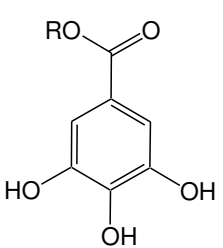
Dans le cadre du projet BioCapTech dans lequel cette thèse s'inscrit, le pouvoir algicide/algistatique de plusieurs SA a été testé. Plus particulièrement, divers esters de l'acide

gallique ont été envisagés (Tableau II.18). Ces esters varient par la longueur de la chaîne de l'alcool utilisé lors de leur préparation.

Au cours de cette thèse, le gallate d'octyle (OG) a été choisi comme substance active modèle à encapsuler à l'intérieur de nos NCs. En effet, des études menées dans un des laboratoires partenaires du projet (Laboratoire FP Environnement situé à Merten en Lorraine) ont démontré le pouvoir algistatique de l'OG sur un type d'algues donné (détails confidentiels) au bout de 24h et à faible concentration dans l'eau. De plus, un effet algicide à 100% a été observé après 24h à forte concentration en OG.

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'en plus de ces propriétés algicide/algistatique, l'OG possède également des propriétés antioxydantes. C'est pourquoi, il est aussi couramment utilisé dans les formulations cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires. Il est aussi répertorié comme additif alimentaire sous le nom de E311⁵³.

Tableau II.18. Acide gallique et ses esters

Formule générale	R	Nom de la substance
	H	Acide gallique
	CH ₂ CH ₃	Gallate d'éthyle
	CH ₂ CH ₂ CH ₃	Gallate de propyle
	(CH ₂) ₇ CH ₃	Gallate d'octyle
	(CH ₂) ₁₁ CH ₃	Gallate de lauryle

II. RESULTATS

II.1. Solubilité de l'OG dans la formulation et dans les NCs

L'objectif était de solubiliser l'OG à l'intérieur des NCs. C'est pourquoi, afin d'évaluer la quantité de l'OG à employer dans les essais d'encapsulation, il a été nécessaire de déterminer au préalable sa quantité globalement dans la formulation initiale mais aussi dans les NCs finales.

Afin d'évaluer la quantité d'OG globalement soluble dans les NCs, il faut tenir compte de sa quantité maximale soluble dans le cœur huileux M810. Cette dernière a été évaluée à 46 mg_{OG}/mL_{M810} (voir Partie III, p. 208). L'OG est également miscible à l'écorce PLA jusqu'à

50% massique. Cette miscibilité maximale a été déterminée par des analyses MDSC des mélanges PLA/OG en proportions variables (voir Partie III, p. 214). Ainsi, l'OG peut être dissous à la fois dans le cœur M810, mais peut également se solubiliser dans l'écorce PLA. Il faut donc tenir compte de ces deux contributions pour préparer nos formulations initiales (Tableau II.19). Notons que pour chaque expérience, la phase organique est de volume constant et contient 0,1 mL de M810, 0,9 mL de solvant volatil et 25 mg de PLA. Ainsi, en plus des 4,6 mg d'OG solubilisés dans le cœur M810, jusqu'à 25 mg d'OG pourrait être dissous dans le PLA (Tableau II.19).

Tableau II.19. Quantités d'OG potentiellement possibles à encapsuler dans les NCs et expériences à réaliser selon le solvant organique volatil choisi. La masse de PLA utilisée dans la formulation est constante et égale à 25 mg. Le volume de la phase organique est constant et égal à 1 mL (soit 0,9 mL CH₂Cl₂ et 0,1 mL M810)

Quantité d'OG dans l'écorce		Quantité d'OG dissoute dans M810 ^(b)	Masse totale OG dans la formulation [mg] ^(c)	Solvant volatil	
Rapport PLA/OG (m/m)	mg OG/25 mg PLA ^(a)			CH ₂ Cl ₂	AcOEt
100/0	0	4,6	4,6	+	+
80/20	6,3		10,9	+/-	+
70/30	10,7		15,3	-	+
50/50	25		29,6	-	+

(a) Correspond à la quantité de l'OG miscible dans l'écorce des NCs en tenant compte de la colonne précédente.

(b) Correspond à la quantité de l'OG soluble dans le volume de M810 utilisé dans la formulation initiale d'élaboration de NCs.

(c) Correspond à la totalité d'OG possible à dissoudre dans les NCs (4,6 mg dans le cœur M810 + la quantité miscible dans l'écorce PLA).

Cependant, comme nous voulions encapsuler la plus grande quantité possible de l'OG dans les NCs, mais en le gardant toujours soluble, nous avons décidé d'utiliser des concentrations de l'OG supérieures à sa solubilité dans le cœur M810. Malheureusement, toutes ces expériences ne sont pas réalisables en pratique car il faut aussi tenir compte de la solubilité de l'OG dans la phase organique initiale. Celle-ci dépend du solvant volatil employé. Ainsi, l'emploi de CH₂Cl₂ utilisé jusqu'à présent comme solvant volatil permet de solubiliser seulement 10 mg d'OG par 1 mL de la phase organique initiale. C'est pourquoi, nous avons également testé un autre solvant – l'acétate d'éthyle (AcOEt). En effet, dans ce

dernier cas, plus de 160 mg d'OG pouvaient être dissous par 1 mL de la phase organique initiale, ce qui est bien supérieur au cas du CH₂Cl₂.

Pour conclure, cette analyse montre que le CH₂Cl₂ n'est pas le solvant volatil le plus approprié pour préparer des NCs contenant de l'OG en quantité suffisante à cause de sa faible capacité à solubiliser la SA. Au contraire, l'utilisation de l'AcOEt comme solvant volatil permettra d'augmenter la quantité de l'OG utilisable dans nos formulations. C'est pourquoi pour la suite de nos essais d'encapsulation, nous avons choisi d'employer l'AcOEt comme solvant volatil dans la phase organique, même si toute la première partie de ce manuscrit a décrit des NPs réalisées en employant le CH₂Cl₂ comme solvant volatil.

II.2. Encapsulation de l'OG

Le protocole de préparation des NCs contenant de l'OG à l'intérieur est similaire à celui utilisé pour la préparation de NCs sans SA mis à part que le CH₂Cl₂ a été remplacé par l'AcOEt. Des quantités variables d'OG (de 0 à 25 mg) ont été solubilisées avec le PLA dans la phase organique. La distribution de taille des NCs ainsi obtenues a été tout d'abord déterminée par analyse de leurs suspensions par granulométrie laser. Ensuite, l'analyse RMN ¹H des NCs lyophilisées a permis d'évaluer les quantités de l'OG et de M810 encapsulées à l'intérieur des NCs mais aussi l'efficacité de couplage « click » et le taux de recouvrement en dextrane (Γ_{exp}).

II.2.1. Distribution de taille des NCs

La Figure II.32 présente la comparaison des distributions de tailles après lavages de NCs préparées avec différentes quantités d'OG initialement ajoutées à la formulation (de 0 à 15 mg OG). Leur diamètre moyen en surface ($d[3:2]$) augmente notablement avec la quantité d'OG introduit dans la phase organique initiale. Ainsi, le lot des NCs préparé sans OG (NC_{A0}) présente le diamètre $d[3:2]$ plus faible (126 nm) tandis que le $d[3:2]$ des objets NC_{A1} et NC_{A2}, obtenus avec 10 et 15 mg d'OG, respectivement, est plus élevé (172 et 204 nm, respectivement). Ceci peut être dû à la redispersion de ces NCs qui n'est pas optimale entre les étapes de lavages. Néanmoins, il faut noter que l'on n'observe pas l'apparition d'agrégats de tailles microniques lors de ces étapes.

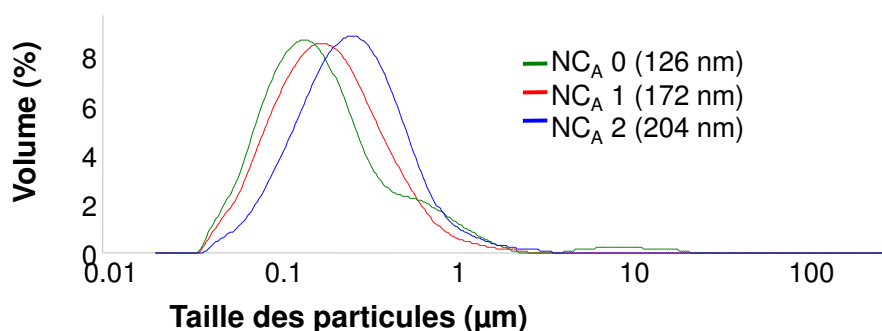


Figure II.32. Comparaison des distributions de tailles des NCs lavées et préparées avec des quantités variables de l'OG (de 0 à 15 mg) dans la phase organique initiale (0,1 mL M810 + 0,9 mL AcOEt) et en réalisant une réaction CuAAC *in situ*. DexN₃-23 est utilisé comme stabilisant. Les diamètres entre parenthèses correspondent aux d[3:2]

Notons ici que les NCs formulées avec de l'AcOEt et sans OG (NCA0) présentent un diamètre ($d[3:2] = 126$ nm) légèrement plus faible que celles obtenues en employant le CH₂Cl₂ dans les mêmes conditions ($d[3:2] = 151$ nm, voir Tableau II.12 du Chapitre III, p. 140).

II.2.2. Efficacité d'encapsulation de la SA

Les NCs lyophilisées ont été dissoutes dans le DMSO-*d*₆, puis caractérisées par RMN ¹H (Figure II.33). L'ajout de deux gouttes de D₂O dans le tube est cependant nécessaire pour améliorer la précision d'un pic de référence de l'OG (pic *r* vers 6,9 ppm) utilisé pour évaluer la quantité de l'OG dans l'échantillon (grâce aux Equations 26 ou 27). Ceci permet la disparition des protons labiles tels que ceux dans les fonctions –OH des unités glucopyranose (entre 4,3 et 5 ppm) (voir Partie III, Figure III.7, p. 206 pour la comparaison des spectres sans et avec D₂O). L'efficacité d'encapsulation de l'OG (EE) à l'intérieur de NCs peut quant à elle être donc calculée grâce à l'Equation 28.

$$mg\ OG/25\ mg\ PLA = \frac{A_r/2 \cdot M_{OG} \cdot m_{PLA}}{A_c \cdot M_{u.r.PLA}} \quad [26]$$

$$mg\ OG/g\ objets = \frac{A_r/2 \cdot M_{OG} \cdot m_{PLA}}{A_c \cdot M_{u.r.PLA} \cdot (m_{PLA} + m_{M810})} \cdot 1000 \quad [27]$$

avec : A_r – aire du pic des protons aromatiques –CH de l'OG situé vers 6,9 ppm,

A_c – aire de pic des protons méthine du PLA situé vers 5,2 ppm. Cette aire est obtenue à partir de l'aire totale du pic vers 5,2 ppm qui correspond aux protons *c* et aux protons *n* du M810. La contribution de ces derniers est estimée grâce à l'aire des

protons *m*, *o* du M810 qui résonnent entre 4,0 et 4,3 ppm. Or les protons *s* de l'OG présentent un déplacement chimique dans cette même zone. Aussi, l'aire A_{m+o+s} est elle-même corrigée en tenant compte des protons *s*, d'où : $A_c = A_{c+n} - \left(\frac{A_{m+o+s} - A_r}{4} \right)$,

M_{OG} – masse molaire de l'OG (282 g/mol),

$M_{u,r,PLA}$ – masse molaire d'une unité de répétition du PLA (72 g/mol),

m_{PLA} – masse du PLA dans l'échantillon (0,025 g).

$$EE(\%) = \frac{m_{OG\ finale}}{m_{OG\ initiale}} * 100 \quad [28]$$

avec : $m_{OG\ initiale}$ – masse d'OG initialement introduite,

$m_{OG\ finale}$ – masse d'OG encapsulée dans les nano-objets évaluée par RMN 1H et à l'aide de l'Equation 26.

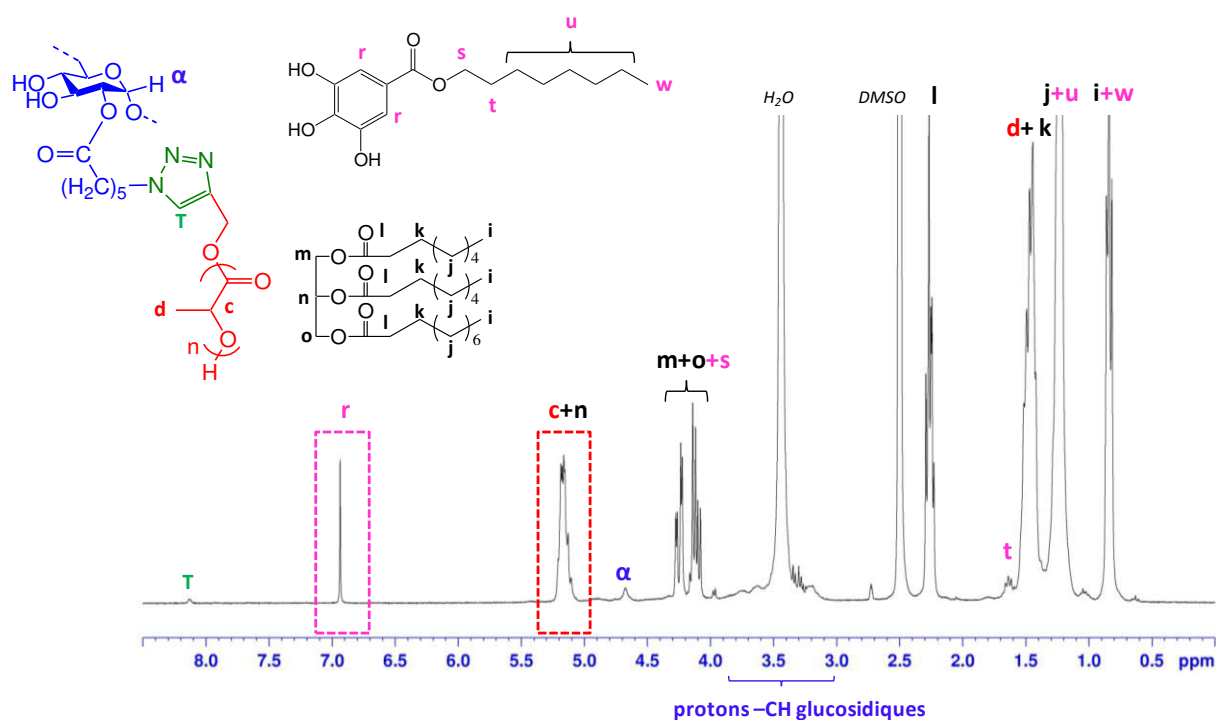


Figure II.33. Exemple d'un spectre RMN 1H (DMSO- d_6 + 2 gouttes D_2O) des NCs PLA/OG

Cette analyse RMN 1H permet également d'estimer l'efficacité de la réaction « click » CuAAC, la quantité de M810 encapsulée et le taux de recouvrement (Γ_{exp}) des NCs en dextrane (Tableau II.20).

Tableau II.20. Résultats d'encapsulation de l'OG dans les NCs préparées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant avec une réaction « click » CuAAC (catalyseur CuSO₄/AAsc, pour plus de détails voir Chapitre II, Tableau II.6, p. 116, échantillon NC3). Les expériences ont été effectuées au moins deux fois ($n \geq 2$), sauf NC3

N°	Masse OG initiale [mg]	Masse OG encapsulée [mg/g objets] ^(a)	EE [%] ^(b)	Masse M810 [mg/g objets] ^(c)	Γ_{exp} [mg/m ² objets] ^(d)	Diamètre d[3:2] [nm] ^(e)	% click ^(f)
NC _{CH₂Cl₂}	0	—	—	769±9	4,2±0,5	151±10	69±4
NC _{A0}	0	—	—	756±19	2,0±0,1	126±11	79±1
NC _{A1}	10	63±13	64±11	757±10	2,8±0,3	172±20	73±1
NC _{A2}	15	149±1	71±5	649±20	4,0±0,2	213±10	81±2
NC _{A3}	25	208	63	672	n.d.	n.d.	85

(a) Obtenue par RMN ¹H (DMSO-d₆ + D₂O) (voir exemple Figure II.33) et calculée à l'aide de l'Eq. 27, p.174.

(b) Efficacité d'encapsulation calculée à l'aide de l'Eq.28, p.175.

(c) Calculée à l'aide de l'Eq. 8 (Partie III, p. 207).

(d) Taux de recouvrement en dextrane calculé à l'aide de l'Eq. 10 (Partie III, p. 208).

(e) Diamètre moyen en surface déterminé par granulométrie laser.

(f) Obtenue par RMN ¹H (dans DMSO-d₆ + 2 gouttes D₂O; sauf NC CH₂Cl₂ – dans le DMSO-d₆ seul) et à l'aide de l'Eq.10 (Chapitre II, p. 113).

L'efficacité d'encapsulation (EE) de l'OG à l'intérieur de NCs se situe généralement entre 60 et 70 % quelle que soit la masse d'OG employée initialement (NC_{A1}, NC_{A2} et NC_{A3}, Tableau II.20). Ainsi, la quantité de l'OG encapsulée dans les NCs finales peut être augmentée en introduisant plus d'OG dans la formulation initiale : de 63 mg/g de NCs (NC_{A1}) jusqu'à 208 mg d'OG/g de NCs (NC_{A3}). De plus, comme cette quantité d'OG encapsulée est supérieure à la solubilité de l'OG dans le M810 (46 mg_{OG}/mL M810, voir Paragraphe II.1., p. 171), on peut supposer que l'OG est réparti dans le cœur huileux mais aussi dans l'écorce des NCs dans tous les cas (NC_{A1}, NC_{A2} et NC_{A3}).

Cependant, on note une diminution de la quantité du M810 contenues dans les NCs lorsque la quantité d'OG augmente nettement (NC_{A2} et NC_{A3}) bien que toutes ces expériences aient été réalisées avec la même quantité de M810 dans la formulation initiale. Ces résultats sont en accord avec les observations visuelles réalisées lors de la préparation de ces NCs : les surnageants récupérés lors des lavages étaient plus troubles dans le cas de NC2

et NC3. Ceci n'était pas le cas en l'absence d'OG (NC_{A0}) ou lorsqu'il a été utilisé en faible quantité (NC_{A1}).

On peut également remarquer que le taux de recouvrement en dextrane (Γ_{exp}) des NCs préparées en utilisant l'AcOEt comme solvant volatil (en l'absence d'OG) est inférieur au Γ_{exp} des NCs élaborées avec du CH₂Cl₂ (NC_{A0} *versus* NC_{CH₂Cl₂}). Ces résultats indiquent que les propriétés des NCs sont fortement liées à la composition initiale de la formulation et notamment aux propriétés du solvant volatil choisi dans la phase organique.

Enfin, l'efficacité de la réaction « click » (% click) pour tous les NCs préparées reste élevée (~70 – 80%) et ne semble pas être influencée par la présence de l'OG dans la formulation.

II.2.3. Cinétiques de libération de la SA

Pour évaluer la cinétique de libération de l'OG à partir des NCs (réalisée à température ambiante), le lot NC_{A1} (voir Tableau II.20) préparé avec 10 mg de l'OG introduits initialement a été choisi à titre d'exemple. En plus de ces NCs et afin de pouvoir observer l'influence de la morphologie des objets sur la cinétique de libération, nous avons également préparé des NSs. Afin de limiter l'influence de la concentration de la SA à l'intérieur des objets sur sa cinétique de libération, ces NSs ont été élaborées avec une quantité de l'OG encapsulée par g d'objets équivalente à celle dans l'échantillon NC_{A1}. Les caractéristiques de toutes ces NPs sont présentées dans le Tableau II.21.

Tableau II.21. Caractéristiques des NPs utilisées dans les expériences d'évaluation des cinétiques de libération de l'OG. Les expériences ont été effectuées deux fois (n = 2)

N°	Type d'objets	Masse OG initiale [mg]	Masse OG encapsulée [mg/g objets] ^(a)	EE [%] ^(b)	Diamètre d[3:2] [nm] ^(c)
NC _{A1}	Nanocapsules	10	63±13	64±11	172±20
NS	Nanosphères	3,7	71±8	48±5	112±3

(a) Obtenue par RMN ¹H (DMSO-d₆ + D₂O) (voir exemple Figure II.33) et calculée à l'aide de l'Eq. 27, p. 174.

(b) Efficacité d'encapsulation calculée à l'aide de l'Eq.28, p. 175.

(c) Diamètre moyen en surface déterminé par granulométrie laser.

Afin de suivre les cinétiques de libération de l'OG à partir de ces NPs, des boudins de dialyse ont été utilisés et placés dans un grand volume d'eau (voir Partie III, p. 215). Cette

méthode implique la diffusion de la SA à partir des NPs vers le milieu extérieur (l'eau dans notre cas) à travers la membrane de dialyse. Cette dernière assure une séparation entre la SA libérée et celle encore présente à l'intérieur des NPs. Comme indiqué précédemment (p. 167), afin d'assurer que le milieu environnant ne soit pas limitant pour la diffusion de la SA, il a été nécessaire de travailler dans des conditions « sink » (dans notre cas $\leq 20\%$ de saturation du milieu extérieur en SA).

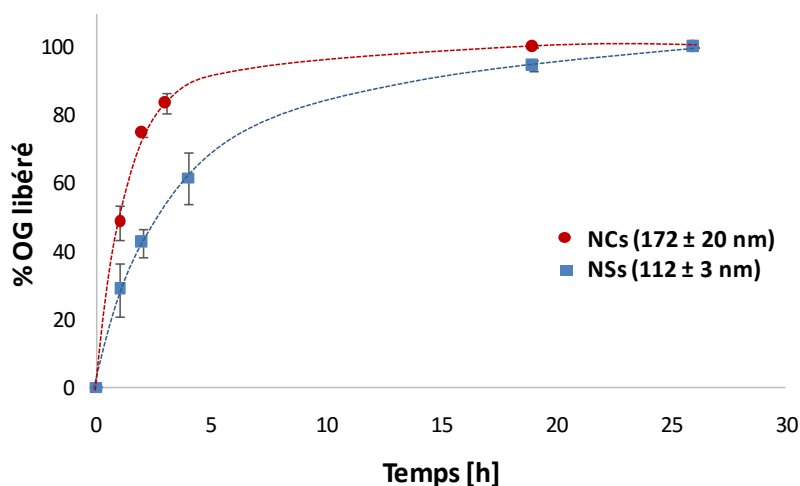


Figure II.34. Cinétiques de libération de l'OG à partir des NCs et NSs préparées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » CuAAC ($n = 2$). Le %OG libéré a été calculé selon l'équation suivante : $\%OG \text{ libéré} = \frac{m_{OG}^0 - m_{OG}^t}{m_{OG}^0} \cdot 100$ où m_{OG}^0, m_{OG}^t correspondent aux masses d'OG à temps initial et à temps t calculées grâce à l'Eq. 26, p. 174. Diamètres entre parenthèses correspondent aux d[3:2]

On note que tout l'OG encapsulé à l'intérieur des NCs ou des NSs est libéré au bout de 20h et 26h, respectivement (Figure II.34). Cependant, la cinétique de libération de l'OG est différente pour les deux types d'objets. La libération est plus rapide à partir des NCs qu'à partir des NSs, malgré leur diamètre plus important (172 nm pour NCs et 112 nm pour NSs). Ceci provient vraisemblablement de morphologie différente de ces objets. Ainsi, en admettant que la diffusion de la SA dans le polymère soit le facteur limitant la libération de la SA, la plus faible épaisseur de polymère à traverser dans les cas des NCs explique la cinétique plus rapide. Effectivement, dans notre cas l'épaisseur de l'écorce polymère dans les NCs, qui a pu être évaluée à partir des rayons externe (r_o) et interne (r_i) de la nanocapsule, est beaucoup plus faible (~ 5 nm) que le rayon (R) de la nanosphère (~ 56 nm). r_o et R sont égaux aux $d[3:2]/2$ pour les NCs et NSs, respectivement, tandis que le r_i est estimé en tenant compte du volume

d'huile encapsulée (voir Partie III, Eq. 15, p. 216). Ainsi, le système de type réservoir (NCs) facilite la libération de la SA.

Nous avons ensuite appliqué les modèles de libération de la SA à partir de NCs et NSs présentés dans le Paragraphe I.3., p. 167 afin de pouvoir estimer les coefficients de diffusion (D) de l'OG à travers l'écorce ou la matrice PLA (Tableau II.22). Dans le cas des NSs, connaissant leur rayon, on peut évaluer la valeur D comme variable ajustable de l'Equation 25 (p. 169) en ne corrélant que les premiers points pour lesquels le % OG libéré reste inférieur à 90%. Cependant, dans le cas des NCs, la modélisation des cinétiques de libération par l'Equation 24 (p. 170) ne nous permet d'évaluer que le produit $K \times D$ où K est le coefficient de partage de la SA entre le polymère et l'huile. Il faut signaler que nous ne connaissons pas ce coefficient K pour notre système SA/polymère/huile. Cependant, nous avons approximé la valeur de K à $\sim 10^{-3}$ à partir des valeurs que nous avons trouvées pour d'autres systèmes SA/polymère/huile (Tableau II.23). Ceci nous a permis de proposer une estimation de la valeur D pour nos NCs (Tableau II.22).

Tableau II.22. Résultats de détermination de coefficients de diffusion (D) de l'OG dans les NCs et NSs.
n.a. = non-applicable

N°	Type d'objets	$K \times D$ [m^2/s] ^(a)	D [m^2/s] ^(b)
NC _{A2}	Nanocapsules	$2,0 \times 10^{-20}$	$\sim 2,0 \times 10^{-17}$
NS	Nanosphères	<i>n.a.</i>	$1,3 \times 10^{-20}$

(a) Calculé par l'Eq. 24, p. 170.

(b) Pour NSs calculé par l'Eq. 25, p. 170 ; pour NCs $D = \frac{DK}{K^*}$ avec : K^* - ordre de grandeur du coefficient de partage de la SA entre le polymère et l'huile égal à 10^{-3} (selon le Tableau II.23).

Tableau II.23. Coefficient de partage du 4-nitroanisole entre le polystyrène et différents huiles⁵⁰

Huile du cœur	Hexadécane	Diéther de <i>n</i> -butyle	Isovalérate d'éthyle	4-heptanone
K	$5,2 \times 10^{-3}$	$4,4 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$9,6 \times 10^{-3}$

Le coefficient de diffusion (D) de l'OG dans la matrice PLA dans le cas de NSs est de l'ordre de $10^{-20} m^2/s$. Cette valeur est similaire à celle évaluée précédemment au LCPM pour des NSs de PLA encapsulant une autre SA (la lidocaïne)⁵⁴. Cependant, notre estimation de D pour nos NCs est trois ordres de grandeur supérieure à celui des NSs ($10^{-17} m^2/s$). Ceci semble indiquer que l'OG diffuse plus rapidement dans l'écorce des NCs que dans la matrice des

NSs. Des résultats similaires ont été obtenus par Nordstierna *et al.*⁵⁵. Dans leurs travaux, les valeurs de D étaient également supérieures dans le cas des microcapsules PMMA ($\sim 10^{-19}$ m²/s) par rapport à des microsphères PMMA ($\sim 10^{-20}$ m²/s). L'hypothèse émise par ces auteurs était que le choix d'une huile (hexadécane) plastifiant le polymère (PMMA) permet d'accélérer la libération de la SA (4-nitroanisole) en augmentant la flexibilité des chaînes polymères et en rendant l'écorce plus poreuse par rapport à des sphères obtenues sans huile.

Dans notre cas, compte-tenu du fait que le D devrait être constant pour un système SA/polymère donné, nos résultats semblent indiquer que l'écorce PLA dans les NCs a également été modifiée par rapport aux NSs. Il est possible que cette modification soit due, comme dans le cas cité ci-dessus, à la plastification du polymère par l'huile. Nous avons effectivement montré précédemment (Chapitre III, Paragraphe IV.1., p. 155) par des analyses de miscibilité par MDSC que le PLA est plastifié par 3% m de M810 dans son mélange physique. Il est également possible que la variation de D observée pour les NCs et les NSs soit due à un autre phénomène entraînant des différences dans la morphologie de la matrice PLA dans ces deux cas.

III. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Nous avons réussi à encapsuler une SA algicide/algistatique modèle – le gallate d'octyle (OG) au sein de NCs. Ces dernières ont été préparées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » CuAAC en utilisant le système catalytique CuSO₄/AAsc.

Afin d'augmenter la solubilité de la SA dans la phase organique initiale, nous avons étudié dans un premier temps la solubilité de la SA dans la formulation et à l'intérieur des NCs. Le dichlorométhane (CH₂Cl₂) utilisé jusqu'à présent comme solvant volatil s'est avérée peu pertinent, aussi il a été remplacé par l'acétate d'éthyle (AcOEt) qui est un meilleur solvant de l'OG.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé diverses formulations en solubilisant différentes quantités de la SA dans la phase organique initiale afin de varier la quantité encapsulée à l'intérieur de NCs. Nous avons ainsi observé que le diamètre moyen $d[3:2]$ de NCs augmente avec la quantité d'OG initialement utilisée. L'efficacité d'encapsulation est de l'ordre de 60 – 70% indépendamment de la quantité d'OG utilisée initialement. La quantité de

l'OG chargée dans les NCs est supérieure à sa solubilité dans le cœur M810 ce qui suggère que la SA doit alors être répartie entre le cœur huileux et l'écorce des NCs. Ainsi, nous avons pu encapsuler jusqu'à 208 mg d'OG/g de NCs. En outre, l'efficacité de la réaction « click » pour tous les NCs préparées est élevée (~70 – 80%) et ne semble pas être influencée par la présence de l'OG dans la formulation.

Finalement, nous avons suivi la libération de l'OG à partir de ces NCs. Pour comparaison, des NSs clickées ont été également préparées avec une quantité de l'OG encapsulée par g d'objets équivalente à celle dans les échantillons de NCs étudiées. Nous avons observé la libération totale de l'OG au bout de 20h et 26h pour des NCs et NSs, respectivement. De plus, nous avons observé une cinétique de libération de l'OG plus rapide à partir de NCs qu'à partir de NSs malgré leur diamètre plus important. Ces résultats ont montré l'influence de la morphologie (cœur huileux/écorce polymère ou matrice polymère) des nano-objets sur la vitesse de libération de la SA. En utilisant les modèles théoriques de libération d'une SA à partir des objets polymères, nous avons pu estimer les coefficients de diffusion (D) de l'OG dans l'écorce PLA des NCs et dans la matrice PLA des NSs. Le D estimé pour des NCs est de trois ordres de grandeur supérieur à celui obtenu pour des NSs. Ceci témoigne d'une modification de l'écorce PLA des NCs qui est certainement liée à la plastification du PLA par l'huile constituant le cœur (M810).

IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chemical Reviews* **2008**, 108, (8), 2952-3015.
2. Laville, M.; Babin, J.; Londono, I.; Legros, M.; Nouvel, C.; Durand, A.; Vanderesse, R.; Leonard, M.; Six, J.-L., Polysaccharide-covered nanoparticles with improved shell stability using click-chemistry strategies. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 93, (2), 537-546.
3. Laville, M. Nanoparticules polymères de deuxième et troisième générations pour des applications thérapeutiques anti-cancer et anti-HIV. Université de Lorraine, Nancy, 2013.
4. Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, 49, (9), 1540-1573.
5. Kricheldorf, H. R.; KreiserSaunders, I., Polylactides - Synthesis, characterization and medical application. *Macromolecular Symposia* **1996**, 103, 85-102.
6. Nouvel, C.; Dubois, P.; Dellacherie, E.; Six, J.-L., Controlled synthesis of amphiphilic biodegradable polylactide-grafted dextran copolymers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, 42, (11), 2577-2588.

7. Chognot, D.; Six, J. L.; Leonard, M.; Bonneaux, F.; Vigneron, C.; Dellacherie, E., Physicochemical evaluation of PLA nanoparticles stabilized by water-soluble MPEO-PLA block copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, 268, (2), 441-447.
8. Duval, C.; Nouvel, C.; Six, J. L., Is Bismuth Subsalicylate an Effective Nontoxic Catalyst for PLGA Synthesis? *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2014**, 52, (8), 1130-1138.
9. Leenslag, J. W.; Pennings, A. J., Synthesis of High-Molecular-Weight Poly(L-Lactide) Initiated with Tin 2-Ethylhexanoate. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1987**, 188, (8), 1809-1814.
10. Duda, A.; Penczek, S., Thermodynamics of L-Lactide Polymerization - Equilibrium Monomer Concentration. *Macromolecules* **1990**, 23, (6), 1636-1639.
11. Sourkahi, B. K.; Cunningham, A.; Zhang, Q.; Oh, J. K., Biodegradable Block Copolymer Micelles with Thiol-Responsive Sheddable Coronas. *Biomacromolecules* **2011**, 12, (10), 3819-3825.
12. Duval, C. Elaboration de copolymères biorésorbables pour endoprothèse. INPL, Nancy, 2011.
13. Cleland, W. W., Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry* **1964**, 3, (4), 480-482.
14. Cai, T.; Li, M.; Neoh, K.-G.; Kang, E.-T., Preparation of stimuli responsive polycaprolactone membranes of controllable porous morphology via combined atom transfer radical polymerization, ring-opening polymerization and thiol-yne click chemistry. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22, (32), 16248-16258.
15. Khalikova, E.; Susi, P.; Korpela, T., Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2005**, 69, (2), 306-325.
16. Monsan, P.; Bozonnet, S.; Albenne, C.; Joucla, G.; Willemot, R.-M.; Remaud-Simeon, M., Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **2001**, 11, (9), 675-685.
17. 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* **2003**, 32, (2), 125-135.
18. Dupayage, L. Elaboration contrôlée de glycopolymères amphiphiles à partir de polysaccharide: synthèse de Dextrane-g-PMMA par polymérisation radicalaire par transfert d'atome. INPL, Nancy, 2009.
19. Dupayage, L.; Save, M.; Dellacherie, E.; Nouvel, C.; Six, J. L., PMMA-Grafted Dextran Glycopolymers by Atom Transfer Radical Polymerization. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2008**, 46, (23), 7606-7620.
20. Soliman, S. M. A. From photosensitive glycopolymers to smart drug delivery systems. Université de Lorraine, Nancy, 2014.
21. Rotureau, E.; Leonard, M.; Dellacherie, E.; Durand, A., Amphiphilic derivatives of dextran: Adsorption at air/water and oil/water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, 279, (1), 68-77.
22. Rouzes, C.; Durand, A.; Leonard, M.; Dellacherie, E., Surface activity and emulsification properties of hydrophobically modified dextrans. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, 253, (1), 217-223.
23. Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H., Cu-I-catalyzed alkyne-azide "click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, (1), 51-68.
24. Sun, J. P.; Hu, J. W.; Liu, G. J.; Xiao, D. S.; He, G. P.; Lu, R. F., Efficient Synthesis of Well-Defined Amphiphilic Cylindrical Brushes Polymer with High Grafting Density: Interfacial "Click" Chemistry Approach. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2011**, 49, (5), 1282-1288.
25. Kai, S.; Ashaduzzaman, M.; Uemura, S.; Kunitake, M., Composite Polymer Materials Consisting of Nanofilms Formed by Click Reaction between Polymers at an Oil-Water Interface. *Chemistry Letters* **2011**, 40, (3), 270-272.
26. Md. Ashaduzzaman; Shuhei Kai; Kunitake, M., Investigation of Click Reaction at an Oil-Water Interface Using Hydrophobic and Hydrophilic Polymers. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy* **2013**, 6, 31-39.
27. Siebert, J. M.; Baier, G.; Musyanovych, A.; Landfester, K., Towards copper-free nanocapsules obtained by orthogonal interfacial "click" polymerization in miniemulsion. *Chemical Communications* **2012**, 48, (44), 5470-5472.

28. Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau. SEQ-Eau (version 1), annexe A: grilles de seuils par altération avec justifications. *Les Etudes des Agences de l'Eau N° 64* **1996**, révisé **1998**.
29. Li, G. Z.; Randev, R. K.; Soeriyadi, A. H.; Rees, G.; Boyer, C.; Tong, Z.; Davis, T. P.; Becer, C. R.; Haddleton, D. M., Investigation into thiol-(meth)acrylate Michael addition reactions using amine and phosphine catalysts. *Polymer Chemistry* **2010**, 1, (8), 1196-1204.
30. Uygun, M.; Tasdelen, M. A.; Yagci, Y., Influence of Type of Initiation on Thiol-Ene "Click" Chemistry. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, 211, (1), 103-110.
31. Poltorak, K.; Durand, A.; Leonard, M.; Six, J.-L.; Nouvel, C., Interfacial click chemistry for improving both dextran shell density and stability of biocompatible nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2015**, 483, 8-17.
32. Deshiikan, S. R.; Papadopoulos, K. D., Modified Booth equation for the calculation of zeta potential. *Colloid and Polymer Science* **1998**, 276, (2), 117-124.
33. Eversole, W. G.; Boardman, W. W., The Effect of Electrostatic Forces on Electrokinetic Potentials. *Journal of Chemical Physics* **1941**, 9, 798.
34. Rotureau, E.; Leonard, M.; Marie, E.; Dellacherie, E.; Camesano, T. A.; Durand, A., From polymeric surfactants to colloidal systems (1): Amphiphilic dextrans for emulsion preparation. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, 288, (1-3), 131-137.
35. Tadros, T., Interparticle interactions in concentrated suspensions and their bulk (Rheological) properties. *Advances in Colloid and Interface Science* **2011**, 168, (1-2), 263-277.
36. Osterberg, E.; Bergstrom, K.; Holmberg, K.; Riggs, J. A.; Vanalstine, J. M.; Schuman, T. P.; Burns, N. L.; Harris, J. M., Comparison of Polysaccharide and Poly(Ethylene Glycol) Coatings for Reduction of Protein Adsorption on Polystyrene Surfaces. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **1993**, 77, (2), 159-169.
37. Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P., Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 24-36.
38. Long, J. A.; Osmond, D. W. J.; Vincent, B., The Equilibrium Aspects of Weak Flocculation. *Journal of Colloid and Interface Science* **1973**, 42, 545-553.
39. Cattoz, B.; Cosgrove, T.; Crossman, M.; Prescott, S. W., Surfactant-Mediated Desorption of Polymer from the Nanoparticle Interface. *Langmuir* **2012**, 28, (5), 2485-2492.
40. Blokhuis, A. M.; Djurhuus, K., Adsorption of poly(styrene sulfonate) of different molecular weights on alpha-alumina: Effect of added sodium dodecyl sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 296, (1), 64-70.
41. Fox, T. G., Influence of diluent and of copolymer composition on the glass temperature of a polymer system. *Bulletin of the American Physical Society* **1956**, 1, 123.
42. Lee, W. A.; Knight, G. J., Ratio of the glass transition temperature to the melting point in polymers. *British Polymer Journal* **1970**, 2, (1), 73-80.
43. Subramaniam, N.; Simpson, A.; Monteiro, M. J.; Shaffer, O.; Fellows, C. M.; Gilbert, R. G., Cryo-sectioning and chemical-fixing ultramicrotomy techniques for imaging rubber latex particle morphology. *Microscopy Research and Technique* **2004**, 63, (2), 111-114.
44. Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A., Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, 385, (1-2), 113-142.
45. Hofmeister, I.; Landfester, K.; Taden, A., Controlled Formation of Polymer Nanocapsules with High Diffusion-Barrier Properties and Prediction of Encapsulation Efficiency. *Angewandte Chemie-International Edition* **2015**, 54, (1), 327-330.
46. Hansen, C. M., *Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook, Second Edition*. 2007.
47. Benoit, J.-P.; Richard, J.; Venier-Julienne, M.-C., Microencapsulation. *Téchniques de l'ingénieur* **2013**, J 2210.
48. Trojer, M. A.; Nordstierna, L.; Nordin, M.; Nyden, M.; Holmberg, K., Encapsulation of actives for sustained release. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, 15, (41), 17727-17741.

49. Dowding, P. J.; Atkin, R.; Vincent, B.; Bouillot, P., Oil core/polymer shell microcapsules by internal phase separation from emulsion droplets. II: Controlling the release profile of active molecules. *Langmuir* **2005**, 21, (12), 5278-5284.
50. Dowding, P. J.; Atkin, R.; Vincent, B.; Bouillot, P., Oil core-polymer shell microcapsules prepared by internal phase separation from emulsion droplets. I. Characterization and release rates for microcapsules with polystyrene shells. *Langmuir* **2004**, 20, (26), 11374-11379.
51. Zili, Z.; Sfar, S.; Fessi, H., Preparation and characterization of poly-E-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, 294, (1-2), 261-267.
52. Siepmann, J.; Siepmann, F., Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2012**, 161, (2), 351-362.
53. https://en.wikipedia.org/wiki/Octyl_gallate. (Accès on-line le 20 juillet 2015),
54. Rouzes, C. Nanosphères à coeur poly(acide lactique) et couronne de dextrane: élaboration, propriétés et applications biomédicales. INPL, Nancy, 2001.
55. Nordstierna, L.; Abdalla, A. A.; Nordin, M.; Nyden, M., Comparison of release behaviour from microcapsules and microspheres. *Progress in Organic Coatings* **2010**, 69, (1), 49-51.

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

De nombreuses méthodes d'élaboration de nanocapsules (NCs) polymères existent et peuvent être classées en trois groupes principaux : (i) ségrégation de phases entre le cœur liquide et le polymère (généralement préformé ou formé *in situ* par polymérisation) constituant au final l'écorce de la NC. Ceci aboutit à la précipitation du polymère autour du cœur liquide ; (ii) déposition (ou précipitation) d'un polymère en surface d'un nano-template dur ou mou et (iii) réactions à l'interface liquide/liquide de nano-gouttelettes d'une émulsion.

Afin d'éviter certains inconvénients des méthodes précédemment citées, notamment le risque d'avoir des traces de monomères résiduels souvent toxiques (cas d'une polymérisation menée *in situ* durant le procédé), les procédures laborieuses nécessitant plusieurs lavages (cas de l'adsorption couche-par-couche de polyélectrolytes de charges opposées) ou encore les problèmes du contrôle de la morphologie des nano-objets (dans le cas notamment d'un procédé utilisant une ségrégation de phases entre l'huile et le polymère), il est possible de combiner deux types de procédés. Ainsi, une réaction interfaciale, menée entre deux polymères préformés peut être réalisée pendant l'élaboration des capsules par ségrégation de phases. Dans ce cas, il peut être intéressant d'utiliser la chimie « click » afin d'assurer un couplage efficace entre ces polymères. Cependant, ce type de réaction a jusqu'ici été très peu employé à l'interface liquide/liquide. L'objectif de cette thèse était d'utiliser ce procédé de couplage de polymères à l'interface d'une émulsion par chimie « click » afin de préparer des NCs biodégradables susceptibles d'encapsuler et de libérer une substance active (SA) algicide/algistatique. A notre connaissance, il s'agit de la première étude de couplage de polymères préformés à l'interface par chimie « click » permettant l'élaboration des NCs à cœur huileux. Dans ces travaux, ces NCs sont constituées d'une écorce en polymère hydrophobe (polylactide, PLA), d'un cœur liquide (Miglyol®810, M810) et sont recouvertes d'une couronne hydrophile polysaccharide (dextrane). Elles ont été obtenues par le procédé

d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click », soit de type cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu (I) (CuAAC), soit thiol-ène.

Pour cela, nous avons dans un premier temps synthétisé et caractérisé les polymères précurseurs de ces réactions de chimie « click ». D'une part, des polylactides fonctionnalisés à leur extrémité par une fonction X (appelés PLA-X) ont été obtenus. D'autre part, le dextrane a été modifié par des chaînes latérales hydrophobes comportant des fonctions Y susceptibles de réagir avec les fonctions complémentaires des PLA. Ces dérivés sont notés Dex-Y. Selon le type de chimie « click » envisagé, X et Y sont, dans le cas de la réaction CuAAC, une fonction alcyne (PLA α -alcyne) et une fonction azide (DexN₃), ou une fonction thiol (PLA α -SH) et un méthacrylate ou un alcène (DexC=C ou DexC₆C=C), dans le cas de la réaction thiol-ène. De plus, grâce à la présence de chaînes latérales hydrophobes, ces dérivés du dextrane Dex-Y ont montré une capacité à abaisser la tension superficielle air/solution aqueuse ainsi que la tension interfaciale CH₂Cl₂/solution aqueuse, ce qui leur permet de stabiliser des émulsions huile-dans-eau (o/w).

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à optimiser les réactions de couplage « click » entre ces composés, réalisées lors d'un procédé d'élaboration de nano-objets polymères par émulsion-évaporation de solvant, et menées à l'interface liquide/liquide de l'émulsion. Pour réaliser cette réaction interfaciale, l'émulsion o/w a été préparée d'une part avec une phase organique constituée d'un solvant volatil (CH₂Cl₂) mélangé ou non à 5 à 20% vol d'une huile (M810) non-volatile et non-miscible au polymère (PLA α -alcyne ou PLA α -SH). D'autre part, la phase aqueuse contenait un dérivé du dextrane approprié (DexN₃, DexC=C ou DexC₆C=C). L'ajout de M810 dans la phase organique était nécessaire pour obtenir des NCs à cœur liquide, tandis que son absence a abouti à la formation d'objets pleins (nanosphères, NSs). En faisant varier différents paramètres opératoires (puissance et temps de sonication, nature chimique et quantité du catalyseur, quantité de M810) nous avons réussi à lier le dextrane de façon covalente à l'écorce PLA des NCs à l'interface (CH₂Cl₂ mélangé au M810)/eau en utilisant une réaction « click » soit CuAAC, soit thiol-ène. Cette étude nous a permis d'établir différents points :

- Dans le cas de couplage de type CuAAC, différents systèmes catalytiques ont été testés (CuBr, CuI et CuSO₄ associé à l'acide ascorbique (AAsc) en ajoutant ou non un ligand lipophile (BPMODA). Le système catalytique CuSO₄/AAsc s'est avéré être le plus efficace. L'optimisation des conditions opératoires nous a permis d'obtenir des NSs et des

NCs avec 50% et 70%, respectivement, des fonctions alcyne ayant réagi. De plus, grâce à sa bonne solubilité dans l'eau, il s'est aussi révélé être le catalyseur le plus facilement éliminable par traitement avec de l'EDTA. Les NCs ainsi purifiées ne contenaient que 15 ppm de cuivre résiduel.

- Dans le cas des réactions thiol-ène, la *n*-hexylamine a été utilisée en tant que catalyseur et le dithiothréitol (DTT) a été ajouté pour empêcher à la fois le recouplage éventuel entre les fonctions –SH du PLA et la formation de ponts disulfure non-réactifs vis-à-vis de la double liaison C=C. Ainsi, pour nos NCs élaborées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale, nous avons pu faire réagir jusqu'à près de 30% des liaisons C=C avec des fonctions –SH du PLA.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à caractériser les nanoparticules (NPs) obtenues : NCs et NSs. Tout d'abord nous avons cherché à déterminer les caractéristiques classiques de ces NPs : distribution de tailles, taux de recouvrement en dextrane, épaisseur de ce recouvrement et la morphologie des NPs. Les objets colloïdaux obtenus sont de diamètres submicroniques. Les NCs sont néanmoins plus grosses que les NSs. Ceci provient de l'encapsulation d'une quantité d'huile plus importante à l'intérieur des objets en plus du PLA, ce qui conduit à l'augmentation de leur volume.

Nous avons pu montrer que la réaction « click » favorise la stabilité du recouvrement polysaccharide en présence d'un tensioactif compétitif (SDS) et augmente la densité de ce recouvrement en surface en liant chimiquement le dextrane à l'écorce PLA. De plus, nous avons confirmé les résultats obtenus précédemment au LCPM : le recouvrement hydrophile des NPs par du dextrane améliore leur stabilité colloïdale en présence de sel par rapport aux NPs non-recouvertes. En outre, les analyses MDSC ont mis en évidence la non-miscibilité (ou la très faible miscibilité) des composants constituant les NCs, ce qui permet alors leur séparation au cours de procédé d'élaboration des NCs. Enfin, les analyses MET, réalisées après avoir coupé des NCs par cryo-ultramicrotomie, ont prouvé la morphologie cœur liquide/écorce solide de nos NCs.

Finalement, nous avons étudié l'encapsulation de la SA modèle (gallate d'octyle, OG), puis sa libération à partir des NCs et des NSs. Si des encapsulations d'OG peuvent être réalisées en utilisant le CH₂Cl₂ comme solvant volatil dans la phase organique, son remplacement par l'acétate d'éthyle (bon solvant de la SA) a permis d'augmenter la quantité

d'OG soluble dans la formulation initiale. Ainsi, l'efficacité d'encapsulation est de l'ordre de 60 - 70% par rapport à la quantité d'OG initialement introduite, ce qui nous a permis de charger ces NCs jusqu'à 208 mg d'OG/g de NCs. Le suivi de la cinétique de libération d'OG a permis d'observer que tout l'OG encapsulé dans les NCs ou dans les NSs a été libéré au bout de 20h et 26h, respectivement. Dans le cas des NCs, la libération s'est avérée être plus rapide que dans le cas des NSs, ce qui montre la forte influence de la morphologie des objets (cœur liquide/écorce ou matrice polymère) sur la vitesse de libération de la SA.

PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont montré qu'il est possible d'obtenir des NCs polymères potentiellement biodégradables à cœur huileux recouvertes d'une couronne hydrophile par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant. Nous avons pu effectuer un certain nombre de caractérisation sur ces objets. Ainsi, nous avons prouvé que ce recouvrement hydrophile peut être densifié et que sa stabilité peut être améliorée en réalisant une réaction de couplage covalent entre le polymère de l'écorce et celui constituant le recouvrement. Les premiers résultats d'encapsulation et de libération d'une SA à partir de ces NCs montrent le grand potentiel de ce type de vecteur pour la délivrance des SA. Cependant, en raison d'un manque de temps, nous n'avons pas pu approfondir ces études. Un certain nombre de points intéressants peut être énuméré:

- Optimiser les conditions opératoires de la réaction « click » thiol-ène à l'interface lors de l'élaboration des NCs. Dans le cas des conditions nucléophiles, il pourrait être envisagé de tester d'autres catalyseurs, par exemple des phosphines. Dans le cas des conditions radicalaires, il faudrait optimiser la quantité de photo-amorceur utilisé ainsi que le temps et la puissance d'irradiation UV.
- Caractériser davantage la morphologie de NCs. Par exemple réaliser des cryofractures nous permettrait d'observer les objets sans les emprisonner dans une résine et de résoudre ainsi les problèmes de gonflement. Il n'est cependant pas sur que les cryofractures permettent de casser les NCs pour voir leur morphologie creuse. Des analyses par diffusion de neutrons aux petits angles dans des solutions H₂O/D₂O de compositions variables pourraient nous permettre d'élucider davantage la structure interne de nos objets, voire d'évaluer l'épaisseur de l'écorce de nos NCs. De plus, l'introduction d'un agent fluorescent par

exemple dans l'huile pourrait permettre de mieux observer la différence de contraste entre le coeur et l'écorce des NCs.

- Augmenter encore la quantité de la SA modèle encapsulée *in fine* dans les NCs. Pour cela, il serait intéressant de tester d'autres huiles peu volatiles qui soient de meilleurs solvants pour l'OG et/ou d'augmenter l'épaisseur de l'écorce polymère des NCs afin d'encapsuler davantage d'OG.
- Tester l'encapsulation d'autres SA potentiellement algicides/algistatiques. Des expériences préliminaires récentes avec une autre molécule algicide (confidentielle) et analogue à l'OG ont montré qu'il était possible de l'encapsuler dans les NCs élaborées au cours de cette thèse avec la même efficacité que dans le cas d'OG. De plus, ces NCs ont montré un pouvoir algicide notable dès lors qu'elles sont utilisées en concentration suffisante dans le milieu. Ces essais demanderaient à être poursuivis plus avant.
- Tester la stabilité des NCs au cours de temps dans le milieu d'utilisation. Il s'agirait de déterminer la durée au bout de laquelle nos NCs se dégradent et de vérifier si cela ne modifie pas les cinétiques de libération.

Enfin, ces travaux de recherches ouvrent la voie vers d'autres applications pour ces NCs potentiellement biodégradables. Ainsi, suivant la nature de la SA hydrophobe encapsulée, voire de l'huile utilisée, des applications pourraient être envisagées dans le domaine biomédical ou cosmétique par exemple.

PARTIE III

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS

Le dextrane T₄₀ (produit par la bactérie *Leuconostoc Mesenteroides*) est fourni par Sigma-Aldrich. L'analyse de sa distribution massique par chromatographie d'exclusion stérique couplée à une diffusion de lumière multi-angle (SEC-MALLS) (éluant = DMSO + 0,1 M NaNO₃) donne une masse molaire moyenne en nombre ($\overline{M}_n$) d'environ 26 000 g/mol et une dispersité ($\mathcal{D}$) égale à 1.4. Avant modification, il est séché pendant une nuit sous vide dynamique à 100°C, directement dans le ballon réactionnel. Le D,L-lactide (Sigma-Aldrich) est recristallisé deux fois dans du toluène sec (préalablement distillé sur CaH₂), puis séché pendant une nuit sous vide dynamique à 25°C directement dans le ballon réactionnel. L'alcool propargylique (99%) fourni par Alfa Aesar est distillé sous pression réduite en présence de CaH₂ puis stocké à 4°C dans un ballon sous atmosphère inerte. Le disulfure de 2-hydroxyéthyle fourni par Aldrich est séché sur CaH₂, filtré sous atmosphère inerte puis stocké à 4°C dans un ballon sous atmosphère inerte. Le diméthyl sulfoxyde (DMSO), le dichlorométhane (CH₂Cl₂) et le tétrahydrofurane (THF) dits « sec » sont séchés sur tamis moléculaire après ouverture.

Les réactifs suivants, fournis par Sigma-Aldrich-Fluka, sont utilisés sans purification supplémentaire : l'azidure de sodium (NaN₃), le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), l'anhydride méthacrylique, l'octoate d'étain (2-éthylhexanoate d'étain II, SnOct₂), poly(D,L-lactide) α,ω -dihydroxy commercial (PLA_{comm}, $\overline{M}_n \sim 35\,000$ g/mol, $\mathcal{D} = 1.3$ déterminé par SEC-MALLS dans le THF), le bromure de cuivre (CuBr, 99,9%), l'iodure de cuivre (CuI, 99,9%), le sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO₄, 5H₂O), le sulfate de magnésium (MgSO₄), l'acide L-ascorbique (AAsc, 99+%), le dodécyl sulfate de sodium (SDS), le chlorure de sodium (NaCl), l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), le D,L-dithiothréitol (DTT), la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), le 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA). La triéthylamine (Et₃N) et la *n*-hexylamine (HexAm) sont stockées sur tamis moléculaires après ouverture. Le Miglyol[®]810 (M810, triglycéride d'acide caprylique (C8 : 69,3%) et caprique (C10 : 30,1%), densité = 0.94 g/cm³, taux d'humidité = 0,02%, viscosité = 28 mPA.s, solubilité dans le CH₂Cl₂ : > 2 mL M810/1mL CH₂Cl₂) a été offert par Cremer Oleo Division. L'eau déminéralisée est produite par le système de filtration Milli-Q Plus (Millipore France). Le *N,N*-bis(2-pyridylméthyl)octadécylamine (BPMODA) a été synthétisée selon la procédure décrite dans la littérature ¹.

II. PROTOCOLES OPERATOIRES DE SYNTHÈSES

II.1. POLYMERISATION DU LACTIDE

Afin d'assurer le contrôle de la polymérisation, il faut opérer dans des conditions strictes pour éviter toute trace d'eau, d'oxygène ou d'impureté protonique. C'est pourquoi la verrerie utilisée lors de ces travaux est séchée et flambée sous vide dynamique. De même, les polymérisations sont effectuées sous atmosphère inerte. Le toluène est distillé une première fois sur CaH_2 et il est stocké sous atmosphère inerte et sur un agent desséchant (polystyryl lithium). Juste avant la polymérisation, il est à nouveau distillé sur paroi froide. Le monomère D,L-lactide (D,L-LA) est recristallisé deux fois dans du toluène sec (10 g du lactide dans 20 mL de toluène), puis filtré. Ensuite, il est introduit dans un bicol préalablement conditionné et pesé, puis séché sous vide à 25°C pendant une nuit. Le produit est repesé le lendemain pour connaître la masse exacte du monomère sec.

II.1.1. PLA α -alcyne (Schéma III.1)

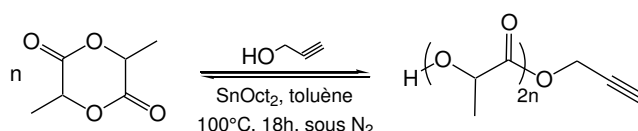


Schéma III.1. Synthèse du PLA α -alcyne par polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide catalysée par SnOct_2 et amorcée par l'alcool propargylique

Exemple de la synthèse du PLA α -alcyne 1 (voir Partie II, Chapitre I, Tableau II.1, p. 94)

31 mL de toluène fraîchement distillé sur paroi froide sont transférés par une canule flambée, sous N_2 , dans un bicol contenant 7,6 g du D,L-LA sec (soit 4,1 mL de toluène pour 1g de D,L-LA). Ensuite, 3,8 mL de la solution de l'alcool propargylique à 0,661 mol/L ($2,53 \times 10^{-3}$ mol) dans le toluène sec sont introduits. Le mélange est porté à 100°C . Puis, 3,9 mL de la solution de SnOct_2 à $1,95 \times 10^{-2}$ mol/L ($7,59 \times 10^{-5}$ mol) dans le toluène sec sont ajoutés dans le réacteur de façon à obtenir le rapport molaire $R = [\text{SnOct}_2]/\text{OH}$ égal à environ 0,03. La réaction est conduite à 100°C pendant 18h sous N_2 statique.

La polymérisation est arrêtée par ajout de quelques gouttes d'éthanol acidifié par de l'acide acétique et un prélèvement du milieu brut est effectué, puis analysé par RMN ^1H (dans CDCl_3) afin de déterminer la conversion en monomère (Figure III.1, Equation 1). La conversion est ainsi obtenue en comparant les aires respectives des signaux correspondant aux protons méthyne du PLA (A_c , vers 5,2 ppm) avec ceux du monomère (A_l , vers 4,9 ppm). Puis, le système est refroidi dans un bain de glace.

Le polymère est solubilisé dans du THF, précipité deux fois par de l'éthanol froid et enfin séché sous vide dynamique à 40°C.

$$\text{Conversion (\%)} = \frac{A_c}{A_c + A_1} \cdot 100 \quad [1]$$

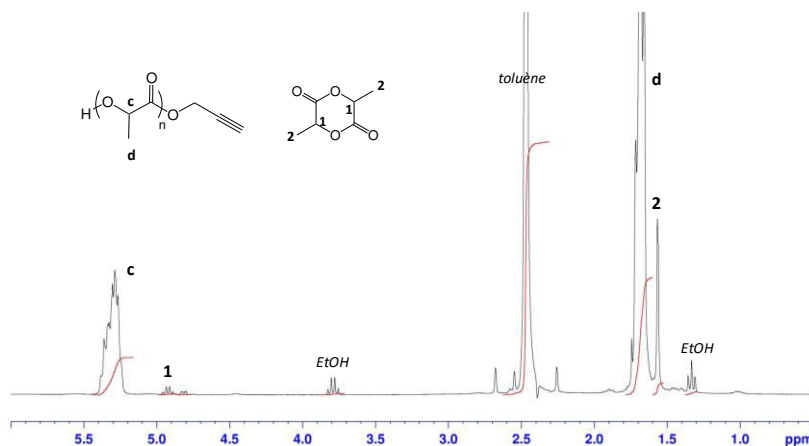


Figure III.1. Spectre RMN ¹H (CDCl₃) du milieu réactionnel brut (avant purification) dans le cas de la synthèse du PLA α-alkyne 1

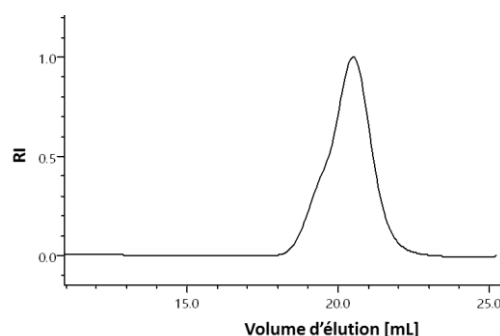


Figure III.2. Exemple d'un chromatogramme SEC-MALLS, détection réfractométrique, éluant THF (PLA α-alkyne ; $\overline{M}_n = 3\,900$ g/mol, $\overline{D} = 1,2$)

II.1.2. PLA α-SH

II.1.2.1. Synthèse de PLA-SS-PLA (Schéma III.2)

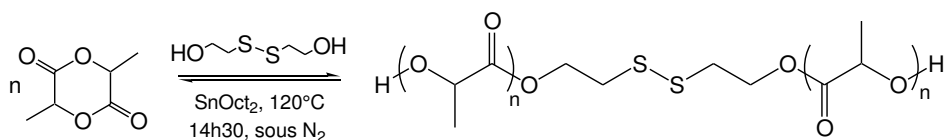


Schéma III.2. Synthèse du PLA-SS-PLA par polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide catalysée par SnOct₂ et amorcée par le 2-hydroxyéthyl disulfide

Exemple de la synthèse du PLA-SS-PLA 1 (voir Partie II, Chapitre I, Tableau II.1, p. 94)

0,45 mL ($3,64 \times 10^{-3}$ mol) de 2-hydroxyéthyl disulfide (séché sur CaH_2 , puis filtré sous N_2) sont transférés par une seringue flambée, sous N_2 , dans un bicol contenant 10,9 g de D,L-lactide sec. Ensuite, 2,6 mL de la solution de SnOct_2 à $4,28 \times 10^{-2}$ mol/L dans le toluène sec ($1,092 \times 10^{-4}$ mol) sont ajoutés dans le réacteur de façon à obtenir le rapport molaire $R = [\text{SnOct}_2]/\text{OH}$ égal à environ 0,03. Le ballon réactionnel est mis sous vide pour environ 2 min afin d'enlever le toluène, puis il est remis sous N_2 . La réaction est conduite à 120°C pendant 14h30 sous N_2 statique.

La polymérisation est arrêtée par ajout de quelques gouttes d'éthanol acidifié par de l'acide acétique et un prélèvement du milieu brut est effectué, puis analysé par RMN ^1H (dans CDCl_3) afin de déterminer la conversion en monomère (Equation 1, p. 193). Le polymère est solubilisé dans du THF, précipité deux fois par de l'éthanol froid et enfin séché sous vide dynamique à 40°C .

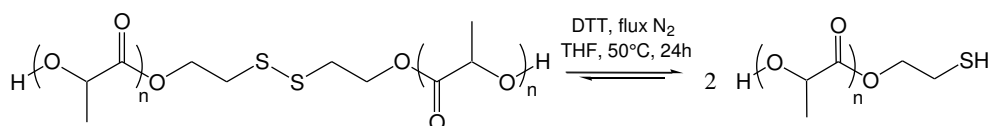
II.1.2.2. Réduction du PLA-SS-PLA (Schéma III.3)

Schéma III.3. Réduction du PLA-SS-PLA avec du DTT

Exemple de l'expérience dans des conditions optimales (voir Partie II, Chapitre I, Tableau II.2, entrée 1, p. 96)

3g de PLA-SS-PLA ($4,76 \times 10^{-4}$ mol) sont solubilisés dans 30 mL de THF (soit 10 mL de THF pour 1g de PLA) dans un bicol et la solution est dégazée pendant 30 min sous flux de N_2 . Ensuite, 3,7 g de DTT (soit 50 éq. par rapport aux ponts -SS- du PLA; $2,38 \times 10^{-2}$ mol) sont introduits via un entonnoir dans le ballon réactionnel sous flux de N_2 . Le milieu est laissé sous agitation, à 50°C , pendant 24h et sous faible flux de N_2 .

Le milieu réactionnel est concentré par distillation sous pression réduite. Puis, le polymère est précipité deux fois par de l'éthanol froid dans un volume au moins 10 fois plus important que le volume de la solution du polymère et séché sous vide dynamique à 30°C .

II.2. MODIFICATION DU DEXTRANE

II.2.1. Dex-azide (DexN₃) (protocole repris des travaux précédents menés au LCPM²)

II.2.1.1. Synthèse de l'acide 6-azidohexanoïque (adapté de la réf.³ ; Schéma III.4)

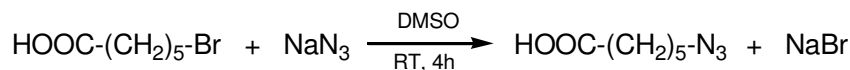


Schéma III.4. Synthèse de l'acide 6- azidohexanoïque

8,17 g d'azidure de sodium (0,126 mol, soit 1,22 éq./COOH) sont solubilisés dans 250 mL de DMSO. 20,1 g d'acide 6-bromohexanoïque (0,103 mol) sont ajoutés progressivement. La réaction se poursuit sous agitation pendant 4h à température ambiante.

La purification du produit se fait par extraction liquide/liquide. Tout d'abord, 250 mL de l'eau acidifiée par HCl (pH = 3) sont ajoutés au milieu réactionnel. La phase aqueuse est extraite 3 fois avec 200 mL du CH₂Cl₂. Puis, la phase organique est lavée 2 fois avec 200 mL de l'eau acidifiée à pH = 3. Finalement, la phase organique est séchée avec du MgSO₄ et filtrée sur le coton. Le CH₂Cl₂ est éliminé par évaporation sous pression réduite à 25 °C (attention, ne pas trop chauffer, car risque de formation d'un composé explosif⁴). Le produit est séché sous vide dynamique à température ambiante. Le produit final (rendement = 96%) est analysé par RMN ¹H après sa dissolution dans le CDCl₃ (Figure III.3). Il contient une certaine quantité du DMSO. Sa teneur dans le DMSO (de 72% massique) peut être alors calculée de l'Equation 2 :

$$\%m_{ac.N3} = \frac{(A_f + A_b + A_c + A_e + A_d) : 10 \cdot M_{ac.N3}}{(A_f + A_b + A_c + A_e + A_d) : 10 \cdot M_{ac.N3} + A_{CH_3 DMSO} : 6 \cdot M_{DMSO}} \cdot 100 \quad [2]$$

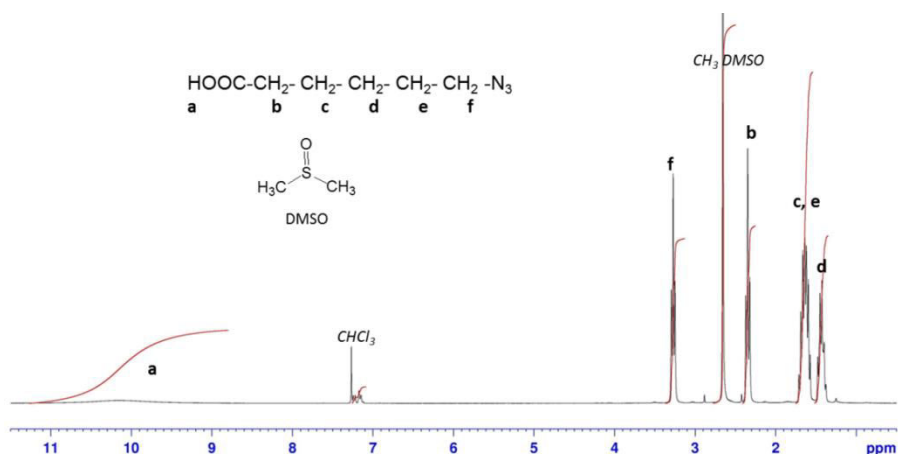


Figure III.3. Spectre RMN ¹H de l'acide 6-azidohexanoïque dans CDCl₃

II.2.1.2. Synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohexanoïque (Schéma III.5)

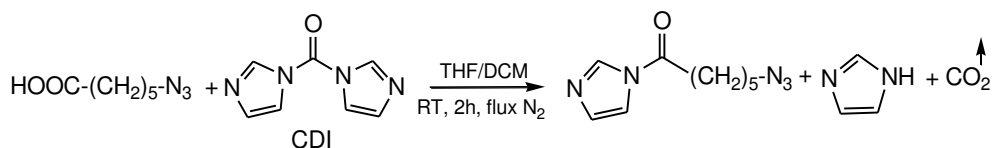
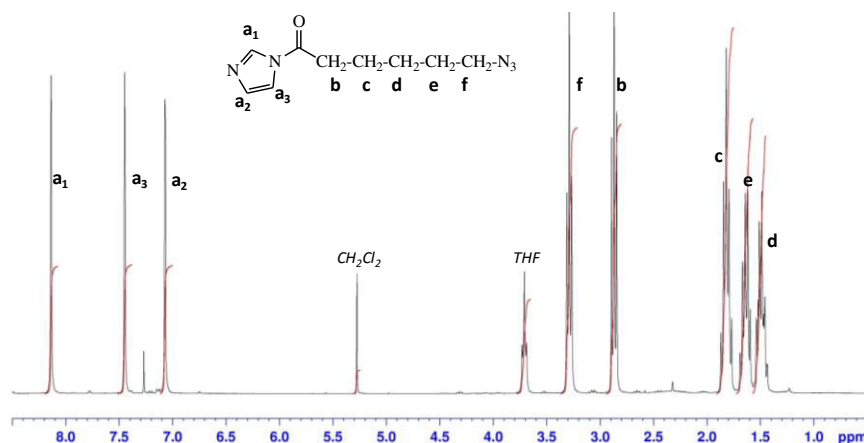


Schéma III.5. Synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohexanoïque

Afin d'éliminer toute trace d'eau, la verrerie est mise à l'étuve et purgée sous N_2 . 19,4 g de 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) (0,120 mol, soit 1,3 éq./COOH) sont mis en suspension dans 250 mL d'un mélange THF/ CH_2Cl_2 (1:1; v/v) secs, sous circulation de N_2 . 14,5 g d'acide 6-azidohexanoïque (contenant du DMSO résiduel, soit 0,079 mol d'acide pur) sont mélangés avec 13 mL du mélange THF/ CH_2Cl_2 (1:1; v/v) sec, et ensuite introduits goutte-à-goutte dans le milieu réactionnel sous N_2 . La réaction se poursuit pendant 2h30 sous agitation et sous faible flux d'azote à 40°C.

Une fois la réaction terminée, la majorité des solvants est éliminée sous pression réduite. Le produit est ensuite dissous dans 50 mL de CH_2Cl_2 , puis le milieu réactionnel est rapidement lavé 2 fois à 100 mL d'eau. La phase aqueuse obtenue est lavée 2 fois à 100 mL du CH_2Cl_2 . La totalité des phases organiques est alors lavée rapidement 2 fois à l'eau, séchée sur MgSO_4 et finalement filtrée sur papier filtre. Le CH_2Cl_2 est évaporé sous pression réduite et le produit est séché à température ambiante sous vide dynamique pendant 1h. Le produit final (rendement = 96%) est analysé par RMN ^1H (dans le CDCl_3 , Figure III.4) puis stocké à -20 °C.

Figure III.4. Spectre RMN ^1H de l'acide 6-azidohexanoïque activé par l'imidazole dans CDCl_3

II.2.1.3. Réaction du dextrane avec l'acide 6-azidohexanoïque activé (Schéma III.6)

Schéma III.6. Réaction du dextrane avec l'acide 6-azidohexanoïque activé

Exemple de la synthèse (cas de DexN₃-23)

10 g de dextrane sec ($6,17 \times 10^{-2}$ mol d'unités glucopyranose (notées par la suite u.g.) sont dissous dans 100 mL de DMSO sec (soit 10 mL de DMSO pour 1 g de dextrane) sous agitation et en chauffant légèrement. 3,1 g d'acide 6-azidohexanoïque activé ($1,49 \times 10^{-2}$ mol, soit 0,24 éq./u.g.) sont ensuite introduits dans le ballon réactionnel. En variant la quantité d'acide activé utilisé, il est possible d'obtenir des DexN₃ avec différents taux de substitution en chaînes -N₃. La réaction se poursuit sous agitation pendant 48h à 50°C. Le produit est précipité deux fois par de l'éthanol froid, filtré et enfin séché sous vide dynamique à 30°C.

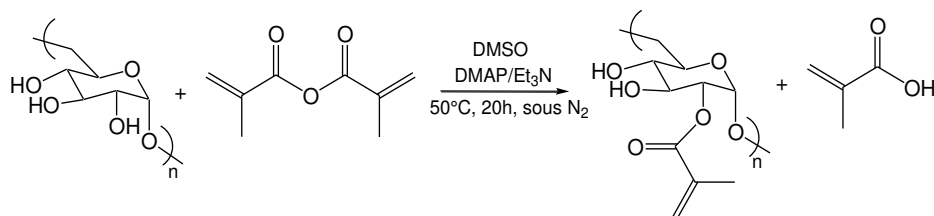
II.2.2. Dex-méthacrylate (DexC=C) (adapté des travaux menés précédemment au LCPM⁵ ; Schéma III.7)

Schéma III.7. Réaction du dextrane avec l'anhydride méthacrylique

Exemple de la synthèse (cas de DexC=C-28)

1,1 g de dextrane sec ($6,79 \times 10^{-3}$ mol d'u.g.) sont dissous dans 20 mL de DMSO sec (soit 18 mL de DMSO pour 1 g de dextrane) sous agitation et en chauffant légèrement. Une solution catalytique DMAP/Et₃N est ensuite préparée par dissolution (en chauffant légèrement sous flux de N₂) de 128 mg de DMAP ($1,04 \times 10^{-3}$ mol, soit 0,05 éq./OH) dans 8,8 mL de triéthylamine (Et₃N, $6,28 \times 10^{-2}$ mol, soit 3 éq./OH). La solution catalytique DMAP/Et₃N est transférée dans le ballon réactionnel à l'aide d'une seringue. Ensuite, 0,2 mL de l'anhydride méthacrylique ($1,40 \times 10^{-3}$ mol) sont ajoutés dans le ballon réactionnel à l'aide d'une seringue flambée. En variant la quantité d'acide activé utilisé,

il est possible d'obtenir des Dex-C=C avec différents taux de substitution en groupes méthacrylate. La réaction se poursuit sous agitation, sous N₂ statique, à 50°C pendant 20h.

Le produit obtenu est précipité deux fois par de l'éthanol froid, filtré et enfin séché sous vide dynamique à 30°C.

II.2.3. Dex-alcène (DexC₆C=C) (adapté des travaux précédemment menés au LCPM⁶)

II.2.3.1. Synthèse de l'ester activé de l'acide hex-5-énoïque (Schéma III.8)

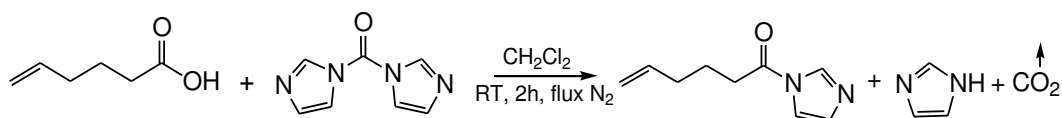


Schéma III.8. Synthèse de l'ester activé de l'acide hex-5-énoïque

Afin d'éliminer toutes traces d'eau, la verrerie est mise à l'étuve et purgée sous N₂. 4,3 g de CDI ($2,63 \times 10^{-2}$ mol, soit 1,5 éq./COOH) sont mis à 38 °C en suspension dans 100 mL de CH₂Cl₂ sec sous flux de N₂ et à 38°C. Ensuite, 2,1 mL d'acide hex-5-énoïque ($1,75 \times 10^{-2}$ mol) dissous dans 5 mL de CH₂Cl₂ sec, sont introduits goutte-à-goutte dans le milieu réactionnel sous N₂. Le bain chaud est retiré et la réaction se poursuit pendant 2h sous agitation à température ambiante et sous faible flux de N₂.

Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est lavé rapidement 2 fois avec 25 mL d'eau, puis la phase aqueuse est lavée 2 fois avec 50 mL de CH₂Cl₂. La totalité des phases organiques est lavée avec 100 mL d'eau, séchée sur MgSO₄ et filtrée sur papier filtre. Le CH₂Cl₂ est évaporé lentement à température ambiante sous pression réduite. Le produit final est analysé par RMN ¹H (dans le CDCl₃, Figure III.5) puis stocké à -20 °C.

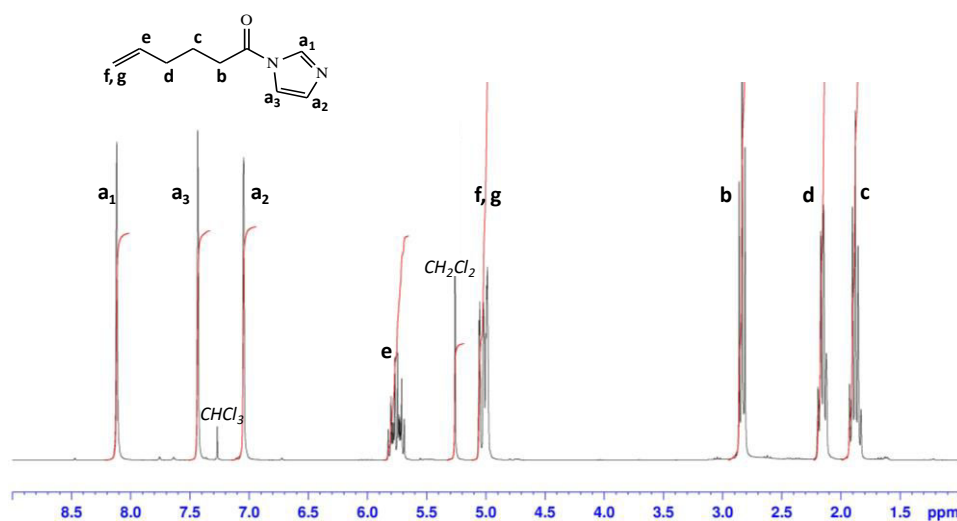


Figure III.5. Spectre RMN ¹H de l'acide hex-5-énoïque activé par l'imidazole dans CDCl₃

II.3.2.2. Réaction du dextrane avec l'acide hex-5-énoïque activée (Schéma III.9)

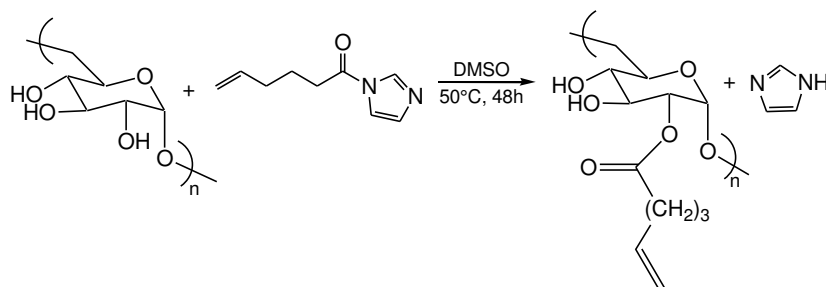


Schéma III.9. Réaction du dextrane avec l'acide hex-5-énoïque activée

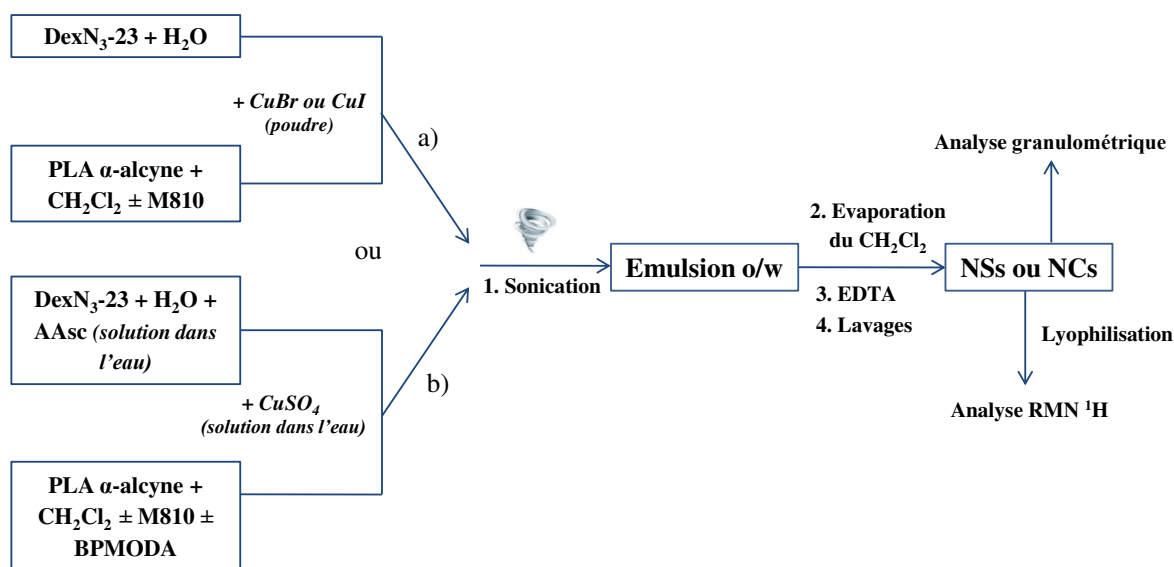
Exemple de la synthèse (cas de DexC₆C=C-21)

5,12 g de dextrane sec ($3,21 \times 10^{-2}$ mol d'u.g) sont dissous dans 52 mL de DMSO sec (soit 10 mL de DMSO pour 1 g de dextrane) sous agitation et en chauffant légèrement. 1,17 g d'acide hex-5-énoïque activé ($7,13 \times 10^{-3}$ mol, soit 0,22 éq./u.g.) sont ensuite introduits via une seringue sous N₂. En variant la quantité d'acide activé utilisé, il est possible d'obtenir des DexC₆C=C avec différents taux de substitution en chaînes alcène. La réaction se poursuit sous agitation pendant 48h à 50°C et sous N₂ statique. Le produit est précipité deux fois par de l'éthanol froid, filtré et enfin séché sous vide dynamique à 40°C.

II.3. PREPARATION DES NANO-OBJETS

II.3.1. Nano-objets clickés

II.3.1.1. Chimie « click » CuAAC (Schéma III.10)

Schéma III.10. Préparation des NSs ou des NCs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » CuAAC en utilisant différents catalyseurs: a) CuBr ou CuI, b) CuSO₄ (±BPMODA)/AAsc

II.3.1.1.1. Utilisation de CuBr ou CuI comme catalyseur

25 mg de PLA α -alcyne (4 000 g/mol ; $6,25 \times 10^{-6}$ mol) sont dissous dans une phase organique composée de (1-x) mL de CH₂Cl₂ et x mL de M810 (x = 0 dans le cas des NSs et x = 0,1 pour des NCs). En parallèle, 50 mg de DexN₃-23 ($6,05 \times 10^{-5}$ mol de fonctions N₃) sont dissous dans 10 mL d'eau Milli-Q saturée par du CH₂Cl₂ puis cette solution est dégazée sous N₂ pendant 30 min. La phase organique est ensuite ajoutée dans la phase aqueuse, puis 5,5 éq. par fonctions alcyne ($3,44 \times 10^{-5}$ mol) de CuBr (soit 5 mg) ou de CuI (soit 6,6 mg) sont introduits. Le mélange est préémulsifié à l'aide d'un vortex pendant 40s sous flux de N₂. Ensuite, le mélange est émulsifié en utilisant la sonde à ultrasons Vibracell en mode pulsé et en présence d'un bain de glace (120 s, puissance 45 ou 180 W). L'émulsion est transférée dans un cristallisateur de 50 mL puis le CH₂Cl₂ est évaporé pendant 2h dans une étuve ventilée à 37°C sous agitation modérée à 65 tours par minute (= 65 rpm). Ensuite, des NPs sont centrifugées (10 000 rpm, 30-50 min, 15 °C), le surnageant est enlevé et des NPs sont redispersées dans 5 mL d'eau Milli-Q à l'aide d'un bain à ultrasons (environ 10-15 min). La procédure est répétée encore deux fois. Finalement, des NPs sont caractérisées par granulométrie puis lyophilisées pour l'analyse RMN ¹H.

II.3.1.1.2. Utilisation de CuSO₄(±BPMODA)/AAsc

25 mg de PLA α -alcyne (4 000 g/mol ; $6,25 \times 10^{-6}$ mol) sont dissous dans une phase organique composée de (1-x) mL de CH₂Cl₂ et x mL de M810 (x = 0 dans le cas des NSs et x = 0,05 ; 0,1 ou 0,2 pour des NCs). Si nécessaire, 1 éq. de BPMODA par mol de Cu(II) (soit 2,8 mg, $6,20 \times 10^{-6}$ mol) est ajouté. En parallèle, 50 mg de DexN₃-23 ($6,05 \times 10^{-5}$ mol de fonctions N₃) sont dissous dans 10 mL d'eau Milli-Q saturée par du CH₂Cl₂ puis cette solution est dégazée sous N₂ pendant 30 min. Environ 10 min avant la fin de dégazage, 10 éq. d'AAsc par mol de CuSO₄ (soit de 0,1 à 0,6 mL de la solution aqueuse d'AAsc à 0,57 mol/L) sont introduits. La phase organique est ensuite ajoutée dans la phase aqueuse, puis de 1 à 5,5 éq. de CuSO₄ par fonctions alcyne (soit de 0,08 à 0,4 mL de la solution aqueuse de CuSO₄ à 0,08 mol/L) sont introduits. La suite de la procédure est identique au cas précédent avec le CuBr ou le CuI comme catalyseur.

II.3.1.1.3. Réalisation de la réaction « click » après évaporation de CH₂Cl₂

Le protocole est similaire à celui des NPs clickées obtenues avec le système catalytique CuSO₄/AAsc avec des légères modifications. L'AAsc (10 éq./CuSO₄, soit 0,6 mL de la solution aqueuse à 0,57 mol/L) est ajouté dans la suspension de NPs après évaporation du CH₂Cl₂, puis le mélange est dégazé sous N₂ pendant 30 min. Ensuite, 5,5 éq. de CuSO₄ par fonctions alcyne (soit 0,4 mL de la solution aqueuse à 0,08 mol/L) sont ajoutés. La suspension est à nouveau dégazée pendant 5

min et laissée sous agitation magnétique, à température ambiante pendant une nuit. Les NPs sont ensuite lavées comme décrit précédemment.

II.3.1.1.4. Nano-objets avec de l'OG encapsulé à l'intérieur

Le protocole est similaire à celui permettant l'élaboration des NPs clickées avec le système catalytique CuSO_4 (5,5 éq./alcyne)/AAAsc (10 éq./ CuSO_4) (voir Paragraphe II.3.1.1.2.). Cependant, le CH_2Cl_2 utilisé comme solvant volatil dans la phase organique est remplacé par l'acétate d'éthyle (AcOEt) et du gallate d'octyle (OG) est ajouté dans la phase organique. Cette dernière est alors constituée de (1-x) mL d'AcOEt, de x mL de M810 (avec $x = 0$ pour les NSs et $x = 0,1$ pour les NCs), de 25 mg PLA α -alcyne (4 000 g/mol) et d'une quantité variable d'OG (3,7 ; 10 ; 15 ou 25 mg).

II.3.1.2. Chimie « click » thiol-ène

II.3.1.2.1. Conditions nucléophiles

II.3.1.2.1.1. Expériences préliminaires en milieu homogène

19 mg de DexC=C-20 ($2,15 \times 10^{-5}$ mol de fonctions C=C), 100 mg de PLA α -SH (3 100 g/mol ; $3,22 \times 10^{-5}$ mol ; 1,5 éq./C=C) et 5 mg de dithiotréitol (DTT ; $3,22 \times 10^{-5}$ mol, 1 éq./-SH) sont solubilisés dans le 1 mL de DMSO. Ensuite, 14 μL de *n*-hexylamine ($1,075 \times 10^{-4}$ mol ; 5 éq./C=C ou 3,3 éq./-SH) sont ajoutés dans le milieu réactionnel. La réaction se poursuit dans un ballon de 5 mL, à température ambiante, pendant 24h. Le produit est précipité deux fois par de l'éthanol froid (dans un bain EtOH/ N_2 liquide).

II.3.1.2.1.2. Réactions à l'interface (Schéma III.11)

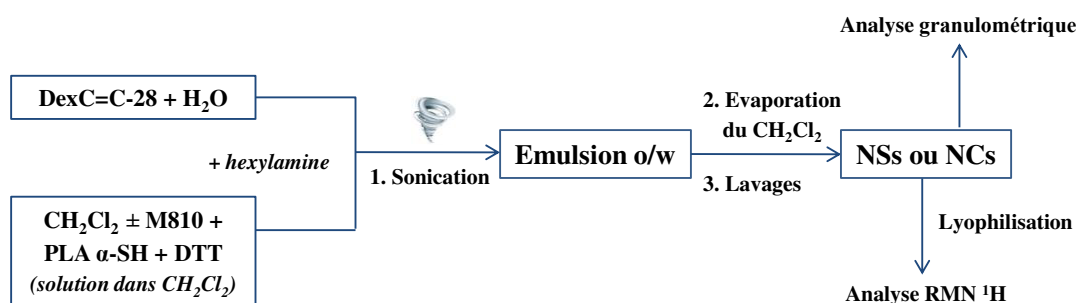


Schéma III.11. Préparation des NSs ou des NCs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » thiol-ène dans des conditions nucléophiles

25 mg de PLA α -SH (3 100 g/mol ; $8,06 \times 10^{-6}$ mol) sont dissous dans une phase organique composée de (1-x) mL de CH_2Cl_2 et x mL de M810 ($x = 0$ dans le cas des NSs et $x = 0,1$ pour des NCs). Ensuite, 1 éq. de DTT par fonctions -SH (soit 62 μL de la solution DTT dans CH_2Cl_2 à 0,13

mol/L) est ajouté dans la phase organique. En parallèle, 50 mg de DexC=C-28 ($7,78 \times 10^{-5}$ mol de fonctions C=C) sont dissous dans 10 mL d'eau Milli-Q saturée par du CH_2Cl_2 . La phase organique est ensuite ajoutée dans la phase aqueuse, puis de 1 à 3,3 éq. d'hexylamine par fonctions -SH (soit de 11 à 35 μL de la solution d'hexylamine dans CH_2Cl_2 à 0,761 mol/L) sont introduits. Le mélange est préémulsifié à l'aide d'un vortex pendant 40s sous flux de N_2 . Ensuite, le mélange est émulsifié en utilisant la sonde à ultrasons Vibracell en mode pulsé et en présence d'un bain de glace (120 s, puissance 45 W). L'émulsion est transférée dans un cristallisateur de 50 mL et le CH_2Cl_2 est évaporé pendant 2h dans une étuve ventilée à 37°C sous agitation modérée (65 rpm). Ensuite, des NPs sont centrifugées (10 000 rpm, 30-50 min, 15 °C), le surnageant est enlevé et des NPs sont redispersées dans 5 mL d'eau Milli-Q à l'aide d'un bain à ultrasons (environ 10-15 min). La procédure est répétée encore deux fois. Finalement, des NPs sont caractérisées par granulométrie et puis lyophilisées pour l'analyse RMN ^1H .

II.3.1.2.2. Conditions radicalaires (Schéma III.12)

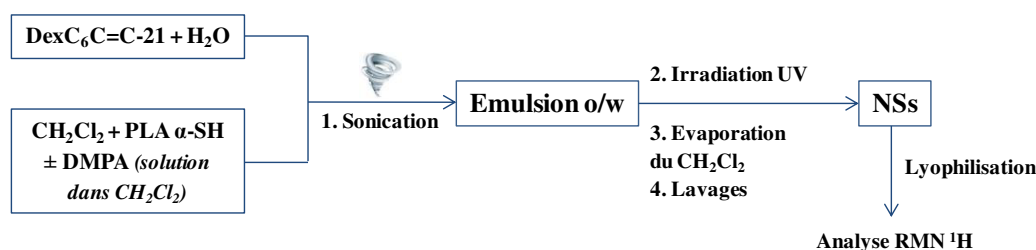


Schéma III.12. Préparation des NSs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » thiol-ène dans les conditions radicalaires

25 mg de PLA α -SH (3 100 g/mol ; $8,06 \times 10^{-6}$ mol) sont dissous dans une phase organique composée de 1 mL de CH_2Cl_2 . Ensuite, 0,2 éq. de DMPA par fonctions -SH (soit 42 μL de la solution DMPA dans CH_2Cl_2 à 0,039 mol/L) est ajouté dans la phase organique, en la protégeant de la lumière. En parallèle, 50 mg de DexC₆C=C-21 ($7,7 \times 10^{-5}$ mol de fonctions C=C) sont dissous dans 10 mL d'eau Milli-Q saturée par du CH_2Cl_2 et cette solution est dégazée sous N_2 pendant 30 min. La phase organique est ensuite ajoutée dans la phase aqueuse. Le mélange (protégé de la lumière) est préémulsifié à l'aide d'un vortex pendant 40s sous flux de N_2 puis émulsifié en utilisant la sonde à ultrasons Vibracell en mode pulsé et en présence d'un bain de glace (120 s, puissance 45 W). L'émulsion est transférée dans un cristallisateur de 50 mL et mise à irradier sous UV ($\lambda = 365$ nm, 372 mW/cm², soit 20% de puissance maximale de la lampe OmniCure®Series1000 utilisée) pendant 15 min. Le CH_2Cl_2 est ensuite évaporé pendant 2h dans une étuve ventilée à 37°C sous agitation modérée (65 rpm). Ensuite, des NPs sont centrifugées (10 000 rpm, 30-50 min, 15 °C), le surnageant est enlevé et des NPs sont redispersées dans 5 mL d'eau Milli-Q à l'aide d'un bain à ultrasons (environ 10-15

min). La procédure est répétée encore deux fois. Finalement, des NPs sont lyophilisées pour l'analyse RMN ^1H .

II.3.2. Nano-objets non-clickés

Le protocole est similaire à celui pour élaborer des NPs clickés, mais au lieu d'utiliser un PLA fonctionnel, le PLA α,ω -dihydroxy commercial (35 000 g/mol) a été employé. De plus, la phase aqueuse n'est pas dégazée et aucun catalyseur n'est ajouté.

II.3.3. Nano-objets nus

Le protocole est similaire à celui pour élaborer des NPs non-clickés, mais au lieu d'utiliser un dérivé amphiphile du dextrane, du SDS (3 g/L) est employé. Un spectre RMN ^1H de ces nano-objets nus après lyophilisation confirme que les objets ne contiennent plus de tensioactif.

III. CARACTERISATION DES POLYMERES

III.1. Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN sont enregistrés à 25°C à l'aide d'un spectromètre Brüker Avance 300. Les champs utilisés sont 300 MHz pour les expériences RMN ^1H et 75,5 MHz pour les RMN ^{13}C . Les analyses sont réalisées pour des solutions homogènes dans des solvants deutérés : diméthyl sulfoxyde (DMSO- d_6 , Sigma-Aldrich) ou chloroforme (CDCl_3 , Sigma-Aldrich).

Pour les analyses RMN ^1H , les tubes RMN contiennent de 8 à 10 mg d'échantillon dans 0,6 mL de solvant deutéré et 40 mg d'échantillon pour la RMN ^{13}C . Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par référence aux impuretés isotopiques résiduelles du solvant deutéré. Des spectres HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), corrélation hétéronucléaire entre un carbone et un proton liés par liaison covalente, sont réalisés pour des solutions homogènes dans du DMSO- d_6 .

III.2. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La SEC est un de type de chromatographie en phase liquide permettant de séparer les macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique en solution. Les molécules éluées peuvent plus ou moins pénétrer dans les pores de la phase stationnaire – un gel polymère, dont sont remplies les colonnes. Ainsi, les macromolécules ayant le volume hydrodynamique le plus faible sont d'avantage retenues que celles avec le volume hydrodynamique plus grand parce que leur temps de rétention est plus long. Après avoir parcouru la colonne, les macromolécules sont analysées par des

détecteurs, le plus souvent un refractomètre différentiel (RI). Ce détecteur mesure une différence d'indice de réfraction entre une cellule de référence qui contient de l'éluant pur et une cellule de détection où s'écoule l'échantillon élué. Le couplage de l'appareil à un détecteur de diffusion de la lumière permet d'évaluer la masse molaire moyenne absolue, à condition de connaître le dn/dc de l'échantillon à analyser.

Au cours de cette thèse, des analyses SEC ont été réalisées en utilisant deux appareillages:

- Cas de THF comme éluant : un appareil constitué d'un détecteur de diffusion de lumière multi-angles (MALLS) de modèle Mini Dawn Treos Wyatt, mesurant l'intensité de la lumière diffusée à 45, 90 et 140°, d'un refractomètre différentiel (RI) de type OPTILAB rex (Wyatt Technology Corporation), d'un dégazeur AF (waters in-line), d'une pompe Waters 515 (débit = 1 mL/min), d'une boucle d'injection de 100 μ l, d'une série de trois colonnes de séparation PLgel 5 μ m, 300 mm x 7,5 mm (10⁵ Å, 10³ Å, 100 Å) avec une pré-colonne et d'un passeur d'échantillon de type Waters 2707.
- Cas de DMSO + 0,1 M NaNO₃ comme éluant : un appareil constitué d'un détecteur de diffusion de lumière multi-angles mesurant l'intensité de la lumière diffusée à 45, 90 et 140° (Mini Dawn Wyatt), d'un refractomètre différentiel (RID - 10A, Shimadzu), d'un détecteur UV (SPD - 20A Shimadzu), d'un dégazeur (DGU - 20A_{3R}, Shimadzu), d'une pompe (LC - 20AD, Shimadzu) (débit = 0,7 mL/min), d'une boucle d'injection de 100 μ l, d'une série de trois colonnes de séparation PLgel 5 μ m, 300 mm x 7,5 mm (10⁵ Å, 10³ Å, 100 Å) avec une pré-colonne et d'un passeur d'échantillon de Shimadzu.

Les échantillons sont préparés la veille dans l'éluant (environ 10 g/L), puis filtrés sur des filtres Millex HA de 0,2 μ m. La valeur du rapport dn/dc égale à 0,054 mL/g est utilisée dans le cas des PLA analysés dans le THF. Pour les analyses dans le DMSO + 0,1 M NaNO₃, le dn/dc utilisé dans le cas du dextrane et de ses dérivés est égal à 0,07.

III.3. Propriétés tensioactives

Tension superficielle air/solution aqueuse de DexY

Les mesures sont effectuées selon la méthode de l'anneau de Du Noüy sur un tensiomètre Krüss K20 EasyDyne automatique, thermostaté à 25 °C. Une solution mère de DexY est préparée et mise sous agitation pendant 7h à température ambiante. Les solutions à concentration variable en DexY (20 mL), préparées par dilution de la solution mère, sont placées dans les godets de mesure (préalablement nettoyés avec de l'acide sulfurique afin d'éliminer toute trace organique, abondamment rincés à l'eau et séchés) et laissées au repos pendant la nuit dans un endroit frais. Avant de commencer la mesure, un temps d'attente de 10 min est respecté pour permettre la stabilisation de la température.

Pour chaque échantillon, cinq mesures sont effectuées et une valeur moyenne est calculée. Entre chaque mesure, l'anneau est rincé à l'eau puis à l'acétone et séché par la flamme d'un chalumeau.

Tension interfaciale CH₂Cl₂/solution aqueuse de DexY

Les mesures sont effectuées selon la méthode de l'anneau de Du Noüy sur un tensiomètre Krüss, thermostaté à 25 °C. Une solution mère de DexY est préparée et agitée pendant 8h à température ambiante. 20 mL de CH₂Cl₂ (stabilisé à l'amylène) sont introduits dans les godets de mesure (préalablement nettoyés avec de l'acide sulfurique afin d'éliminer toute trace organique, abondamment rincés à l'eau et séchés), puis 10 mL de la solution aqueuse à concentration variable en DexY, préparée par dilution de la solution mère, sont doucement ajoutés au-dessus. Les échantillons sont laissés au repos pour une nuit dans un endroit frais. Avant de commencer la mesure, un temps d'attente de 10 min est respecté pour permettre la stabilisation de la température. L'anneau est placé dans la phase organique et ensuite doucement remonté vers la phase aqueuse. Pour chaque échantillon, trois mesures sont effectuées et une valeur moyenne est calculée. Entre chaque mesure, l'anneau est rincé à l'eau puis à l'acétone et séché par la flamme d'un chalumeau.

IV. CARACTERISATION DES NANO-OBJETS

IV.1. Calculs des erreurs expérimentales

Pour $n \geq 3$ (n – nombre de répétition d'une expérience), les erreurs expérimentales correspondent à la déviation standard calculée grâce à l'Equation 3. Pour $n < 3$, les erreurs sont calculées grâce à l'Equation 4.

$$S_{n \geq 3} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \text{ avec } \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad [3]$$

$$S_{n < 3} = |x_i - \bar{x}| \quad [4]$$

IV.2. Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ¹H sont enregistrés à 25°C à l'aide d'un spectromètre Brüker Avance 300. Le champ utilisé est 300 MHz. Les analyses sont réalisées pour des solutions homogènes dans des solvants deutérés : diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-*d*₆, Sigma-Aldrich) éventuellement avec ajout de 2 gouttes de D₂O (Sigma-Aldrich).

Les tubes RMN contiennent de 8 à 10 mg d'échantillon dans 0,6 mL de solvant deutéré. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par référence aux impuretés isotopiques résiduelles du solvant deutéré.

Les NPs lyophilisées sont dissoutes dans le DMSO- d_6 (Figure III.6) ou DMSO- d_6 + 2 gouttes de D₂O (uniquement dans le cas des NPs contenant de l'OG, Figure III.7) pour évaluer la quantité de M810 encapsulé, le ratio molaire Dex/PLA et le taux de recouvrement en dextrane.

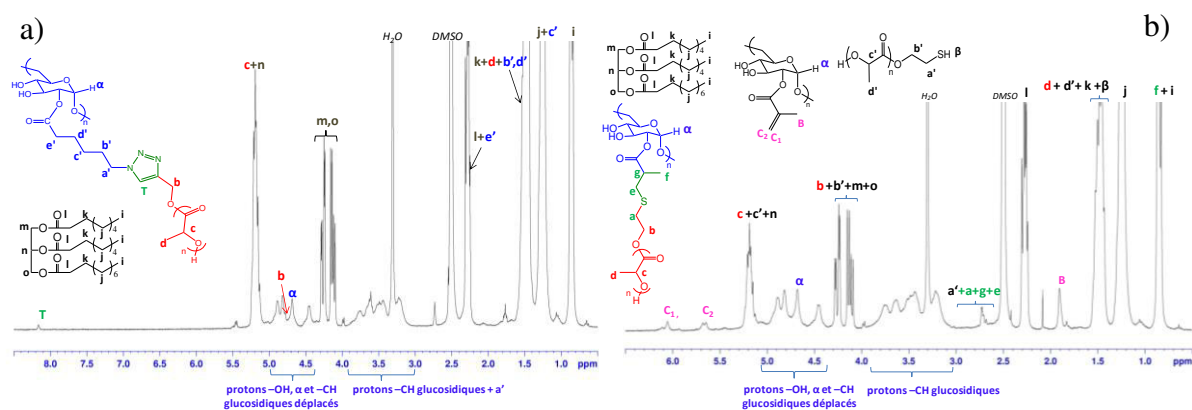


Figure III.6. Spectres RMN ¹H (DMSO- d_6) des NCs lyophilisées après avoir réalisé une réaction de chimie « click » : a) CuAAC entre un PLA α-alcyne et un DexN₃, b) thiol-ène nucléophile entre un PLA α-SH et un DexC=C

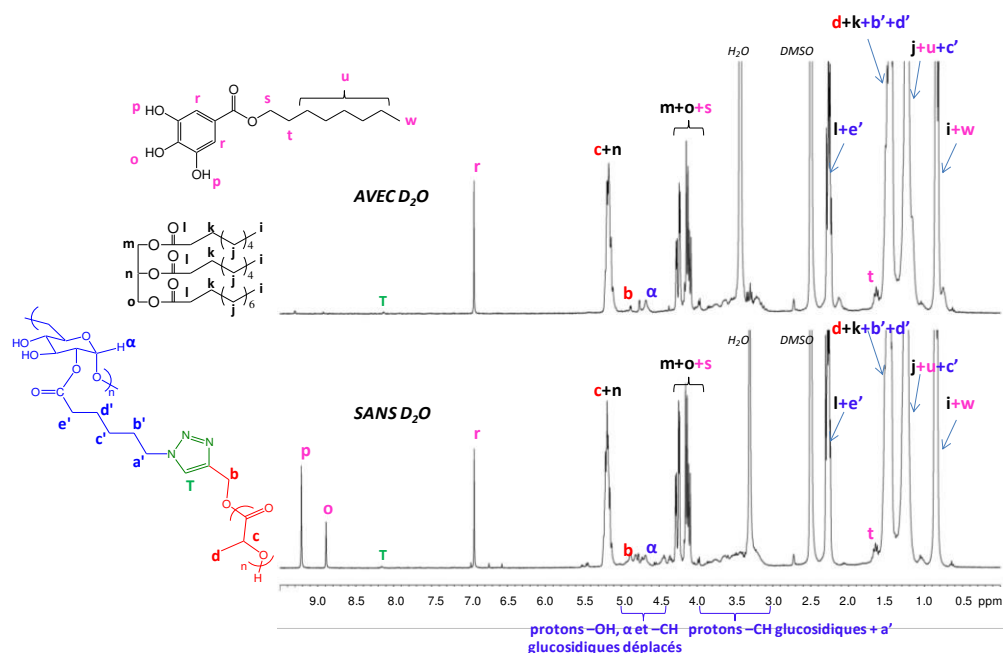


Figure III.7. Spectres RMN ¹H des NCs lyophilisées, clickées par réaction CuAAC et avec de l'OG encapsulé, réalisés dans DMSO- d_6 (en bas) ou dans DMSO- d_6 + 2 gouttes D₂O (en haut)

IV.2.1. Détermination de la quantité de M810 dans les NCs

Nous n'avons pas toujours utilisé les mêmes pics selon les conditions différentes d'élaboration des NCs (c'est-à-dire pour des réactions CuAAC, thiol-ène et en présence d'OG) car il n'a pas été possible de déterminer un pic de référence pour le M810 qu'il soit invariable dans les trois conditions

utilisées (Tableau III.1). Le ratio massique M810/PLA est estimé selon l'Equation 5 et la quantité de M810 dans les NCs selon les Equations 6 à 8.

Tableau III.1. Pics de référence de M810 pour les spectres RMN ^1H des NCs obtenues dans différentes conditions

Conditions	Pic de référence pour M810 (A_{M810})	Nombre de protons (x)	Déplacement chimique [ppm]
CuAAC	i	9	0,8
Thiol-ène	l	6	2,3
Présence d'OG	m, o	4	4,0-4,4

$$\text{Ratio massique M810/PLA} = \left(\frac{A_{M810}/x \cdot M_{M810}}{A_c \cdot M_{u.r.PLA}} \right) \quad [5]$$

$$\text{mg M810/25 mg PLA} = \left(\frac{A_{M810}/x \cdot M_{M810} \cdot m_{PLA}}{A_c \cdot M_{u.r.PLA}} \right) \cdot 1000 \quad [6]$$

$$\mu\text{L M810/25 mg PLA} = \frac{1}{d_{M810}} \cdot \left(\frac{A_{M810}/x \cdot M_{M810} \cdot m_{PLA}}{A_c \cdot M_{u.r.PLA}} \right) \cdot 1000 \quad [7]$$

$$\text{mg M810/g objets} = \frac{A_{M810}/x \cdot M_{M810} \cdot m_{PLA}}{A_c \cdot M_{u.r.PLA} \cdot (m_{PLA} + m_{M810})} \cdot 1000 \quad [8]$$

avec : A_{M810}/x – aire du pic de référence pour le M810 divisée par le nombre de protons correspondant (voir Tableau III.1),

A_c – aire du pic des protons méthine du PLA (vers 5,2 ppm). Cette aire est obtenue grâce à l'aire totale du pic vers 5,2 ppm correspondant aux protons c et aux protons n du M810. La contribution de ces derniers est estimée grâce à l'aire A_{M810} des protons i , l ou m , o du M810 (voir Tableau III.1), d'où : $A_c = A_{c+n} - A_{M810}/x$.

M_{M810} , $M_{u.r.PLA}$ – masses molaires de M810 (498 g/mol) et d'une unité de répétition du PLA (72 g/mol),

m_{PLA} , m_{M810} – masses de PLA (0,025 g) et de M810 (déterminée par l'Eq. 6) dans l'échantillon,

d_{M810} – densité du M810 (0,94 g/mL).

IV.2.2. Détermination du ratio molaire Dex/PLA

Le ratio molaire Dex/PLA est déterminé selon l'Equation 9.

$$\text{Ratio molaire Dex/PLA} = \frac{A_\alpha}{A_c} \quad [9]$$

avec : A_α – aire du pic des protons anomère des unités glucopyranose (vers 4,7 ppm),

A_c – aire du pic des protons méthine du PLA (vers 5,2 ppm). Cette aire est obtenue grâce à l'aire totale du pic vers 5,2 ppm correspondant aux protons c et aux protons n du M810. La

contribution de ces derniers est estimée grâce à l'aire A_{M810} des protons *i*, *l* ou *m*, *o* du M810 (voir Tableau III.1), d'où : $A_c = A_{c+n} - A_{M810}/x$.

IV.2.3. Détermination du taux de recouvrement en dextrane [mg/m²]

Le taux de recouvrement des nano-objets en dextrane est déterminé selon l'Equation 10.

$$\Gamma_{exp}[mg/m^2] = \left(\frac{A_\alpha \cdot 162 \cdot m_{PLA}}{A_c \cdot 72 \cdot (m_{PLA} + m_{M810}) \cdot S_p} \right) \cdot 1000 \quad [10]$$

avec : A_α – aire du pic des protons anomère des unités glucopyranose (vers 4,7 ppm),

A_c – aire du pic des protons méthine du PLA (vers 5,2 ppm). Cette aire est obtenue grâce à l'aire totale du pic vers 5,2 ppm correspondant aux protons *c* et aux protons *n* du M810. La contribution de ces derniers est estimée grâce à l'aire A_{M810} des protons du M810 (voir Tableau III.1), d'où : $A_c = A_{c+n} - A_{M810}/x$,

S_p – surface spécifique déterminée par granulométrie laser,

m_{PLA} , m_{M810} – masses de PLA (0,025 g) et de M810 (déterminée par l'Eq. 6) dans l'échantillon.

IV.2.4. Détermination de la solubilité maximale du gallate d'octyle dans le M810

Dans un pilulier contenant 2 mL de M810 on ajoute progressivement 10 mg d'OG jusqu'à saturation (~100 mg/2 mL M810). La solution est laissée à température ambiante sous agitation pendant toute la nuit. Le lendemain, la solution est centrifugée (19000 rpm, 1h, 15 °C) et le surnageant (solution saturée) est récupéré. Une masse connue de la solution saturée (14,8 mg) est transférée dans un tube RMN, puis une masse connue de phénol utilisé ici comme référence interne (4,4 mg) y est ajoutée. Le spectre RMN ¹H est réalisé dans le CDCl₃ (Figure III.8). Le phénol (Ph) a été choisi comme référence car son spectre RMN ¹H dans le CDCl₃ possède au moins un pic distinct des autres substances. La solubilité maximale d'OG est alors calculée grâce à l'Equation 11. Si la quantité de M810 est comparée à celle introduite initialement dans le tube RMN, un écart relatif de seulement 2,4% est obtenu. Ceci permet de montrer la pertinence des résultats obtenus par cette méthode.

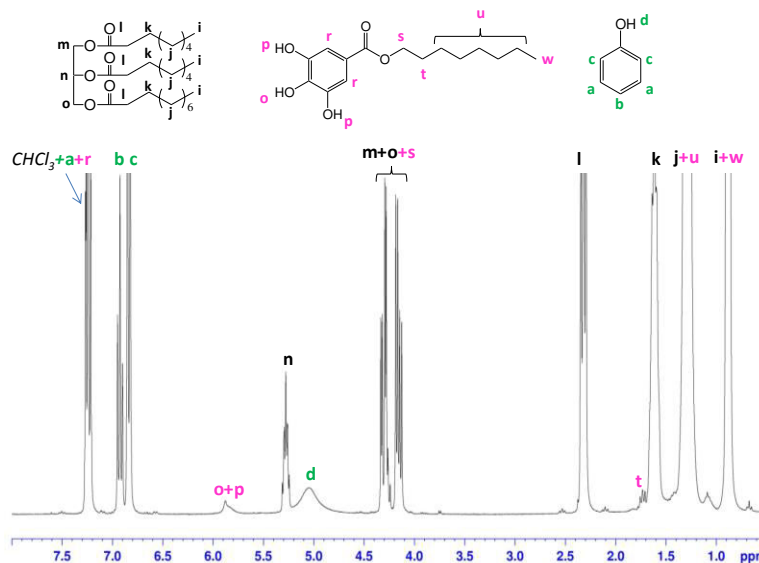


Figure III.8. Spectre RMN ^1H (CDCl_3) du M810 saturé en OG en utilisant phénol comme référence interne

$$\text{Solubilité maximale} = \frac{R_{OG/Ph}}{R_{M810/Ph}} \times \frac{M_{OG}}{M_{M810}} \times d_{M810} = 46,04 \frac{\text{mg OG}}{\text{mL M810}} \quad [11]$$

avec : $R_{OG/Ph} = \frac{A_{o+p/3}}{A_b}$ – ratio molaire des pics des protons –OH d’OG (vers 5,8 ppm) et du proton –CH de phénol (vers 6,9 ppm),

$R_{M810/Ph} = \frac{A_{l/6}}{A_b}$ – ratio molaire des pics des protons –CH₂ de M810 (vers 2,3 ppm) et du proton –CH de phénol (vers 6,9 ppm),

M_{OG} , M_{M810} – masses molaires d’OG et de M810 égales à 282 et 498 g/mol, respectivement,

d_{M810} – densité du M810 (0,94 g/mL).

IV.3. Distribution de taille (granulométrie laser)

La distribution de tailles des suspensions aqueuses de nano-objets est déterminée par granulométrie laser (Mastersizer 2000© Malvern Instruments) (Figure III.9).

Le principe de cette méthode repose sur la diffraction de la lumière. Ainsi, lorsqu'un faisceau laser éclaire une particule, des franges de diffraction sont observées et la variation angulaire de l'intensité de lumière diffusée est mesurée. Les grosses particules diffusent la lumière à de petits angles par rapport au faisceau laser et les petites particules diffusent la lumière à des angles supérieurs au faisceau laser. Les données relatives à l'intensité diffusée en fonction de l'angle sont analysées pour calculer les diamètres des particules qui ont créé l'image de diffraction, grâce à la théorie de Mie. Cette théorie fait intervenir les indices de réfraction de l'échantillon et du milieu porteur. Les diamètres des

particules donnés représentent les diamètres des sphères équivalentes, ayant le même volume que les particules analysées.

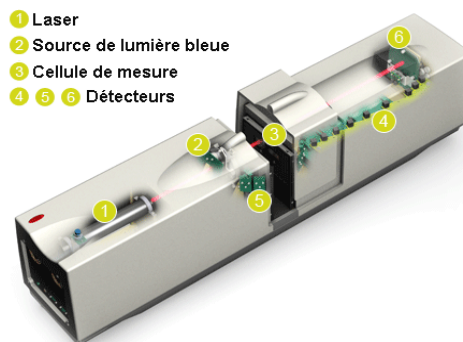


Figure III.9. Granulomètre Mastersizer 2000© Malvern⁷

Pour effectuer une mesure, il est nécessaire de connaître des indices de réfraction du milieu (eau : 1,33) et des objets (PLA : 1,407) et la densité des objets. La densité pour les NSs correspond à celle du PLA égale à 1,25 g/mL, tandis que la densité des NCs est calculée grâce à l'Equation 12.

$$d_{NCs} = \frac{m_{PLA} + m_{M810}}{m_{PLA}/d_{PLA} + m_{M810}/d_{M810}} \quad [12]$$

avec : m_{PLA} , m_{M810} – masses de PLA (0,025 g) et de M810 (l'Eq. 6, p. 206) dans les NCs,

d_{PLA} , d_{M810} – densité du PLA et du M810 (1,25 g/mL et 0,94 g/mL, respectivement).

En pratique, une mesure d'un blanc est réalisée au préalable. La cellule de l'appareil est alors remplie avec de l'eau Milli-Q, puis l'agitation et la pompe sont mises en marche. L'appareil détecte l'image de diffraction du blanc qui sera ensuite soustraite à l'image de diffraction de l'échantillon analysé. Pour effectuer une mesure de l'échantillon, la cellule de l'appareil est remplie avec de l'eau Milli-Q, puis quelques gouttes de suspension de nano-objets sont ajoutées pour obtenir une obscurité de laser entre 1 et 5%. Chaque mesure est effectuée trois fois.

IV.4. Mesures de la mobilité électrophorétique (détermination de l'épaisseur du recouvrement en dextrane)

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 III.10). La première couche appelée couche de Stern, correspond à la région la plus proche de la surface et comporte des contre-ions solidement liés. La seconde couche appelée couche de Gouy-Chapman, est plus diffuse et son épaisseur dépend de la force ionique du

milieu. Au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface de la particule, le potentiel chimique de la couche diffuse décroît.

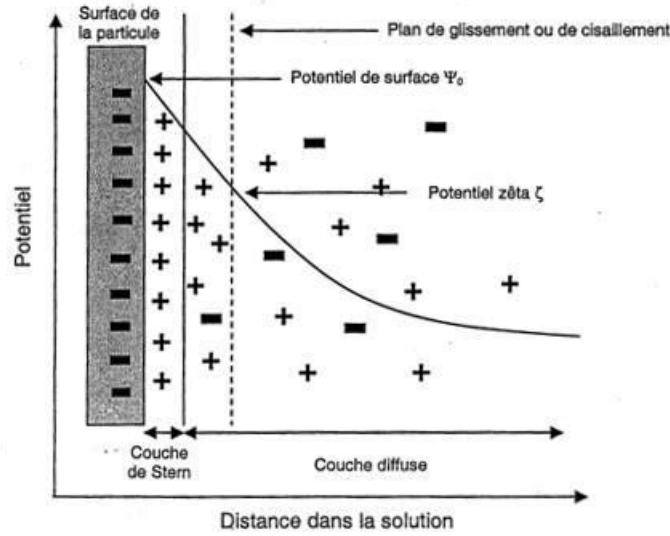


Figure III.10. Modélisation de la double-couche électrostatique autour d'une particule chargée⁸

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 et la force de frottement subie par les particules s'oppose à ce mouvement. Quand l'équilibre entre ces deux forces est atteint, les particules se déplacent à vitesse constante. Leur vitesse dépend du champ électrique, du milieu et de la charge de la particule. Sous l'effet des forces de frottement, la couche d'ions diffusés 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).

Les valeurs de potentiel Zêta (ζ) sont calculées à partir des mesures de mobilités électrophorétiques μ_E (exprimées en $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) et à l'aide de l'équation de Booth modifiée⁹ (Equation 13) comme dans les travaux menés précédemment au LCPM^{10, 11}.

$$\zeta(\text{mV}) = 25,7 \left[\frac{E}{f_1} - \left| \frac{C_3 \left(\frac{E}{f_1} \right)^3 + C_4 \left(\frac{E}{f_1} \right)^4}{f_1 + 3C_3 \left(\frac{E}{f_1} \right)^2 + 4C_4 \left(\frac{E}{f_1} \right)^3} \right| \right] \quad [13]$$

avec $E = 7520 \mu_E$ et f_1 est le facteur de correction de Henry, qui tient compte de la déformation du champ électrique autour des particules, alors que les effets de relaxation sont pris en compte par les coefficients C_3 , C_4 .

Cette équation permet de calculer le ζ pour toute valeur de k_H (k_H^{-1} est la longueur de Debye liée à la force ionique) et de a (rayon de la particule). Contrairement aux équations classiques du

Smoluchowski et Hückel qui ne peuvent être appliquées que dans deux cas limites, c'est-à-dire quand $k_H a > 100$ et $k_H a < 0.1$. Ensuite, afin d'estimer l'épaisseur du recouvrement, l'évolution du ζ versus k_H aux faibles concentrations en sel peut être approximée par une équation d'Eversole et de Boardman¹² (Equation 14). La valeur absolue de la pente correspond ainsi au Δ_{PZ} (voir Figure III.11 à l'exemple des NCs cliquées).

$$\ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \zeta}{4 k_B T} \right) \right] = \ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \psi_0}{4 k_B T} \right) \right] - k_H \cdot \Delta_{PZ} \quad [14]$$

avec : Z – valence de l'ion considéré dans le milieu,

e – charge élémentaire de l'électron ($1,6022 \times 10^{-19}$ C),

k_B – constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23}$ J.K⁻¹),

T – température absolue du milieu (298 K),

ψ_0 – potentiel de surface de la particule.

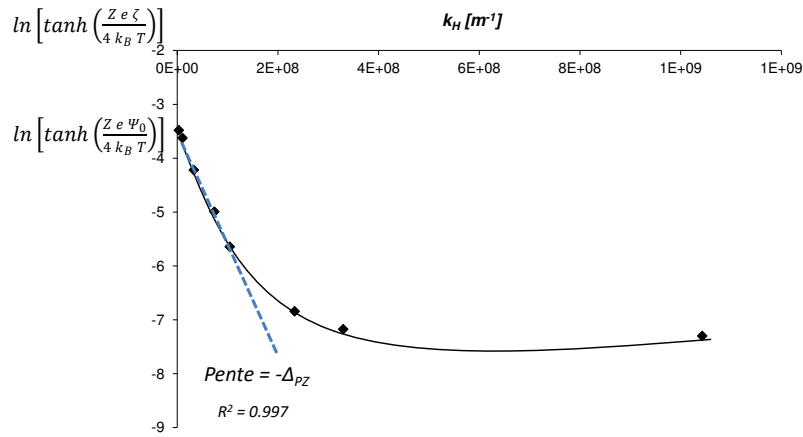


Figure III.11. Exemple de détermination de Δ_{PZ} , d'après les valeurs de potentiel ζ des NCs cliquées. Les calculs sont réalisés en utilisant l'équation d'Eversole et Boardman, et en fonction du paramètre de Debye-Hückel k_H

Ainsi, la mobilité électrophorétique est mesurée dans des solutions de NaCl de concentration variable (de 10^{-6} à 10^{-2} mol/L) et à l'aide de Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments). Pour cela, quelques gouttes de suspension des NPs cliquées ou non sont ajoutées à 5 mL d'une solution de NaCl de façon que la concentration finale en NPs soit d'environ 0,01% m. La cuvette d'analyse est tout d'abord rincée avec de l'eau Milli-Q, puis avec de la suspension à analyser. Enfin, cette cuvette est remplie de suspension des NPs, en veillant à ne pas introduire de bulles d'air, et fermée par des bouchons de deux côtés.

IV.5. Stabilité colloïdale en présence de NaCl

La stabilité colloïdale des dispersions aqueuses des nano-objets est étudiée par turbidimétrie à l'aide d'un spectrophotomètre UVikon (Bio-Tek Instruments). Les NCs clickées ou non sont préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale. 0,5 mL de la dispersion de ces NCs dans l'eau (à $C = 5,4 \text{ mg/mL}$) est ajouté dans des cuves spectrophotométriques remplies avec 3 mL de solution NaCl de concentration variable (de 10^{-4} à 4 mol/L). Les cuves sont agitées manuellement et laissées au repos à température ambiante pendant une heure. Juste avant la mesure les cuves sont à nouveau agitées. Des mesures de la densité optique (DO) de ces suspensions sont effectuées entre 450 nm et 650 nm avec des intervalles de 50 nm. Pour chaque concentration en NaCl, la courbe $\log(\text{DO})$ en fonction de $\log(\lambda)$ est tracée et la pente $d(\log \text{OD})/d\lambda$ est calculée.

IV.6. Stabilité du recouvrement en dextrane en présence d'un tensioactif compétitif

1% massique de SDS est ajouté dans la suspension aqueuse des NPs lavées et le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24h. Ensuite, les NPs sont centrifugées, lavées 2 fois comme pendant leur élaboration et enfin lyophilisées. Un spectre RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) est réalisé à partir des NPs avant et après le traitement par le SDS afin de déterminer la quantité de dextrane résiduel.

IV.7. Calorimétrie Différentielle à Balayage Modulée (MDSC)

La technique MDSC, par rapport à la DSC conventionnelle, permet de séparer le flux de chaleur total en deux parties : un flux inversible (qui répond linéairement à la variation de la vitesse de chauffage) et un flux non inversible (qui dépend du temps et de la température absolue et donc qui ne répond pas linéairement à la variation de la vitesse de chauffage). Le flux inversible permet de détecter la capacité calorifique (C_p), la température de transition vitreuse (T_g) ou la température de fusion (T_f), tandis que le flux non inversible permet d'observer par exemple des phénomènes tels que la cristallisation, l'évaporation, la réticulation, la décomposition ... L'analyse MDSC se réalise à deux vitesses de chauffage: moyenne (linéaire) et modulée (sinusoïdale). Ceci permet d'obtenir en même temps des bonnes résolution et sensibilité (capacité à détecter les transitions dans l'échantillon), meilleures qu'en utilisant la DSC classique.

Au cours de cette thèse, des analyses thermiques sont réalisées en utilisant un calorimètre différentiel à balayage en mode modulé (Q2000, TA Instruments). La méthode opératoire consiste en trois cycles de chauffage et refroidissement de -25°C à 200°C (ou 220°C) sous flux continu de N_2 avec une vitesse constante de 5°C/min , en modulant $\pm 1^\circ\text{C}$ chaque 40s. Les échantillons (environ 10 mg ;

séchés à l'étuve sous vide pendant une nuit) sont introduits dans des creusets en aluminium (Tzero Aluminium) et placés dans le passeur automatique de l'appareil avec un autre creuset, vide, servant de référence. Un exemple du thermogramme MDSC est présenté dans la Figure III.12 dans le cas du mélange PLA_{comm}/M810 (19:81; m/m).

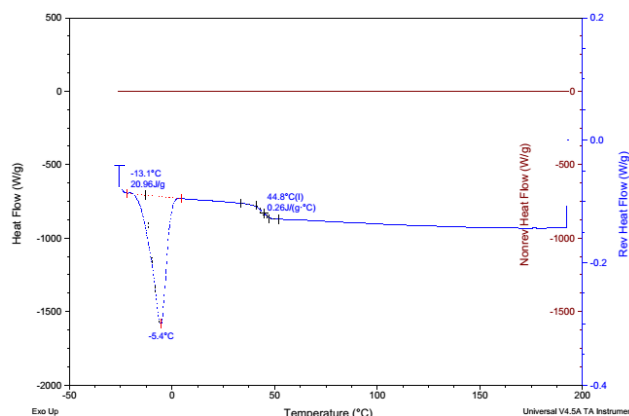


Figure III.12. Exemple du thermogramme MDSC (flux inversible) du mélange PLA_{comm}/M810 (19:81 m/m)

Des analyses MDSC des mélanges PLA/OG en proportions variables (Partie II, Chapitre IV, Paragraphe II.1., p. 171) ont été réalisées par Asma Chebil (thèse en cours). Les résultats sont regroupés dans le Tableau III.2.

Tableau III.2. Résultats des analyses MDSC des différents mélanges PLA/OG. Les analyses réalisées au LCPM au cours de la thèse d'Asma Chebil en cours

N°	Composition de l'échantillon	F _{PLA} [% m]	F _{OG} [% m]	T _g [°C]	T _f [°C]
1	PLA	100	0	53	—
2	OG	0	100	—	90
3	PLA/OG	90	10	39	—
4		85	15	34	—
5		75	25	26	—
6		67	33	16	—
7		50	50	7	81

IV.8. Microscopie Electronique à Transmission

Les NPs ont été observées par Microscopie Electronique à Transmission à basse température (cryo-TEM) à l'aide d'un appareil Philips CM120 (120 kV). Les échantillons ont été préparés en mettant quelques gouttes de la suspension aqueuse des NPs sur un support de cuivre recouvert par une couche fine de carbone. Les échantillons sont ensuite congelés dans de l'éthane liquide et puis

transférés dans de l'azote liquide pour stockage. Pour plus de contraste, dans certains cas, les NPs préparées avec du PLA α -alcyne ont été marquées avec de l' OsO_4 .

Afin de prouver la morphologie cœur liquide/écorce de NCs, des objets lyophilisés ont été enrobés dans une résine Epofix qui est ensuite polymérisée pendant 2h à 60°C et finalement coupée par tranches de 60 nm à l'aide d'un cryo-ultramicrotome. Ensuite, les échantillons ont été observés par TEM classique. Toutes ces analyses ont été réalisées au Centre Technologie des Microstructures, Université Lyon 1, France.

IV.9. Détermination de la quantité de cuivre résiduel

Afin d'éliminer le maximum de cuivre des nano-objets, environ 5 éq. d'EDTA par Cu sont ajoutés dans une suspension aqueuse des NCs non-lavées, préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale. La suspension est laissée sous agitation, à température ambiante, pendant une nuit. Ensuite, elle est centrifugée et lavée 2 fois avec de l'eau Milli-Q. Après lyophilisation, des NCs sont solubilisées dans 5 mL de la solution aqueuse d'acide nitrique HNO_3 à 2% massique à température ambiante, pendant une nuit. Avant l'analyse, des échantillons sont filtrés en utilisant des filtres de porosité 0,45 μm .

La quantité de cuivre résiduel dans les NCs finales est déterminée par spectrométrie par torche à plasma (ICP-OES) à l'aide d'un spectromètre ICAP 6000 (Thermo Scientific). L'appareil est calibré avec des solutions de concentrations variant de 0 à 5 ppm en CuSO_4 . Cet appareil est situé à l'ENSIC (TP chimie analytique).

IV.10. Cinétique de libération de la SA

La cinétique de libération de la SA à partir des NPs est suivie par dialyse dans l'eau, à température ambiante en utilisant une membrane (Standard RC tubing, MWCO: 12–14 kD) fournie par Spectral Laboratories. Après centrifugation des NPs, le surnageant est enlevé puis l'échantillon est redispersé dans 25 mL d'eau Milli-Q à l'aide d'un bain à ultrasons (environ 15-20 min). La membrane de dialyse de la longueur d'environ 27 cm est remplie avec 4 mL de la suspension des NPs lavées et fermée avec des nœuds des deux côtés. Environ 8 boudins de dialyse sont préparés pour chaque lot de NPs. Une fois les membranes remplies, elles sont introduites dans un bécher contenant 2 L d'eau distillée et sont laissées sous agitation (environ 200 rpm) jusqu'au premier prélèvement après 1h. L'eau dans le bécher est changée deux fois par jour. Chaque échantillon prélevé est congelé dans l'azote liquide, lyophilisé puis analysé par RMN ^1H dans du $\text{DMSO-}d_6$ + 2 gouttes de D_2O .

IV.11. Détermination du rayon interne de la nanocapsule

Le rayon interne de la nanocapsule r_i est estimé en tenant compte du volume d'huile M810 encapsulée selon l'Equation 15.

$$r_i = \sqrt[3]{\frac{3 \cdot V_{M810 \text{ final}}}{4\pi \cdot N_{NCs}}} \quad [15]$$

$$N_{NCs} = \frac{3}{4\pi \left(\frac{d[3:2]_{NC}}{2}\right)^3} \cdot \left(\frac{m_{PLA}}{d_{PLA}} + V_{M810 \text{ final}}\right) \quad [16]$$

avec : r_i – rayon interne de la nanocapsule,

$V_{M810 \text{ final}}$ – volume réel du M810 encapsulé à l'intérieur des NCs (voir Partie II, Chapitre III, Tableau II.12, p. 139),

$d[3:2]_{NC}$ – diamètre moyen en surface des NCs,

N_{NCs} – nombre de NCs dans la suspension,

m_{PLA} – masse du PLA initialement introduite (0,025 g),

d_{PLA} – densité du PLA (1,25 g/mL).

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Xia, J. H.; Matyjaszewski, K., Controlled/"living" radical polymerization. Atom transfer radical polymerization catalyzed by copper(I) and picolylamine complexes. *Macromolecules* **1999**, 32, (8), 2434-2437.
2. Laville, M.; Babin, J.; Londono, I.; Legros, M.; Nouvel, C.; Durand, A.; Vanderesse, R.; Leonard, M.; Six, J.-L., Polysaccharide-covered nanoparticles with improved shell stability using click-chemistry strategies. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 93, (2), 537-546.
3. Zhang, W. L.; Huang, J.; Fan, N. Q.; Yu, J. H.; Liu, Y. B.; Liu, S. Y.; Wang, D. X.; Li, Y. P., Nanomicelle with long-term circulation and enhanced stability of camptothecin based on mPEGylated alpha,beta-poly (L-aspartic acid)-camptothecin conjugate. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2010**, 81, (1), 297-303.
4. Brase, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V., Organic azides: An exploding diversity of a unique class of compounds. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, (33), 5188-5240.
5. Dupayage, L. Elaboration contrôlée de glycopolymères amphiphiles à partir de polysaccharide: synthèse de Dextrane-g-PMMA par polymérisation radicalaire par transfert d'atome. INPL, Nancy, 2009.
6. Soliman, S. M. A. From photosensitive glycopolymers to smart drug delivery systems. Université de Lorraine, Nancy, 2014.
7. Manuel d'utilisation du granulomètre Mastersizer2000© Malvern. In.
8. Wu, M. Synthèse de nanoparticules à propriétés de surface contrôlées par polymérisation en miniémulsion pour la vécotorisation de molécules actives. INPL, Nancy, 2007.
9. Deshiikan, S. R.; Papadopoulos, K. D., Modified Booth equation for the calculation of zeta potential. *Colloid and Polymer Science* **1998**, 276, (2), 117-124.
10. Rouzes, C.; Gref, R.; Leonard, M.; Delgado, A. D.; Dellacherie, E., Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 50, (4), 557-565.

11. Delgado, A. D.; Leonard, M.; Dellacherie, E., Surface modification of polystyrene nanoparticles using dextrans and dextran-POE copolymers: Polymer adsorption and colloidal characterization. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2000**, 11, (12), 1395-1410.
12. Eversole, W. G.; Boardman, W. W., The Effect of Electrostatic Forces on Electrokinetic Potentials. *Journal of Chemical Physics* **1941**, 9, 798.

LISTE DES FIGURES

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I.1. Nanoparticules polymères: a) nanosphère, b) nanocapsule	10
Figure I.2. Nanosphères polymères contenant une substance active: a) encapsulée à l'intérieur, b) adsorbée en surface, c) accrochée chimiquement à la surface.....	12
Figure I.3. Nanoparticules polymères: a) nanosphère, b-c) nanocapsules à cœur liquide, d) nanocapsule creuse (à cœur vide).....	13
Figure I.4. Nanoparticules polymères recouvertes d'une couronne de polymère hydrophile: a) nanosphère, b) nanocapsule.....	22
Figure I.5. Différentes morphologies des capsules: a) cœur/écorce, b) « gland », c) poreuse, d) nanoparticule et nano-gouttelette d'huile séparées.....	31
Figure I.6. Exemples de bases utilisées dans la réaction de chimie « click » CuAAC : a) <i>N,N,N',N',N''</i> -pentaméthyl-diéthylène-triamine, b) <i>N,N</i> -diisopropyléthylamine, c) 2,2'-bipyridine, d) 2,6-diméthylpyridine	48
Figure I.7. Agents réducteurs utilisés dans la réaction de chimie « click » CuAAC: a) ascorbate de sodium, b) chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyle) phosphine.....	50
Figure I.8. Phosphines utilisées en tant que catalyseurs nucléophiles dans la réaction thiol-ène : a) diméthylphénylphosphine, b) méthyldiphénylphosphine, c) triphénylphosphine, d) tri- <i>n</i> -propylphosphine, e) chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl) phosphine.....	54
Figure I.9. Exemples de composés avec une double liaison activée utilisés dans la réaction thiol-Michael (classés selon la réactivité décroissante): a) maléimide, b) fumarate, c) maléate, d) acrylate, e) acrylamide, f) crotonate, g) cinnamate, h) méthacrylate, i) méthacrylamide	55
Figure I.10. Un groupement chromophore cétone aromatique.....	56
Figure I.11. Exemples d'amines tertiaires utilisées comme réducteurs dans les réactions redox : a) <i>N,N</i> -diméthyle- <i>p</i> -toluidine, b) <i>N,N</i> -bis-(2-hydroxyéthyle)- <i>p</i> -toluidine, c) alcool 4- <i>N,N</i> -diméthylaminophénylique	59

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

Figure II.1. Spectres RMN ¹ H (dans CDCl ₃) des différents polylactides utilisés dans ces travaux : PLA α,ω -dihydroxy (commercial) (I), PLA α-alcyne (II), PLA-SS-PLA (III) et mélange PLA-SS-PLA/PLA α-SH (IV)	92
Figure II.2. Superposition de chromatogrammes SEC-MALLS obtenus dans le THF (détection réfractométrique) du polymère de départ (PLA-SS-PLA) et du polymère après la réduction (PLA α-SH)	96
Figure II.3. Structure quasi-linéaire du dextrane.....	97
Figure II.4. Différents dérivés du dextrane utilisés au LCPM: a) phénoxy (DexP), b) hexyle (DexC ₆), c) décyle (DexC ₁₀), d) azide (DexN ₃), e) alcène (DexC ₆ C=C), f) méthacrylate (DexC=C).....	98
Figure II.5. Spectres RMN ¹ H (dans DMSO- <i>d</i> ₆) du dextrane et de ses dérivés : I) Dextrane natif, II) DexN ₃ , III) DexC=C, IV) DexC ₆ C=C	102

Figure II.6. Chromatogrammes SEC-MALLS obtenus dans le DMSO/NaNO ₃ 0,1 M (détection réfractométrique) du dextrane natif (Dex-natif), du DexN ₃ -23, du DexC=C-20 et du DexC ₆ C=C-21	103
Figure II.7. Evolution de la tension superficielle des différents dérivés du dextrane solubilisés dans le milieu aqueux en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes. Les mesures ont été réalisées à 25 °C par méthode de l'anneau Du Noüy.....	105
Figure II.8. Etudes de la tension interfaciale CH ₂ Cl ₂ /solution aqueuse du DexN ₃ -17 en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes. Les mesures ont été réalisées à 25 °C par méthode de l'anneau Du Noüy	106
Figure II.9. Spectres RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) : (I) mélange physique PLA α-alcyne + DexN ₃ , (II) NSs et (III) NCs lyophilisées après avoir réalisé une réaction « click » CuAAC entre un PLA α-alcyne solubilisé dans la phase organique (25 g/L) et un DexN ₃ présent dans l'eau (5g/L) lors du procédé d'émulsion-évaporation de solvant.....	112
Figure II.10. Chromatogrammes SEC-MALLS (détection réfractométrique) du PLA α-alcyne, du DexN ₃ -23 et des NCs obtenues avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale et dissoutes dans du DMSO. Eluant : DMSO + 0,1 M NaNO ₃	113
Figure II.11. Spectres RMN ¹ H (dans DMSO- <i>d</i> ₆) du mélange physique PLA α-SH + DexC=C (I) et du copolymère dextrane- <i>g</i> -PLA purifié et produit par la réaction thiol-ène (II) entre le DexC=C-34 (1 éq. de C=C) et le PLA α-SH ($\overline{M}_n \sim 3\ 100$ g/mol, 1,5 éq. SH /C=C) dans le DMSO (% click = 100)	121
Figure II.12. Spectres RMN 2D ¹ H – ¹³ C (HSQC) (DMSO- <i>d</i> ₆) du produit de la réaction thiol-ène entre le DexC=C-20 et le PLA α-SH dans le DMSO (100% click) (II) et du mélange physique PLA α-SH + DexC=C dans les mêmes proportions que dans le copolymère (I)	122
Figure II.13. Superposition des chromatogrammes SEC-MALLS (détection réfractométrique) du PLA α-SH, du DexC=C-20 et du copolymère Dex- <i>g</i> -PLA obtenu par la réaction thiol-ène en DMSO. Eluant : DMSO + 0,1 M NaNO ₃	123
Figure II.14. Spectre RMN ¹ H (dans DMSO- <i>d</i> ₆) des NCs lyophilisées avant leurs lavages obtenues par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction thiol-ène <i>in situ</i> (voir expérience NC, Tableau II.9)	126
Figure II.15. Spectres RMN ¹ H (dans DMSO- <i>d</i> ₆) d'une suspension PLA α-SH + DexC ₆ C=C + DMPA lyophilisée avant l'irradiation UV (I) et du produit de la réaction thiol-ène radicalaire (II) entre le DexC ₆ C=C-21 et le PLA α-SH ($\overline{M}_n \sim 3\ 100$ g/mol) à l'interface d'une émulsion.....	130
Figure II.16. Distributions de taille obtenue par granulométrie laser : a) NCs clickées avant et après lavages, b) NPs non-clickées, après lavages, c) NPs clickées, après lavages. Les NPs sont préparées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant avec ou sans réaction « click » et en utilisant du PLA α-alcyne, α-SH ou commercial (25 g/L) et le DexN ₃ -23 ou le DexC=C-28 (5 g/L) (comme stabilisant). Pour les NCs, 10% vol de M810 ont été ajoutés dans la phase organique initiale.	137
Figure II.17. Influence de la quantité de M810 sur le diamètre moyen en surface d[3:2] des NPs lavées: (●) NPs clickées, (■) NPs non-clickées, --- diamètre moyen en surface théorique (D) calculé par l'Equation 14, p. 138. La quantité du PLA dans la phase organique ainsi que la quantité du DexN ₃ -23 dans la phase aqueuse sont constantes et égales à 25 g/L et 5 g/L, respectivement.	138
Figure II.18. Evolution du potentiel Zêta de nano-objets clickés ou non en dispersion dans une phase aqueuse de NaCl de 10 ⁻⁶ à 10 ⁻² mol/L. Cas des NPs préparées par procédé d'émulsion-évaporation de solvant en utilisant le DexN ₃ -23 en tant que stabilisant (sauf NCs nues): (■) NSs clickées, (X) NCs clickées, (▲) NCs non-clickées, (◆) NSs non-clickées, (●) NCs nues. La réaction « click » est réalisée	

en utilisant 5,5 éq. CuSO₄/alcyne (+10 éq. AAsc/CuSO₄) comme catalyseur. Les NCs sont préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale..... 142

Figure II.19. Représentation schématique de la contraction volumique de NCs clickées ou non-clickées lors de l'évaporation du CH₂Cl₂. Les valeurs de Γ_{exp} et de Δ_{PZ} sont données pour des NCs préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale et en utilisant du DexN₃-23 comme stabilisant..... 145

Figure II.20. Comparaison entre le taux de recouvrement expérimental (Γ_{exp} ; calculé par l'Eq. 10, Partie III, p. 207) et théorique ($\Gamma_{\text{théorique}}$; calculé par l'Eq. 19, p. 145) des NCs clickées. La ligne pointillée représente la première diagonale..... 147

Figure II.21. Variations du taux de recouvrement en dextrane (DexN₃-23) (Γ_{exp}) en fonction de l'épaisseur du recouvrement (Δ_{PZ}) obtenue à partir de valeurs de potentiel Zêta (ζ). Les erreurs expérimentales correspondent à la déviation standard calculée grâce aux Eq. 3 et 4 (Partie III, p. 204) 148

Figure II.22. Stabilité colloïdale de NCs en présence de NaCl. Les NCs ont été préparées par le procédé d'émulsion- évaporation solvant en utilisant 10%vol. de M810 dans la phase organique initiale et en réalisant ou non *in situ* la réaction de chimie « click » CuAAC ou thiol-ène nucléophile (voir détails dans le Tableau II.14)..... 150

Figure II.23. Comparaison des spectres RMN ¹H (dans DMSO-*d*₆) des NCs obtenues par émulsion-évaporation de solvant avec le DexN₃-23 comme stabilisant et en réalisant *in situ* la réaction de chimie « click » CuAAC (B) ou non (A). Les spectres sont comparés avant et après traitement par le SDS (1% massique en milieu aqueux) 152

Figure II.24. Influence de l'efficacité de la réaction « click » (% click) sur la désorption du DexN₃-23 dans le cas de NSs préparées par procédé d'émulsion-évaporation de solvant dans des différentes conditions catalytiques. La tendance probable est indiquée par la ligne pointillée..... 154

Figure II.25. Représentation schématique de l'immobilisation chimique d'une chaîne de DexN₃ à la surface de NPs de PLA dans le cas d'un couplage « click » CuAAC entre un PLA α -alcyne et un DexN₃ 154

Figure II.26. Nanocapsule clickée à écorce PLA, cœur M810 et recouverte de dextrane 159

Figure II.27. Micrographies cryo-MET des NPs en suspension dans l'eau : a) NSs, b) NCs non-clickées, c) NCs clickées par réaction CuAAC. NCs ont été préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale..... 159

Figure II.28. Micrographies MET après la coupe des NPs lyophilisées : a) NCs clickées préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale, b) NSs..... 160

Figure II.29. Relation linéaire entre l'efficacité d'encapsulation et un des paramètres de solubilité de Hansen (δ_h) pour la SA (huile) dans l'écorce polymère et l'efficacité d'encapsulation⁴⁴ 165

Figure II.30. Représentation des différents profils de libération de la SA à partir des particules polymères : capsules (A-D), sphères (E) (Image inspirée par référence ⁴⁶) 168

Figure II.31. Représentation de morphologies différentes des objets : a) capsule, b) sphère 170

Figure II.32. Comparaison des distributions de tailles des NCs lavées et préparées avec des quantités variables de l'OG (de 0 à 15 mg) dans la phase organique initiale (0,1 mL M810 + 0,9 mL AcOEt) et en réalisant une réaction CuAAC *in situ*. DexN₃-23 est utilisé comme stabilisant. Les diamètres entre parenthèses correspondent aux d[3:2] 174

Figure II.33. Exemple d'un spectre RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6 + 2$ gouttes D_2O) des NCs PLA/OG	175
Figure II.34. Cinétiques de libération de l'OG à partir des NCs et NSs préparées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » CuAAC ($n = 2$). Le %OG libéré a été calculé selon l'équation suivante : $\% \text{OG libéré} = \frac{m_{\text{OG}t} - m_{\text{OG}0}}{m_{\text{OG}0}} \cdot 100$ où $m_{\text{OG}0}$, $m_{\text{OG}t}$ correspondent aux masses d'OG à temps initial et à temps t calculées grâce à l'Eq. 26, p. 173. Diamètres entre parenthèses correspondent aux $d[3:2]$	178

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

Figure III.1. Spectre RMN ^1H (CDCl_3) du milieu réactionnel brut (avant purification) dans le cas de la synthèse du PLA α -alcyne 1	193
Figure III.2. Exemple d'un chromatogramme SEC-MALLS, détection réfractométrique, éluant THF (PLA α -alcyne ; $\overline{M}_n = 3\,900$ g/mol, $\overline{D} = 1,2$)	193
Figure III.3. Spectre RMN ^1H de l'acide 6-azidohexanoïque dans CDCl_3	195
Figure III.4. Spectre RMN ^1H de l'acide 6-azidohexanoïque activé par l'imidazole dans CDCl_3	196
Figure III.5. Spectre RMN ^1H de l'acide hex-5-énoïque activé par l'imidazole dans CDCl_3	198
Figure III.6. Spectres RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) des NCs lyophilisées après avoir réalisé une réaction de chimie « click » : a) CuAAC entre un PLA α -alcyne et un DexN_3 , b) thiol-ène nucléophile entre un PLA α -SH et un $\text{DexC}=\text{C}$	206
Figure III.7. Spectres RMN ^1H des NCs lyophilisées, clickées par réaction CuAAC et avec de l'OG encapsulé, réalisés dans $\text{DMSO}-d_6$ (en bas) ou dans $\text{DMSO}-d_6 + 2$ gouttes D_2O (en haut).....	206
Figure III.8. Spectre RMN ^1H (CDCl_3) du M810 saturé en OG en utilisant phénol comme référence	208
Figure III.9. Granulomètre Mastersizer 2000© Malvern ⁷	209
Figure III.10. Modélisation de la double-couche électrostatique autour d'une particule chargée ⁸	210
Figure III.11. Exemple de détermination de Δp_z , d'après les valeurs de potentiel ζ des NCs clickées. Les calculs sont réalisés en utilisant l'équation d'Eversole et Boardman, et en fonction du paramètre de Debye-Hückel k_H	212
Figure III.12. Exemple du thermogramme MDSC (flux réversible) du mélange PLA _{comm} /M810 (19:81 m/m)	214

LISTE DES SCHEMAS

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Schéma I.1. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé de nanopréciipitation.....	25
Schéma I.2. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé d'émulsion-diffusion.....	26
Schéma I.3. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant ..	27
Schéma I.4. Elaboration de NCs à cœur aqueux par le procédé de double émulsification	28
Schéma I.5. Elaboration des NCs à cœur huileux par le procédé d'émulsion-coacervation	29
Schéma I.6. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé de polymérisation en chaîne en miniémulsion directe	31
Schéma I.7. Elaboration des NCs à cœur liquide par le procédé couche-par-couche à partir d'un cœur sacrificiel dur : 1°) synthèse d'un cœur dur, 2°) fonctionnalisation éventuelle de la surface du cœur, 3°) formation couche-par-couche de l'écorce polymère autour du template dur, 4°) élimination du cœur sacrificiel, 5°) remplissage du cœur par une solution contenant la SA par imprégnation, 6°) redispersion des NCs dans l'eau.....	34
Schéma I.8. Synthèse de NCs vides par le procédé couche-par-couche par réaction de polymérisation RAFT à partir de la surface en utilisant des nanosphères de silice comme templates (adapté de la référence ¹²⁵). tBMA = méthacrylate de <i>tert</i> -butyle, DMIPM = méthacrylate de 2,3-diméthylimidopropyle, HPMA =N-(2-hydroxypropyle) méthacrylamide	34
Schéma I.9. Synthèse de NCs à cœur huileux par le procédé couche-par-couche à partir de la surface d'une nano-gouttelette d'émulsion chargée positivement (adapté de la référence ⁷³).....	36
Schéma I.10. Elaboration des NCs à cœur huileux par le procédé de dépôt d'une couche polymère (« polymer coating »).....	37
Schéma I.11. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé de polymérisation par étapes à l'interface d'une gouttelette de miniémulsion.....	39
Schéma I.12. Elaboration de NCs à cœur huileux par le procédé de polymérisation en chaîne à l'interface d'une gouttelette de miniémulsion.....	41
Schéma I.13. Elaboration des MCs à cœur CHCl ₃ par réaction « click » CuAAC à l'interface CHCl ₃ /eau.....	42
Schéma I.14. Elaboration des NCs à cœur aqueux par réaction « click » thiol-ène à l'interface eau/CH ₂ Cl ₂ (adapté de la référence ¹⁶⁶)	43
Schéma I.15. Elaboration des NCs vides par réaction « click » thiol-ène photo-amorcée à l'interface CHCl ₃ /eau (adapté de la référence ¹⁶⁷)	44
Schéma I.16. Réactions de cycloaddition azide-alcyne : a) non-catalysée, b) catalysée par Cu(I)	45
Schéma I.17. Modification de D-glucose via une transformation « one-pot multi-step » impliquant la réaction de chimie « click » CuAAC ¹⁷⁵	47
Schéma I.18. Mécanisme proposé de la réaction CuAAC ¹⁷⁹	48
Schéma I.19. Réaction de chimie « click » CuAAC entre des alcynes terminaux et un nucléoside (1-(4'-azido-2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl) cytosine) ¹⁸⁰	49
Schéma I.20. Génération de Cu(I) à partir de sels de Cu(II)	50

Schéma I.21. Réaction de chimie « click » CuAAC réalisée à l'interface entre deux solvant non-miscibles et catalysée par CuSO ₄ /NaAsc (inspiré par ¹⁸³)	51
Schéma I.22. Deux principaux mécanismes de la réaction thiol-ène: a) nucléophile ou basique, b) radicalaire	52
Schéma I.23. Mécanisme de la réaction thiol-ène catalysée par une molécule nucléophile (XR ₃) ¹⁸⁸ ..	53
Schéma I.24. Mécanisme de la réaction thiol-ène catalysée par une base ¹⁸⁷ . B correspond à une base et EWG aux groupes attracteurs d'électrons (ang. Electron Withdrawing Groups)	54
Schéma I.25. Mécanisme radicalaire de la réaction thiol-ène ¹⁹⁰	56
Schéma I.26. Mécanisme d'amorçage de la réaction thiol-ène en utilisant un photo-amorceur de type I, dans l'exemple du DMPA ¹⁸⁹	58
Schéma I.27. Mécanisme d'amorçage de la réaction thiol-ène en utilisant un photo-amorceur de type II. Cas de la BP ¹⁹⁸	58
Schéma I.28. Mécanisme de formation de radicaux par un système BPO/amine tertiaire ²⁰⁶	61

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

Schéma II.1. Voies de synthèse du polylactide	88
Schéma II.2. Synthèse du PLA α -alcyne par polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide catalysée par SnOct ₂ et amorcée par l'alcool propargylique	89
Schéma II.3. Synthèse du PLA α -SH : I) Synthèse du PLA-SS-PLA par polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide, II) Réduction des liaisons disulfure en thiol	90
Schéma II.4. Synthèse d'un macroamorceur PLA d'ATRP : a) synthèse de l'amorceur fonctionnel, b) POC du D,L-LA ¹¹	90
Schéma II.5. Réduction d'une liaison disulfure à l'aide du DTT ¹³	91
Schéma II.6. Synthèse du dextrane-azide (DexN ₃) par réaction entre le dextrane natif et l'acide 6-azidohexanoïque activé	99
Schéma II.7. Synthèse du dextrane-méthacrylate (DexC=C) par réaction entre le dextrane natif et l'anhydride méthacrylique.....	100
Schéma II.8. Synthèse du dextrane-alcène (DexC ₆ C=C) par réaction entre le dextrane natif et l'acide 5-hexenoïque activé.....	101
Schéma II.9. Synthèse des NCs de PLA à cœur M810 et recouvertes de dextrane par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » à l'interface de l'émulsion huile-dans-eau. Des NSs seront obtenues s'il n'y a pas de M810 dans la formulation initiale	110
Schéma II.10. Réaction « click » CuAAC entre un DexN ₃ et un PLA α -alcyne.....	111
Schéma II.11. Réaction « click » thiol-ène nucléophile entre un DexC=C et un PLA α -SH	120
Schéma II.12. Réaction « click » thiol-ène entre un DexC ₆ C=C et un PLA α -SH dans les conditions radicalaires.....	128

Schéma II.13. Mécanismes principaux de libération prolongée de la SA à partir d'une capsule polymère	166
---	-----

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

Schéma III.1. Synthèse du PLA α -alcyne par polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide catalysée par SnOct ₂ et amorcée par l'alcool propargylique	192
Schéma III.2. Synthèse du PLA-SS-PLA par polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide catalysée par SnOct ₂ et amorcée par le 2-hydroxyéthyl disulfide	193
Schéma III.3. Réduction du PLA-SS-PLA avec du DTT	194
Schéma III.4. Synthèse de l'acide 6- azidohexanoïque	195
Schéma III.5. Synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohexanoïque	196
Schéma III.6. Réaction du dextrane avec l'acide 6-azidohexanoïque activé	197
Schéma III.7. Réaction du dextrane avec l'anhydride méthacrylique.....	197
Schéma III.8. Synthèse de l'ester activé de l'acide hex-5-énoïque.....	198
Schéma III.9. Réaction du dextrane avec l'acide hex-5-énoïque activée.....	199
Schéma III.10. Préparation des NSs ou des NCs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » CuAAC en utilisant différents catalyseurs: a) CuBr ou CuI, b) CuSO ₄ ($\pm$ BPMODA)/AAsc	199
Schéma III.11. Préparation des NSs ou des NCs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » thiol-ène dans des conditions nucléophiles	201
Schéma III.12. Préparation des NSs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » thiol-ène dans les conditions radicalaires	202

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I.1. Structures de certains polymères biodégradables d'origine naturelle ou synthétiques utilisés pour former des NPs	11
Tableau I.2. Exemples d'huiles non-volatiles utilisées dans la formulation de NCs	16
Tableau I.3. Exemples d'huiles qui se solidifient à température ambiante	17
Tableau I.4. Applications des NCs polymères à cœur liquide préparées par différents procédés. (*Composition de l'huile non précisée)	18
Tableau I.5. Exemples de photo-amorceurs de type cétone aromatique utilisés et disponibles dans le commerce (d'après les références ^{198, 201, 203})	57
Tableau I.6. Exemples d'amorceurs thermiques utilisés dans la réaction thiol-ène. Les températures pour un $t_{1/2}$ de 10h sont issues du site de Sigma-Aldrich (http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/General_Information/thermal_initiators.pdf ; Accès on-line le 23 avril 2015)	60
Tableau I.7. Application des réactions de chimie « click » à la synthèse et/ou la fonctionnalisation de particules polymères (NSs = nanosphères, NCs = nanocapsules, MCs = microcapsules)	63

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau II.1. Caractéristiques des PLA fonctionnels obtenus par polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide catalysée par le SnOct ₂ et en utilisant l'alcool propargylique ou le 2-hydroxyéthyl disulfide comme amorceur. * Polymérisé en solution toluène (100°C, 18h), ** Polymérisé en masse (120°C, 14h30)	94
Tableau II.2. Conditions et résultats de réduction des PLA-SS-PLA à l'aide du DTT	96
Tableau II.3. Degrés de substitution de dérivés du dextrane utilisés au cours de cette thèse	103
Tableau II.4. Caractéristiques du dextrane et de ses dérivés obtenus	104
Tableau II.5. Influence de différents paramètres sur l'efficacité de la réaction « click » CuAAC à l'interface CH ₂ Cl ₂ /eau entre un PLA α -alcyne ($\overline{M}_n \sim 4\,000$ g/mol) solubilisé dans la phase organique (25 g/L) et un DexN ₃ -23 présent dans l'eau (5 g/L). Elaboration des NSs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant	114
Tableau II.6. Influence du M810 sur l'efficacité de la réaction « click » CuAAC à l'interface (CH ₂ Cl ₂ + M810)/eau entre un PLA α -alcyne ($M_n \sim 4\,000$ g/mol) solubilisé dans la phase organique (25 g/L) et un DexN ₃ -23 présent dans l'eau (5 g/L) lors de l'élaboration des NCs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant	116
Tableau II.7. Détermination de la quantité du cuivre résiduel dans les NCs (préparées avec 10% vol de M810 dans la phase organique initiale) par méthode d'ICAP-OES	118
Tableau II.8. Résultats des réactions thiol-ène entre le DexC=C-28 (1 éq.) ou le DexC=C-20 (1 éq.) et le PLA α -SH ($M_n \sim 3\,100$ g/mol, 1,5 éq./C=C) dans le DMSO	124
Tableau II.9. Influence de différents paramètres sur l'efficacité de la réaction « click » thiol-ène nucléophile à l'interface (CH ₂ Cl ₂ ±M810)/eau entre un PLA α -SH ($M_n \sim 3\,100$ g/mol) solubilisé dans	

la phase organique (25 g/L) et un DexC=C-28 présent dans l'eau (5 g/L) lors de l'élaboration de NSs et NCs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant	127
Tableau II.10. Taux de substitution moyen (τ) du DexC=C déterminé sur des NSs avant et après leur lavages et dans les eaux de lavages. Les erreurs expérimentales correspondent à la déviation standard calculée grâce à l'Eq. 3 (voir Partie III, p. 204) avec $n=4$	128
Tableau II.11. Résultats des essais préliminaires de la réaction « click » thiol-ène radicalaire à l'interface CH_2Cl_2 /eau entre un PLA α -SH ($M_n \sim 3\,100$ g/mol) solubilisé dans la phase organique (25 g/L) et un DexC ₆ C=C-21 présent dans l'eau (5 g/L) au cours d'un procédé d'émulsion-évaporation de solvant (sans M810)	131
Tableau II.12. Caractéristiques de NPs clickées et non-clickées, préparées en utilisant le DexN ₃ -23 ou le DexC=C-28 comme tensioactif, en termes de quantité de M810 encapsulées dans les objets finaux, tailles moyennes en surface ($d[3:2]$) et valeurs de Span	140
Tableau II.13. Caractéristiques du recouvrement en dextrane. Cas des NPs clickées et non-clickées obtenues par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant et en utilisant le DexN ₃ -23 ou le DexC=C-28 en tant que stabilisant de l'émulsion	143
Tableau II.14. NCs utilisées dans les expériences de stabilité colloïdale. Les NCs ont été préparées en utilisant 10% vol de M810 dans la phase organique initiale, le PLA α -alcyne ou le PLA α -SH (25 g/L) et le DexN ₃ -23 ou le DexC=C-28 (5 g/L), respectivement	150
Tableau II.15. Comparaison des propriétés des NPs (obtenues par émulsion-évaporation de solvant, en réalisant ou non <i>in situ</i> la réaction de chimie « click » CuAAC ou thiol-ène) avant et après traitement par SDS (1% massique dans le milieu aqueux).....	152
Tableau II.16. Résultats des analyses MDSC du DexN ₃ , M810 et PLA _{comm} (35 000 g/mol) et des mélanges DexN ₃ /PLA _{comm} et DexN ₃ /M810. Les valeurs données sont moyennées sur le 2 ^{ème} et le 3 ^{ème} cycle de chauffage (voir Partie III, p. 212). L'erreur expérimentale sur les températures de transition est de $\pm 1^\circ\text{C}$ sauf pour des échantillons contenant du DexN ₃ . Pour ceux-ci le saut correspondant à la T_g était très peu visible et donc l'erreur est plus grande (donnée dans le tableau).....	155
Tableau II.17. Résultats des analyses MDSC des PLA (PLA _{comm} 35 000 g/mol, PLA α -alcyne 4 000 g/mol, PLA α -SH 3 100 g/mol), du M810 et de leurs mélanges. Les valeurs données sont moyennées sur le 2 ^{ème} et le 3 ^{ème} cycle de chauffage (voir Partie III, p. 212). L'erreur expérimentale sur les températures de transition $\pm 1^\circ\text{C}$	157
Tableau II.18. Acide gallique et ses esters.....	171
Tableau II.19. Quantités d'OG potentiellement possibles à encapsuler dans les NCs et expériences à réaliser selon le solvant organique volatil choisi. La masse de PLA utilisée dans la formulation est constante et égale à 25 mg. Le volume de la phase organique est constant et égal à 1 mL (soit 0,9 mL CH_2Cl_2 et 0,1 mL M810).....	172
Tableau II.20. Résultats d'encapsulation de l'OG dans les NCs préparées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant avec une réaction « click » CuAAC (catalyseur $\text{CuSO}_4/\text{AAAsc}$, pour plus de détails voir Chapitre II, Tableau II.6, p. 116, échantillon NC3). Les expériences ont été effectuées au moins deux fois ($n \geq 2$), sauf NC3	176
Tableau II.21. Caractéristiques des NPs utilisées dans les expériences d'évaluation des cinétiques de libération de l'OG. Les expériences ont été effectuées deux fois ($n = 2$).....	177
Tableau II.22. Résultats de détermination de coefficients de diffusion (D) de l'OG dans les NCs et NSs. <i>n.a.</i> = non-applicable	179

Tableau II.23. Coefficient de partage du 4-nitroanisole entre le polystyrène et différents huiles⁴⁹ ... 179

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

Tableau III.1. Pics de référence de M810 pour les spectres RMN ¹H des NCs obtenues dans différentes conditions 207

Tableau III.2. Résultats des analyses MDSC des différents mélanges PLA/OG. Les analyses réalisées au LCPM au cours de la thèse d'Asma Chebil en cours 214

Résumé :

Des nanocapsules (NCs) biodégradables contenant une substance active et destinées à des applications environnementales ont été élaborées par un procédé d'émulsion-évaporation de solvant couplé à une réaction de chimie « click » interfaciale. Deux types de réactions « click » ont été testés: (i) cycloaddition azide-alcyne catalysée par le Cu(I) et (ii) thiol-ène. Ces NCs sont constituées d'une écorce en polymère hydrophobe (polylactide) entourant un cœur liquide (Miglyol®810) et recouverte d'une couronne hydrophile polysaccharide (dextrane). Des nanosphères (sans cœur liquide) ont aussi été produites. Ces nano-objets ont été caractérisés en termes de distribution de tailles, morphologie, taux et épaisseur de recouvrement en dextrane ainsi qu'efficacité de couplage « click ». La stabilité colloïdale en milieu salin et la stabilité du recouvrement en présence d'un tensioactif compétitif ont été étudiées. Enfin, une substance active a été encapsulée et libérée à partir des nano-objets.

Mots clés : nanocapsules, chimie « click », polysaccharide, biodégradable, polylactide, encapsulation

Abstract :

Biodegradable nanocapsules allowing encapsulation of active substances for environmental applications were produced by emulsion-evaporation method combined with a “click” reaction occurring at the liquid/liquid interface of emulsion droplets. Two types of “click” reaction were tested: (i) copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and (ii) thiol-ene reaction. The NCs are composed of a hydrophobic polymer shell (polylactide), a liquid core (Miglyol®810) and a hydrophilic polysaccharide coating (dextran). For comparison, nanospheres (without oily core) were also prepared. These nano-objects were characterized in terms of size distribution, dextran coverage density and thickness, “click” coupling efficiency and morphology. Colloidal stability in NaCl solutions as well as dextran coverage stability against an anionic competitive surfactant were also studied. Finally, an active substance was encapsulated and released from these nano-objects.

Keywords: nanocapsules, click chemistry, polysaccharide, biodegradable, polylactide, encapsulation