



**HAL**  
open science

# Élaboration de nano- et microparticules pour l'encapsulation et la libération de molécules polyphénoliques ayant des applications dans le traitement de milieux aquatiques

Asma Chebil

► **To cite this version:**

Asma Chebil. Élaboration de nano- et microparticules pour l'encapsulation et la libération de molécules polyphénoliques ayant des applications dans le traitement de milieux aquatiques. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0054 . tel-01752245

**HAL Id: tel-01752245**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752245>**

Submitted on 29 May 2019

**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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

# THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des procédés et des produits

Par

**Asma CHEBIL**

*Elaboration de nano- et microparticules pour l'encapsulation et la libération de molécules polyphénoliques ayant des applications dans le traitement de milieux aquatiques*

Soutenue le 26 mai 2016 devant le jury constitué de :

Président de jury :	<b>M. Jacques DESBRIÈRES</b>	Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour
Rapporteurs :	<b>Mme Valérie LANGLOIS</b>	Professeur, Université Paris Est Créteil
	<b>M. Christophe SERRA</b>	Professeur, Université de Strasbourg
Examineur :	<b>M. Denis FUNFSCHILLING</b>	Chargé de recherche, CNRS
Membres invités :	<b>Mme Michèle LÉONARD</b>	Chargée de recherche, CNRS
	<b>M. Jean-Claude PIHAN</b>	Directeur Scientifique, Société BioCapTech
Directeur de thèse :	<b>M. Alain DURAND</b>	Professeur, Université de Lorraine
Co-directrice de thèse	<b>Mme Cécile NOUVEL</b>	Professeur, Université de Lorraine



*« Believe you can  
and you're  
halfway there »*



## ***Remerciements***

A présent, je me retrouve face à mes remerciements. Exprimer, en quelques mots, sa profonde gratitude et reconnaissance pour tous ceux qui, par leurs conseils, leur confiance, leur soutien et leur amour, ont contribué à ma réussite...ça c'est dur ! Un exercice encore plus difficile que le travail de synthèse nécessaire à la rédaction d'une thèse. Je me sens toute impuissante. Bon, je prends mon courage à deux mains et je me lance...

Que Madame **Valérie Langlois**, Professeur à l'Université Paris Est Créteil, Monsieur **Christophe Serra**, Professeur à l'Université de Strasbourg et Monsieur **Jacques Desbrières**, Professeur à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Je tiens, particulièrement, à remercier mon directeur de thèse, Monsieur **Alain Durand**, Professeur à l'Université de Lorraine et directeur du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, pour la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien ce travail, pour ses nombreux conseils ainsi que pour ses qualités pédagogiques et son enthousiasme communicatif dont il sait faire preuve. Cette thèse doit beaucoup à son soutien et à ses encouragements. Alain, merci d'avoir cru en moi et merci de m'avoir donné autant de liberté au cours de ces années de thèse. Maintenant, il est temps pour moi de voler de mes propres ailes...Certes, l'idée est un peu effrayante, mais j'ai l'impression d'avoir grandi, d'avoir acquis une certaine confiance, grâce à vous. Merci beaucoup pour tout.

J'adresse ensuite mes remerciements les plus sincères à ma « marraine scientifique », Madame **Michèle Léonard**, Chargée de recherche au CNRS. Je te remercie tout d'abord pour ta confiance et ta disponibilité. Tu as toujours été présente quand j'avais besoin de tes conseils. Certaines manipulations menées au cours de ces travaux n'auraient pas pu être réalisées sans ton aide et sans tes précieuses recommandations. Au fil des années, une complicité remarquable a été rapidement instaurée entre nous deux et j'en suis fière. Je te remercie infiniment pour les agréables discussions scientifiques et non scientifiques qu'on a pu avoir, pour tes suggestions éclairées et pour tes précieuses corrections de mon manuscrit. Cette thèse te doit beaucoup. Pour tout cela merci.

J'adresse ensuite toute ma reconnaissance à Madame **Cécile Nouvel**, ma co-directrice de thèse, Professeur à l'Université de Lorraine, pour nos nombreux échanges scientifiques et pratiques qui ont enrichi ce travail et qui m'ont énormément apporté. J'ai particulièrement apprécié ta disponibilité et ton respect sans failles des délais serrés de relecture des documents que je t'avais adressés. Merci Cécile pour ta confiance ainsi que pour tes conseils avisés qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse.

Je tiens à présenter ma gratitude à Monsieur **Jean-Luc Six**, Professeur à l'Université de Lorraine d'avoir suivi de près ce travail. Un grand merci pour la qualité scientifique de ses conseils, pour sa disponibilité et pour sa gentillesse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur **Denis Funfschilling**, Chargé de recherche au CNRS pour son aide précieuse sur la partie microfluidique. Denis, merci de m'avoir initié à la fabrication des systèmes microfluidiques. Je te remercie aussi pour tes conseils et ta disponibilité. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec toi.

Je tiens à remercier aussi **Isabelle Martinuzzi** (ma zouzou, je t'adore) et Vincent Jaouen les deux post-doc embauchés dans le cadre du projet BioCapTech. Notre collaboration était un vrai succès. A l'issue de ce projet des liens solides d'amitié ont été tissés. J'en suis ravie.

Je remercie également tous les partenaires du projet BioCapTech et plus particulièrement Messieurs **Jean-Claude Pihan** et **Loïc Chomel de Varagnes** qui ont veillé à la réussite et au bon déroulement de ce projet.

Je présente ma gratitude à Monsieur **Olivier Fabre** pour les centaines d'analyses RMN effectuées au cours de cette thèse, à Madame **Marie Christine Grassiot** et à Madame **Caroline Sejil** pour la gestion des commandes des produits, les analyses par SEC-MALLS et par M-DSC. Je remercie aussi Monsieur **Jean-Claude Sivault** pour son appui technique tout au long de ma thèse. Je vous remercie tous pour votre aide et pour votre disponibilité.

J'adresse particulièrement mes remerciements à Madame **Nathalie Brenon** pour sa bonne humeur et sa sympathie ainsi que pour son efficacité dans l'organisation des missions et la résolution des problèmes administratifs. Merci beaucoup Nath pour tout.

Ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans tout le personnel du LCPM. Un grand merci à tous, permanents et doctorants, pour tous les repas, les pauses café, les pots partagés et

les nombreuses discussions qui les ont accompagnés. Merci également pour votre soutien dans les moments les plus difficiles. Je pense particulièrement aux permanents du labo : **Marie** (la bonne humeur en personne, je t'adore), **Jérôme** « le taquin ! » (Je te remercie beaucoup pour ton aide pendant les TP), **Carole** (merci pour ta bonne humeur et la joie de vivre que tu dégages ! merci pour ton aide pour préparer les TP), **Anne** (merci pour vos encouragements !) et **Chrystel** (merci de prendre de mes nouvelles, merci de te soucier de ma santé pendant les moments difficiles et merci pour tes encouragements). Je pense aussi à tous les doctorants avec qui j'ai partagé labo et/ou bureau : **Meriem** (ma Tunisienne préférée, ma copine de maternelle et la plus belle des mamans-doctorantes une dédicace spéciale au petit Salim, bon courage pour la thèse tu vas assurer ! Je t'adore), **Laura** (ma Colombienne préférée, ma camarade de parcours et la meilleure prof de Salsa de tous les temps), **Xavier** et sa bonne humeur (merci Xav pour les longues discussions qu'on a eues, souvent non scientifiques...Bon courage pour la dernière ligne droite! Le départ pour l'Australie s'approche à grands pas...), **Natcha** (my beloved Thai friend ! I will never forget our madness my dear! I'm still waiting for the sky dinner in Bangkok...), **Lupita** (my beautiful Mexican friend! I will never forget our endless discussions ! See you soon in New York my dear), **Miao** (merci beaucoup pour ta gentillesse et pour le « diplôme d'assistante sociale » que tu m'as délivré :p je n'oublierai jamais tes taquineries ainsi que celles de Xav et Maxou), **Audrey** (merci beaucoup pour ta gentillesse je te souhaite plein de réussite dans ta vie personnelle et professionnelle), **Fred** (le plus discret des voisins de bureau ! Merci d'avoir supporté la « bruyante » camarade de bureau que je suis ! Bon courage pour cette fin de thèse), **Mohamed I** (thanks a lot for the delicious sweet pastries and wish you all the best for the future) **Ning, Amirah, Tanya, Olga et Dew** (bon courage aux futures docteurs, vous allez assurer! Good luck for all of you, It was a pleasure for me to meet you here), **Faten et Mohamed M** (Good luck and all the best for Jana, Yusuf and you both), **Maxime et Sébastien** (un grand merci Maxou et Séb pour vos encouragements, vous avez laissé un grand vide dans le labo), **Khalid et Soliman** (merci pour les discussions enrichissantes, diverses et variées qu'on a eues pendant les repas et les pauses, je vous remercie aussi pour vos encouragements). Place maintenant au remerciement à mes stagiaires favoris : **Chunyue** (ma petite Chinoise préférée, je te remercie pour ton amabilité, ta générosité et ta bonne humeur, je te souhaite le meilleur pour l'avenir! merci beaucoup pour tous les cadeaux que tu m'as offerts) et **Camilo** (mon petit Colombien préféré, je te remercie beaucoup pour ta gentillesse, pour tes encouragements et pour les petits cadeaux, je te souhaite tout le bonheur du monde).

Je tiens aussi à remercier tout le personnel de l'équipe SysPol du LRGP qui m'a accueillie à

bras ouverts pour effectuer une partie de mes expériences : *Meriem, Olfa, Rainier, Laura, Nicolas, Xiaofen*... Je vous remercie pour votre aide et pour les discussions intéressantes qu'on a menées.

Je dois un gigantesque merci à, *Manelle*, mon exceptionnelle colocataire, ma sœur Nancéienne. Merci pour nos délires et nos fous rires. Merci pour nos moments de folie, de bonheur et de déprime ! Merci Manen pour tout, je t'adore ! Ces années passées à Nancy resteront gravées à jamais dans ma mémoire.

Des rencontres exceptionnelles ont embelli mes années de thèse. Un grand merci à mes chers amis Nancéiens avec qui j'ai partagé des moments inoubliables. Merci pour votre sympathie, disponibilité et bonne humeur : *Nessrine* (ma petite Ness, je t'adore), *Selma, Wassim, Khaoula* et *Faycel, Sourour, Ahmed, Amine, Narimane, Wissam, Said, Hamma, Ilef*...

J'adresse un grand merci à mes très chères amies *Aya* et *Sana*, qui ont pu me soutenir et partager avec moi mes moments de joie et de tristesse à distance malgré les milliers de kilomètres qui nous séparaient. Je vous aime.

Il est temps de remercier ma petite et grande famille pour leur amour inconditionnel qu'ils n'hésitent jamais à me prouver : « *Baba Sattar* », *Mima, Ryma, Laylouna, Deen, Mino, Khalkhouli, Charrouka, Skan, Youssef*... Merci pour votre soutien, je vous aime.

Ces années passées à Nancy n'auraient pas pu être les mêmes sans la présence de mes très chers *Tifa* et *Muhannad*. Ils étaient toujours à mes côtés pour me soutenir dans mes moments de stress et de déprime et pour les moments de délire, ils étaient toujours présents pour m'aider à prendre les bonnes décisions et à aller vers l'avant. Je vous aime beaucoup ! Je dédie cette thèse à mes petits rayons de soleil *Rafi* et *Lynn*.

On finit toujours par le meilleur. Un grand merci à mes parents et à mon frère, pour leur soutien et leur présence sans failles. Les mots ne seront jamais assez forts pour exprimer toute la reconnaissance et l'amour que je vous porte. « P'tit Frère », merci pour tout je t'aime beaucoup *Becem* ! *Mamma*, tu resteras à jamais ma joie de vivre et ma raison d'être. *Papa*, tu as toujours été mon idole et tu le resteras pour toujours. Je vous dédie cette thèse.

*Asma*





## Table des matières

### Liste des abréviations

<b>Introduction Générale .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : Etude bibliographique .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Vecteurs de substances actives et domaines d'application .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.1. Les vecteurs de substances actives.....</b>	<b>13</b>
1.1.1.1. Les nano- et microparticules .....	13
1.1.1.2. Les agrégats de polymères .....	16
1.1.1.3. Les dendrimères .....	17
1.1.1.4. Les liposomes.....	18
<b>1.1.2. Domaines d'application des vecteurs particuliers de SA (nano- et microparticules).....</b>	<b>19</b>
1.1.2.1. Cosmétique .....	21
1.1.2.2. Textile.....	23
1.1.2.3. Alimentaire et emballage .....	25
1.1.2.4. Agriculture et environnement .....	28
1.1.2.5. Lutte contre les espèces envahissantes dans les plans d'eau.....	31
<b>1.1.3. Conclusion et objectifs du travail de thèse .....</b>	<b>32</b>
<b>1.2. Elaboration de particules matricielles par procédés discontinus.....</b>	<b>34</b>
<b>1.2.1. Introduction.....</b>	<b>34</b>
<b>1.2.2. Principaux procédés discontinus utilisés pour l'élaboration des particules.....</b>	<b>35</b>
1.2.2.1. Nanoprécipitation .....	35
1.2.2.2. Procédé basé sur l'émulsification .....	37
1.2.2.3. Coacervation simple.....	44
1.2.2.4. Dialyse.....	46
1.2.2.5. Spray drying .....	48
1.2.2.6. Utilisation de fluides supercritiques .....	50
<b>1.2.3. Elaboration de particules recouvertes de polysaccharides amphiphiles: Dextranes modifiés 52</b>	<b>52</b>
<b>1.2.4. Conclusion et objectifs du travail de thèse .....</b>	<b>58</b>
<b>1.3. Procédé continu d'élaboration de particules : Microfluidique.....</b>	<b>59</b>
<b>1.3.1. Introduction.....</b>	<b>59</b>
<b>1.3.2. Généralités sur la microfluidique .....</b>	<b>59</b>
1.3.2.1. Rapide historique de la microfluidique.....	59
1.3.2.2. Avantages et inconvénients .....	60
<b>1.3.3. Emulsification.....</b>	<b>61</b>
1.3.3.1. Formation de gouttelettes à l'intérieur du microsystème.....	62
1.3.3.2. Facteurs ayant une influence sur la formation des gouttes dans un microsystème....	66
<b>1.3.4. Elaboration de particules de polymère par microfluidique.....</b>	<b>69</b>
1.3.4.1. De la goutte à la particule : processus de solidification.....	70
1.3.4.2. Exemple de particules élaborées par microfluidique.....	72
<b>1.3.5. Conclusion et objectifs de la thèse .....</b>	<b>76</b>
<b>1.4. Conclusion générale et objectifs de la thèse.....</b>	<b>77</b>

<b>1.5. Références bibliographiques.....</b>	<b>79</b>
--	-----------

## **CHAPITRE 2: Matériels et méthodes.....101**

<b>2.1. Réactifs et solvants.....</b>	<b>105</b>
---------------------------------------	------------

<b>2.2. Méthodes et procédures expérimentales.....</b>	<b>106</b>
--	------------

<b>2.2.1. Synthèse du dextrane modifié.....</b>	<b>106</b>
2.2.1.1. Procédure expérimentale.....	106
2.2.1.2. Détermination du taux de modification par RMN <sup>1</sup> H .....	107
<b>2.2.2. Caractérisation des SA (GO et GN).....</b>	<b>109</b>
2.2.2.1. Détermination de la solubilité maximale des SA dans l'eau et dans les solutions de Dextrane modifié.....	109
2.2.2.2. Evaluation du pouvoir tensioactif des SA.....	111
2.2.2.3. Evaluation de la miscibilité des SA avec le PLA par MDSC.....	111
<b>2.2.3. Elaboration des particules.....</b>	<b>113</b>
2.2.3.1. Procédés discontinus : nanoprecipitation et émulsion-évaporation de solvant.....	113
2.2.3.2. Procédé continu : émulsion-diffusion en géométrie microfluidique .....	115
<b>2.2.4. Caractérisation des particules .....</b>	<b>120</b>
2.2.4.1. Granulométrie par diffraction laser.....	120
2.2.4.2. Microscopie électronique à transmission (MET).....	123
2.2.4.3. Microscopie optique.....	123
2.2.4.4. Encapsulation de SA dans les particules.....	124
<b>2.2.5. Propriétés de surface des particules recouvertes de Dextrane .....</b>	<b>125</b>
2.2.5.1. Détermination des taux de recouvrement en Dextrane des particules .....	125
2.2.5.2. Détermination de l'épaisseur de la couche de Dextrane à la surface des particules..	127
2.2.5.3. Stabilité colloïdale dans les solutions salines.....	130
<b>2.2.6. Suivi de la cinétique de libération .....</b>	<b>133</b>
2.2.6.1. Procédure par dialyse pour les nanoparticules : méthode indirecte.....	133
2.2.6.2. Procédure pour les microparticules.....	134
<b>2.2.7. Suivi de la dégradation du PLA par Chromatographie d'Exclusion Stérique .....</b>	<b>135</b>
2.2.7.1. Principe de la SEC.....	135
2.2.7.2. Procédures expérimentales .....	136
<b>2.2.8. Répétabilité des résultats et estimation des erreurs expérimentales .....</b>	<b>136</b>
2.2.8.1. Répétabilité.....	136
2.2.8.2. Incertitude sur le taux de recouvrement.....	137
2.2.8.3. Cinétiques de libération : barres d'erreurs.....	138

<b>2.3. Références bibliographiques.....</b>	<b>140</b>
--	------------

## **CHAPITRE 3: Elaboration et caractérisation de particules de PLA par procédés discontinus.....143**

<b>3.1. Introduction et objectifs.....</b>	<b>147</b>
--	------------

<b>3.2. Préparation de nanoparticules.....</b>	<b>150</b>
--	------------

<b>3.2.1. Nanoprecipitation.....</b>	<b>150</b>
3.2.1.1. Mise au point de la nanoprecipitation .....	151
3.2.1.2. Préparation de nanoparticules de PLA en présence de DexC <sub>6</sub> -τ.....	153
<b>3.2.2. Emulsion-évaporation de solvant .....</b>	<b>161</b>
3.2.2.1. Elaboration des nanoparticules par E-ES.....	161
3.2.2.2. Caractérisation des nanoparticules de PLA obtenues.....	162

<b>3.3. Etude paramétrique de procédés pour l'obtention de microparticules .....</b>	<b>163</b>
3.3.1. Précipitation .....	164
3.3.2. Emulsion-évaporation de solvant (E-ES).....	166
3.3.2.1. Emulsification avec les ultrasons.....	166
3.3.2.2. Emulsification par agitation mécanique .....	176
<b>3.4. Conclusion .....</b>	<b>188</b>
<b>3.5. Références bibliographiques.....</b>	<b>191</b>

## **CHAPITRE 4: Elaboration de microparticules par microfluidique.....197**

<b>4.1. Introduction.....</b>	<b>201</b>
<b>4.2. Choix de la géométrie et du matériau constituant le microsystème microfluidique.....</b>	<b>201</b>
4.2.1. Géométrie .....	202
4.2.2. Matériau .....	204
<b>4.3. Modification de la surface du PDMS .....</b>	<b>204</b>
4.3.1. Procédures expérimentales.....	206
4.3.2. Résultats et discussion.....	208
<b>4.4. Mise au point des conditions de formation de l'émulsion.....</b>	<b>214</b>
<b>4.5. Elaboration des particules par microfluidique .....</b>	<b>216</b>
4.5.1. Emulsion-Evaporation de solvant.....	217
4.5.2. Emulsion-Diffusion de solvant .....	218
4.5.2.1. Diffusion dans le volume minimal nécessaire .....	218
4.5.2.2. Diffusion dans un volume d'eau égal à 3 fois le volume minimal.....	220
<b>4.6. Etude paramétrique de la taille des gouttelettes formées et des particules obtenues .....</b>	<b>221</b>
4.6.1. Variation des débits en gardant un rapport R constant.....	222
4.6.2. Influence de la variation du rapport R sur la taille des particules.....	223
<b>4.7. Caractérisation des microparticules de PLA .....</b>	<b>227</b>
4.7.1. Redispersion des microparticules après lavages.....	227
4.7.2. Caractérisation par microscope optique : morphologie des microparticules.....	228
4.7.3. Taux de recouvrement par le DexC <sub>6</sub> -15 .....	229
<b>4.8. Conclusion .....</b>	<b>232</b>
<b>4.9. Références bibliographiques.....</b>	<b>233</b>

## **CHAPITRE 5: Etude de l'Encapsulation et de la libération des esters de l'acide gallique.....239**

<b>5.1. Introduction.....</b>	<b>243</b>
<b>5.2. Choix des substances actives à encapsuler.....</b>	<b>243</b>
5.2.1. Tests de solubilité dans l'eau.....	243
5.2.2. Tests de solubilité dans les solvants organiques.....	244
5.2.3. Tests de miscibilité entre le PLA et les SA choisies.....	245
5.2.4. Stabilité des esters d'acide gallique encapsulés dans le PLA .....	248

<b>5.3. Encapsulation des SA dans les nanoparticules</b> .....	<b>248</b>
5.3.1. Solubilité des SA dans les solutions aqueuses de dérivés amphiphile du dextrane	248
5.3.2. Etude de l'adsorption compétitive éventuelle des SA à la surface des particules	250
5.3.2.1. Propriétés tensioactives du GO.....	250
5.3.2.2. Propriétés de surface de particules de PLA préparées par nanopréciptation en présence d'une phase aqueuse saturée en SA .....	251
5.3.3. Etude paramétrique de l'encapsulation des SA dans des NP élaborées par nanopréciptation .....	253
5.3.3.1. Influence du rapport SA/PLA.....	254
5.3.3.2. Influence de la composition de la phase aqueuse .....	258
5.3.4. Etude paramétrique de l'encapsulation des SA dans des nanoparticules élaborées par E-ES	264
5.3.4.1. Influence de la saturation/non saturation de la phase aqueuse en Acétate d'éthyle	264
5.3.4.2. Elaboration de nanoparticules avec différentes compositions initiales (SA/PLA) dans la phase organique.....	266
5.3.4.3. Elaboration de nanoparticules avec différentes compositions de phase aqueuse.....	271
5.3.5. Comparaison entre les caractéristiques des nanoparticules élaborées par nanopréciptation et par E-ES.....	273
<b>5.4. Encapsulation des SA dans les microparticules</b> .....	<b>279</b>
5.4.1. Microparticules élaborées par microfluidique (Emulsion-diffusion) .....	279
5.4.1.1. Phase continue non saturée en GO.....	279
5.4.1.2. Phase continue saturée en GO.....	280
5.4.2. Microparticules élaborées par Emulsion-Evaporation de solvant.....	283
5.4.2.1. Influence de la %W <sub>SA</sub> initiale dans la phase organique .....	284
5.4.2.2. Influence de la nature de la SA encapsulée.....	285
5.4.2.3. Stabilité aux lavages et à la lyophilisation.....	286
5.4.2.4. Morphologie des microparticules.....	287
<b>5.5. Libération du GO et du GN encapsulés</b> .....	<b>288</b>
5.5.1. Généralités .....	288
5.5.2. Libération à partir des nanoparticules.....	288
5.5.2.1. Etude des mécanismes de libération.....	288
5.5.2.2. Cinétiques de libération.....	291
5.5.3. Libération des SA à partir des microparticules préparées par E-ES avec émulsification par agitation magnétique .....	297
5.5.3.1. Suivi de la dégradation du PLA.....	299
5.5.3.2. Mise en évidence du gonflement des microparticules.....	301
<b>5.6. Conclusion</b> .....	<b>303</b>
<b>5.7. Références Bibliographiques</b> .....	<b>306</b>
<b>CHAPITRE 6: Transposition de l'élaboration des nanoparticules à l'échelle pilote (1L) et tests de leur efficacité sur le traitement des cyanobactéries</b> .....	<b>311</b>
<b>6.1. Introduction</b> .....	<b>315</b>
<b>6.2. Transposition du procédé de nanopréciptation de l'échelle laboratoire (25 mL) à l'échelle pilote (1 L)</b> .....	<b>315</b>
6.2.1. Etude bibliographique.....	315
6.2.1.1. Transposition de l'élaboration des nanoparticules.....	316
6.2.1.2. Transposition de l'étape d'élimination du solvant organique .....	319
6.2.1.3. Transposition de l'étape de séchage des nanoparticules.....	322

<b>6.2.2. Elaboration des nanoparticules par nanopréciptation à plus grande échelle ....</b>	<b>323</b>
6.2.2.1. Schéma de montage.....	323
6.2.2.2. Transposition de l'élaboration de nanoparticules par nanopréciptation : de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote.....	325
<b>6.3. Efficacité du traitement sur les cyanobactéries .....</b>	<b>335</b>
6.3.1. Procédure expérimentale .....	335
6.3.2. Evaluation de l'efficacité de l'utilisation des nanoparticules élaborées à l'échelle du laboratoire sur le traitement des invasions algales.....	337
6.3.3. Evaluation de l'efficacité de l'utilisation des nanoparticules élaborées à l'échelle pilote sur le traitement des invasions algales .....	339
<b>6.4. Conclusion .....</b>	<b>340</b>
<b>6.5. Références bibliographiques.....</b>	<b>342</b>
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>345</b>



# Liste des abréviations

## A

AG : Acide gallique

AcOEt : Acétate d'éthyle

## C

CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de calcium

CsA : Cycloprine

CV : coefficient de variation

## D

DCM : Dichlorométhane

DMAc : N,N-diméthyl acétamide

DMF : N,N-diméthyl formamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DS : Degré de substitution

D<sub>2</sub>O : eau deutérée

d(0,1) : diamètre de particule en dessous duquel se trouve 10% du volume de l'échantillon

d(0,5) : diamètre de particule en dessous duquel se trouve 50% du volume de l'échantillon

d(0,9) : diamètre de particule en dessous duquel se trouve 90% du volume de l'échantillon

D[3,2] : diamètre moyen en surface

D[4,3] : diamètre moyen en volume

$D_g$  : le diamètre des gouttelettes de l'émulsion formée dans le microsystème ( $\mu\text{m}$ )

## E

E/H : Emulsion eau/huile

E-ES : Emulsion-évaporation de solvant

E-DS : Emulsion-diffusion du solvant

E-SO : Emulsion salting-out

Eudragit<sup>®</sup> RS 100 : poly(acrylate d'éthyle-co-méthacrylate de méthyle-co-chlorure de méthacrylate de triméthylammonium éthyle)

Eudragit<sup>®</sup> RL100 : poly (acrylate d'éthyle-co-méthacrylate de méthyle-co-chlorure de triméthylammonioéthyle méthacrylate)

Eudragit E100 :poly (méthacrylate de butyle-co-méthacrylate de (2-diméthylaminoéthyle)-co-méthacrylate de méthyle)

Eudragit<sup>®</sup> L100-55 : poly(acide méthacrylique-co-méthacrylate de méthyle)

## **F**

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

FF : Flow-Focusing

## **G**

GAS :Gaz Anti-Solvant

GE : Gallate d'éthyle (GE)

GP : Gallate de propyle (GP)

GO : Gallate d'octyle (GO)

GN: Gallate de nonyle (GN)

GL : Gallate de lauryle (GL)

## **H**

Ha : proton anomère

HPMC : Hydroxypropyl méthyl cellulose

H /E : émulsion huile/eau

## **M**

MEB : Microscope électronique à balayage

MET : Microscope électronique à transmission

$M_{ph}$  : masse molaire du phénol

$M_{SA}$ : masse molaire de la SA

$m_{réf}$  : masse de la référence externe ajoutée lors des dosages RMN  $^1H_{mMicroscopie}$

$m_{SA-initiale}$  : Masse de SA initialement introduite dans la phase organique

$m_{SA-encapsulée}$ : Masse de SA encapsulée dans les particules

$m_{SA\_Libérée/t}$  : Masse de SA libérée à l'instant t  
 $m_{SA\_encapsulée/t0}$  : Masse de SA totale encapsulée  
 $m_{SA\_encapsulée/t}$  : Masse de SA encore encapsulée à l'instant t  
MTZ : Metazachlor  
 $Mg(C_2H_3O_2)_2$  : Acétate de magnésium  
 $MgCl_2$  : Chlorure de magnésium  
 $\bar{M}_n$  : Masse molaire moyenne en nombre  
 $\bar{M}_w$  : Masse molaire moyenne en masse  
MWCO : Molecular weight cut off  
MDSC : Modulated Differential Scanning Calorimetry  
 $M_{DexC6-\tau}$  : masse molaire de l'unité monomère du DexC<sub>6</sub>- $\tau$

## **N**

NaCl : Chlorure de sodium  
NaN<sub>3</sub> : Azoture de sodium  
NMP : N-methyl-2-pyrrolidinone

## **P**

PAG : poly( $\gamma$ -acide glutamique)  
PAsp : poly (acide aspartique)  
PCL: poly( $\epsilon$ -caprolactone)  
PDLLA: Poly(D,L-lactide)  
PDLLA-b-PDMAEMA: poly (D,L-lactide)-b-poly(2-diméthylaminorthyl méthacrylate)  
PEG : polyéthylèneglycol  
PGlu : poly (acide glutamique)  
PGSS : Particle from Gaz Saturated Solution  
PLA : poly(acide lactique)  
PLGA : poly(acide lactique-co-acide glycolique)  
PLLA: poly(L-lactic acid)  
PMMA : poly(méthacrylate de méthyle)  
PMA: Poly( $\alpha,\beta$ -L-malic acid)  
POE-b-PAD: poly(ethylene oxide)-b-poly(N-amidino dodecyl acrylamide)  
PFO: Polyfluorène

PEO: Poly(ethylene oxide)  
PSMA: Poly(styrène-co-anhydride maléique)  
PTMC: Poly(trimethylene carbonate)  
PVA: Poly(alcool vinylique)  
PVP: Polyvinylpyrrolidone  
PC: Polycarbonate  
PTFE: Polytétrafluoroéthylène  
Piranha : Mélange d'eau oxygénée et d'acide sulfurique  
PET : Poly(téréphtalate d'éthylène)

## Q

$Q_d$  : Débit de la phase dispersée  
 $Q_c$  : Débit de la phase continue

## R

RESS: Rapid Expansion of Supercritical Solutions  
rpm : Rotation per minute (tour par minute)  
RR : Rétinyl rétinolate  
R : Rapport du débit de la phase continue ( $Q_c$ ) au débit de la phase dispersée ( $Q_d$ )

## S

SA: Substance(s) active(s)  
SPF: Sun protection factor  
SAS: Supercritical Anti-Solvent  
scCO<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> supercritique  
 $SM_{SA/eau}$  et  $SM_{SA/DexC6-\tau}$ : solubilité maximale de la SA dans l'eau  
 $SM_{SA/DexC6-\tau}$ : solubilité maximale de la SA dans une solution de dextrane modifié  
SU-8 : Résine époxy  
SEC : Chromatographie d'exclusion stérique  
SEC-MALLS : Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière multi-angle  
Sp: surface spécifique (m<sup>2</sup>/g)

## **T**

$T_f$ : Température de fusion

$T_g$ : Température de transition vitreuse

TBAOH : Hydroxide de Tétrabutylammonium

THF : Tétrahydrofurane

TE% : Taux d'encapsulation

## **U**

US: Ultrason

## **W**

$W_{SA\text{ initiale}}$  : Fraction massique de la SA initialement introduite dans la phase organique

$W_{SA\text{ dans les NP}}$  : Fraction massique de la SA présente dans le cœur des particules

## **X**

$x_{PLA}$  : Fraction massique du PLA

## **Autres**

4-MBC : 3-4 méthylbenzyldiène camphre

$\tau$ : taux de substitution

$\zeta$ : Potentiel zêta

$\Gamma$ : Taux de recouvrement en Dextrane (mg de DexC<sub>6</sub>/m<sup>2</sup>)

$\sigma$ : Tension superficielle

$\Delta_{PZ}$  : Epaisseur de la couche polymère à la surface des particules

$\rho_{AE}$  : Masse volumique de l'AcOEt = 0,902 (g mL<sup>-1</sup>)

$\rho_{PLA}$  : Masse volumique du PLA et qui est égale à 1,26 (g mL<sup>-1</sup>)

$\frac{\Delta(x)}{x}$  : Incertitude relative sur une grandeur x donnée

$\Delta(x)$  : Incertitude absolue sur une grandeur x donnée



# *Introduction générale*



L'eau est à l'origine de la vie sur terre et y est indispensable. Sa disponibilité, tant en quantité qu'en qualité constitue la base du développement de toute société et le prérequis de toute activité humaine. Les sources de pollution de l'eau peuvent être classées en deux catégories : les sources localisées qui incluent entre autre les rejets industriels ou encore les installations de traitements d'eaux usées, ainsi que des sources plus difficilement traçables qui incluent les écoulements de sédiments, engrais, produits chimiques, déchets d'animaux de ferme...

L'eutrophisation est une forme singulière mais naturelle de pollution de certains écosystèmes aquatiques qui se produit lorsque le milieu reçoit trop de matières nutritives assimilables par différentes algues ou cyanobactéries<sup>1</sup> et que celles-ci prolifèrent.

Cette prolifération perturbe l'écosystème et est à l'origine de plusieurs problèmes. Les cyanobactéries peuvent être toxiques pour les mammifères et pour l'homme en particulier, ce qui peut aller jusqu'à des cas d'intoxications graves. Le contact direct avec les cyanobactéries, lors de baignades par exemple, peut également affecter la santé. De plus, l'invasion algale des milieux aquatiques conduit non seulement à une formation d'écume à odeur pestilentielle mais aussi à la détérioration esthétique de ces milieux. En France, de nombreuses réserves d'eau douce se trouvent actuellement contaminées par les « blooms »<sup>2</sup> de cyanobactéries. Des traitements de l'eau sont alors nécessaires.

Actuellement, divers traitements sont utilisés pour pallier les problèmes d'eutrophisation. Les traitements mécaniques utilisent, par exemple, des faucardeuses<sup>3</sup> pour enlever les algues accumulées à la surface. Cependant, le traitement subséquent de ces algues reste délicat. En effet, les brûler provoque des dégagements de vapeurs toxiques. Les traitements chimiques impliquent le déversement de produits algicides à base de sulfate de cuivre ou encore des colorants organiques synthétiques qui permettent de limiter la prolifération des algues en bloquant la pénétration de la lumière dans l'eau et ainsi l'activité photosynthétique nécessaire à la croissance des algues (effet algistatique)<sup>4</sup>. Certes ces traitements sont très efficaces mais leurs impacts sur le reste de l'environnement ne sont pas négligeables. Enfin, il existe également des traitements que l'on peut qualifier de naturels qui font appel à des plantes présentant naturellement des activités algicides ou algistatiques. Parmi les traitements naturels les plus

---

<sup>1</sup> Paerl, H.W. and J. Huisman, *Blooms Like It Hot*. Science, 2008. **320**(5872): p. 57-58.

<sup>2</sup> Terme anglais couramment employé et désignant une « prolifération relativement rapide ».

<sup>3</sup> Machines destinées à faucher les algues

<sup>4</sup> Morin, R., *Contrôle et élimination des algues dans les étangs piscicoles*. Direction de l'aquaculture et du développement durable. Québec, Canada. 2007.

utilisés, nous citerons le dépôt de paille d'orge<sup>5</sup>. Suite à la dégradation de cette dernière par les bactéries et les champignons présents naturellement dans les milieux aquatiques, des composés polyphénoliques initialement localisés dans les parois des cellules végétales sont libérés progressivement dans le milieu aqueux environnant et exercent une action inhibitrice de la croissance des algues. La paille d'orge apparaît donc comme un outil efficace de lutte biologique contre les algues dans les eaux de surface<sup>6</sup>. Parmi les composés polyphénoliques, identifiés comme molécules efficaces pour inhiber la croissance des cyanobactéries et lutter contre les blooms algaux, nous pouvons citer l'acide gallique et certains de ses esters<sup>7</sup>. Ces composés présentent l'avantage d'être des molécules d'origines naturelles biocompatibles.

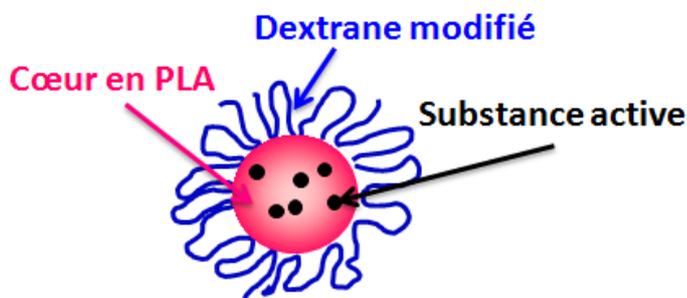
Le projet « BioCapTech » a été initié dans le but de développer des solutions innovantes et éco-durables pour lutter contre les invasions algales dans les systèmes lenticques. Cette thèse s'inscrit dans le cadre de ce projet, porté par la société « BioCapTech » et financé par la Région Lorraine et l'Union Européenne (FEDER). Ce projet rassemble sept laboratoires de recherches (dont 5 unités de recherche ayant l'Université de Lorraine comme tutelle, parmi lesquelles le Laboratoire de Chimie physique Macromoléculaire, LCPM) et cinq PME lorraines. Les travaux décrits dans ce mémoire ont été réalisés au LCPM. Notre contribution a consisté, dans un premier temps, à maîtriser l'élaboration de particules nano- et micrométriques couvrant une large gamme de taille allant de 0,1  $\mu\text{m}$  à 1000  $\mu\text{m}$ . En nous fondant sur l'expertise du LCPM dans l'élaboration de nanosphères de poly(acide lactique) (PLA) recouvertes de dérivés amphiphiles de dextrane, un polysaccharide bactérien non ionique (Figure 1), l'enjeu consistait à étudier de façon systématique les différents procédés permettant d'obtenir non seulement des objets de taille nanométriques mais aussi micrométriques avec des distributions granulométriques relativement étroites.

---

<sup>5</sup> Iredale, R.S., A.T. McDonald, and D.G. Adams, *A series of experiments aimed at clarifying the mode of action of barley straw in cyanobacterial growth control*. *Water Research*, 2012. **46**(18): p. 6095-6103.

<sup>6</sup> Lim, B.J., et al., *Application of barley straw to dammed river for algal control*. *Desalination and Water Treatment*, 2015. **54**(13): p. 3728-3736.

<sup>7</sup> Lu, Y.P., et al., *Inhibition of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze on *Microcystis aeruginosa* and isolation of the inhibition factors*. *Biotechnology Letters*, 2013. **35**(7): p. 1029-1034.



**Figure 1 : Particule matricielle**

L'objectif principal était d'encapsuler des dérivés polyphénoliques appartenant à la famille des esters de l'acide gallique dans les vecteurs particulaires élaborés et d'étudier leurs mécanismes de libération dans différents milieux. Nous souhaitons mettre en évidence l'influence de la taille des particules sur aussi bien la quantité encapsulée que sur le profil de libération.

Dans le premier chapitre de ce mémoire nous ferons l'inventaire des principaux vecteurs de substances actives décrits dans la littérature. Nous décrirons les conditions d'obtention et les applications des vecteurs de type particulaire notamment dans le domaine de la cosmétique, du textile, de l'agroalimentaire ainsi que dans le domaine environnemental. Les différents procédés « batch » et continus permettant l'obtention de nano- et microparticules avec des caractéristiques maîtrisées seront également décrits. La présentation des objectifs de cette thèse sera enfin détaillée et mise en perspective au regard de l'état de l'art.

Le deuxième chapitre est consacré à toutes les informations relatives aux produits et protocoles expérimentaux utilisés dans ce travail. Nous présenterons les caractéristiques des matériaux utilisés, la méthode de synthèse du stabilisant macromoléculaire (dextrane modifié) ainsi que les différentes procédures expérimentales d'élaboration et de caractérisation des nano- et microparticules de PLA chargées en substances actives. Toutes les techniques analytiques utilisées seront décrites de manière détaillée.

Le chapitre 3 examinera les conditions de préparation de particules par nanopréciipitation et par émulsion-évaporation de solvant avec des tailles bien maîtrisées et des distributions de tailles étroites. Les conditions opératoires permettant l'obtention de particules dans les domaines de taille n°1 (0,1  $\mu\text{m}$  - 1  $\mu\text{m}$ ) et n°3 (100  $\mu\text{m}$  – 1000  $\mu\text{m}$ ) seront établies. Une étude détaillée des caractéristiques des particules obtenues sera présentée, à savoir la quantité de dextrane déposé à la surface des particules et la stabilité colloïdale en fonction de la force ionique dans le cas des

nanoparticules, et enfin la stabilité des suspensions au cours de la lyophilisation pour l'ensemble des particules obtenues.

Dans le chapitre 4, nous décrivons le procédé d'émulsion-diffusion de solvant avec émulsification dans un système microfluidique qui permet l'élaboration de microparticules du domaine de taille n°2 (1  $\mu\text{m}$  - 100  $\mu\text{m}$ ). Les différentes étapes de fabrication de ces particules, allant de la mise au point du dispositif expérimental jusqu'à l'identification des conditions opératoires permettant l'obtention des microparticules, seront abordées dans ce chapitre.

Le chapitre 5 concernera l'encapsulation d'esters de l'acide gallique dans les différentes particules de PLA. Les conditions expérimentales permettant de maximiser les quantités encapsulées seront présentées. Les particules élaborées ont été caractérisées en termes de tailles, morphologies et quantités de SA encapsulées. Le taux de recouvrement en dextrane modifié a été évalué ainsi que la stabilité colloïdale des nanoparticules préparées. Les cinétiques de libération des SA à partir des particules des domaines de tailles n°1 et n°3 seront suivies et les phénomènes limitant cette libération seront identifiés.

Les résultats présentés dans le dernier chapitre de cette thèse porteront sur les études préliminaires d'utilisation de ces vecteurs pour des applications phytosanitaires. D'une part nous examinerons la transposition du procédé d'élaboration des nanoparticules, de l'échelle du laboratoire (25 mL) à l'échelle pilote (1 L). D'autre part des essais sur l'efficacité des nanoparticules chargées en substances actives pour le traitement des plans d'eau contenant des cyanobactéries seront décrits et nous amèneront à définir les quantités requises pour atteindre les effets souhaités.

Enfin, une conclusion générale rassemblera les principaux résultats et esquissera quelques perspectives.





# **Chapitre 1**

*Etude bibliographique*



# Table des matières

<b>1.1. Vecteurs de substances actives et domaines d'application</b>	<b>13</b>
<b>1.1.1. Les vecteurs de substances actives</b>	<b>13</b>
1.1.1.1. Les nano- et microparticules	13
1.1.1.2. Les agrégats de polymères	16
1.1.1.3. Les dendrimères	17
1.1.1.4. Les liposomes	18
<b>1.1.2. Domaines d'application des vecteurs particuliers de SA (nano- et microparticules)</b>	<b>19</b>
1.1.2.1. Cosmétique	21
1.1.2.2. Textile	23
1.1.2.3. Alimentaire et emballage	25
1.1.2.4. Agriculture et environnement	28
1.1.2.5. Lutte contre les espèces envahissantes dans les plans d'eau	31
<b>1.1.3. Conclusion et objectifs du travail de thèse</b>	<b>32</b>
<b>1.2. Elaboration de particules matricielles par procédés discontinus</b>	<b>34</b>
<b>1.2.1. Introduction</b>	<b>34</b>
<b>1.2.2. Principaux procédés discontinus utilisés pour l'élaboration des particules</b>	<b>35</b>
1.2.2.1. Nanoprécipitation	35
1.2.2.2. Procédé basé sur l'émulsification	37
1.2.2.3. Coacervation simple	44
1.2.2.4. Dialyse	46
1.2.2.5. Spray drying	48
1.2.2.6. Utilisation de fluides supercritiques	50
<b>1.2.3. Elaboration de particules recouvertes de polysaccharides amphiphiles: Dextranes modifiés</b>	<b>52</b>
<b>1.2.4. Conclusion et objectifs du travail de thèse</b>	<b>58</b>
<b>1.3. Procédé continu d'élaboration de particules : Microfluidique</b>	<b>59</b>
<b>1.3.1. Introduction</b>	<b>59</b>
<b>1.3.2. Généralités sur la microfluidique</b>	<b>59</b>
1.3.2.1. Rapide historique de la microfluidique	59
1.3.2.2. Avantages et inconvénients	60
<b>1.3.3. Emulsification</b>	<b>61</b>
1.3.3.1. Formation de gouttelettes à l'intérieur du microsystème	62
1.3.3.2. Facteurs ayant une influence sur la formation des gouttes dans un microsystème	66
<b>1.3.4. Elaboration de particules de polymère par microfluidique</b>	<b>69</b>
1.3.4.1. De la goutte à la particule : processus de solidification	70
1.3.4.2. Exemple de particules élaborées par microfluidique	72
<b>1.3.5. Conclusion et objectifs de la thèse</b>	<b>76</b>
<b>1.4. Conclusion générale et objectifs de la thèse</b>	<b>77</b>
<b>1.5. Références bibliographiques</b>	<b>79</b>



## 1.1. Vecteurs de substances actives et domaines d'application

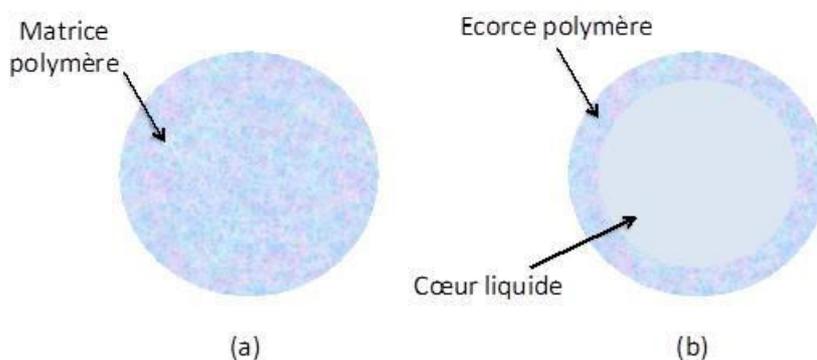
### 1.1.1. Les vecteurs de substances actives

L'utilisation de systèmes physico-chimiques pour l'encapsulation et la libération contrôlée dans le temps de substances actives (SA) suscite un vif intérêt dans un nombre croissant de domaines. Encapsuler une SA à l'intérieur d'un vecteur permet effectivement de l'isoler du milieu extérieur et donc de la protéger surtout lorsque cette substance est volatile, photosensible, thermosensible,... De plus, contrôler la libération d'une molécule dans un environnement permet d'en réduire la toxicité et les effets secondaires. Ces systèmes peuvent être conçus et adaptés pour l'encapsulation de molécules aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes ce qui revient à augmenter virtuellement la solubilité des molécules encapsulées dans le milieu où elles sont destinées à agir [1].

De nombreux systèmes de vectorisation sont décrits dans la littérature. Ainsi, seuls les vecteurs les plus utilisés ainsi que leurs caractéristiques seront présentés de façon synthétique dans ce qui suit.

#### 1.1.1.1. Les nano- et microparticules

Les nano- et microparticules sont des vecteurs ayant une taille inférieure au micromètre dans le cas des particules nanométriques et entre 1 et 1000  $\mu\text{m}$  pour les micrométriques. Deux catégories sont habituellement définies : les particules matricielles (nano- ou microsphères) et les particules réservoirs (nano- ou microcapsules).



**Figure 2: (a) nano/microsphère (b) nano/microcapsule.**

Les particules matricielles sont des particules solides sphériques. Elles peuvent avoir une surface aussi bien lisse que rugueuse. Une SA encapsulée se trouvera dispersée/solubilisée dans

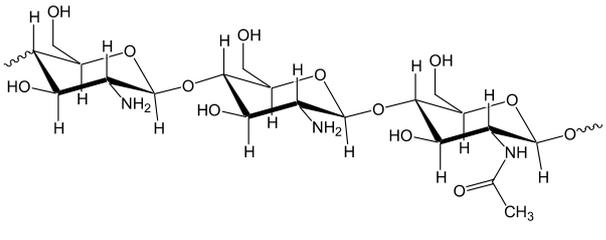
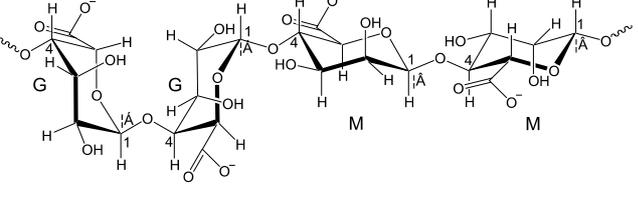
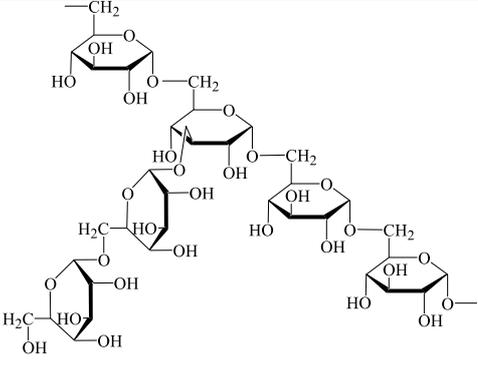
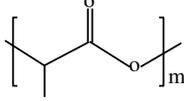
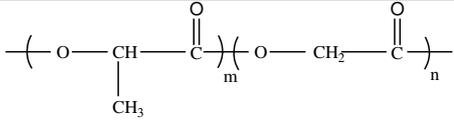
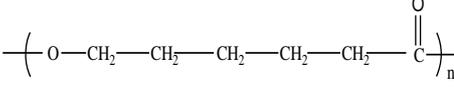
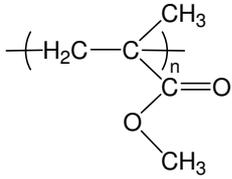
la matrice polymère [2-4]. Dans le but d'assurer la stabilité colloïdale de ces particules, des stabilisants moléculaires [5] et/ou macromoléculaires sont utilisés [6, 7]. Pour une même SA encapsulée dans un même polymère, la libération de la SA encapsulée dans des particules matricielles se trouve prolongée lorsque le diamètre des particules augmente.

Les capsules, quant à elles, sont des systèmes vésiculaires de type cœur-écorce solide. Le cœur de la capsule, généralement liquide, peut contenir des substances lipophiles ou hydrophiles selon les cas. L'écorce est formée par un polymère qui sert à protéger et contenir ce cœur liquide. Les SA peuvent être véhiculées à l'intérieur de la capsules sous forme dissoute, liquide ou dispersée, dans l'écorce ou dans le cœur liquide.

Plusieurs polymères biocompatibles et biodégradables ont été employés pour l'élaboration aussi bien de la matrice des sphères que des écorces des capsules. Ces polymères peuvent être classés en deux familles, les polymères naturels et les polymères synthétiques [8]. Le Tableau 1 regroupe les polymères les plus utilisés pour élaborer les vecteurs de SA.

Les polymères naturels sont beaucoup utilisés pour élaborer des vecteurs de SA micrométriques [9, 10]. Cependant, les polymères synthétiques sont largement utilisés pour l'élaboration aussi bien des nano- que des microparticules car ils possèdent certains avantages. Ainsi, leur composition chimique est facilement modulable, un contrôle de la distribution de leurs masses molaires ainsi qu'une maîtrise de leurs architectures peuvent également être obtenus par des méthodes de synthèse macromoléculaire appropriées. Il est à noter que les polyesters aliphatiques comme le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA) ou le poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) par exemple sont beaucoup utilisés pour l'élaboration de vecteurs de SA du fait de leur biocompatibilité et biodégradabilité [11]. Ils sont aussi agréés par la FDA (*Food and Drug Administration*).

**Tableau 1: Polymères naturels et synthétiques utilisés pour l'élaboration des nano- et microparticules.**

Origine	polymère	Structure chimique
Naturelle	Chitosane	
	Alginate	
	Dextran	
Synthétique	PLA	
	PLGA	
	PCL	
	PMMA	

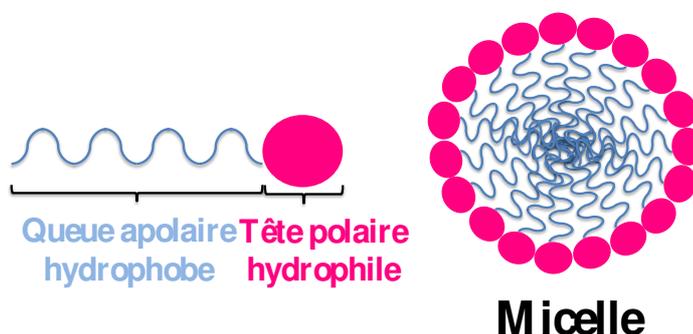
De nos jours, plusieurs produits pharmaceutiques commerciaux contiennent dans leurs formulations des particules matricielles ou à cœur liquide (Tableau 2).

**Tableau 2: Exemples de produits commerciaux contenant des microparticules ou des microcapsules [11, 12].**

Produit commercial	SA	Application	Industrie
CIPRO <sup>®</sup>	Ciprofloxacine	Infection microbienne	Bayer Inc
Micro-K <sup>®</sup>	Chlorure de potassium	Hypokaliémie	KV Pharmaceutical Co.
Nopap <sup>™</sup>	Paracétamol	Douleurs et fièvre	Mayne Pharma International
Fortovase <sup>®</sup>	Saquinavire	HIV	Roche
Lupron Depot <sup>®</sup>	Acétate de leuprolide	Cancer de prostate	TAP
Trelstar <sup>™</sup> Depot	Pamoate de triptoréline	Cancer de prostate	Pfizer
Risperidal <sup>®</sup>	Risperidone	Neuroleptiques	Johnson & Johnson

### 1.1.1.2. Les agrégats de polymères

Il s'agit d'agrégats de macromolécules amphiphiles [13, 14] formant spontanément, en milieu aqueux, un système de type cœur-écorce, lorsque la concentration des macromolécules dépasse une valeur critique. Les macromolécules amphiphiles s'auto-organisent en regroupant leurs parties hydrophobes à l'intérieur de l'agrégat, alors que leurs motifs hydrophiles restent en périphérie, en contact avec les molécules d'eau. Cet arrangement est similaire aux micelles obtenues avec des petites molécules de tensioactifs (Figure 3).



**Figure 3: Micelle sphérique de tensioactif.**

Les micelles de tensioactifs moléculaires peuvent se dissocier par dilution en milieux aqueux. En revanche, les agrégats de polymères peuvent se maintenir à des dilutions très importantes selon la structure des macromolécules. De tels systèmes physico-chimiques sont utilisés dans des formulations pharmaceutiques commerciales (Tableau 3).

**Tableau 3: Exemples de produits commerciaux contenant des agrégats de polymères [13].**

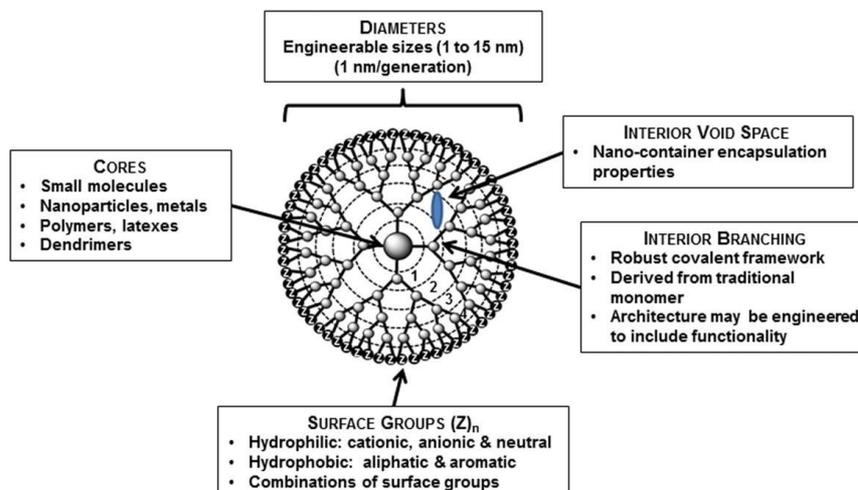
<b>Produit commercial</b>	<b>Polymère</b>	<b>Application</b>	<b>Industrie</b>
NK012	PEG-PGlu(SN38)	Cancer du sein	Nippon Kayaku Co., Japan
NK105	PEG-PAsp	Cancer de l'estomac	Nippon Kayaku Co., Japan
NK 911	PEG-PAsp	Cancer du pancréas	Nippon Kayaku Co., Japan
Genexol <sup>PM</sup>	PEG-PLA	Cancers du sein Cancer du pancréas	Samyang Co., Korea

### **1.1.1.3. Les dendrimères**

Les dendrimères sont des polymères fortement branchés, avec des paramètres macromoléculaires bien contrôlés ( $\mathcal{D} \sim 1,005$ ) (Figure 4). Ils sont constitués d'un cœur central, d'unités branchées comportant des groupements fonctionnels terminaux. Leur taille peut varier de 1 à 15 nm.

Des SA peuvent être encapsulées dans le cœur des dendrimères ou à leur surface par le biais de liaisons covalentes.

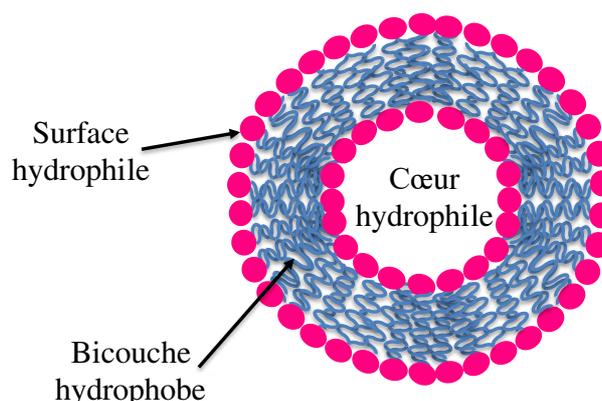
Les premiers dendrimères ont été formés par le poly(amidoamine) élaborés par l'équipe de Tomalia et al. [15]. Ils sont employés dans plusieurs domaines notamment la chimie, la nanotechnologie, la biomédecine ainsi que les sciences pharmaceutiques [16-19].



**Figure 4 : Représentation schématique d'un dendrimère comportant 4 points de branchement [19].**

#### 1.1.1.4. Les liposomes

Ils font partie de la famille des vésicules et sont constitués d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Les liposomes ont un diamètre qui peut varier de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres. Ils ont le principal avantage d'être à la fois non toxiques et biodégradables, du fait de leur composition en phospholipides qui sont des constituants naturels des membranes biologiques.



**Figure 5: Liposome.**

Les liposomes permettent d'encapsuler aussi bien des molécules hydrophiles dans leur cœur aqueux que des molécules hydrophobes dans leur bicouche.

Les liposomes ont été les premiers systèmes utilisés pour la libération des antibiotiques et

plusieurs chercheurs se sont basés sur le principe des liposomes pour développer de nouveaux systèmes de libération. Dans le domaine pharmaceutique, les liposomes sont reconnus comme les systèmes d'encapsulation et de libération de SA antibactériennes les plus utilisés. Les liposomes permettent d'assurer une vectorisation ciblée des SA et de réduire leurs éventuelles toxicités. De plus, les liposomes ont déjà montré leur efficacité pour l'encapsulation de la Doxorubicine ce qui permet de diminuer fortement sa toxicité cardiaque. Il en est de même pour la néphrotoxicité de l'Amphotéricine B [20]. Ils permettent également d'éviter l'apparition d'effets secondaires au moment de l'administration sous-cutanée, intra-dermique ou intramusculaire, que l'on observe avec certains principes actifs irritants. Ainsi, plusieurs produits pharmaceutiques, qui contiennent dans leur formulation des liposomes, sont commercialisés depuis des années (Tableau 4).

**Tableau 4: Exemples de produits pharmaceutiques commerciaux utilisant des liposomes dans leurs formulations [21].**

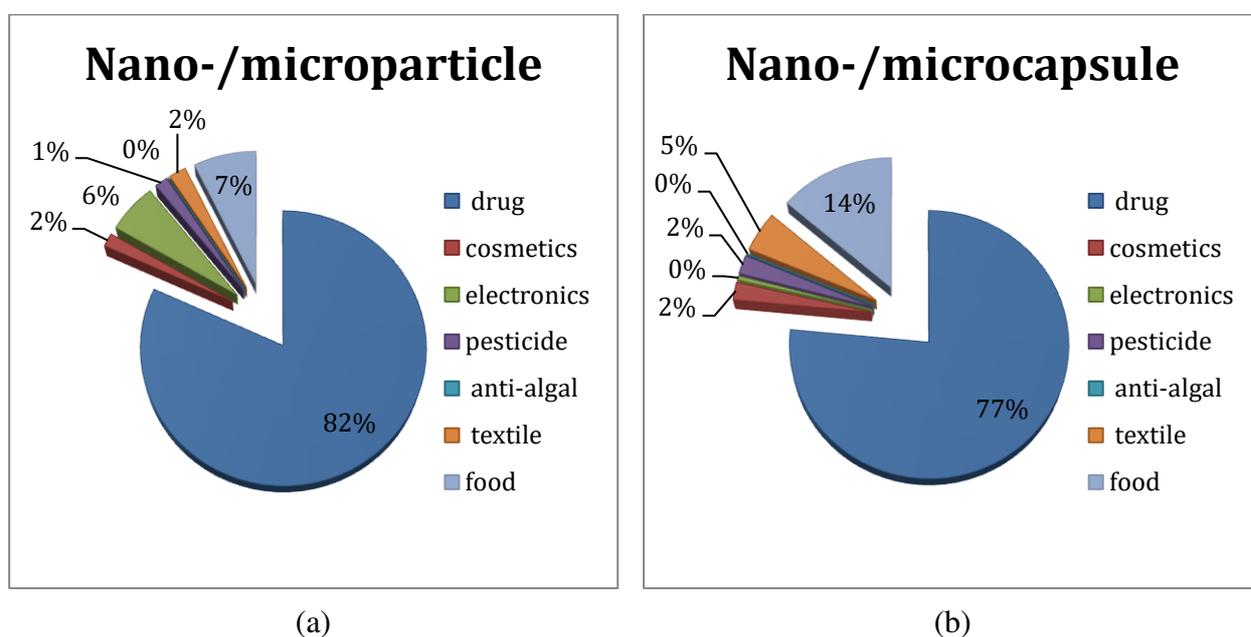
<b>Produit commercial</b>	<b>SA</b>	<b>Application</b>	<b>Industrie</b>
AmBiosome	Amphotericine B	Graves infections fongiques	NeXstar Pharmaceuticals
Doxila	Doxorubicine	Sarcoma de Kaposi (Cancer)	Sequus Pharmaceuticals
DaunoXome	Daunorubicine	Sarcoma de Kaposi (Cancer)	NeXstar Pharmaceuticals

### **1.1.2. Domaines d'application des vecteurs particuliers de SA (nano- et microparticules)**

De nos jours, les recherches scientifiques se tournent de plus en plus vers le développement de nouveaux produits innovants et de nouvelles technologies. Dans le cas des industries cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques, ces dernières investissent des millions de dollars dans le développement des technologies innovantes leur permettant d'obtenir des produits révolutionnaires avec des propriétés bien déterminées. L'utilisation de vecteurs pour l'encapsulation de molécules actives, arômes ou colorants ou autres substances, sert à protéger ces différentes molécules et à induire leurs libérations et en conséquence leurs actions de manières ciblées.

Les vecteurs de SA de type nano-/microparticules et nano-/microcapsules trouvent leurs application dans divers domaines : pharmaceutique, alimentaire, cosmétique,.... Nous avons

essayé d'évaluer la part des travaux scientifiques associée à chaque domaine utilisant ces vecteurs. Pour cela, nous nous sommes basés sur les résultats des recherches effectuées sur la base de données « Web of Knowledge » en associant dans chaque recherche un des mots-clés suivant : « nanoparticle », « microparticle », « nanocapsule » ou « microcapsule » avec l'un des termes suivants : « drugs », « cosmetics », « electronics », « pesticide », « anti-algal », « textile » ou « food » (Figure 6 (a) et (b)). Les résultats obtenus confirment bien que le domaine pharmaceutique reste le domaine où se retrouve la grande majorité des travaux publiés dans la littérature scientifique sur les nano-et microparticules ainsi que sur les nano-et microcapsules.



**Figure 6: Part des travaux publiés jusqu'au mois d'Avril 2016 mentionnant les (a) Nano-/microparticules ou (b) Nano-/microcapsules en fonction des domaines d'applications – recherche dans la base de données « Web of Knowledge »**

L'utilisation des vecteurs de SA dans le domaine pharmaceutique [22-25] étant largement décrite dans la littérature et l'objet de cette thèse n'étant pas dans ce domaine, nous avons choisi d'axer notre recherche bibliographique sur d'autres domaines d'application comme la cosmétique, le textile, l'agroalimentaire et les emballages, ainsi que l'agriculture et l'environnement.

### 1.1.2.1. Cosmétique

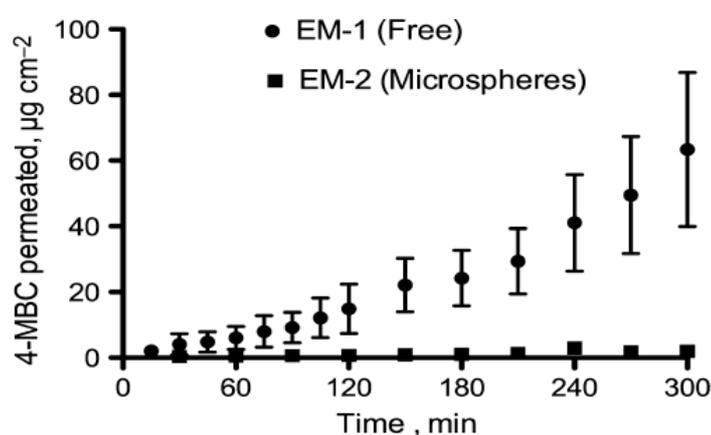
Les industries cosmétiques sont constamment à la recherche de technologies innovantes. Ces dernières années, l'intérêt porté à la microencapsulation et au développement de produits composés de vecteurs, dans lesquels des parfums, des conservateurs ou des huiles essentielles sont encapsulés, est en plein essor.

Wattanasatcha et al. [26] se sont intéressés à l'élaboration de nanoparticules de méthylcellulose/éthylcellulose (1:1) dans lesquelles le thymol a été encapsulé. Le thymol est une substance antibactérienne qui permet d'agir contre l'*E.coli*, *P.aeruginosa* ainsi que *S.aureus* par exemple. L'équipe de Wattanasatcha a élaboré des nanoparticules ayant un diamètre égal à  $420 \pm 118$  nm incorporées dans plusieurs formulations cosmétiques et contenant du thymol. Dans le cas de lotions cosmétiques, la présence de nanoparticules contenant du thymol a permis d'éviter le développement des bactéries citées plus haut pendant toute la période du test qui est égale à 3 mois. Dans le cas où le thymol est incorporé directement dans la formulation la prolifération bactérienne n'est stoppée que pendant 2 à 4 semaines maximum en utilisant les mêmes concentrations initiales de thymol.

Fernandes et al. [27] ont développé des nanoparticules de PLA/colorant pour le traitement des troubles de follicules pileux. Ces particules présentent l'avantage de traiter les follicules pileux en pénétrant dans leurs bulbes sans atteindre l'épiderme. L'utilisation des nanoparticules dans la formulation de tels produits permet de véhiculer la SA jusqu'à la cible et d'avoir une meilleure efficacité du traitement. L'efficacité thérapeutique de ces nanoparticules sur le traitement des follicules pileux, leurs stabilité colloïdale maintenue durant plus de 6 mois, l'absence de toxicité sur les cellules de la peau ainsi que l'efficacité d'encapsulation et de libération de molécules modèles lipophiles (Rouge de Nil) et hydrophiles (Isothiocyanate de fluorescéine - FITC) font que ces nanoparticules sont des formulations intéressantes pour le développement de nouveaux produits cosmétiques.

Le 3-4 méthylbenzyldiène camphre (4-MBC) est un filtre UV largement utilisé dans les formulations cosmétiques solaires. Cependant, plusieurs études ont montré qu'il peut provoquer des effets de perturbation endocrinienne. Monti et al. [28] ont encapsulé cette SA dans des microparticules élaborées à partir du Eudragit® RS 100 (poly(acrylate d'éthyle-co-méthacrylate de méthyle-co-chlorure de méthacrylate de triméthylammonium éthyle) 1:2:0.1) dans le but de les incorporer ensuite dans des formulations cosmétiques d'écran solaire. La présence de microparticules de 4-MBC a permis d'avoir une libération prolongée du 4-MBC. En libérant progressivement cette SA, le risque d'irritation de la peau est réduit. De plus, le 4-MBC se

trouve protégé contre la photodégradation en étant encapsulé à l'intérieur des microparticules. Une comparaison entre la présence ou l'absence (dans la formulation cosmétique) de microparticules de 4-MBC sur la pénétration du 4-MBC à travers une peau reconstituée a été effectuée. La présence de microparticules de 4-MBC ayant une taille égale à 30  $\mu\text{m}$  dans la formulation étudiée a permis d'éviter une pénétration du 4-MBC dans la peau pendant toute la durée du suivi (300 minutes). Lorsque cette SA n'est pas encapsulée, sa pénétration a lieu dès les premières minutes.



**Figure 7 : Pénétration du 4-MBC ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) à travers la peau en fonction du temps (épiderme reconstitué) [28]**

Les microparticules ont été aussi utilisées dans des formulations de crèmes antirides. Kim et al. [29] ont choisi d'encapsuler le rétinyl rétinoate (RR), une substance possédant des propriétés antirides, dans des microparticules de PLA. L'encapsulation de cette SA permet de la protéger contre la chaleur, la lumière et l'oxygène qui peuvent déclencher des réactions de dégradation. Les microparticules élaborées ont une taille moyenne égale à 12,8  $\mu\text{m}$ . L'utilisation de crèmes formulées avec des microparticules contenant le RR est plus efficace que l'utilisation de crèmes formulées avec du RR non encapsulé. La présence de microparticules permet une meilleure pénétration du RR dans la peau et par la suite une meilleure efficacité du traitement.

Nous avons présenté des exemples de nano- et microparticules matricielles utilisées dans des formulations cosmétiques. Dans ce même domaine, l'encapsulation des huiles essentielles et des parfums se fait plus dans des particules réservoirs (nano- ou microcapsules) [30, 31].

### 1.1.2.2. Textile

Le domaine du textile s'étend du textile classique utilisé pour l'habillement au textile technique utilisé dans le domaine médical, sportif ou encore dans les cosmétotextiles (parfum, substance hydratante pour la peau,...). La tendance générale est de donner de plus en plus de fonctionnalités aux textiles pour qu'ils soient conformes aux attentes techniques des consommateurs. Ces fonctionnalités peuvent être intrinsèques aux fibres (Tableau 5) ou peuvent être apportées par la fixation de particules dans lesquelles des SA sont encapsulées.

**Tableau 5: Exemples de fibres commerciales présentant des propriétés de fonctionnalisation intrinsèques.**

Nom commercial de la fibre	Origine	Application	Réf.
Cocona <sup>®</sup> (37.5)	Noix de coco	Fabrication de vêtements imperméables plus respirant	[32]
Milkofil <sup>®</sup>	Caséine du lait	Stimulation de la circulation sanguine Amélioration de la respiration de la peau	[33]
Lenpur <sup>®</sup>	Pulpes du pin blanc du Canada	Propriétés anallergiques et anti-odeurs	[34]
Sportwool <sup>™</sup>	Combinaison entre la laine Mérino et le polyester	Fabrication de vêtements légers, élastiques, respirant anti-odeur et protégeant des UV	[35]
TENCEL <sup>®</sup>	Cellulose	Propriétés superabsorbantes et thermorégulatrices	[36]

Depuis plusieurs années, l'intérêt porté à la fonctionnalisation du textile par la fixation de nano- et microparticules ne cesse d'augmenter [37, 38]. L'encapsulation de SA dans des particules fixées sur le textile permet, selon les cas, d'améliorer les propriétés olfactives du tissu, d'y apporter des propriétés antibactériennes, autonettoyantes ou encore retardatrices de flamme. Le tissu peut également acquérir des propriétés thermorégulatrices par encapsulation de matériaux à changement de phase. L'utilisation de ces vecteurs de SA pour le textile a permis le développement des textiles « intelligents » (Tableau 6). Ces derniers trouvent leur application dans plusieurs domaines : médical, sportif, militaire ou même cosmétique (cosmétotextile).

Il est à noter que, dans le domaine du textile, le terme microcapsule (ou nanocapsule) est utilisé pour désigner aussi bien des particules à cœur huileux que des particules matricielles

(sphères) [39]. Dans plusieurs cas, il n'est pas évident de savoir si les objets décrits dans des publications sont des sphères ou des capsules à cœurs huileux.

Goetzendorf-Grabowska et al. [40] se sont intéressés, depuis quelques années, à l'élaboration de particules PLA-Triclosan. Ces microsphères (diamètre = 3 µm) à vocation antibactérienne ont été imprégnées sur des fibres de viscose non tissées. Récemment, ces mêmes auteurs [41] ont fixé ces mêmes microsphères sur des fibres de polyester et de polypropylène dans le but de développer un nouveau filtre à air à partir de tissu fonctionnalisé. La nature de la fibre utilisée pour le textile ainsi que la technique d'imprégnation ont toutes les deux une influence sur la fixation des microparticules et sur l'efficacité du maintien de l'activité du tissu. Les tests préliminaires de l'utilisation d'un filtre à air fabriqué à partir d'un tissu de polyester fonctionnalisé en utilisant les microparticules de PLA-Triclosan ont montré que l'activité antimicrobienne peut être maintenue jusqu'à 12 mois.

**Tableau 6: Exemples de nano- ou microparticules commerciales utilisées dans les textiles « intelligents ».**

<b>Nom commercial</b>	<b>Caractéristiques des substances encapsulées</b>	<b>Application</b>	<b>Industrie</b>
SunCaps®	Ecran solaire	Vêtements avec un indice SPF élevé qui permettent d'assurer une bonne protection contre les rayons UV	Particle Sciences, Inc.
Vitatek®	Vitamine E	Vêtements, gants, chaussettes	J&C Microchem, Inc.
EuraTherm®	Thermochrome	Vêtements (T-shirts qui changent de couleur en fonction de la température)	EURACLI
Thermasorb®	ComforTempTechnology développée par la NASA Matériau à changement de phase (Ex: paraffine)	Combinaisons militaires Combinaisons de ski Chaussures de sport ...	J&C Microchem, Inc.

Dans le but de fonctionnaliser les tissus à l'aide de nano- ou microparticules, plusieurs procédés peuvent être utilisés. Parmi ces procédés, on peut trouver le foulardage, l'enduction, la pulvérisation...[42-45]. Afin d'avoir une bonne adhésion des particules au textile, un composé supplémentaire doit être ajouté à la formulation de particules. Ce composé est appelé liant et est

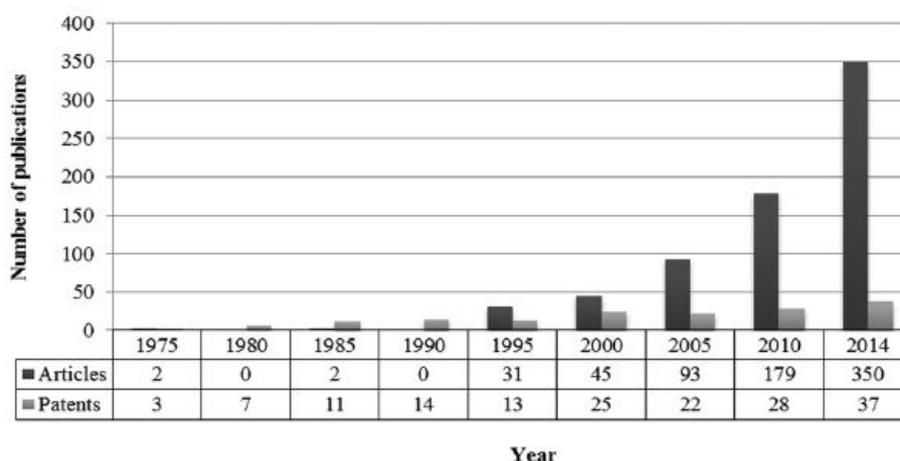
choisi non seulement en fonction de la dispersion de nano- ou microparticules utilisée et de la nature du textile mais aussi en fonction de la technique choisie pour la fixation et des caractéristiques attendues (douceur, souplesse...).

Plusieurs textiles fonctionnels ont été développés ces dernières années [46, 47]. L'évolution de la technologie a permis de commercialiser de tels produits qui faisaient partie, quelques dizaines d'années plutôt, du domaine de la science fiction (Tableau 6).

### 1.1.2.3. Alimentaire et emballage

L'encapsulation de SA antioxydantes, antimicrobiennes, probiotiques ou autres dans des nano- ou microparticules et l'utilisation de ces dernières aussi bien dans la formulation alimentaire que dans les emballages [48-53] [54] a suscité un grand intérêt ces dernières années (Figure 8).

En effet, l'encapsulation de ces substances dans des systèmes matriciels nano- ou micrométriques permet les libérer de manière contrôlée, ciblée et avec des concentrations fixées, tout en les protégeant contre la perte de leur activité [52, 55]. En fonction de la cinétique de libération désirée, l'encapsulation sera effectuée à partir de vecteurs nano- ou micrométriques [56]. Dans ce qui suit, nous allons présenter quelques uns des exemples de la littérature qui concernent aussi bien les aliments que les emballages.



**Figure 8: Evolution du nombre d'articles de revues et de brevets scientifiques qui traitent la microencapsulation pour des application dans le domaine alimentaire entre 1970 et 2014 [54].**

#### **1.1.2.3.1. Aliments**

Les arômes alimentaires sont introduits lors de la formulation d'un produit. Cependant, la plupart des arômes sont très volatils. La microencapsulation était donc la solution pour remédier aux problèmes de volatilité. Plusieurs études ont examiné l'influence de la nature du matériau constituant les nano- ou microparticules dans lesquels l'encapsulation a lieu ainsi que le procédé utilisé sur l'efficacité de l'encapsulation des arômes [57]. Parmi les arômes utilisés dans l'industrie alimentaire, nous pouvons citer le L-menthol. Ce dernier est un arôme présent sous forme solide. Il possède une température de fusion entre 41 et 43°C et est très volatil [58]. Ce problème de volatilité limite son utilisation. Pour y remédier Yoshii et al. [59] ont encapsulé le L-menthol dans des microparticules formées par de la maltodextrine et de la gomme arabique.

L'encapsulation de colorants a été aussi l'objet de plusieurs travaux. En plus d'être un colorant naturel, le curcumin présente des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires ainsi qu'anticancéreuses. Cependant, sa faible solubilité dans l'eau limite sa solubilité dans les produits alimentaires et réduit son absorption dans l'organisme. Récemment, Gomez-Estaca et al. [60], ont étudié l'encapsulation du curcumin dans des microsphères de gélatine. Les microparticules élaborées présentent un diamètre entre 0,5 à 1,2 µm. L'évaluation de la solubilité dans l'eau a montré que la solubilité du curcumin dans l'eau passe de 2 mg/L dans le cas où il n'est pas encapsulé à 77,2 mg/L dans le cas où il est encapsulé dans la gélatine. Concernant sa bio-accessibilité *in vitro* dans un milieu simulé de digestion gastrointestinale, une augmentation est aussi notée (0,23 à 2,63 µg/100 µg de curcumin) même si elle est moins prononcée que celle de la solubilité. L'application de ces particules à la matrice modèle alimentaire a montré une meilleure dispersion de la couleur jaune (apportée par le curcumin) et une amélioration de l'activité antioxydante lorsque des microparticules sont utilisées dans la formulation plutôt que lorsque le curcumin commercial est utilisé directement. En effet, la quantité présente dans la matrice et qui est bio-accessible, est plus importante dans le cas où le curcumin est encapsulé dans les microparticules.

Il est à noter que l'élaboration de particules nano- ou micrométriques matricielles dans la littérature, pour des applications alimentaires, est beaucoup moins représenté que l'étude des nano- ou microcapsules. Ceci peut s'expliquer par la nature des SA alimentaires qui sont encapsulées et qui sont le plus souvent liquides [61, 62].

### **1.1.2.3.2. Emballages**

Les emballages alimentaires protègent les aliments du milieu extérieur, ils les conservent et constituent aussi le support des informations nutritionnelles destinées aux consommateurs. De nos jours, beaucoup de matériaux polymères sont utilisés à la place des emballages plus conventionnels (en verre, céramique ou métal). En effet, les emballages en polymère présentent l'avantage d'avoir une faible masse, un coût de production peu élevé et sont très faciles à produire. Cependant, ces emballages présentent l'inconvénient d'être moins rigides que les emballages classiques [63] et relativement perméables aux gaz et à la vapeur d'eau [51]. Pour remédier à ces problèmes et dans le but d'améliorer les propriétés mécaniques et thermiques des emballages alimentaires, les chercheurs se sont intéressés à l'incorporation de substances spécifiques dans les emballages permettant de renforcer leurs propriétés, d'améliorer leurs performances (« active packaging ») ou de fournir des informations sur l'historique et/ou sur la qualité des aliments (« smart packaging ») [56, 64, 65]. Dans ce qui suit, nous allons présenter des exemples de nano- et microparticules utilisées dans les emballages pour renforcer certaines de leurs caractéristiques.

Des nanoparticules d'argent ou encore de  $\text{TiO}_2$  qui ne contiennent aucune SA présentent des caractéristiques permettant par leur présence dans certaines formulations de renforcer les propriétés thermiques, mécaniques ou même antibactériennes des emballages [66].

Dans le cas des emballages actifs (« active packaging »), l'emballage ne joue pas uniquement un rôle de barrière protectrice passive comme pour les emballages conventionnels, mais plutôt il interagit avec les aliments de la manière souhaitée. Ces emballages peuvent contenir des particules dans lesquelles des substances antimicrobiennes ou antioxydantes sont encapsulées. Di Maio et al. [67] se sont intéressés à l'élaboration d'un film de PLA actif, en y incorporant des microparticules de PLA (160  $\mu\text{m}$ ), dans lesquelles une substance anti-oxydante ( $\alpha$ -tocophérol) a été encapsulée. Ce film présente des propriétés optiques et barrières à l'oxygène similaires à celles d'un film de PLA mais sa ductilité se trouve largement améliorée par la présence des microparticules. Cette amélioration de la ductilité du film est due à la SA qui, par sa présence, plastifie le PLA. Des tests préliminaires sur la durée de conservation du brocoli frais dans ce film actif ont été effectués. Il a été démontré que ce légume peut être conservé dans un très bon état durant plus d'un mois. La libération progressive de l'antioxydant encapsulé dans les microparticules est responsable de la bonne conservation du brocoli.

Le nisipalin<sup>®</sup> est une protéine antibactérienne thermosensible qui perd son activité lorsqu'elle est exposée à des températures élevées, ce qui est le cas des températures utilisées lors de

l'élaboration des films de PLA/nispalin<sup>®</sup> qui peuvent atteindre 190°C. Pour éviter la perte d'activité antibactérienne du nispalin<sup>®</sup>, Liu et al. [68] ont essayé d'encapsuler cette protéine dans des microparticules de pectine (30 µm) puis de préparer des films de PLA en y incorporant ces microparticules. Les résultats d'évaluation de l'activité antimicrobienne ont montré que les films incluant ces microparticules sont thermorésistants et peuvent empêcher le développement du *L. monocytogenes* (10 minutes à 160°C). En revanche, la présence des microparticules pectine/nispalin<sup>®</sup> dans les films provoque une diminution de certaines propriétés mécaniques. Néanmoins, ce film peut être utilisé comme couche interne dans des emballages actifs multicouches.

Woranuch et al. [69, 70] ont étudié l'encapsulation de l'eugénol dans des nanoparticules de chitosane. Cette SA phénolique d'origine naturelle présente des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes et a été utilisée précédemment en pharmacie, cosmétique et alimentaire [71, 72]. Cependant, comme la plupart des composés phénoliques dérivés des plantes, l'eugénol est sensible à l'oxygène, à la lumière ainsi qu'aux hautes températures. L'exposition de nanoparticules de chitosane/eugénol (80 - 100 nm) à des températures élevées (155°C) a montré que l'activité antioxydante de l'eugénol est maintenue.

L'incorporation de ces nanoparticules dans des films préparés par extrusion, à partir de mélanges de farines thermoplastiques, a permis de leur conférer une activité antioxydante maintenue même à 170°C [70].

#### **1.1.2.4. Agriculture et environnement**

Le changement climatique, l'urbanisation, l'exploitation continue des ressources naturelles et environnementales ainsi que l'accumulation des fertilisants et pesticides dans la nature, présentent un réel danger pour l'environnement dans le monde. Cependant, la demande mondiale en production agricole ne cesse de croître en raison d'un accroissement démographique continu (la population mondiale pour 2050 est estimée entre 6 à 9 milliards d'individus [73]). C'est pourquoi, il est nécessaire d'optimiser cette production en minimisant les pertes notamment dans les champs (en utilisant par exemple des insecticides ou des pesticides) et en améliorant sa qualité et son rendement (en utilisant par exemple des engrais et des fertilisants) [74].

Ces dernières années de nouvelles formulations comportant des SA encapsulées dans des nano- ou microparticules sont en cours de développement, notamment des polymères et des SA biodégradables et/ou d'origine naturelle [75, 76]. Dans la littérature, les publications

scientifiques qui traitent l'encapsulation des SA agricoles (pesticides, fongicides, fertilisants,...) peuvent être classées en deux catégories. La première catégorie concerne l'évaluation de l'efficacité de l'incorporation des nano- ou microparticules, dont le processus de préparation est déjà connu, dans des formulations de produits agricoles. Un autre groupe de travaux explore la conception de nouveaux vecteurs à base de polymères renfermant des SA spécifiques à des traitements appliqués en agriculture [76]. Plusieurs revues sont aujourd'hui disponibles dans la littérature et décrivent les différentes formulations de pesticides, fongicides, insecticides ou autres encapsulés dans des nano- ou microparticules matricielles [76-78]. Dans ce qui suit, nous présenterons des exemples de particules matricielles dans lesquelles des SA biocides ont été encapsulées.

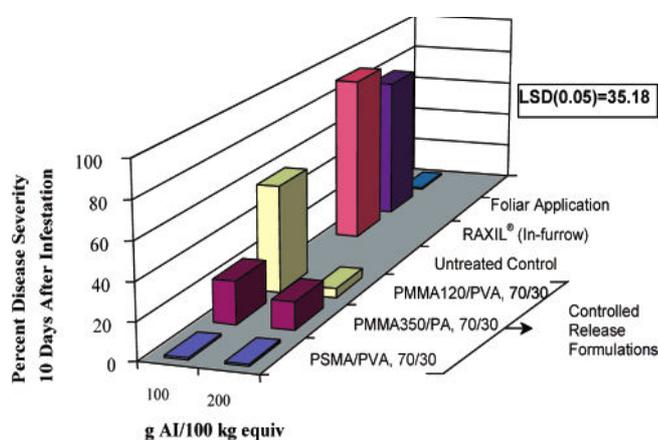
Boehm et al. [79] ont étudié l'encapsulation d'un insecticide permettant le traitement des plantes de coton infectées par des Aphidoidea. L'insecticide a été encapsulé dans des nanosphères de PCL ayant une taille égale à 135 nm. Une comparaison entre les résultats obtenus par application directe d'une suspension classique de SA avec une suspension de nanoparticules comportant l'insecticide a été effectuée. Il s'est avéré que dans les deux cas une action rapide sur les Aphidoidea a lieu. Cependant, la plus faible taille des nanoparticules permet d'assurer une meilleure pénétration de l'insecticide dans les plantes et d'avoir une action plus ciblée.

Martin et al. [80] se sont intéressés à l'élaboration de microsphères de PEG, polyvinylpyrrolidone (PVP) et d'alginate de sodium pour l'encapsulation de la roténone, une substance possédant des propriétés insecticides et extraite de plantes tropicales (*derris elliptica*). La roténone présente une faible solubilité dans l'eau et est photodégradable, ce qui fait que son activité est perdue au bout de 2 à 3 jours après une application directe. Des particules de PEG, PVP et d'alginate, dans lesquelles la roténone a été encapsulée, ont été préparées à l'aide d'un fluide supercritique. La taille des microparticules obtenues varie entre 0,7 et 1,5  $\mu\text{m}$  et l'efficacité d'encapsulation variait entre 40 – 53 % pour la PVP et 98 – 100 % pour le PEG et l'alginate. Ce dernier étant le polymère à plus faible coût, les microparticules Alginate/Roténone sont donc intéressantes pour des applications dans des formulations insecticides.

D'autres chercheurs ont étudié l'encapsulation du Tébuconazole, une molécule fongicide, dans des nanoparticules de PMMA ou poly(styrène-co-anhydride maléique) (PSMA) [81]. L'objectif est de réduire sa phyto-toxicité et de prolonger sa durée d'activité. Actuellement, il existe un produit commercial à base Tébuconazole commercialisé par Bayer sous le nom Raxil<sup>®</sup> pour le traitement des céréales contre la rouille brune (*puccinia recondita*). L'utilisation de ce produit en excès peut endommager les graines et réduire la germination. Plusieurs formulations de

particules ont été élaborées. La taille des microsphères obtenues varie entre 4 et 13,5  $\mu\text{m}$  avec un pourcentage d'efficacité d'encapsulation élevé variant entre 94,8 et 98,3 %. Des essais de bio-efficacité de certaines formulations, comportant les microparticules de Tébuconazole, ont été réalisés *in vitro* sur des feuilles de blé infectés par la rouille brune (après dix jours d'infection, Figure 9).

Les formulations à base de microparticules dans lesquelles le Tébuconazol se trouve encapsulé agissent sur la rouille brune. L'utilisation de la formulation PSMA/PVA 70/30 (le poly(vinyl acétate) (PVA) est utilisé comme plastifiant de la matrice PSMA) avec différentes concentrations dans le sol assure la meilleure bio-efficacité et montre des résultats comparables à ceux obtenus en appliquant le Tébuconazol directement sur les feuilles.



**Figure 9: Evaluation de l'intensité de l'infection des feuilles du blé 28 jours après l'application du traitement contenant les microparticules dans le sol comparé à un modèle (sans aucun traitement pour le sol), à un traitement par le Raxil® et à une pulvérisation foliaire [81].**

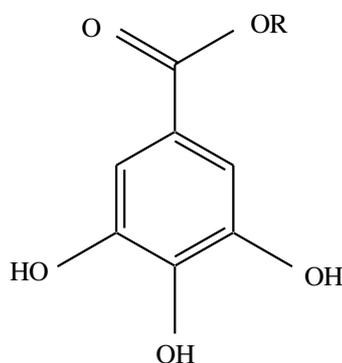
Perera et al. [82] ont étudié l'encapsulation de l'Atrazine dans des nanosphères de PCL et ont ensuite évalué l'efficacité des formulations comportant ces nanoparticules sur l'élimination des mauvaises herbes. L'Atrazine est un herbicide qui permet l'élimination des herbes indésirables lors de leur pré- ou post-développement. Ces herbes entrent en compétition, en ce qui concerne l'apport en lumière, en nutriments et en eau, avec le produit agricole et gênent sa croissance. Néanmoins, l'injection de cette substance directement peut induire une perte dans son activité biologique et peut aussi interagir avec d'autres composés et provoque sa dégradation et la contamination du sol par bioaccumulation des SA dégradées ou qui n'ont pas atteint leurs cibles. Une solution possible pour remédier à tous ces problèmes revient donc à encapsuler l'Atrazine dans des nanosphères. Les nanoparticules de PCL/Atrazine ont un diamètre égal à  $408,5 \pm 2,5$

nm et présentent une efficacité d'encapsulation en herbicide élevée ( $92,7 \pm 1,2\%$ ) ainsi qu'une bonne stabilité colloïdale maintenue pendant 90 jours. Un suivi *in vitro* a montré que l'herbicide encapsulé n'a aucun effet sur les organismes non ciblés du milieu mais il est très efficace sur les organismes-cibles par comparaison à l'effet de l'herbicide ajouté directement. Ceci confirme que l'encapsulation améliore la bio-disponibilité de l'herbicide. La réduction des concentrations et des quantités d'herbicides appliquées dans le milieu à traiter aide à réduire les effets toxiques subis par les organismes non ciblés.

#### **1.1.2.5. Lutte contre les espèces envahissantes dans les plans d'eau**

Plusieurs facteurs dont certains provenant des activités humaines (pollution, eutrophisation), conduisent à des développements de cyanobactéries ou d'efflorescences algales très importants voire envahissants dans des plans d'eau naturels ou artificiels. Ces phénomènes indésirables posent de nombreux problèmes (notamment de biodiversité et de santé publique) et ont aussi des coûts sociaux-économiques. Pour y remédier, l'usage de produits algicides tels que le sulfate de cuivre constitue un moyen certes efficace mais pas sans conséquence. Il est en effet néfaste sur l'environnement en particulier du fait de sa toxicité pour de nombreuses espèces non ciblées [83]. Dans le but de concevoir des traitements ayant moins d'impact environnemental, plusieurs stratégies sont envisageables parmi lesquelles nous citerons l'emploi de SA plus spécifiques des espèces envahissantes ciblées et la libération contrôlée dans le temps et dans l'espace de produits inhibant la croissance des algues ou des cyanobactéries.

La recherche de nouvelles SA a suscité beaucoup d'intérêt de la part des scientifiques, notamment à propos des substances sécrétées par certaines espèces aquatiques (plantes ou micro-organismes) dans le but d'inhiber la croissance d'autres espèces (on parle de substances allélopathiques) [84]. Dans la même idée, la décomposition de certains végétaux en milieu aquatique produit des molécules qui inhibent la croissance des algues [85]. Le cas de la paille d'orge est certainement le plus connu et il est même à l'origine de produits commercialisés [86-88]. La principale difficulté réside dans l'identification des SA responsables des effets observés et dans la possibilité d'en disposer en quantités suffisantes pour les utiliser dans la formulation de traitements. Des molécules de la famille des polyphénols ont été identifiées [84], en particulier l'acide gallique [89, 90] et certains de ses esters [91] (Figure 10).



**Figure 10: Acide gallique (R = H) et ses esters (R ≠ H).**

L'autre piste mentionnée plus haut consiste à développer des vecteurs de SA algicides permettant de libérer localement des quantités adaptées de molécules actives dans le but de réduire le plus possible les effets indésirables et d'accroître l'efficacité du traitement. Cette stratégie est complémentaire à la précédente. L'étude de la littérature démontre que cette dernière voie a été très peu explorée (Figure 6, page 20). Plus précisément, 4 articles seulement évoquent l'encapsulation et la libération contrôlée de substances visant à inhiber la croissance d'algues ou de cyanobactéries. Ils sont tous parus à partir de 2013. Deux SA ont été considérées dans ces travaux en question : l'artémicinine [92, 93] et l'acide linoléique [94, 95]. Les vecteurs sont des particules polymères millimétriques constituées d'alginate et de chitosane réticulés physiquement par du chlorure de calcium et chimiquement par du glutaraldéhyde. Hormis ces travaux, aucune autre étude n'aborde l'encapsulation de SA dans la conception d'un traitement contre les espèces envahissantes des plans d'eau.

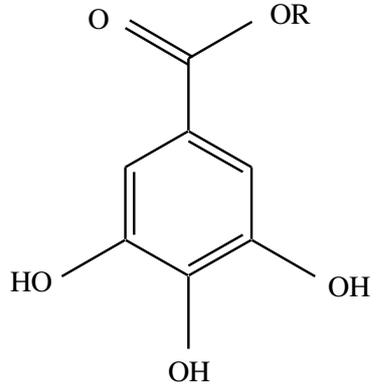
### **1.1.3. Conclusion et objectifs du travail de thèse**

Dans cette première partie bibliographique, nous avons exposé les principaux vecteurs de SA évoqués dans la littérature. Nous nous sommes intéressés à la présentation des différents domaines d'applications de ces vecteurs (cosmétique, textile, alimentaire, emballage, agriculture et environnement) en dehors du domaine thérapeutique, qui est de loin le plus représenté dans la littérature scientifique.

Cette revue bibliographique a fait ressortir que l'usage de vecteurs particuliers dans des traitements visant à inhiber la croissance des algues et des cyanobactéries dans les plans d'eau douce n'a pratiquement jamais été rapporté, à part dans quelques études très récentes. C'est dans ce contexte que se situe ce travail de thèse. Son objectif est la mise au point d'un traitement

contre certaines espèces invasives des plans d'eau douce (algues et cyanobactéries) avec un moindre impact sur l'environnement. Dans ce but, notre stratégie consistera à utiliser l'encapsulation dans des particules matricielles, afin d'avoir un traitement confiné spatialement et d'assurer une libération progressive des SA algicides ou algistatiques. L'identification de SA spécifiques des espèces ciblées et sans effets sur la faune et la flore est un des objectifs du projet BioCapTech mais n'entre pas dans le champ de ce travail de thèse. En conséquence, nous avons choisi d'utiliser des molécules modèles, ayant une structure chimique similaire à celles de substances identifiées dans la littérature. Les molécules retenues sont les esters de l'acide gallique du type gallate de n-alkyle (Tableau 7).

**Tableau 7 : Esters de l'acide gallique de type gallate de n-alkyle à encapsuler.**

Formule générale	Nom de la substance	R
	Gallate d'éthyle (GE) Gallate de propyle (GP) Gallate d'octyle (GO) Gallate de nonyle (GN) Gallate de lauryle (GL)	$\text{CH}_2\text{CH}_3$ $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ $(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$

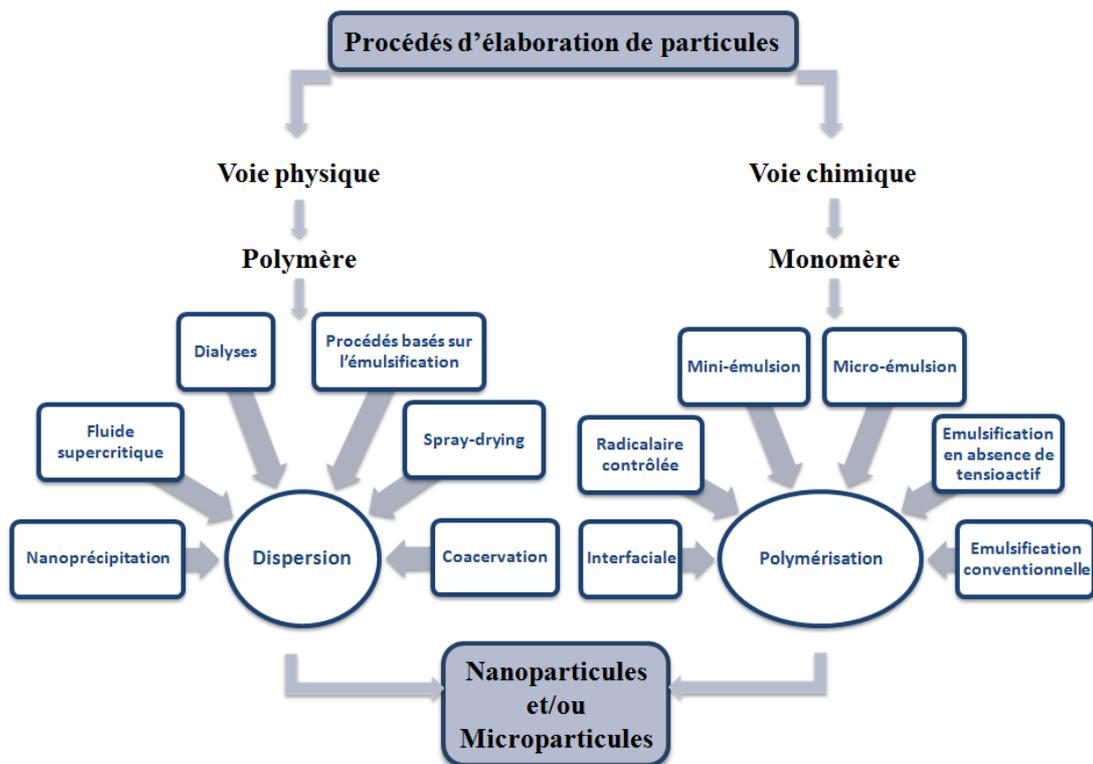
Ces composés présentent des propriétés, antioxydantes [96-100] antibactériennes [101, 102], anticancéreuses [103, 104], antivirales [105], anti-âge [106] et même fongicides [107-109]. Ils sont notamment utilisés dans des applications alimentaires [107, 110, 111], cosmétiques [99, 112] ou thérapeutiques [113]. Toutefois, à notre connaissance, l'encapsulation de ces esters d'acide gallique dans des particules matricielles ou des capsules n'a jamais été rapportée.

Dans la deuxième partie de notre étude bibliographique, nous allons nous intéresser aux procédés batch d'élaboration de ces particules matricielles submicroniques et micrométriques. Le principe de chaque procédé sera exposé. Les paramètres ayant une influence sur la taille des particules obtenues seront aussi analysés.

## 1.2. Elaboration de particules matricielles par procédés discontinus

### 1.2.1. Introduction

Les procédés d'élaboration de particules matricielles nano- et micrométriques décrits dans la littérature peuvent être classés en deux groupes : les procédés chimiques qui utilisent des monomères et incluent une étape de polymérisation [114-116] et les procédés physico-chimiques utilisant des polymères synthétisés par ailleurs [117, 118].



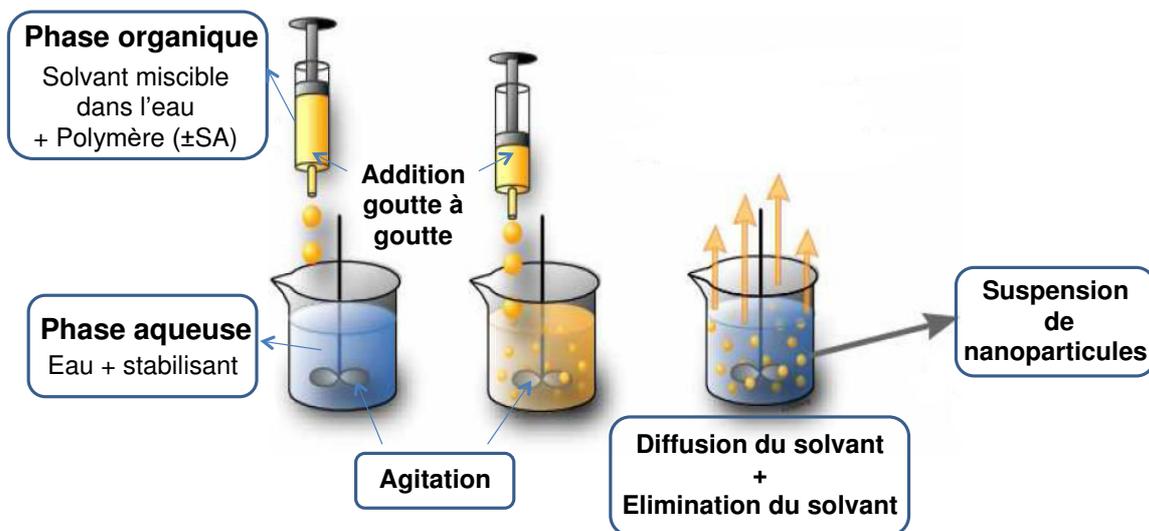
**Figure 11: Procédés d'élaboration de particules submicroniques et micrométriques.**

Nous allons concentrer cette partie bibliographique sur les procédés discontinus (en batch) utilisés pour l'élaboration des nano- et microparticules à partir de polymères préformés. Nous allons présenter le principe de chaque procédé, la gamme de taille de particules accessible ainsi que les différents paramètres opératoires ayant une influence sur la distribution de tailles des particules obtenues.

## 1.2.2. Principaux procédés discontinus utilisés pour l'élaboration des particules

### 1.2.2.1. Nanoprécipitation

La nanoprécipitation a été développée par Fessi et al. vers la fin des années 80 [119]. Ce procédé d'élaboration de nanoparticules nécessite l'emploi de deux solvants miscibles. Le polymère est solubilisé dans un solvant organique (bon solvant pour le polymère) [120] contenant éventuellement la SA à encapsuler. La solution de polymère est ajoutée goutte à goutte et sous agitation modérée dans un second solvant miscible au premier et non-solvant du polymère (le plus souvent de l'eau), appelé phase continue. Cette dernière contient généralement au moins un tensioactif permettant la stabilisation des particules formées. La diffusion spontanée du solvant dans la phase aqueuse entraîne une précipitation du polymère, et la formation de nanoparticules solides (Figure 12). Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation ou par dialyse.



**Figure 12: Préparation de nanoparticules par nanoprécipitation (adaptée de [121]).**

La nanoprécipitation est l'un des procédés batch les plus utilisés pour la fabrication des nanoparticules. En effet, dans la littérature, plus de 50% des nanoparticules utilisées pour la vectorisation des médicaments sont préparées par nanoprécipitation [122]. Cette méthode permet d'obtenir des objets de taille submicronique [119, 123].

Fernandes et al. [27] se sont intéressés à l'élaboration de nanoparticules de PLA par nanoprécipitation pour y encapsuler des colorants capillaires. L'influence de la technique de mélangeage sur la taille des particules ainsi que sur la polydispersité a été testée. Les méthodes de mélangeage utilisées sont l'agitation mécanique, la sonication ainsi que l'homogénéisation à l'aide d'un homogénéisateur haute pression. La méthode qui conduit aux tailles les plus petites et avec la distribution de tailles la plus étroite est l'agitation mécanique. La sonication permet d'obtenir des tailles de particules de l'ordre de 180 nm alors qu'avec l'homogénéisation les tailles des particules sont de l'ordre de 600 nm. La comparaison entre la sonication et l'agitation mécanique a montré que la taille moyenne des nanoparticules obtenues est presque identique mais que la distribution de tailles est plus large dans le cas de la sonication. Les auteurs attribuent cette différence au fait que, lors de l'agitation, l'ajout de la phase organique dans la phase aqueuse continue se fait goutte à goutte, ce qui permet une meilleure diffusion de la phase organique dans la phase continue et assure la précipitation d'agrégats de polymère de manière uniforme [124].

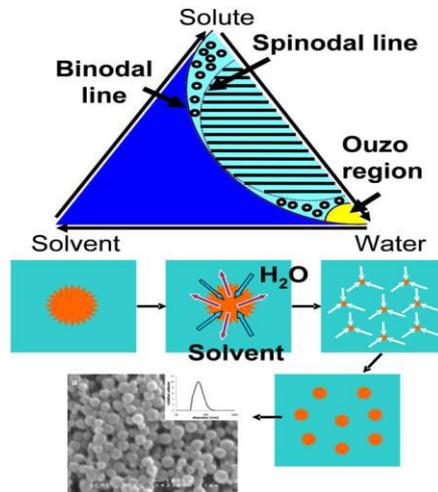
De Oliveira et al. [125] ont examiné l'élaboration des nanoparticules de PLGA, en absence de tensioactif, par nanoprécipitation et plus particulièrement l'influence de la concentration en polymère dans la phase organique sur la taille des particules formées. En augmentant la concentration en PLGA de 1,4 g/L à 15 g/L les auteurs observent que la taille des particules augmente de 50 nm à 130 nm. Cette augmentation est attribuée au fait, qu'en augmentant la concentration en PLGA les interactions polymère-polymère sont favorisées lors de l'inter-diffusion solvant/eau [2, 126]. D'autre part, les auteurs évoquent que l'augmentation de la concentration en polymère induit l'augmentation de la viscosité de la phase organique ce qui peut ralentir la diffusion de la phase organique vers la phase aqueuse et conduit à la formation de particules de tailles plus importantes.

L'influence de la nature du solvant organique utilisé a été aussi étudiée. Galindo-Rodriguez et al. [126] ont montré que la nature du solvant a une influence sur la taille des nanoparticules formées et en particulier les interactions solvant-eau. La formation de nanoparticules plus petites est observée dans le cas d'une bonne affinité entre le solvant et l'eau, ce qui est attribué à une inter-diffusion plus rapide.

D'autres paramètres opératoires ont été évoqués dans la littérature, la température, la masse molaire du polymère ainsi que la tension interfaciale entre le solvant et le non-solvant mais ils n'ont pas une influence significative sur la taille moyenne et la largeur de la distribution de tailles des particules [127, 128].

Globalement, ce procédé est facile à mettre en œuvre et l'enjeu réside dans le choix du polymère/solvant/Non-solvant.

La détermination du diagramme ternaire polymère/solvant/Non-solvant permettra de définir la « zone Ouzo » qui représente la zone où la nanoprécipitation est possible. Dans cette zone du diagramme, délimitée par le courbe spinodale (courbe de limite de stabilité) et la courbe binodale (courbe de limite de miscibilité), la solution de polymère est suffisamment diluée pour être métastable. La nucléation et la croissance des nanoparticules de polymère peuvent alors avoir lieu.



**Figure 13: Diagramme ternaire polymère/solvant/Non-solvant et limites de la zone « Ouzo » : nanoprécipitation et effet « Ouzo » [127].**

Ce procédé peut être extrapolable de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle. Néanmoins, c'est un procédé qui s'applique uniquement à la préparation de nanoparticules, c'est-à-dire avec des diamètres inférieurs à 1  $\mu\text{m}$ .

### 1.2.2.2. Procédé basé sur l'émulsification

Beaucoup de procédés basés sur l'émulsification sont utilisés dans la littérature pour préparer aussi bien des nano- que des microparticules. Dans ce qui suit, nous distinguerons les procédés selon le type d'émulsion (simple ou double) et selon l'étape d'élimination du solvant.

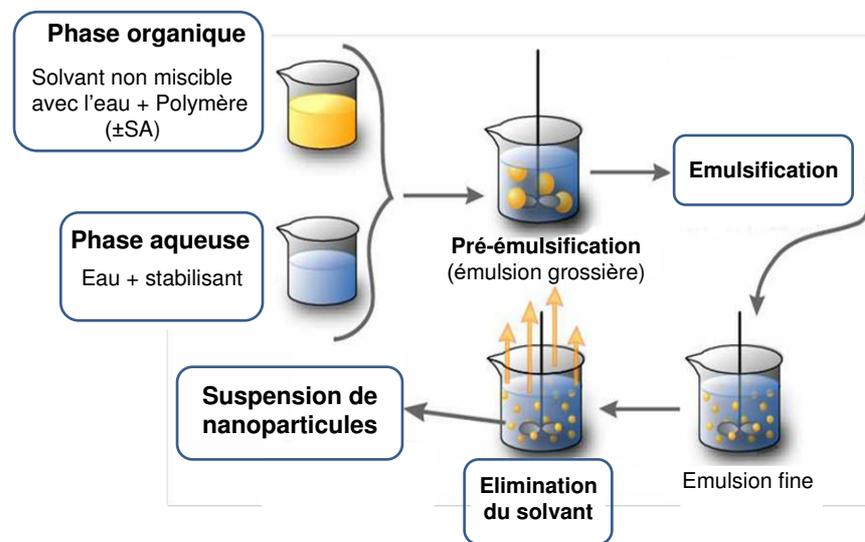
#### 1.2.2.2.1. Emulsion- Evaporation de solvant (E-ES)

Les particules préparées par E-ES [129-134] peuvent être élaborées à partir d'émulsions simples ou doubles.

### a) Emulsion simple

Le principe consiste à former une émulsion à partir de deux phases non miscibles. Dans le cas d'une émulsion directe, la phase continue (le plus souvent l'eau) contient un stabilisant de l'émulsion. La phase dispersée est composée d'un solvant organique volatil (par exemple dichlorométhane, chloroforme, acétate d'éthyle) contenant un polymère dissous et éventuellement la SA à encapsuler. La phase organique est dispersée dans la phase continue sous forme de nano- ou microgouttelettes selon la technique utilisée pour l'émulsification [135, 136] : sonication, homogénéisation à haute pression, agitation mécanique par UltraTurrax ... Les particules sont obtenues après évaporation du solvant organique sous agitation à température ambiante, à pression réduite (Figure 14).

Plusieurs paramètres ont une influence sur la taille des particules obtenues [129-131, 137] à savoir les concentrations en polymère et en tensioactif, les conditions d'émulsification, la température ...



**Figure 14: Préparation de nanoparticules par émulsion-évaporation de solvant (adaptée de [121]).**

Jefferey et al. [5] ont montré qu'une augmentation de la concentration en polymère entraîne une augmentation de la taille des particules. Ainsi, en variant la concentration en PLGA (85 :15) par exemple de 6 (%w/v) à 20 (%w/v), la taille des particules augmente de 5,7  $\mu$ m à 26,1  $\mu$ m. Ce résultat général peut, selon les cas, être expliqué de différentes façons. En augmentant la concentration en polymère, on augmente la probabilité de collision entre les particules en

formation, ce qui conduit à une augmentation de la taille des particules finales. Une autre explication est que la viscosité de la solution de polymère augmente avec la concentration en polymère, ce qui affecte l'étape d'émulsification. Enfin, si chaque goutte formée conduit à une particule (cas de la fabrication de nanoparticules), alors la taille des particules après élimination du solvant augmentera nécessairement avec la concentration du polymère sauf si la taille des gouttes diminue en proportion. Sansdrap et al. [138] ont examiné l'influence de la vitesse d'agitation mécanique et de la concentration du stabilisant Hydroxypropyl méthyl cellulose (HPMC) sur la taille de particules de PLGA. Avec une concentration en HPMC fixée à 1,6 (%w/w), la taille des particules formées passe de 38,1  $\mu\text{m}$  à 13,7  $\mu\text{m}$  en augmentant la vitesse d'agitation de 250 rpm à 1600 rpm. Lorsque la vitesse d'agitation est fixée à 800 rpm, l'augmentation de la concentration en HPMC de 0,4 (%w/w) à 2,5 (%w/w) conduit à une diminution de la taille des particules de 28,5  $\mu\text{m}$  à 12,9  $\mu\text{m}$ . Les effets des deux paramètres examinés traduisent l'importance de l'étape d'émulsification qui est, dans cet exemple, contrôlée par la vitesse d'agitation et la quantité de stabilisant disponible. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Lemoine et al. [139] qui se sont intéressés à l'élaboration de nanoparticules de PLGA stabilisées par du poly(alcool vinylique) (PVA).

Mainardes et al. [140] ont décrit l'influence du rapport volumique phase organique /phase aqueuse sur la taille des particules dans le cas de l'élaboration de nanoparticules de PLGA recouvertes de PVA pour encapsuler une molécule hydrophobe (Praziquantel). La taille des particules diminue légèrement lorsque ce rapport volumique augmente. Cette tendance ne peut pas être expliquée par l'étape d'émulsification. Toutefois, le fait que les auteurs aient augmenté le volume de solvant organique sans modifier la quantité de polymère, implique que la concentration en PLGA dans la phase organique diminue, ce qui semble être le facteur dominant.

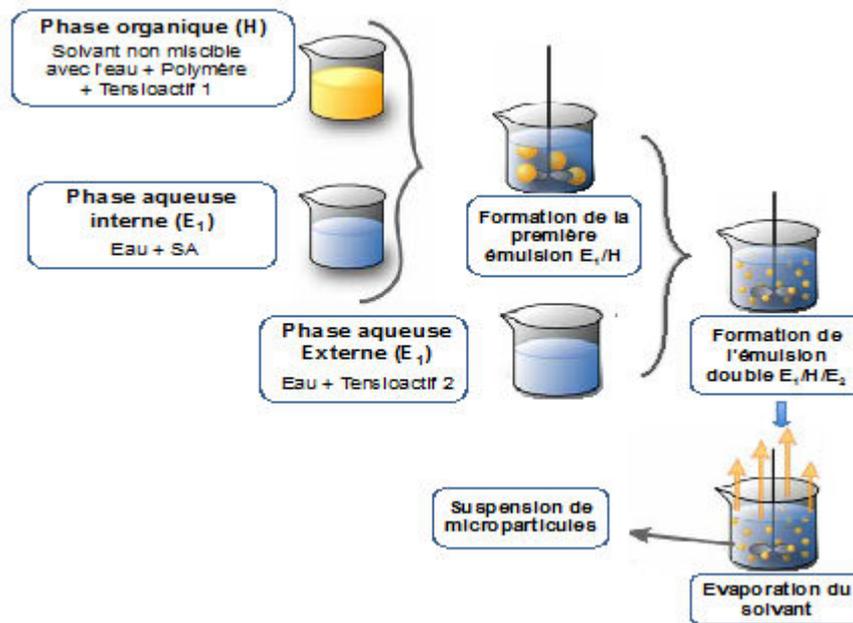
L'effet de la température a aussi été exploré et il s'est avéré que ce paramètre n'a pas d'influence sur la taille des particules mais plutôt sur la morphologie et sur la quantité de SA encapsulée dans les particules. Les études [141] de FU et al. ont montré que des microparticules préparées à 40°C renferment une quantité de SA (Huperzine-A) plus faible que celles préparées à des températures inférieures. Ceci a été attribué au fait que des pores se forment dans les particules suite à l'évaporation rapide du solvant organique (dichlorométhane) à 40 °C et conduisent à une perte de SA par diffusion.

Le procédé d'émulsion-évaporation de solvant peut présenter une faible efficacité et peut même être totalement inadapté dans le cas d'une émulsion directe huile/eau (H/E) pour l'encapsulation d'une substance hydrophile. Dans ce cas, la SA aura tendance à se solubiliser

majoritairement dans la phase continue (eau) lors de l'émulsification. La préparation d'une émulsion double peut être une solution à ce problème.

### b) Emulsion double

La méthode d'émulsion double (Figure 15) permet d'obtenir des objets à matrice hydrophobe (PLA par exemple) encapsulant une SA hydrophile dissoute dans des (micro-/nano-) domaines aqueux.



**Figure 15: Préparation des microparticules par double émulsion-évaporation de solvant (Emulsion E<sub>1</sub>/H/E<sub>2</sub>).**

Une double émulsion est préparée par dispersion d'une première émulsion (réalisée à partir d'une phase aqueuse contenant une substance à encapsuler et le premier tensioactif et d'une phase organique dans laquelle le polymère hydrophobe est dissous) dans une phase aqueuse contenant un deuxième tensioactif. Les deux types de tensioactifs sont alors utilisés : hydrophobe ou protecteur colloïdal stabilisant l'interface interne E/H de la première émulsion et hydrophile stabilisant l'interface externe H/E de la deuxième émulsion. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite par exemple [142-144].

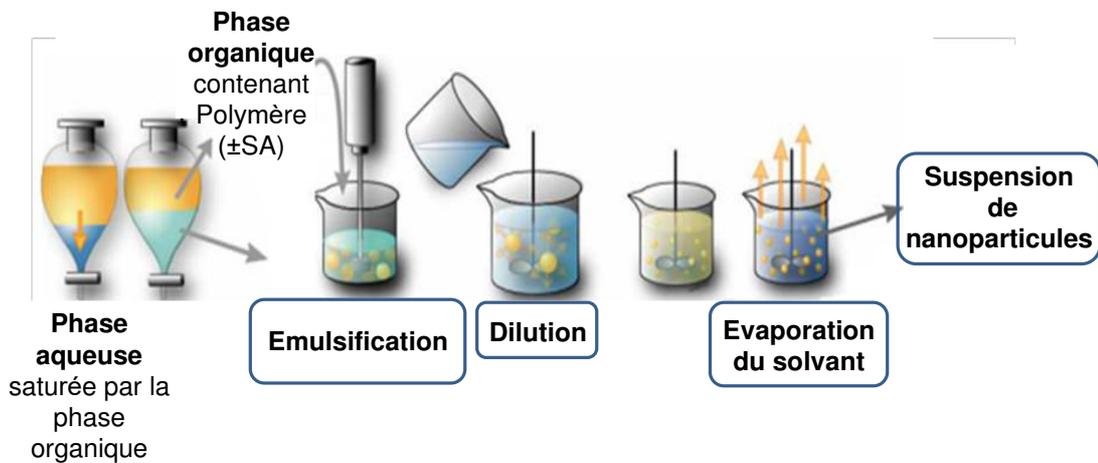
Iqbal et al. [145] ont rapporté l'influence de plusieurs paramètres sur la taille de particules de PCL. Ils ont montré qu'en variant le temps de sonication lors de la première émulsification et en gardant fixe le temps d'émulsification appliqué lors de la deuxième émulsification aucun

changement de taille des particules n'est observé. Inversement, si on garde fixe le temps d'émulsification de la première émulsion, l'augmentation progressive du temps de sonication pour la formation de la deuxième émulsion induit une diminution considérable dans la taille des particules. Cette dernière passe de 677 nm à 351 nm quand le temps d'émulsification augmente de 2 à 10 min. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Bilati et al. [146]. Parmi les autres paramètres ayant une influence sur la taille des particules, nous citerons les volumes des phases aqueuses interne et externe. Ibraheem et al. [147] ont montré que le volume de la phase aqueuse interne n'a aucun effet sur la taille des particules obtenues après évaporation de solvant, alors qu'une augmentation du volume de la phase aqueuse externe entraîne une diminution de la taille des particules finales. Les auteurs attribuent cette variation à la diminution de la viscosité de l'émulsion. Parikh et al. [148] ont expliqué ces résultats par le fait qu'en augmentant le volume de la phase aqueuse externe la fréquence de collision entre les gouttelettes diminue et par conséquent le phénomène de la coalescence se trouve réduit. Li et al. [149] se sont intéressés à l'influence du volume de la phase aqueuse externe sur la morphologie de microparticules. En augmentant ce volume, la porosité des microparticules augmente, ce qui est attribué à l'accélération de la diffusion du solvant.

Les procédés impliquant la préparation d'émulsions multiples ont été développés essentiellement dans le but d'encapsuler des SA hydrophiles [134]. De fait, ce sont des émulsions doubles du type E/H/E qui sont employées alors que d'autres types comme E/H/H ou E/H/H/H [150] sont nettement moins décrits dans la littérature.

#### **1.2.2.2. Emulsion-Diffusion de solvant (E-DS)**

Ce procédé a été développé par Leroux et al. [151]. Il diffère des procédés précédents par l'étape d'extraction du solvant organique, où l'évaporation est remplacée par une étape de diffusion dans un grand volume d'eau. Ce procédé va donc faire intervenir un solvant organique qui doit avoir une miscibilité non nulle avec l'eau. L'addition ultérieure d'eau après l'étape d'émulsification provoque la diffusion du solvant organique dans la phase aqueuse (à cause de sa miscibilité partielle avec l'eau) et finalement la formation des particules par précipitation du polymère (Figure 16). Le solvant organique résiduel peut éventuellement être éliminé de la phase aqueuse par évaporation à pression réduite [118, 152] ou par dialyse [118, 152]. Néanmoins, l'étape d'évaporation n'a pas d'influence sur la taille des particules car elles sont déjà formées suite à la diffusion de la totalité de la phase organique constituant l'émulsion dans le grand volume d'eau utilisé [153].



**Figure 16: Préparation des nanoparticules par émulsion diffusion (adaptée de [121]).**

L'influence des paramètres de formulation sur la taille des particules formées par E-DS a été rapportée dans la littérature [153-155]. La concentration du polymère et du stabilisant ainsi que la vitesse et le temps d'émulsification ont des effets similaires à ceux observés dans le cas de l'émulsion-évaporation de solvant (paragraphe 1.2.2.2.1- a)). Kwon et al. [154] ont montré que la température joue un rôle important sur la taille des particules finales. La taille de particules de PLGA recouvertes de PVA passe de 204 nm (à 25°C) à 170 nm (à 60°C), ce qui est attribué à l'accélération de la diffusion du solvant.

Le volume d'eau dans lequel la diffusion a lieu joue un rôle important sur la taille des particules obtenues par émulsion diffusion. Imbrogno et al. [156] se sont intéressés au volume d'eau nécessaire pour la diffusion du solvant contenu dans les gouttelettes formées par émulsification membranaire dans le but d'obtenir des microparticules de PCL ayant des formes sphériques et des distributions de tailles monomodales. Ils ont montré que le temps nécessaire pour la solidification des particules, ainsi que leurs tailles sont relativement sensibles au volume utilisé pour la diffusion du solvant. Ils ont décrit leurs résultats en calculant le rapport du volume d'eau utilisé dans l'étape de diffusion ( $V_{sd}$ ) au volume minimal nécessaire pour solubiliser la totalité du solvant organique ( $V_{théorique}$ ). En faisant varier ce rapport de 6 à 0,5, le temps de solidification des microparticules formées passe de moins d'une seconde à 2h. Ce rapport a aussi une influence importante sur la distribution de taille des particules obtenues : le Span diminue de 1,5 à 0,5 quand le rapport volumique diminue de 6 à 0,5. Ces résultats indiquent que le choix d'un rapport  $V_{sd}/V_{théorique}$  supérieur ou égal à 3 semble à privilégier.

Les polymères les plus utilisés pour élaborer les particules par émulsion-diffusion de solvant sont le PCL, le PLA, le PLGA ainsi que l'Eudragit® [157]. Il est possible d'adapter la technique

d'émulsification utilisée ainsi que les conditions de diffusion du solvant selon la taille des particules visées. Ainsi, cette technique peut être particulièrement intéressante d'autant plus que son extrapolation à l'échelle industrielle peut être envisagée.

### 1.2.2.2.3. Emulsion-salting out (E-SO)

Bindschaedler et al. [158] ont développé le procédé d'émulsion-salting out. Ce procédé [118, 159] consiste à préparer une émulsion H/E sous agitation mécanique vigoureuse. Cette émulsion est obtenue en ajoutant une solution de polymère et de SA dans l'acétone à une solution aqueuse saturée en soluté (soit des molécules très hydrophiles comme le saccharose soit des électrolytes comme  $Mg(C_2H_3O_2)_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ ) et contenant un stabilisant. La saturation de la solution aqueuse par le sel empêche la diffusion de l'acétone dans l'eau et permet l'obtention d'une émulsion (alors que l'acétone est miscible avec l'eau pure). Cette émulsion est ensuite diluée par une quantité suffisante d'eau afin de provoquer la diffusion de l'acétone vers la phase aqueuse (sous l'effet de la diminution de la force ionique), ce qui permet d'obtenir des particules par précipitation du polymère. Avant de récupérer les particules obtenues, une étape de purification est nécessaire pour éliminer le sel et le solvant (Figure 17). Le procédé d'émulsion-salting out peut être vu comme une extension du procédé d'émulsion-diffusion à des solvants totalement miscibles à l'eau. Plusieurs études se sont intéressées à l'élaboration de particules par émulsion salting-out [128] (Tableau 8).

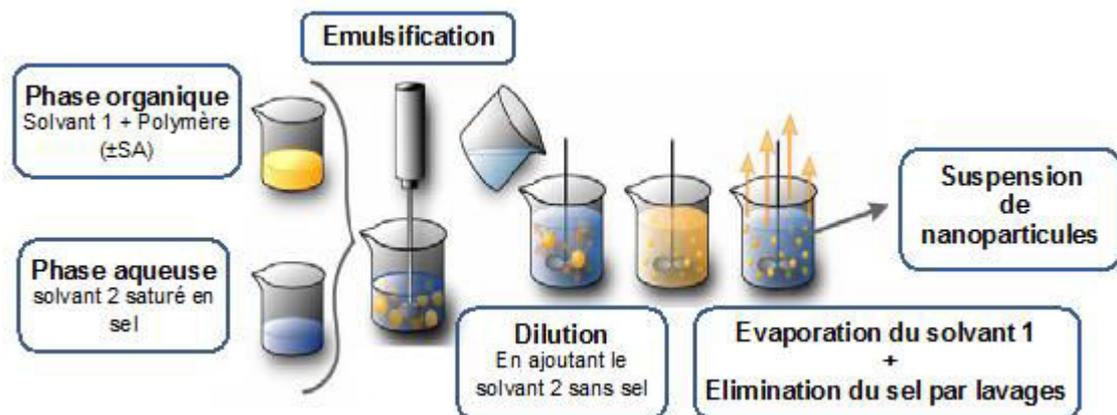


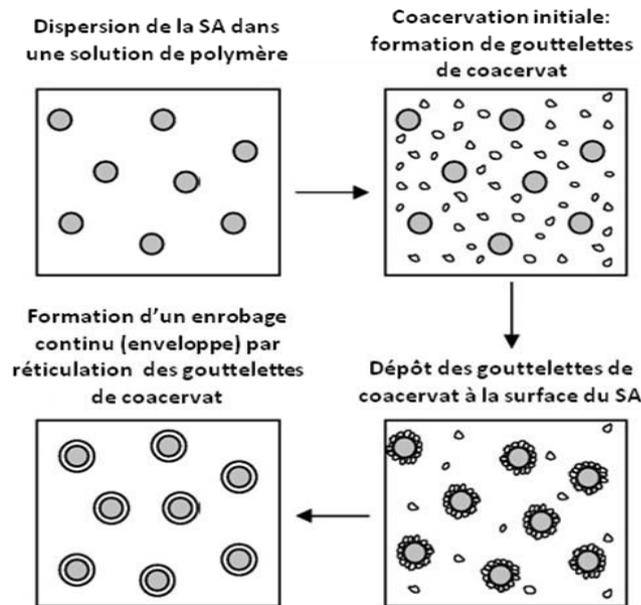
Figure 17: Préparation des nanoparticules par E-SO ( adaptée de [121]).

**Tableau 8: Exemple de nanoparticules préparées par E-SO [128].**

Polymère	Substance de salting-out	Solvant organique	Taille des particules (nm)	Réf.
PDLLA	$Mg(C_2H_3O_6)_2 \cdot 4 H_2O$	Acétone	295	[160]
PEO	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Acétone	280±03	[161]
PLGA	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	THF	>200	[162]
PLGA	$CaCl_2$	Acétonitrile	480	[163]
PDLLA	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Acétone/Acétate d'éthyle	100-400	[164]
PDLLA	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Acétone	279±10	[165]
PDLLA	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Acétone	248	[166]
EUDRAGIT 1100-55	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Acétone	174-557	[167]
PTMC	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	THF	183-316	[168]
PEO-PLGA	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Acétone	190±70	[169]
PMA	$NaCl$	HCl	100-250	[170]

### 1.2.2.3. Coacervation simple

Il existe deux types de coacervation dits « simple » et « complexe ». Nous allons nous intéresser à la coacervation simple destinée à l'élaboration de particules matricielles (Figure 18). Dans le cas de la coacervation complexe ce sont plutôt des capsules qui seront obtenues. Le procédé de coacervation simple [171, 172] consiste à provoquer une séparation de phase à partir d'une solution de polymère (aqueuse ou organique), en modifiant la température, en ajoutant un électrolyte ou un deuxième polymère (agent de coacervation). Deux phases liquides sont alors formées : l'une riche en polymère appelée coacervat et l'autre, contenant très peu de polymère. Les conditions du procédé doivent permettre de contrôler la taille des particules de coacervat. Les caractéristiques thermodynamiques des systèmes (ternaires, quaternaires, ...) mis en œuvre vont avoir une influence importante sur les résultats obtenus. Dans des conditions optimales, une SA présente dans la solution initiale de polymère se retrouvera au sein des gouttelettes de coacervat.

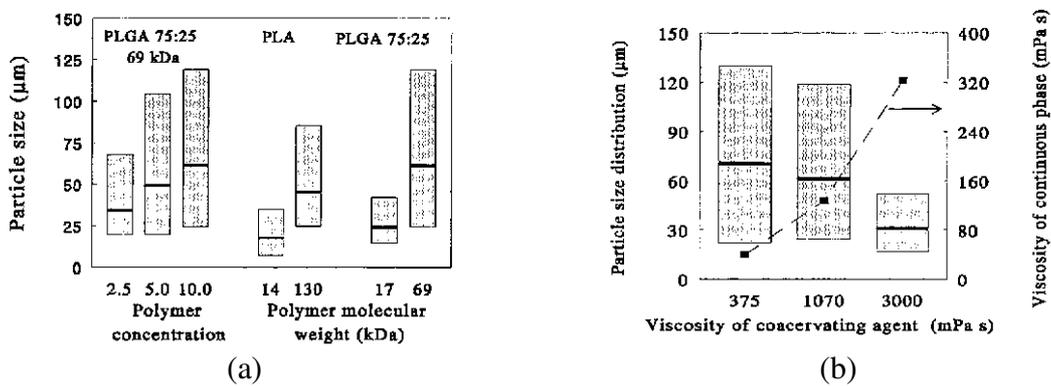


**Figure 18: Préparation des microparticules par coacervation simple d'après Nesterenko et al. [172].**

De nombreux paramètres ont une influence sur la stabilité de ces gouttelettes qui ont tendance à s'agréger (type de polymère, concentration, vitesse d'agitation du système, vitesse d'ajout et viscosité de l'agent de coacervation). Les gouttelettes, une fois récupérées sont durcies ou réticulées par un agent de solidification, lavées, filtrées ou centrifugées puis séchées. Ce procédé permet l'encapsulation de molécules hydrophiles et lipophiles. La coacervation fait partie des procédés les plus complexes d'élaboration de particules puisqu'elle fait intervenir à la fois des propriétés physico-chimiques et thermodynamiques.

Nihant et al. [173] ont étudié l'encapsulation de protéines à l'intérieur de particules de PLGA par coacervation simple. Ils ont montré que la diminution de la vitesse d'agitation lors de la dispersion de la solution de SA dans la solution de polymère induit une augmentation de la taille des gouttelettes et par suite celle de la taille des particules formées. Ils ont montré aussi que l'utilisation d'une vitesse de dispersion supérieure à 400 rpm implique une diminution des tailles des particules (la taille des microparticules passe de 51,5  $\mu\text{m}$  à 40  $\mu\text{m}$  en passant de 400 rpm à 800 rpm), alors qu'une vitesse inférieure à 300 rpm ne permet pas la récupération de microparticules et une précipitation des gouttes de coacervat a lieu. Ceci peut être expliqué soit par le fait qu'en diminuant la vitesse de dispersion la cinétique de recouvrement des gouttes de phase aqueuse par le coacervat devient trop lente soit que la formation de grosses gouttelettes recouvertes de coacervat provoque une instabilité en accélérant le processus de coalescence des gouttelettes. D'autres expériences ont été menées en gardant fixe la vitesse de dispersion et en

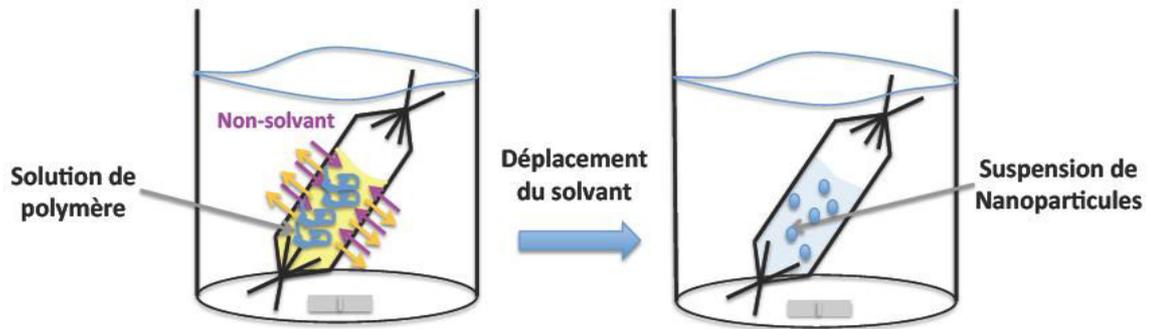
testant l'influence de la variation vitesse d'agitation lors de l'ajout de l'agent de coacervation (une phase d'huile siliconée). Il s'agit du poly(diméthylsiloxane) (PDMS). Il a alors été démontré que la stabilité des gouttelettes de coacervat n'est pas maintenue et que la taille des particules augmente, en augmentant la vitesse d'agitation. La surface des particules dépend aussi de la vitesse d'addition du PDMS. Dans le cas où la vitesse d'ajout est faible, la surface des particules est plus lisse. En effet la morphologie des particules et la rugosité de la surface dépend de la vitesse de précipitation du polymère. Une faible vitesse d'agitation permet l'obtention de particules ayant une surface plus lisse avec une distribution de taille de particules plus étroite, mais avec des tailles plus grandes. Thomasin et al. [171] se sont intéressés aussi à l'influence de la concentration en polymère (PLGA), du  $\bar{M}_w$  ainsi que la viscosité de l'agent de coacervation sur la distribution de taille des particules (Figure 19).



**Figure 19: Evaluation de l'influence (a) de la concentration du polymère, de la  $\bar{M}_w$  et (b) de la viscosité de l'agent de coacervation sur la distribution de taille des particules de PLGA élaborées par coacervation [171].**

#### 1.2.2.4. Dialyse

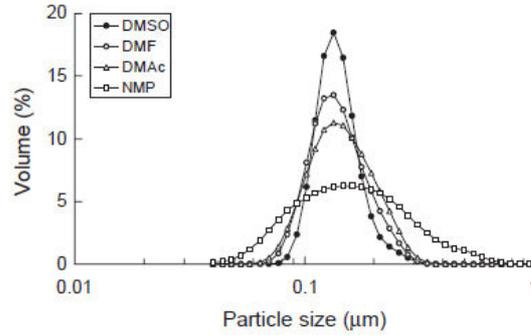
Le principe de cette méthode consiste à dissoudre un polymère dans un solvant organique approprié et mettre la solution dans une membrane de dialyse avec un MWCO adéquat. Les dialyses sont effectuées contre un non solvant du polymère. La dialyse est une méthode simple et efficace pour la préparation de nanoparticules avec des distributions de tailles assez étroites [174, 175].



**Figure 20: Principe de l'élaboration de particules par dialyse.**

Le déplacement du solvant de l'intérieur de la membrane de dialyse vers le milieu extérieur entraîne l'agrégation progressive du polymère. Cette diminution progressive de la solubilité du polymère contenu dans la membrane de dialyse conduit à des suspensions assez uniformes de nanoparticules. Jusqu'à présent, le mécanisme de formation de nanoparticules par dialyse n'est pas complètement compris. Certains auteurs estiment qu'il repose sur les mêmes principes que la nanoprécipitation [176].

Lee et al. [177] ont étudié l'élaboration des nanoparticules de PLA-POE par dialyse en utilisant le N,N-Diméthylformamide (DMF) comme solvant. Akagi et al. [178] se sont intéressés à l'élaboration de particules poly( $\gamma$ -acide glutamique) (PAG) en utilisant différents solvant (DMSO, DMF, N,N-diméthylacétamide (DMAc), N-méthyl-2-pyrrolidinone (NMP) et chloroforme). Il s'avère que la nature du solvant organique modifie la distribution de tailles des particules formées. Cette différence au niveau des distributions de tailles est attribuée à la solubilité du PAG dans chaque solvant utilisé et à la vitesse de diffusion du solvant organique vers l'eau lors de la dialyse. En effet, le partage du solvant entre l'eau le polymère et la SA est très complexe et a une influence directe sur la taille des particules formées. Jung et al. [179] ont rapporté des résultats similaires.



**Figure 21: Distribution de taille des particules de PAG élaborées avec différents solvant organiques [178].**

Ryu et al. [180] ont étudié l’encapsulation du Clonazépam dans des nanoparticules de PCL-b-PEG-b-PCL obtenues par dialyse. La taille des particules est significativement influencée par la masse molaire du bloc PCL dans le copolymère utilisé pour préparer les nanoparticules. Cette augmentation de taille entre des nanoparticules est attribuée à l’augmentation de la masse molaire ainsi qu’à la longueur des chaînes des blocs de PCL dans les copolymères utilisés (Tableau 9).

**Tableau 9: Evolution de la taille des nanoparticules de Clonazépam/ PCL-b-PEG-b-PCL en fonction de la masse molaire du bloc PCL dans le copolymère (cœur des nanoparticules). Les masses du copolymère et du Clonazépam initiales sont respectivement égales à 40 et 20 mg [180].**

Echantillon	$\bar{M}_n$ du PCL dans le copolymère (g/mol)	Taille des particules (nm)
CEC-1	4810	24,6 ± 2,2
CEC-2	7500	33,4 ± 10,4
CEC-3	15860	62,1 ± 4,7

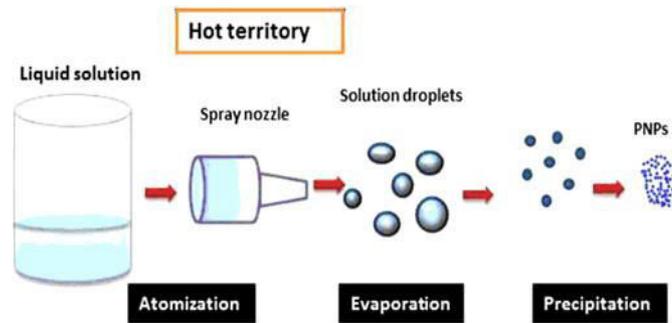
\* CEC : PCL-b-PEG-b-PCL

Au final, le procédé par dialyse est le plus souvent utilisé pour l’élaboration de nanoparticules dont les tailles sont entre 40 nm et 650 nm [128].

### 1.2.2.5. Spray drying

Le principe du « spray-drying » (nébulisation-séchage ou atomisation séchage) est basé sur la nébulisation d’une formulation liquide contenant le polymère et la SA pour les transformer en

particules solides après séchage (Figure 22). Une buse d'atomisation permet la formation d'un aérosol. Ce dernier est mis en contact avec un flux d'air chaud ou d'azote comprimé dans une chambre de dessiccation permettant un séchage rapide. Une étape de récupération des particules est ensuite nécessaire pour isoler la poudre obtenue de l'air contenant le solvant vaporisé [181, 182]. Une perte significative de produit peut avoir lieu suite à l'adhésion des particules sur les parois du dispositif. L'utilisation d'un traitement de surface antiadhésif peut être envisagée le cas échéant.



**Figure 22: Elaboration de particules par le procédé « Spray-drying » [155].**

Palmieri et al. [183] ont été les premiers à utiliser le procédé de « spray-drying » pour l'élaboration de microparticules paracétamol/ Eudragit<sup>®</sup> RS, Eudragit<sup>®</sup> RL ou éthylcellulose. Les microparticules obtenues en sortie du procédé ont des tailles comprises entre 25 et 55  $\mu\text{m}$  et ne sont pas parfaitement sphériques. Elles sont constituées par des agrégats de particules plus petites sphériques ou non. Parmi les paramètres les plus influents sur la taille et la distribution de taille on peut citer la concentration du polymère, la viscosité de la formulation liquide contenant le polymère (qui peut être une solution, une émulsion ou une suspension) ainsi que la géométrie de la buse. Rizi et al. [184] ont utilisé différentes concentrations en Euragit L100 (1, 2,5 et 5% w/w) et ils ont montré que plus la concentration est faible plus la taille des particules finales est petite. Plusieurs explications sont possibles. En diminuant la concentration du polymère dans la solution, on diminue la probabilité d'agrégation des particules et on augmente le temps d'évaporation nécessaire pour atteindre la limite de solubilité du polymère. Ces deux effets peuvent conduire à la formation de particules plus petites. Il a également été démontré que la viscosité a une influence importante sur la taille des particules. Comme la concentration en polymère a un effet (plus ou moins marqué) sur la viscosité des solutions, la viscosité de la solution initiale lors du processus de « spray-drying », va déterminer la taille des gouttes formées au cours de la pulvérisation par la buse et par la suite la taille de la particule [185]. D'autres paramètres liés au procédé doivent être mentionnés : le diamètre de la buse de l'atomiseur, la

température à laquelle les produits sont injectés dans le spray-dryer ainsi que le débit du flux d'air de séchage [186].

Ce procédé permet aussi bien d'obtenir des particules nanométriques que micrométriques et en plus il est extrapolable à l'échelle industrielle. Néanmoins, l'un des principaux problèmes liés à ce procédé est le coût élevé de cette technologie.

#### **1.2.2.6. Utilisation de fluides supercritiques**

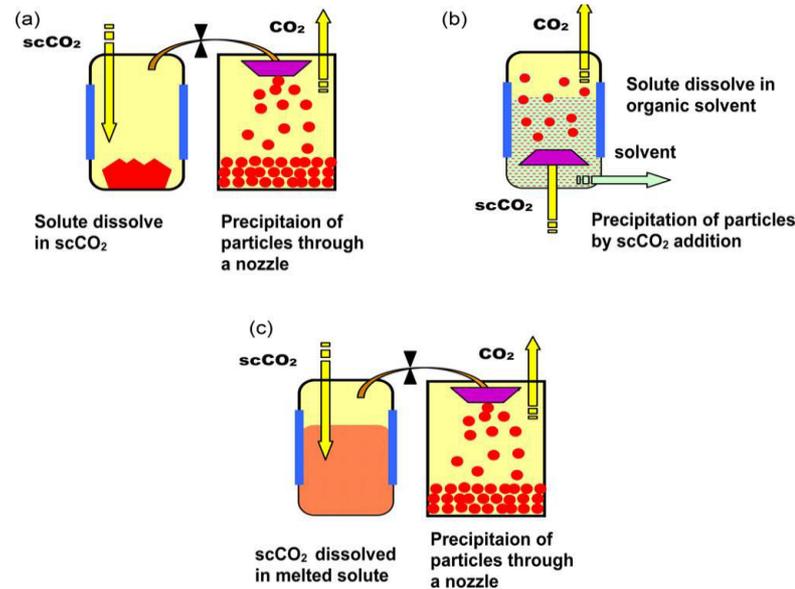
L'utilisation de fluides supercritiques dans les procédés d'élaboration de particules a suscité beaucoup d'intérêt dans le contexte du développement de procédés « verts » et qui permettent de préparer des particules ne contenant aucune trace de solvants organiques. Le point critique est le point qui définit les conditions supercritiques de n'importe quelle substance, dans le diagramme de phase pression – température ( $T_c$ ,  $P_c$ ). Au-delà de ce point, s'étend le domaine supercritique où les propriétés physiques du fluide sont intermédiaires entre celles des liquides et des gaz (densité élevée avec une faible viscosité). Le fluide supercritique le plus utilisé dans ces procédés est le  $\text{CO}_2$  (noté  $\text{scCO}_2$ ) notamment du fait de l'accessibilité des conditions critiques ( $T_c = 31^\circ\text{C}$ ,  $P_c = 7,29 \text{ MPa}$ ) du  $\text{CO}_2$  pour une utilisation dans l'industrie [187]. Selon le rôle du  $\text{scCO}_2$  (en tant que solvant, non-solvant ou soluté), on peut distinguer trois procédés de fabrication de particules (Figure 23).

Dans le cas où le  $\text{scCO}_2$  est un solvant, on parle de procédé RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions) (Figure 23-(a)). Ce procédé consiste à dissoudre un soluté dans le  $\text{scCO}_2$  puis à le recristalliser grâce à une brusque détente à travers une buse. Le  $\text{scCO}_2$  redevient alors gazeux, ce qui entraîne la formation de particules solides. L'utilisation du  $\text{scCO}_2$  se trouve toutefois limitée par la faible solubilité de la plupart des molécules dans ce fluide (notamment les macromolécules). Il est alors nécessaire d'avoir recours à un co-solvant [188].

Dans un deuxième type de procédé le  $\text{scCO}_2$  est utilisé comme non-solvant. Ce procédé est appelé procédé SAS ou GAS (respectivement Supercritical Anti-Solvent et Gaz Anti-Solvent) (Figure 23-(b)). Le principe de ce procédé consiste à pulvériser un mélange solvant – polymère dans le  $\text{scCO}_2$  par exemple. La diffusion du  $\text{scCO}_2$  dans le solvant crée une diminution de la solubilité du polymère. Ce transfert de masse conduit à une rapide saturation du soluté ce qui entraîne la nucléation de particules. Un large panel de polymères peut être utilisé pour fabriquer des particules par cette technique. Un intérêt particulier a été porté au biopolymères comme le PLA, le PLGA, les polysaccharides ou le PCL.

Le troisième type de procédé utilisant les fluides supercritiques est le procédé PGSS (Particle

from Gas Saturated Solution) (Figure 23-(c)). Son principe consiste à dissoudre un gaz sous pression dans un produit fondu. Le gaz dissous va plastifier la matrice et va permettre ainsi sa pulvérisation. La détente du gaz disperse le produit en fines gouttelettes qui seront rapidement solidifiées par abaissement de température.



**Figure 23: Les technique d'élaboration de particules utilisant le CO<sub>2</sub> supercritique (a) RESS (b) GAS/SAS (C) PGSS (adapté de [189]).**

Le procédé d'élaboration de particules par fluide supercritique peut fonctionner aussi bien en batch qu'en continu. Dans cette partie nous allons nous intéresser à l'élaboration de nano-et microparticules par fluide supercritique en batch.

Plusieurs paramètres ont une influence aussi bien sur la taille que sur la morphologie des particules obtenues par ce procédé. Parmi ces paramètres nous pouvons citer : la masse molaire moyenne du polymère utilisé, le ratio massique Gaz/Polymère, la température, la pression ainsi que la taille de l'orifice de la buse de vaporisation.

Tom et al. [190] ont montré que l'élaboration de particules de PLA par RESS est possible malgré sa faible solubilité dans le  $scCO_2$ . Les microparticules obtenues ont une taille comprise entre 10 et 20  $\mu m$ . Néanmoins, les particules formées montrent des tailles irrégulières. L'utilisation de l'acétone comme co-solvant a permis d'obtenir des particules de PLA de taille régulière entre 4 et 25  $\mu m$ .

La température et la pression font partie des paramètres ayant le plus d'influence sur la morphologie et la distribution de taille des particules formées en présence de  $scCO_2$ . Nous prendrons l'exemple de particules formées par le procédé PGSS (Tableau 10).

**Tableau 10: Influence de la température et de la pression sur la morphologie et la distribution de taille des particules élaborées par PGSS [191].**

↗ Température		↗ Pression	
<i>Morphologie</i>	<i>Distribution de taille des particules</i>	<i>Morphologie</i>	<i>Distribution de taille des particules</i>
↗ Sphéricité	↗ Largeur de la distribution ↗ Diamètre moyen	Effets antagonistes : ↗ Solubilité et sphéricité ↗ Cisaillement → ↗ fibres	↘ Largeur de la distribution ↘ Diamètre moyen

L'influence de la taille de la buse de vaporisation a été testée par Mawson et al. [192]. Des particules de fluoropolymère ont été préparées par le procédé RESS. Deux tailles de buses ont été utilisées 30 et 50 µm de diamètre. La taille des particules obtenues varie entre 0,3 et 5 µm.

De plus Nalawade et al. [193] se sont intéressés à l'influence de la forme et du diamètre de la buse utilisés. En utilisant le bisphénol propoxylate, une augmentation du diamètre de la buse est accompagnée de la formation de particules de plus en plus petites. Ceci est attribué à une diminution des contraintes élongationnelles.

### **1.2.3. Elaboration de particules recouvertes de polysaccharides amphiphiles : Dextranes modifiés**

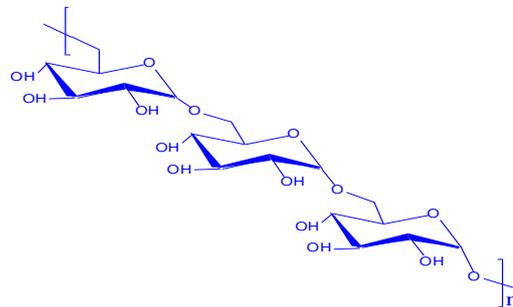
Un grand nombre de particules obtenues à partir de polymères de synthèse (cf. Tableau 1- chapitre bibliographique Partie 1) possèdent des surfaces à caractère hydrophobe. Il est donc nécessaire de recouvrir ces surfaces dans le but de les rendre hydrophiles afin d'utiliser ces particules en dispersion aqueuse, ce qui est essentiel dans différents domaines notamment biomédical, cosmétique ou autres. Plusieurs polymères ont été utilisés depuis des années pour assurer cette fonction. Nous pouvons citer le PEG [194, 195], des copolymères amphiphiles à bloc (PEG-PLA par exemple [196-198]) ou des copolymères greffés (possédant une chaîne principale hydrophile avec des groupements hydrophobes en chaînes latérales ou inversement) par exemple les polysaccharides amphiphiles [6, 199].

Ces dernières années, l'intérêt porté à l'élaboration des vecteurs de SA biocompatibles et biodégradables est en plein développement. Les polysaccharides amphiphiles, possédant ces propriétés, sont de plus en plus utilisés pour l'élaboration de particules nano et/ou

micrométriques. En effet, mis à part leur bicompatibilité et biodégradabilité, ils présentent d'autres avantages. La présence de ces polymères à la surface de nanoparticules permet d'assurer la stabilité colloïdale des suspensions. De plus, la fonctionnalisation de leur surface est possible grâce à la présence de plusieurs groupements réactifs (par exemple hydroxyle ou acide carboxylique). Ces groupements réactifs peuvent être mis à profit pour fixer de façon covalente des groupements spécifiques conduisant à un ciblage actif des particules.

Le LCPM a étudié depuis près de 20 ans l'utilisation de dérivés du dextrane comme polymères amphiphiles pour formuler des nanoparticules ayant des tailles et des caractéristiques bien maîtrisées. Les propriétés de dérivés du dextrane ont été rigoureusement décrites dans plusieurs thèses effectuées préalablement au LCPM [200-202]. Le dextrane est un polysaccharide produit par un grand nombre de microorganismes à partir du saccharose, majoritairement issu de la fermentation de sucres de betterave. Pour la production commerciale du dextrane, la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* (souche B512-F) est souvent employée. La dextrane-sucrase est une enzyme présente dans ces organismes et qui se complexe avec le saccharose et conduit à la formation de fructose et d'un dextrane dit « natif » [203]. Celui-ci possède une masse molaire élevée et une large distribution de masses molaires. Il est constitué majoritairement par l'enchaînement d'unités glucopyranoses liées en  $\alpha(1\rightarrow6)$  avec un nombre variable de liaisons  $\alpha(1\rightarrow2)$ ,  $\alpha(1\rightarrow3)$  et  $\alpha(1\rightarrow4)$  [204]. Ce dextrane « natif » est ensuite soumis à une hydrolyse partielle en milieu acide, suivie d'un fractionnement par l'éthanol ou le méthanol. Ceci conduit à l'obtention de chaînes de dextrane plus courtes et essentiellement linéaires. Ainsi, nous pouvons considérer la structure du dextrane commercial comme principalement linéaire et constitué d'enchaînement d'unités glycopyranoses liées en  $\alpha(1\rightarrow6)$  (Figure 24).

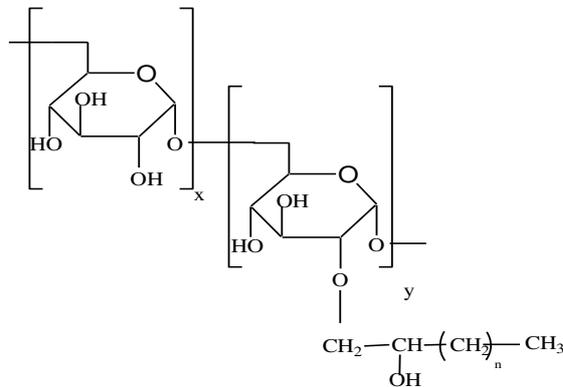
Les dextranses sont généralement désignés par l'intermédiaire de leur masse molaire moyenne en masse ( $\overline{M}_w$ ) sous le nom générique ( $T_{\overline{M}_w}$ ) avec la masse molaire exprimée en kg/mol.



**Figure 24: Structure linéaire du dextrane avec des enchaînements en  $\alpha(1\rightarrow6)$**

Le dextrane est un polysaccharide non ionique. Grâce à sa biodégradabilité et biocompatibilité, il est utilisé dans plusieurs applications surtout dans les domaines thérapeutiques et médicaux, par exemple comme substitut de plasma sanguin.

Des dérivés du dextrane, obtenus par modification hydrophobe, peuvent être préparés en faisant réagir ce polysaccharide avec des époxydes aliphatiques, ce qui conduit à la fixation covalente de groupements hydrocarbonés aliphatiques le long des chaînes (Figure 25). Le taux de substitution d'un dextrane modifié (noté  $\tau$ ) est défini comme le nombre moyen de groupements hydrocarbonés fixés sur 100 motifs glucopyranose. Ce taux de substitution est utilisé pour caractériser l'étendue de la modification chimique. Ce taux de substitution est déterminé expérimentalement par analyse RMN  $^1\text{H}$ . Il est parfois également noté Degré de Substitution (DS). En première approximation, il sera admis que la répartition des groupements aliphatiques le long des chaînes est statistique même si elle n'est pas une caractéristique aisément accessible expérimentalement. Dans le cas de la fixation de groupements hydrocarbonés à partir de l'époxyoctane ( $n = 5$ ), les dextrans obtenus seront notés  $\text{DexC}_6\text{-}\tau$ .



**Figure 25 : Structure chimique du  $\text{DexC}_6\text{-}\tau$  (avec  $n = 5$ ) -  $\tau = \frac{y}{x+y}$**

La modification du dextrane par des chaînes alkyle conduit à des polymères présentant des propriétés amphiphiles qui les rendent utilisables comme stabilisants macromoléculaires. Leur capacité à s'adsorber durablement aux interfaces huile/eau (H/E) est notamment utilisée pour la préparation d'émulsions H/E afin d'obtenir des nanoparticules avec des applications dans le domaine biomédical ou cosmétique [6, 201, 205].

Dans ses travaux de thèse [202], Céline Rouzès a étudié l'influence du taux de substitution sur la tension superficielle à l'interface eau/air et interfaciale dans un système eau/dodécane. Les

résultats obtenus ont montré que les DexC<sub>6</sub>- $\tau$  présentent des propriétés tensioactives, d'autant plus marquées que  $\tau$  augmente. Par exemple, le DexC<sub>6</sub>-20 présente des propriétés tensioactives comparables à celles d'un tensioactif comme le dodécylsulfate de sodium (SDS). Toutefois, lorsque  $\tau$  devient supérieur à ~30%, les polymères obtenus ont une solubilité dans l'eau très faible, ce qui limite leur utilité pour préparer des dispersions aqueuses. Cependant, ces polymères « très substitués » possèdent une solubilité non négligeable dans certains solvants organiques [206].

Les dérivés amphiphiles du dextrane ont été préalablement appliqués à la préparation de nanoparticules en utilisant différents procédés physico-chimiques : la nanoprécipitation [6] et l'émulsion-évaporation de solvant [7, 207] essentiellement (Tableau 11). Dans de nombreux travaux, le cœur des particules était constitué de PLA. Dans ces procédés, les dérivés amphiphiles du dextrane s'adsorbent de manière irréversible à la surface des particules hydrophobes de PLA, via un ancrage physique des groupements C<sub>6</sub> en surface. Ainsi, il se forme autour des particules de PLA une couronne hydrophile de boucles de dextrane. Cette couche superficielle confère, pour des valeurs de  $\tau$  judicieusement choisies, une excellente stabilité colloïdale aux suspensions, même à des forces ioniques élevées. De plus, le grand nombre de groupements hydroxyle présent en surface offre des possibilités de fonctionnalisation ou d'ancrage chimique des particules [7].

A notre connaissance, l'utilisation de dérivés amphiphiles du dextrane pour la préparation de microparticules n'a jamais été rapportée dans la littérature par quelque procédé que ce soit.

**Tableau 11: Exemples de particules matricielles élaborées par des procédés batch et qui utilisent des dextrans modifiées dans leur formulation.**

Recouvrement en Dextrane	Cœur des particules	Mécanisme responsable du recouvrement	Méthode d'élaboration des particules	Diamètre (nm)	$\zeta^*$ (mV)	$\Gamma^{**}$ (mg/m <sup>2</sup> )	Réf.
Dex-CH *CH: Cholestérol	PLA	La modification du dextrane par les chaînes hydrophobes du cholestérol permet leur ancrage dans le cœur PLA. Un enchevêtrement entre les greffons du cholestérol et les chaînes du PLA a lieu.	E-ES	100-200	-11,9	ND	[208]
Dextrane	PLA	L'auto-organisation du copolymère (Dex-g-xPLA <sub>m</sub> - g-yN <sub>3</sub> ) lors du processus de nanopréciipitation entraîne une agrégation des greffons PLA suivi d'une contraction du dextrane permettant l'obtention de particules de PLA recouvertes de Dextrane.	Nanopréciipitation	125-131	ND	ND	[7]
DexN <sub>3</sub> -15	$\alpha$ -alkyne PLA	L'addition du CuBr à l'émulsion entraîne la formation du Dex-g-xPLA <sub>m</sub> -g-yN <sub>3</sub> à l'interface liquide/liquide par chimie-click, ce qui permet de créer des liaisons covalentes entre la couronne de dextrane et le cœur de PLA	E-ES	150	-20	6,42	[7]
Dextran-ester décanoate (DS =15%)	Dextran-ester décanoate (DS= 25, 80 et 150%)	Le Dex-ester décanoate (DS = 15%) soluble dans l'eau vient s'adsorber à la surface des nanoparticules autogénérées par les copolymères de Dex-ester décanoate ayant un DS >25 et qui sont solubles dans la phase organique.	Nanopréciipitation	80-200	ND	ND	[209]
DexP <sub>15</sub>	PLA	La modification du Dextrane par des groupements phénoxy hydrophobes permet leurs ancrages à la surface hydrophobe du	E-ES	150-200	-7,5	4,6	[207]

		PLA. Un enchevêtrement a lieu entre les groupements phénoxy et les chaînes de PLA proches de la surface.					
DexC <sub>6-15</sub>	PLA	La modification du Dextrane par des chaînes alkyles en C <sub>8</sub> permet de créer des point d'ancrage avec la surface hydrophobe du PLA. Un enchevêtrement a lieu entre les chaînes alkyles pendantes et les chaînes de PLA proches de la surface (résultats confirmés par DSC).	E-ES	160	ND	4	[210]
DexC <sub>10-7</sub>	PLA	L'adsorption du DexC <sub>10-7</sub> à la surface du PLA a lieu de manière physique sans ancrage. C'est un résultat confirmé par DSC ou aucune miscibilité n'a été détecté entre le PLA et le dodecanol (qui joue le rôle des chaînes en C <sub>12</sub> greffées au Dextrane).	E-ES	180	ND	4	[210]
Dex-g-PCL	PCL	Le copolymère Dex-g-PCL, étant dispersé dans un mélange eau/Acétate d'éthyle ou DCM, migre à l'interface liquide/liquide des gouttes formées par l'émulsification. Par évaporation de solvant, des nanoparticules de PCL recouverte de Dextrane sont formées.	E-ES (Migration interfaciale/Evaporati on de solvant)	45-140	ND	ND	[211]
Dex-g-PLA	PLA	Le copolymère Dex-g-PLA, étant dispersé dans un mélange eau/DCM, migre à l'interface liquide/liquide des gouttes formées par l'émulsification. Par évaporation de solvant, des nanoparticules de PLA recouverte de Dextrane sont formées.	E-ES	200	0	4,6	[212]

\*: Potentiel zêta

\*\* : Taux de recouvrement en Dextrane

#### **1.2.4. Conclusion et objectifs du travail de thèse**

Dans cette deuxième partie bibliographique, nous nous sommes intéressés aux procédés physico-chimiques discontinus les plus utilisés pour l'élaboration de particules nano- et micrométriques. Nous avons défini chaque procédé et nous avons présenté les paramètres opératoires ayant une influence sur la taille et la morphologie des particules préparées.

A l'issue de la première partie bibliographique, nous avons mis en évidence l'intérêt et l'originalité au regard de l'état de l'art, de préparer des systèmes particuliers de libération contrôlée de substances algicides « modèles », les esters aliphatiques de l'acide gallique. Compte tenu du caractère hydrophobe de ces substances, de l'usage envisagé en milieu naturel et de l'expertise du laboratoire, nous avons choisi d'utiliser des particules de PLA recouvertes de dérivés amphiphiles du dextrane. La présence des chaînes de dextrane en surface est intéressante dans l'optique de fixer de façon covalente les particules sur des supports (fibres tissées par exemple) permettant de confiner le traitement dans des zones définies de plan d'eaux naturelles ou artificielles.

Par ailleurs, nous explorerons tout particulièrement comment, selon le choix du procédé de préparation, obtenir des particules avec des distributions de tailles bien définies et ayant des tailles moyennes variant entre 0,1  $\mu\text{m}$  et 1000  $\mu\text{m}$ , c'est-à-dire allant du domaine des « nanoparticules » jusqu'à la limite inférieure du domaine des « particules millimétriques ».

L'objectif est de mettre en évidence l'impact du domaine de taille des particules sur l'efficacité d'encapsulation des molécules actives, la vitesse de libération de ces molécules, le coût de fabrication et la facilité d'utilisation. Comme nous l'avons vu, si la préparation de nanoparticules de PLA recouvertes de dextrane à l'échelle du laboratoire est déjà bien connue, il n'en est pas de même pour la fabrication de particules avec des diamètres supérieurs au micromètre pour lesquelles il n'existe aucune référence. De plus, à notre connaissance, la préparation et la comparaison de suspensions de particules couvrant un aussi large domaine de taille et obtenues à l'aide des mêmes constituants (PLA, dextrane, esters d'acide gallique) n'ont encore jamais été rapportées.

## **1.3. Procédé continu d'élaboration de particules : Microfluidique**

### **1.3.1. Introduction**

Le développement des procédés continus pour l'élaboration de particules matricielles est en plein essor. Parmi ces procédés, nous pouvons citer l'utilisation du scCO<sub>2</sub> en combinant le procédé RESS avec le SAS [213] (le principe de l'utilisation du scCO<sub>2</sub> est détaillé dans la partie 2 de ce chapitre bibliographique (paragraphe II.6) portant sur les procédés discontinus), en opérant par scCO<sub>2</sub>/Emulsion-Extraction [214], par spray-drying [215] ou encore par microfluidique [216, 217].

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à l'utilisation des procédés microfluidiques pour l'élaboration de nano- et microparticules matricielles.

### **1.3.2. Généralités sur la microfluidique**

#### **1.3.2.1. Rapide historique de la microfluidique**

La microfluidique est la science qui étudie la manipulation des fluides en petits volumes ( $10^{-9}$  à  $10^{-18}$  litres) confinés dans des canaux de dimensions micrométriques (10 à 1000  $\mu\text{m}$ ). Ces canaux peuvent être d'origines naturelles ou synthétiques [218, 219]. La microfluidique est une technique en plein développement et qui peut être utilisée dans différents domaines (analytique, électronique, physique, chimie, biomédecine, pharmacie,...[219-223]). Malgré les nombreux avantages qu'elle présente [219], l'emploi de la microfluidique à une échelle industrielle n'en est cependant qu'à ses premières années.

Dans le but d'améliorer la performance des colonnes utilisés pour des séparations chromatographiques (pour la chromatographie gaz ou liquide), les chercheurs se sont intéressés à la réduction des diamètres de ces colonnes. Ces premières recherches de miniaturisation ont été menées dans les années 1950 [224]. Le premier système microfluidique a ainsi vu le jour en 1979 à l'université de Stanford, lorsque Terry et al. [225] ont développé un mini analyseur d'air pour chromatographie gazeuse sur un support en silicone. Au fil des années, les travaux sur la miniaturisation des systèmes et l'amélioration de leurs performances ont gagné de plus en plus d'intérêt. Depuis le début des années 1990, le nombre de publications traitant de la microfluidique ne cesse de croître [226].

Les premiers travaux sur l'élaboration de particules en utilisant des microsystèmes microfluidiques ont commencé au début des années 2000. En une quinzaine d'année, environ 500 articles ont été publiés. L'encapsulation de SA dans des particules élaborées par microfluidique a été abordée ultérieurement. C'est au début de l'année 2005 que les premiers essais d'encapsulation utilisant ce procédé ont été publiés. Martin-Banderas et al. [227] ont été parmi les premiers à encapsuler un antibiotique hydrophile (le sulfate de gentamicine) dans des particules de PLGA en utilisant la microfluidique. Mis à part les microsphères [228], plusieurs types de vecteurs de SA peuvent être élaborés par microfluidique à savoir les microcapsules [229-232], les microgels [233-235], les vésicules [236, 237]...

### **1.3.2.2. Avantages et inconvénients**

La microfluidique présente plusieurs avantages [238]. En effet, l'utilisation de dispositifs de dimensions micrométriques réduit le volume des réactifs, généralement assez coûteux, utilisés en biologie ou en médecine, par exemple [226]. La consommation des réactifs est ainsi 1000 à 10000 fois plus faible que dans le cas des méthodes conventionnelles. De plus, l'utilisation de microréacteurs peut permettre d'un point de vue industriel de passer d'opérations discontinues à une production continue et d'intensifier ainsi les procédés. Un autre avantage de la microfluidique est de permettre une sécurité accrue en raison des faibles dimensions. En effet, les transferts de chaleurs, par exemple, sont plus faciles dans les microcanaux, ce qui peut limiter les emballements thermiques et les risques associés [239]. Un contrôle plus précis de la température devient possible. D'autre part, pour des applications pharmaceutiques, l'utilisation de la microfluidique est particulièrement intéressante pour la synthèse de médicament à libération contrôlée : une production de particules avec des tailles très bien contrôlées et avec une très grande régularité est possible, ce qui permet d'atteindre un coefficient de variation CV%<sup>8</sup> inférieur à 5%. La miniaturisation assure également une portabilité plus facile des dispositifs, ce qui permet d'effectuer des analyses dans presque n'importe quel endroit.

La contrepartie des faibles dimensions des systèmes utilisés en microfluidique est que les forces de surfaces (tension de surface, rugosité de la surface, Van der Waals...) sont dominantes. Ceci rend certaines réactions réalisables à l'échelle macroscopique plus difficiles à mettre en œuvre [240].

La question des quantités produites par microfluidique est le principal problème limitant l'extrapolation de ce procédé de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle. La principale

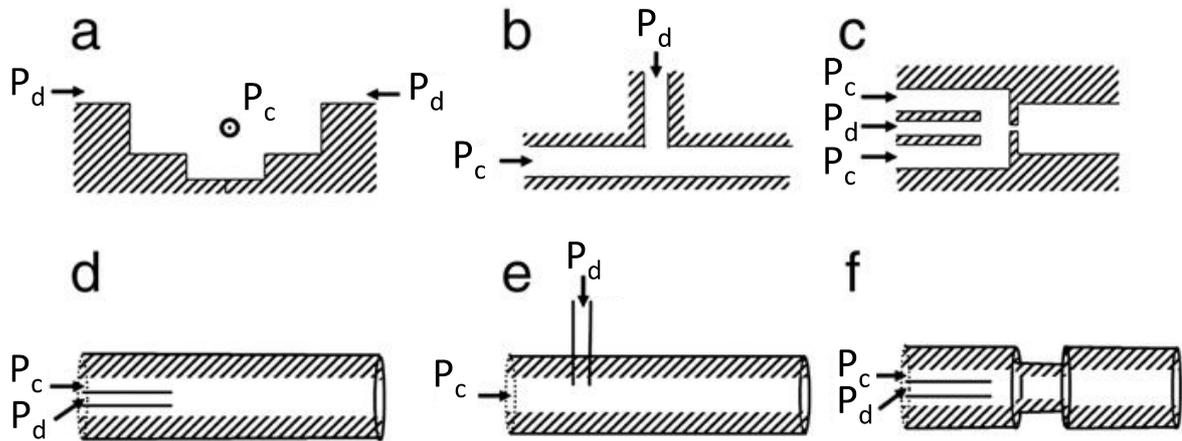
---

<sup>8</sup> Le rapport entre l'écart type et le diamètre moyen des particules formées multiplié par 100

réponse apportée à ce problème est la mise en parallèle de microsystèmes. Cependant, cette mise en parallèle des flux peut s'avérer complexe et peut engendrer une mauvaise distribution des flux. Ceci induit au final une diminution du contrôle du procédé et des performances. L'entretien des microsystèmes est aussi un autre problème à ne pas négliger. Il est alors nécessaire de s'équiper d'un nombre de microsystème supérieur aux besoins pour pouvoir maintenir une production régulière en intégrant des arrêts pour nettoyage.

### 1.3.3. Emulsification

Deux familles de systèmes microfluidiques sont fréquemment utilisées pour élaborer des émulsions: les systèmes à microcanaux et les systèmes à microcapillaires (Figure 26).



**Figure 26: Représentation des systèmes microfluidiques les plus utilisés. Systèmes à microcanaux (a) en Terrace (b) en jonction T (c) en Flow-Focusing. Microsystème à capillaire (d) en co-écoulement (e) en écoulement croisé (f) en Flow-Focusing.  $P_c$  et  $P_d$  représentent respectivement la phase continue et la phase dispersée [218]**

Les systèmes formés par des microcapillaires peuvent être rapidement fabriqués à partir de capillaires en verre et sont résistants aux solvants organiques. Néanmoins, les opérations d'alignement de capillaires sont un peu délicates. Les systèmes en microcanaux sont préparés par des procédés de microfabrication comme par microfraisage, micro-usinage par laser, par lithographie, ou par moulage en utilisant un large panel de matériaux (métaux, verre, polymères). Leur fabrication nécessite un peu de temps mais l'avantage de ces systèmes c'est qu'ils sont faciles à manipuler et peuvent être mis en parallèle pour augmenter le volume de la production.

Nous allons nous intéresser aux systèmes microfluidiques à microcanaux. Par définition, un canal ayant des dimensions inférieures au micromètre est un microcanal. Dans ces conditions, le nombre de Reynolds ( $Re$ ) qui représente le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité se trouve inférieur à 1. L'écoulement est donc dominé par les effets visqueux. L'écoulement des fluides est alors laminaire.

Dans le cas où les fluides utilisés dans le microsystème sont miscibles, un écoulement stratifié a lieu. Le mélange entre les deux fluides à l'interface est alors un phénomène purement diffusif. Hitt et al. [241] ont établi des relations entre la position de l'interface observée entre des fluides miscibles circulant dans un microsystème, le débit et les viscosités des fluides. Kamholz et al. [242] ont utilisé les écoulements stratifiés pour déterminer des paramètres physico-chimiques (viscosité, coefficient de diffusion, pH...) de différentes espèces. Le taux d'occupation de chacune des strates a été étudié par Larsen et al. [243] en fonction de leurs débits et viscosités.

Lorsque les fluides utilisés sont non miscibles, trois types d'écoulements peuvent être observés dans les microcanaux : à gouttes, stratifié ou annulaire. Dans le cas d'un écoulement à gouttes, le fluide formant les gouttes est la phase dispersée alors que le fluide environnant est la phase continue. Lorsque le diamètre des gouttes est inférieur à la largeur du canal, des gouttelettes parfaitement sphériques sont obtenues. Dans le cas où la dimension des gouttelettes est supérieure à la largeur du canal, des gouttelettes plutôt allongées sont obtenues. Nous pouvons parler d'écoulement stratifié lorsque les fluides immiscibles s'écoulent parallèlement. L'écoulement annulaire, quant à lui, est une forme dérivée de l'écoulement stratifié. L'un des fluides s'écoule à proximité des parois et un filet continu du deuxième fluide se crée au milieu du canal.

Dans notre cas, nous allons nous intéresser plutôt aux écoulements à gouttes. Ces gouttes pourront générer des particules après l'intervention d'une étape de solidification appropriée.

### **1.3.3.1. Formation de gouttelettes à l'intérieur du microsystème**

Le processus de formation de gouttelettes par microfluidique pour l'obtention d'émulsions directes ou inverses (H/E ou E/H) a lieu lorsque deux phases non miscibles, sont mises en contact à l'intérieur d'un microcanal. Un cisaillement est appliqué aux deux fluides non miscibles à la jonction où ils entrent en contact. Ce cisaillement va déformer l'interface entre les deux fluides jusqu'à la formation d'une goutte. Les conditions de formation d'une goutte sont décrites par le nombre adimensionnel  $Ca$  (appelé nombre capillaire) qui compare les forces de cisaillement aux forces interfaciales.

$$Ca = \frac{\mu \cdot U}{\sigma} \quad \text{Eq. 1}$$

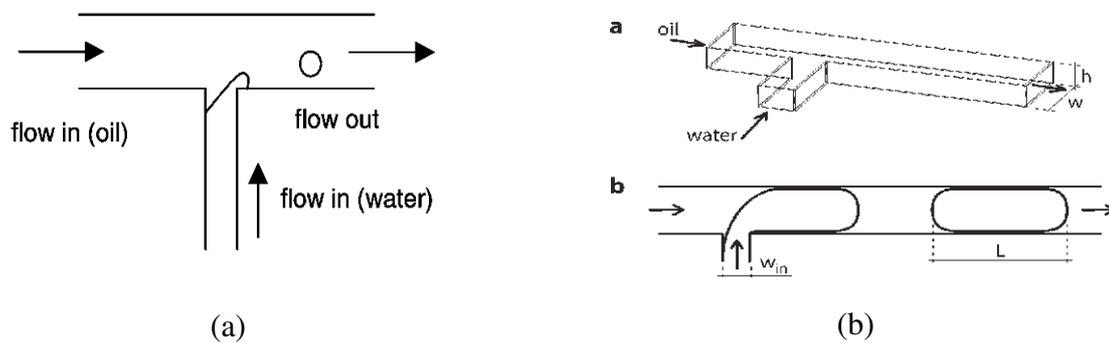
$\mu$  est la viscosité dynamique du fluide constituant la phase continue (Pa.s),  $U$  est la vitesse du fluide au niveau de la surface ( $\text{m.s}^{-1}$ ) et  $\sigma$  est la tension interfaciale entre les deux fluides ( $\text{N.m}^{-1}$ ). La formation de gouttes n'est possible que si le nombre capillaire est supérieur à une valeur critique  $Ca_c$ , qui dépend des conditions d'écoulement et du rapports des viscosités dynamiques des deux fluides.

Plus le cisaillement appliqué est important plus le diamètre des gouttelettes obtenues à l'intérieur du canal est faible. Dans la littérature [244], plusieurs géométries de canaux sont utilisées pour former des émulsions. Nous allons nous intéresser plutôt aux géométries en jonction T [226, 245, 246] et en « Flow-Focusing » [247-249].

#### **1.3.3.1.1. Jonction T**

Thorsen et al. [246] ont été les premiers chercheurs à avoir utilisé la jonction T pour la génération de gouttes dans les microcanaux. Leurs travaux ont porté sur l'élaboration d'émulsions inverses E/H en utilisant différentes phases continues (décane, tétradécane, hexadécane) avec plusieurs concentrations en Span 80. L'influence de la pression relative appliquée sur la taille et la morphologie des gouttes formées a été mise en évidence. Thorsen et al. ont expliqué la formation des gouttelettes de l'émulsion à l'intérieur d'un microsystème en T comme suit : une goutte se détache suite à une compétition entre la tension de surface (tendant à retenir la goutte dans le canal secondaire où la phase dispersée circule) et les forces visqueuses (tendant à détacher la goutte par cisaillement).

Garstecki et al. [251] ont proposé une autre explication au mécanisme de formation de gouttelettes dans une jonction en T. La phase continue circule dans le canal principal et la phase dispersée est amenée perpendiculairement par un canal secondaire. La formation de gouttelette est liée à une chute de pression. Cette dernière est due à la présence de la phase dispersée dans le canal principal et qui gêne le passage de la phase continue. Lorsque la chute de pression à travers la phase dispersée devient trop importante, une goutte se détache.

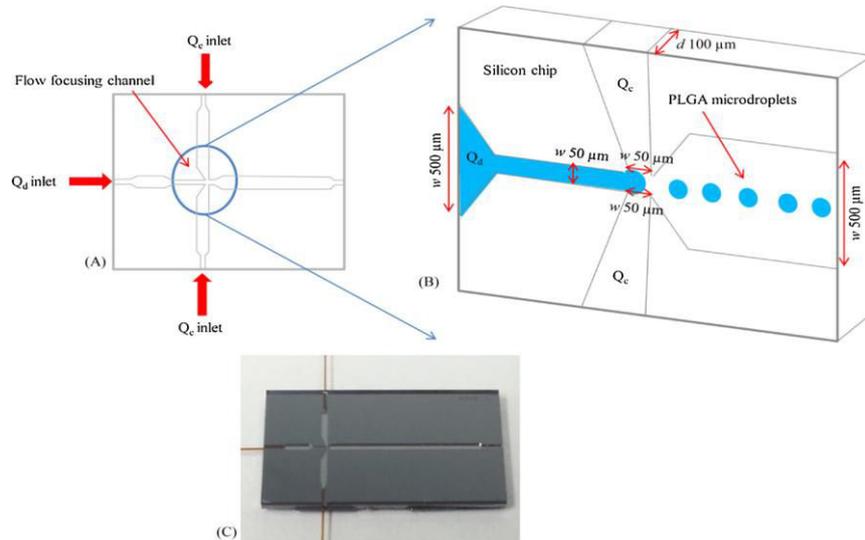


**Figure 27: Génération de gouttes dans une jonction T : (a) taille des gouttes inférieure au diamètre du canal principal [250], (b) gouttes allongées et confinées par les parois du canal principal (« plot ») [251].**

Les deux explications proposées par Thorsen et al. et par Garstecki et al. ne sont pas contradictoires. En effet, la formation des gouttelettes dépend forcément de la mouillabilité partielle ou nulle de la surface du canal par les phases continue ou dispersée [252]. Ainsi, dans le cas où la phase dispersée mouille légèrement les parois des canaux du microsystème, ou dans celui où le canal principal est plus large que le canal secondaire, le détachement des gouttes est dû à une compétition entre la tension de surface et le cisaillement visqueux. Dans certains, il est même possible de former des gouttes dont le diamètre est inférieur à la largeur du canal principal (Figure 27-a). Dans le cas où la phase continue mouille entièrement les parois des microcanaux, et que le canal principal est de taille similaire à celle du canal secondaire voir plus petite, la goutte se détachera à cause de la chute de pression à travers elle dans le canal principal. Dans cette situation, il est impossible de former des gouttes de diamètre absolu inférieur à la largeur du canal principal (Figure 27-b). On aura donc formation de « plots » plus au moins allongés plutôt que de gouttes.

#### **1.3.3.1.2. « Flow-focusing (FF) »**

Anna et al. [253] ont été les premiers à étudier la génération de gouttes par une jonction de type FF dans un microsystème. Le principe de cette technique repose sur l'injection d'une phase dispersée au milieu de deux entrées de phase continue. Le cisaillement de la phase continue s'exerce à la périphérie du flux d'entrée de phase dispersée : elle est ainsi pincée par la phase continue jusqu'à la formation d'une goutte (Figure 28) [254-256].



**Figure 28: Formation de gouttelettes à l'intérieur d'une jonction en FF [257]**

Il existe aussi une autre forme de la jonction en FF qui est dite « Shear-Focusing (SF)» [258]. Dans ce cas, la phase dispersée est injectée au milieu de deux entrées de phase continue et l'ensemble de ces trois courants est dirigé vers un rétrécissement. Ce dernier induit une accélération de la vitesse des deux phases à cet étranglement, ce qui augmente le cisaillement appliqué à la phase dispersée. Le co-flux laminaire ainsi créé passe à travers une constriction, ce qui l'affine et induit éventuellement la formation des gouttelettes à la sortie de l'étranglement (Figure 29).

L'intérêt de cette méthode réside principalement dans la largeur de la gamme de taille des gouttes accessible, celles-ci pouvant indifféremment être plus grandes ou plus petites que la taille de la constriction. Dans des conditions bien contrôlées de flux ou de pression, la taille des gouttes obtenues est extrêmement reproductible. D'autre part, leur fréquence de génération est relativement élevée, ce qui convient pour un certain nombre d'applications, particulièrement dans le cas de formation d'émulsions destinées à l'élaboration de microparticules.

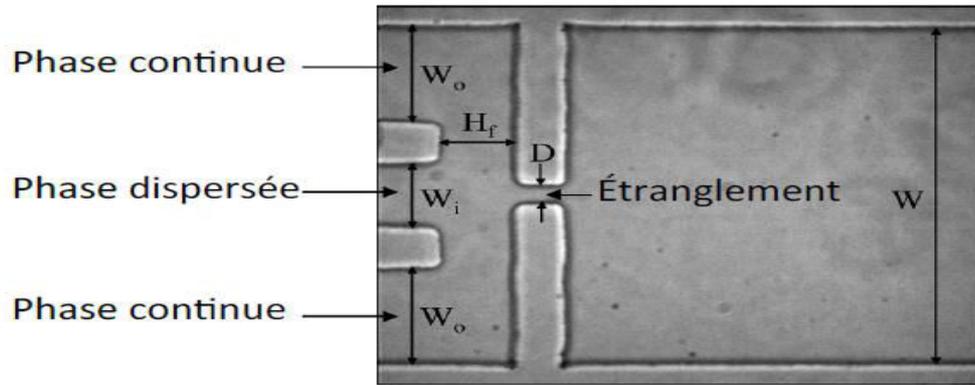


Figure 29: Jonction en « shear-focusing » dans un système microfluidique (adaptée de [253]).

### 1.3.3.2. Facteurs ayant une influence sur la formation des gouttes dans un microsystème

Parmi les paramètres qui ont le plus d'influence, on peut citer la mouillabilité du matériau constituant les parois du microsystème et les débits des phases continue et dispersée (ainsi que le rapport des débits des phases).

#### 1.3.3.2.1. Mouillabilité de la surface des canaux

La mouillabilité est l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur la surface d'un solide. L'utilisation de la notion d'angle de contact est intéressante pour décrire le comportement d'un liquide au contact d'une surface solide.

En microfluidique, la formation d'émulsions directes ou inverses (H/E ou E/H) dépend de la mouillabilité du matériau constituant les canaux du microsystème. Le liquide constituant la phase continue doit mouiller les parois des canaux. Pour une goutte d'un liquide A en contact avec un solide S, l'angle de contact  $\theta$  se calcule à partir de la relation de Young :

$$\sigma_S = \sigma_{SA} + \sigma_A \cdot \cos \theta \quad \text{Eq. 2}$$

$\sigma_S$ ,  $\sigma_{SA}$  et  $\sigma_A$  représentent respectivement la tension superficielle du solide S, la tension interfaciale entre le solide S et le liquide A et la tension superficielle du liquide A. La valeur de l'angle de contact permet de caractériser la mouillabilité de la surface :

- pour  $\theta = 0^\circ$ , le liquide mouille parfaitement le solide
- pour  $0 < \theta < 90^\circ$ , la mouillabilité du solide par le fluide est bonne
- pour  $90 < \theta < 150^\circ$ , la mouillabilité du solide par le fluide est faible
- au-delà de  $150^\circ$ , le fluide est considéré comme non-mouillant.

La Figure 30 illustre les mesures d'angle de contact d'une goutte sur une surface donnée.



**Figure 30: Illustration de l'angle de contact d'une goutte d'eau avec une surface hydrophile et une surface hydrophobe.**

Pour avoir la formation d'une émulsion avec des gouttes monodisperses dans un système microfluidique, la nature de la surface doit être similaire à celle de la phase continue : hydrophile pour une émulsion H/E et hydrophobe pour une émulsion E/H [259]. Ainsi Liu et al. [260] ont rapporté l'impossibilité de former une émulsion H/E dans un microsystème hydrophobe fabriqué à partir de polymère acrylique. Ils ont observé un fil de phase huileuse mouillant la surface de manière continue sans aucune formation d'émulsion.

Le PDMS est largement utilisé pour la fabrication de systèmes pour la microfluidique. Néanmoins, ce matériau est hydrophobe. Pour élaborer des émulsions H/E, il est donc nécessaire d'effectuer un traitement de surface préalable pour rendre hydrophile la surface des canaux du microsystème. Plusieurs méthodes sont proposées dans la littérature et peuvent être classées en deux types : les traitements par voies sèches (plasma oxygène /Argon [261, 262], décharge de corona [263]...) et ceux par voies humides (traitement chimique par le piranha/KOH [264], dépôt de dépôt de multicouches de polyélectrolytes [247]...). Certains chercheurs ont proposé des traitements de surface impliquant des fixations de groupements par liaisons covalentes qui permettent de conférer un caractère hydrophile permanent à la surface du PDMS [265, 266]. La plupart de ces traitements n'ont été appliqués qu'à des surfaces planes et pas à des systèmes fermés comme les systèmes microfluidiques. Il est à noter que l'utilisation du plasma oxygéné

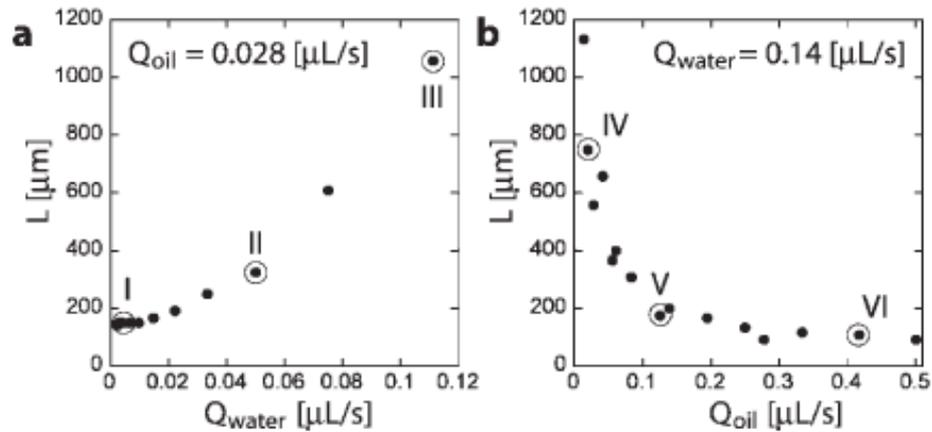
reste la méthode d'hydrophilisation de surface la plus rapportée et utilisée dans la littérature du faite de la simplicité et de la rapidité du traitement. Néanmoins, cette méthode reste limitée par le réarrangement des chaînes de PDMS qui font que la surface retrouve son hydrophobie quelques minutes voire quelques heures (parfois quelques jours après) en fonction des temps d'exposition au plasma et du mode de conservation des surfaces traitées [267, 268]. Le traitement, de microsystèmes scellés, avec du plasma oxygéné reste une opération délicate du faite que la surface à traiter peut ne pas être exposée de la même manière au plasma créant ainsi des hétérogénéités au niveau de l'hydrophilisation [264].

La nature et la concentration du stabilisant utilisé pour stabiliser l'émulsion a également une influence sur la tension interfaciale entre les deux fluides immiscibles choisis pour la formation de l'émulsion, ce qui modifie la taille des gouttes formées [269]. L'influence du pH des fluides utilisés a aussi été décrite [270].

#### **1.3.3.2.2. Débits des phases continue et dispersée**

Dans un système microfluidique, la contrainte de cisaillement que subit l'interface entre les deux phases liquides dépend des valeurs des débits de chaque phase, ainsi que de la géométrie de la jonction. Les débits des phases continue et dispersée sont notés respectivement  $Q_c$  et  $Q_d$ . Plus le rapport  $Q_c/Q_d$  est élevé, plus la contrainte de cisaillement appliquée à l'interface est grande plus la taille des gouttelettes de l'émulsion formée est petite [253]. Ainsi, pour un  $Q_d$  fixe, la taille des gouttes diminue quand le débit de la phase continue augmente, alors qu'en maintenant fixe  $Q_c$ , la taille des gouttes augmente avec  $Q_d$  [250, 271]. Garstecki et al. [251] ont utilisé un microsystème en jonction T pour former des émulsions E/H. Leurs observations expérimentales illustrent les tendances évoquées (Figure 31 (a) et (b)).

De plus, d'autres paramètres ont une influence sur la taille des gouttes formées : les viscosités des fluides utilisés, la géométrie des microsystèmes ainsi que les dimensions des canaux.

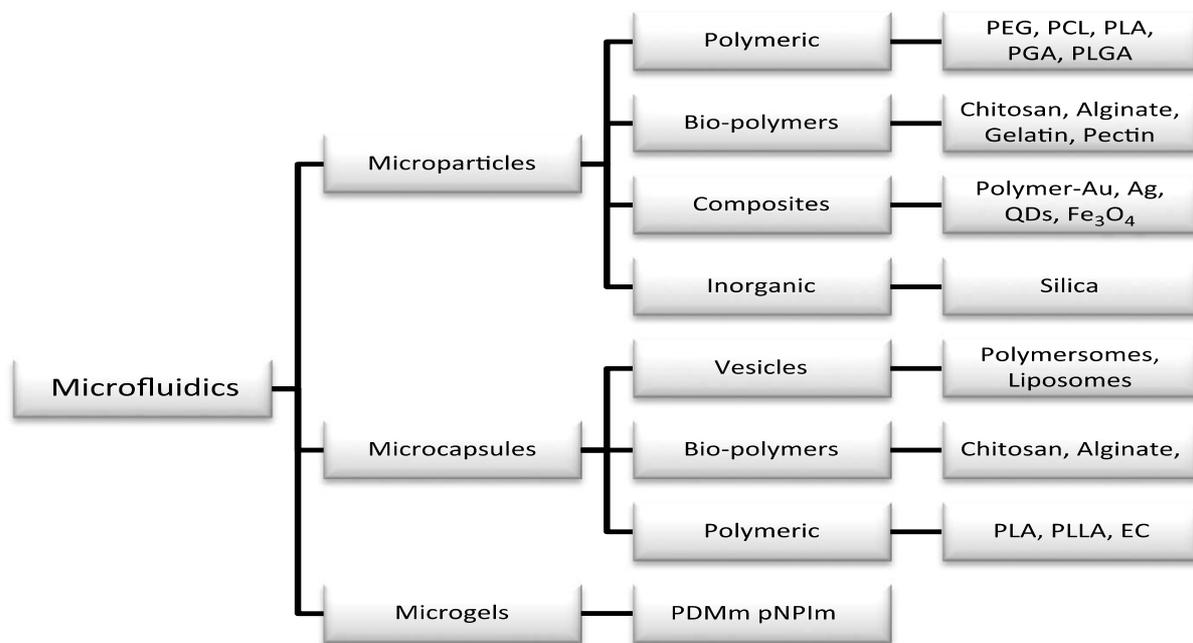


**Figure 31: Evolution de la taille des gouttes d'une émulsion E/H formée dans un microsystème en jonction T en fonction (a) de  $Q_d$  en gardant  $Q_c$  fixe (b) de  $Q_c$  en gardant  $Q_d$  fixe,  $Q_d$  et  $Q_c$  représentent  $Q_{\text{water}}$  et  $Q_{\text{oil}}$  respectivement [251].**

#### 1.3.4. Elaboration de particules de polymère par microfluidique

Les avancés dans la microfluidique ont contribué au développement de la fabrication de divers types de vecteurs par ce procédé (Figure 32).

Comme nous l'avons décrit précédemment, la génération de gouttelettes isométriques repose sur l'utilisation d'écoulements laminaires et contrôlés de fluides. La maîtrise de la taille des gouttes de l'émulsion formée à l'intérieur du microsystème est un facteur important car c'est cette taille qui va contrôler la taille des microparticules obtenues après solidification des gouttes. La méthode de solidification la plus appropriée dépend de la nature des constituants employés.



**Figure 32: Vecteurs préparés par microfluidique et natures des matériaux qui les constituent [272].**

#### 1.3.4.1. De la goutte à la particule : processus de solidification

Parmi les procédés de solidification les plus utilisés, nous citerons la polymérisation radicalaire (avec un amorçage thermique, photochimique ou ionique), la polycondensation, l'extraction de solvant ou encore l'auto-assemblage. Le choix de la méthode de solidification appropriée dépend du précurseur liquide, du type de particules désiré, des propriétés physico-chimiques et des applications finales visées pour les objets. Le Tableau 12 présente les différentes méthodes évoquées dans la littérature [273, 274] pour solidifier des dispersions liquides, élaborées par des systèmes microfluidiques. Nous nous sommes concentrés sur les résultats relatifs aux jonctions T et en FF.

Les méthodes utilisées pour solidifier les gouttes formées dans les microsystèmes sont diverses et permettent d'obtenir des nano- et microparticules. Le choix du processus de solidification des particules dépend des caractéristiques prioritaires visées : isométriques, non agrégées, nanométriques, micrométriques....

**Tableau 12: Récapitulatifs des différentes méthodes de solidification de particules rapportées dans la littérature.**

Géométrie du microsystème	Méthode de solidification	Composition des particules	Diamètre des particules (µm)	Réf.
Jonction T	Auto-assemblage	Organosilane	100-600	[275]
	Polymérisation radicalaire déclenchée thermiquement à l'extérieur du microsystème	Poly(divinylbenzène)	50-200	[276]
	Polymérisation radicalaire déclenchée par une exposition aux rayons UV à l'intérieur du microsystème	Norland Optical Adhesive 60 (NOA 60 Polymère photosensible)	60-100	[277]
	Réaction déclenchée par une exposition aux UV à l'extérieur du microsystème	Poly(1,6-hexanediol diacrylate)	30-120	[278]
		Poly (Isobornyle acrylate)	90-190	
	Réticulation ionique	Alginate de calcium	70-220	[279]
	Changement de phase (par refroidissement)	Agarose	90-110	[280]
	Evaporation de solvant	PLGA	400-500	[281]
Diffusion de solvant	PLA	6-50	[216]	
Flow-Focusing	Auto-assemblage	Chitosane modifié par des groupements hydrophobes	0,216-0,73	[282]
	Polymérisation radicalaire déclenchée thermiquement à l'extérieur du microsystème	PDMS	100-125	[283]
	Polymérisation radicalaire déclenchée par une exposition aux rayons UV à l'extérieur du microsystème	Dextran modifié par un méthacrylate d'hydroxyéthyle (Dex-HEM)	10	[284]
	Polymérisation radicalaire	Divinylbenzène	20-1000	[285]

	déclenchée par une exposition aux rayons UV à l'intérieur du microsystème			
	Réaction de chimie click	Poly(éthylène glycol) Dithiol + Acrylate de polyglycérol hyperbranché	250-350	[286]
	Réticulation ionique	Alginate de calcium	50-2000	[287]
		Chitosan	100-800	[288]
	Changement de phase (par refroidissement)	Agar	176-750	[289]
	Polycondensation	Polyuréthane-Polybutadiènediol	40-50	[290]
	Evaporation de solvant	PLGA	42	[291]
		Polyfluorène	0,150-2	[292]
	Diffusion de solvant	Silice	7-50	[293]

### 1.3.4.2. Exemple de particules élaborées par microfluidique

#### 1.3.4.2.1. Nanoparticules

Kuehne et al. [292] ont étudié l'élaboration de particules de polyfluorène (PFO) dans un système microfluidique avec une jonction en FF de dimensions 20 x 20  $\mu\text{m}^2$ . Les gouttes produites sont récupérées dans un volume assez important de phase continue où diffuse le solvant organique (toluène), ce qui induit la formation des particules. La suspension de particules est ensuite mise sous agitation afin de finaliser l'évaporation de solvant. En augmentant la concentration en PFO de  $5 \cdot 10^{-3}$  g/L à 0,5 g/L la taille des particules varie de 150 nm à 2  $\mu\text{m}$ . De plus, les nanoparticules obtenues sont sphériques et isométriques avec un CV% inférieur à 10% (Figure 33).

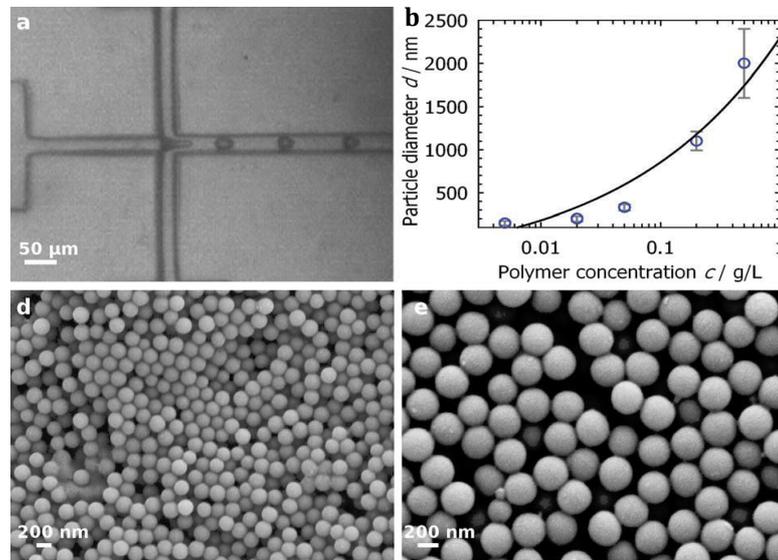


Figure 33 : (a) Formation des gouttes dans le microsystème en FF (b) Diamètre des particules en fonction de la concentration en PFO. Micrographie MEB des particules ayant un diamètre (d) 150nm (e) 200 nm.

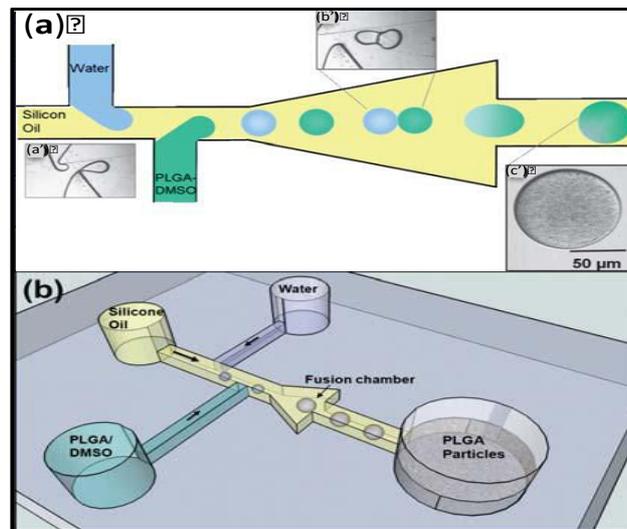


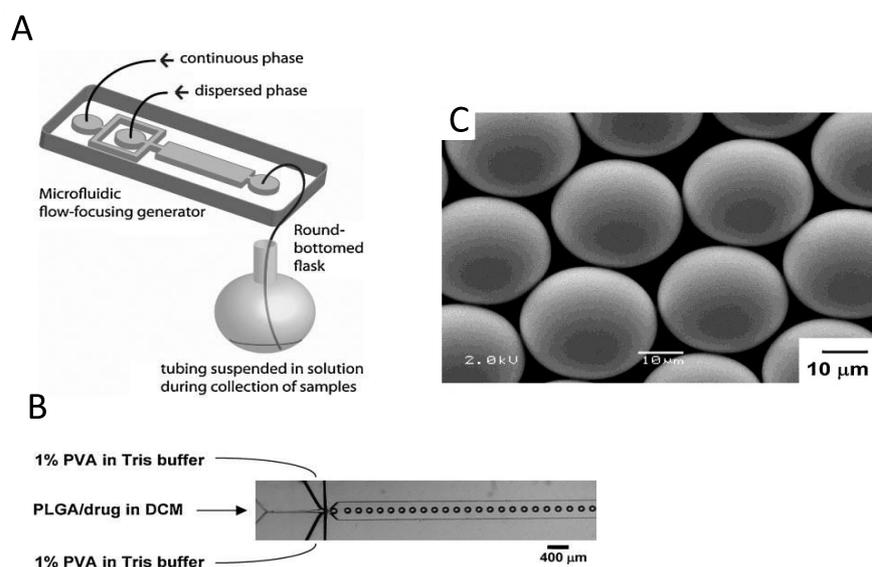
Figure 34: (a) Elaboration de nanoparticules de PLGA par microfluidique associé à une extraction de solvant (a') Formation de la goutte d'eau et de la goutte de PLGA-DMSO dans des jonction T (b') Chambre de fusion : fusion de la goutte d'eau avec le PLGA- DMSO induisant l'extraction du DMSO et la précipitation du PLGA (c') Chaque goutte formée est un réservoir d'une centaine de particules. (b) Dispositif expérimental global du procédé d'élaboration de nanoparticules de PLGA par extraction de solvant ce système comprend : trois entrées, une chambre de fusion et un réservoir de collecte de particules. Adapté de Hung et al. [294].

Hung et al. [294] se sont intéressées au développement d'un système microfluidique permettant l'obtention *in situ* de nanoparticules de PLGA par extraction de solvant. La Figure 34 présente le microsystème utilisé ainsi que les différentes parties qui le constituent. Le rapport du débit de la phase aqueuse et de la phase PLGA+DMSO a une forte influence sur la taille des particules. Ainsi, en passant d'un rapport 1:4 à un rapport 1:1 le diamètre moyen des nanoparticules obtenues diminue de 500 à 70 nm

Valencia et al. [295] ont examiné l'élaboration de nanoparticules de PLGA et de PLGA-Lipide dans un microsystème à jonction FF avec des tailles allant de 35 à 180 nm. Kolishetti et al. [296] ont préparé des nanoparticules de PLA avec un diamètre égal à 100 nm et dans lesquelles une SA à base de Pt(IV) a été encapsulée.

#### 1.3.4.2.2. Microparticules

Des microparticules de PLA/PLGA ont aussi été obtenues dans des systèmes microfluidiques avec des diamètres allant de quelques micromètres à plusieurs centaines de micromètres. Les distributions de tailles des microparticules obtenues sont généralement étroites et ont un CV inférieur à 5%. Xu et al. [297] ont réalisé l'élaboration de microparticules de PLGA dans lesquelles ils ont encapsulé du bupivacaïne. Des microparticules isométriques avec des tailles entre 10 et 40  $\mu\text{m}$  ont été obtenues par émulsion-évaporation de solvant. Le système utilisé est en PDMS avec une jonction FF.



**Figure 35: Elaboration de microparticules de PLGA par un système à jonction FF (A) Schéma du dispositif (B) Formation des gouttes (C) Micrographie MEB des microparticules obtenues (Adapté de [297]).**

Dans ce même travail, une comparaison a été faite entre la cinétique de libération de la bupivacaïne à partir des particules uniformes élaborées en système microfluidique et à partir d'autres particules élaborées par agitation mécanique (ultraturrax) et qui présentent des distributions de tailles relativement larges. Il s'est avéré que, plus la taille des particules est uniforme (pour le même diamètre moyen), plus la cinétique de libération est lente. L'effet burst habituellement observé avec des particules élaborées par agitation mécanique n'a plus lieu et la libération se trouve retardée. Le burst provenait en effet, pour les particules classiques d'une libération rapide à partir des plus petites particules, dont le rapport surface sur volume est bien plus élevé que pour le reste de la suspension. He et al. [298] ont examiné l'encapsulation et la libération du Paclitaxel encapsulé dans des microparticules de poly(L-lactic acid) (PLLA). Les particules obtenues ont une taille entre 30 et 50  $\mu\text{m}$  avec un coefficient de variation inférieur à 4%. Le microsystème utilisé est en PDMS et un traitement préalable, avec du plasma oxygéné, de la surface des canaux du microsystème était nécessaire pour rendre la surface hydrophile.

#### **1.3.4.2.3. Stabilisant utilisés dans la formulation des particules**

La plupart des travaux utilisent soit un tensioactif moléculaire tel que le dodécylsulfate de sodium (SDS) [277, 299], soit un stabilisant macromoléculaire amphiphile comme le PVA [217, 291, 298, 300] pour stabiliser les objets formés et diminuer éventuellement la taille des gouttelettes et donc la taille des objets formés par microfluidique. Dans une étude les auteurs utilisent un copolymère dibloc amphiphile le PEG-PLA [216]. Avec ce stabilisant macromoléculaire, des microparticules avec des tailles allant de 6 à 50  $\mu\text{m}$  ont été élaborées. Des polymères amphiphiles ont aussi été utilisés dans quelques exemples pour assurer la stabilité de microcapsules (PDLLA-b-PDMAEMA [301]) ou encore pour préparer des vésicules [302] par auto-assemblages (POE-*b*-PAD).

Actuellement, sauf erreur ou omission de notre part, l'utilisation de polysaccharides amphiphiles comme stabilisant macromoléculaire pour élaborer des particules dans un système microfluidique n'a jamais été rapportée dans la littérature. L'utilisation de dextrane modifié pour formuler des microparticules en utilisant ce procédé continu sera donc étudiée pour la première fois au cours de cette thèse.

### **1.3.5. Conclusion et objectifs de la thèse**

Depuis plusieurs années, l'intérêt porté à l'élaboration de particules nano- ou micrométriques de taille et morphologie contrôlées ne cesse de croître de part leurs vastes domaines d'applications. Les méthodes conventionnelles comme la nanoprécipitation et l'émulsion-évaporation de solvant (par ultraturax ou sonication...) permettent l'élaboration en masse de particules mais présentent aussi de nombreux challenges. Pour cela, ces dernières années, les chercheurs se sont intéressés de plus en plus au développement des procédés microfluidiques qui permettent de contrôler parfaitement la taille, la composition ainsi que la morphologie des particules obtenues. Dans cette partie, nous avons essayé de balayer les différents aspects relatifs à la microfluidique et nous avons présentés les différentes méthodes utilisées pour élaborer des particules par ce procédé. Des exemples de nano- et microparticules de polymères préparées dans la littérature ont été présentés mais la liste n'est pas exhaustive.

Durant ce travail de thèse, nous examinerons l'utilisation de système microfluidiques pour la préparation de microparticules de PLA recouvertes de dextrans amphiphiles avec des diamètres entre 1 et 100  $\mu\text{m}$ . Nous comparerons ce procédé avec les procédés d'émulsion-évaporation de solvant comportant une étape d'émulsification par agitation mécanique.

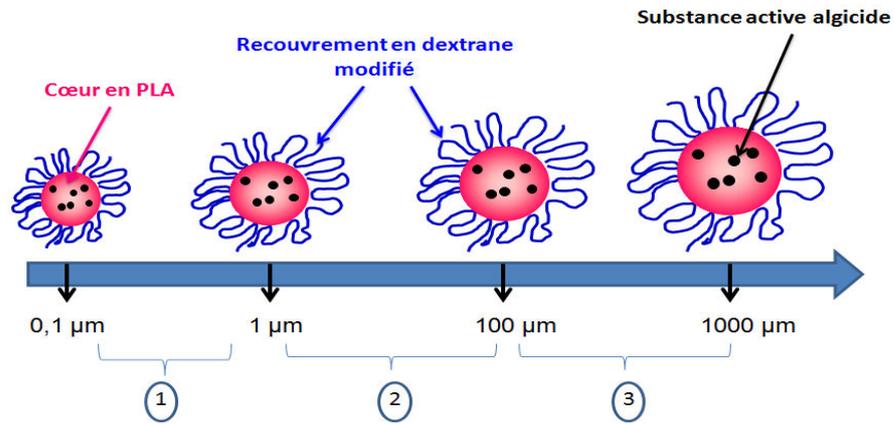
## 1.4. Conclusion générale et objectifs de la thèse

Cette thèse porte sur l'élaboration et la caractérisation de particules matricielles, dans lesquelles des SA algicides sont encapsulées. Il était donc nécessaire de définir les vecteurs de SA les plus utilisés dans la littérature et de voir les différents domaines dans lesquels ils peuvent être appliqués. Etant donné que l'utilisation de particules matricielles pour des applications pharmaceutiques a été déjà présentée dans plusieurs thèses effectuées au LCPM, nous avons préféré nous concentrer sur d'autres domaines d'application possibles pour ces particules et nous avons mis en évidence que très peu de travaux concernaient l'application visée, à savoir les traitements des plans d'eau naturels ou artificiels. Les SA modèles retenues sont les esters aliphatiques de l'acide gallique.

L'élaboration de particules matricielles nano- et micrométriques sera effectuée par différents procédés. Pour cela, nous nous sommes intéressés dans la deuxième partie de la synthèse bibliographique aux procédés batch qui peuvent être utilisés pour concevoir ces particules ainsi qu'aux différents paramètres ayant une influence sur leurs tailles et morphologies. La nanopréciipitation et l'émulsion-évaporation de solvant apparaissent comme particulièrement pertinents.

Pour clôturer ce chapitre bibliographique, nous nous sommes intéressés aux procédés continus d'élaboration de particules matricielles et plus précisément à la microfluidique. Les caractéristiques de ce procédé, les paramètres ayant une influence sur la formation des émulsions à l'intérieur des systèmes microfluidiques et sur la taille des particules élaborés ainsi que la méthode de récupération des particules ont été détaillés dans cette partie.

La taille des vecteurs de SA fait partie des facteurs qui ont une influence aussi bien sur la quantité de SA encapsulée que sur sa cinétique de libération. Il était donc intéressant d'évaluer la possibilité d'élaborer des particules chargées en SA (esters aliphatiques de l'acide gallique), à partir du même polymère (PLA) et stabilisant (dextrane amphiphile), avec des tailles et morphologies contrôlées balayant une large gamme de taille et de comparer les différentes caractéristiques et cinétiques de libération obtenues (Figure 36).



**Figure 36: Particules de PLA recouvertes dextrane modifié renfermant une substance active algicide qu'on vise à élaborer (1) domaine (0,1 µm – 1 µm) (2) domaine (1 µm – 100 µm) (3) domaine (100 µm - 1000 µm)**

Dans la littérature, certains travaux se sont intéressés à l'étude simultanée de nano et microparticules. Venkatpurwar et al. [303] ont rapporté l'encapsulation du Cycloprine (CsA) dans des nano- et microparticules de PLA ayant respectivement des tailles de 280 nm et 1,21 µm. Les particules ont été élaborées par émulsion-évaporation de solvant. Le comportement hématologique et biochimique des rats (Sprague Dawley (SD)), auxquels certaines doses de particules ont été injectées, a été évalué. Après 28 jours de suivi, les nano- ou les microparticules agissent de la même manière sur les rats étudiés. Il est à noter que ces chercheurs ont montré que leurs lot de microparticules contenait une quantité assez importante de nanoparticules. Stloukal et al. [304] se sont intéressés à l'encapsulation d'un herbicide (Metazachlor: MTZ) dans des nano- et microparticules de PLA par émulsion-évaporation de solvant. Trois gammes de tailles de particules ont été élaborées (600 nm, 800 nm et 8 µm). L'efficacité d'encapsulation est par définition le pourcentage de la masse de substance active encapsulée par rapport à la masse de SA introduite initialement. Pour le MTZ encapsulé dans ces particules, l'efficacité de l'encapsulation (EE%) a atteint 65% pour certaines formulations. La comparaison entre les différentes cinétiques obtenues pour les nano- et microparticules PLA/MTZ a confirmé que la cinétique de libération est inversement proportionnelle à la taille des particules et qu'elle est plutôt proportionnelle à la quantité d'herbicide encapsulée. En effet, le MTZ plastifie le PLA et peut avoir une influence sur la cinétique de libération.

A notre connaissance, il n'existe pas d'autres travaux qui comparent les caractéristiques de nano- et microparticules chargées en SA. De plus, les travaux disponibles comparent des tailles plutôt proches variant de quelques centaines de nanomètres à quelques micromètres.

## 1.5. Références bibliographiques

1. Singh, M.N., K.S.Y. Hemant, M. Ram, and H.G. Shivakumar, *Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery*. Research in pharmaceutical sciences, 2010. **5**(2): p. 65-77.
2. Aubry, J., F. Ganachaud, J.-P. Cohen Addad, and B. Cabane, *Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting: I. Boundaries*. Langmuir, 2009. **25**(4): p. 1970-1979.
3. Danhier, F., E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Preat, *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications*. Journal of Controlled Release, 2012. **161**(2): p. 505-522.
4. Imbrogno, A., E. Piacentini, E. Drioli, and L. Giorno, *Micro and nano polycaprolactone particles preparation by pulsed back-and-forward cross-flow batch membrane emulsification for parenteral administration*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. **477**(1-2): p. 344-350.
5. Jeffery, H., S.S. Davis, and D.T. Ohagan, *The preparation and characterization of poly(Lactide-co-Glycolide) microparticles. I. Oil-in-Water Emulsion solvent evaporation* International Journal of Pharmaceutics, 1991. **77**(2-3): p. 169-175.
6. Gavory, C., A. Durand, J.-L. Six, C. Nouvel, E. Marie, and M. Leonard, *Polysaccharide-covered nanoparticles prepared by nanoprecipitation*. Carbohydrate Polymers, 2011. **84**(1): p. 133-140.
7. Laville, M., J. Babin, I. Londono, M. Legros, C. Nouvel, A. Durand, R. Vanderesse, M. Leonard, and J.-L. Six, *Polysaccharide-covered nanoparticles with improved shell stability using click-chemistry strategies*. Carbohydrate Polymers, 2013. **93**(2): p. 537-546.
8. Akash, M.S.H., K. Rehman, and S.Q. Chen, *Natural and Synthetic Polymers as Drug Carriers for Delivery of Therapeutic Proteins*. Polymer Reviews, 2015. **55**(3): p. 371-406.
9. Hadeif, I., B. Roge, and F. Edwards-Levy, *Serum Albumin-Alginate Microparticles Prepared by Transacylation: Relationship between Physicochemical, Structural and Functional Properties*. Biomacromolecules, 2015. **16**(8): p. 2296-2307.
10. Tu, L., Y.H. He, H.B. Yang, Z.S. Wu, and L.J. Yi, *Preparation and characterization of alginate-gelatin microencapsulated Bacillus subtilis SL-13 by emulsification/internal gelation*. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2015. **26**(12): p. 735-749.
11. Mundargi, R.C., V.R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, and T.M. Aminabhavi, *Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives*. Journal of Controlled Release, 2008. **125**(3): p. 193-209.
12. Lam, P.L. and R. Gambari, *Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries*. Journal of Controlled Release, 2014. **178**: p. 25-45.
13. Topete, A., S. Barbosa, and P. Taboada, *Intelligent micellar polymeric nanocarriers for therapeutics and diagnosis*. Journal of Applied Polymer Science, 2015. **132**(42): p. 42650.
14. Tu, C., L. Zhu, P. Li, Y. Chen, Y. Su, D. Yan, X. Zhu, and G. Zhou, *Supramolecular polymeric micelles by the host-guest interaction of star-like calix 4 arene and chlorin e6 for photodynamic therapy*. Chemical Communications, 2011. **47**(21): p. 6063-6065.
15. Tomalia, D.A., H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith, *A new class of polymers-starburst-dendritic macromolecules*. Polymer Journal, 1985. **17**(1): p. 117-132.
16. Grayson, S.M. and J.M.J. Frechet, *Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications*. Chemical Reviews, 2001. **101**(12): p. 3819-3867.

17. Tekade, R.K., P.V. Kumar, and N.K. Jain, *Dendrimers in Oncology: An Expanding Horizon*. Chemical Reviews, 2009. **109**(1): p. 49-87.
18. Kannan, R., R. Iezzi, B. Rajaguru, and S. Kannan, *Dendrimers for sustained release of compounds*. 2011, Patent EP2214646A2.
19. Chauhan, A.S., *Dendrimer nanotechnology for enhanced formulation and controlled delivery of resveratrol*, in *Resveratrol and Health*, O. Vang and J.M. Pezzuto, Editors. 2015. p. 134-140.
20. Szoka, F.C. and M. Tang, *Amphotericin B Formulated in Liposomes and Lipid Based Systems: A Review*. Journal of Liposome Research, 1993. **3**(3): p. 363-375.
21. Storm, G. and D.J.A. Crommelin, *Liposomes: quo vadis?* Pharmaceutical Science & Technology Today, 1998. **1**(1): p. 19-31.
22. Mansour, H.M., M. Sohn, A. Al-Ghananeem, and P.P. DeLuca, *Materials for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects*. International Journal of Molecular Sciences, 2010. **11**(9): p. 3298-3322.
23. Musyanovych, A. and K. Landfester, *Polymer Micro- and Nanocapsules as Biological Carriers with Multifunctional Properties*. Macromolecular Bioscience, 2014. **14**(4): p. 458-477.
24. Vehring, R., *Pharmaceutical particle engineering via spray drying*. Pharmaceutical Research, 2008. **25**(5): p. 999-1022.
25. Kalhapure, R.S., N. Suleman, C. Mocktar, N. Seedat, and T. Govender, *Nanoengineered Drug Delivery Systems for Enhancing Antibiotic Therapy*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **104**(3): p. 872-905.
26. Wattanasatcha, A., S. Rengpipat, and S. Wanichwecharungruang, *Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **434**(1-2): p. 360-365.
27. Fernandes, B., R. Silva, A. Ribeiro, T. Matama, A.C. Gomes, and A.M. Cavaco-Paulo, *Improved Poly (D,L-lactide) nanoparticles-based formulation for hair follicle targeting*. International Journal of Cosmetic Science, 2015. **37**(3): p. 282-290.
28. Monti, D., P. Chetoni, S. Buralassi, S. Tampucci, M. Centini, and C. Anselmi, *4-Methylbenzylidene camphor microspheres: reconstituted epidermis (Skinethic (R)) permeation and distribution*. International Journal of Cosmetic Science, 2015. **37**(3): p. 298-305.
29. Kim, H., M. Kim, Y. Quan, T. Moon, J. Mun, H. Cho, N. Park, W. Moon, K. Lee, H. Kim, J. Lee, H. Ryoo, and H. Jung, *Novel anti-wrinkle effect of cosmetic product with new retinyl retinoate microsphere using biodegradable polymer*. Skin Research and Technology, 2012. **18**(1): p. 70-76.
30. Martins, I.M., M.F. Barreiro, M. Coelho, and A.E. Rodrigues, *Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications*. Chemical Engineering Journal, 2014. **245**: p. 191-200.
31. Ammala, A., *Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets*. International Journal of Cosmetic Science, 2013. **35**(2): p. 113-124.
32. Inc, C. *Cocona technology (Thirtysevenfive Technology)*. 2015; Available from: <https://www.thirtysevenfive.com/>. Consulté le: 30/11/15
33. Srl, M.F. *Milkofil*. 2012; Available from: <http://www.filatimaclodio.it/EN/milkofil.html>. Consulté le: 30/11/15
34. Lempur, *Lempur*. 2005. Consulté le: 30/11/15

35. CSIRO. *High performance clothing for elite athletes*. 2015; Available from: <http://www.csiro.au/en/Research/MF/Areas/Chemicals-and-fibres/Advancedfibres/Smart-clothing-and-textiles/Sportswool>. Consulté le: 30/11/15
36. Schuster, K.C., F. Suchomel, J. Maenner, M. Abu-Rous, and H. Firgo, *Functional and comfort properties of textiles from TENCEL (R) fibres resulting from the fibres' water-absorbing nanostructure: A review*. Macromolecular Symposia, 2006. **244**: p. 149-165.
37. Nelson, G., *Application of microencapsulation in textiles*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **242**(1-2): p. 55-62.
38. Sawhney, A.P.S., B. Condon, K.V. Singh, S.S. Pang, G. Li, and D. Hui, *Modern applications of nanotechnology in textiles*. Textile Research Journal, 2008. **78**(8): p. 731-739.
39. Kumar, M., *Nano and microparticles as controlled drug delivery devices*. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2000. **3**(2): p. 234-258.
40. Goetzendorf-Grabowska, B., H. Krolikowska, and M. Gadzinowski, *Polymer microspheres as carriers of antibacterial properties of textiles: A preliminary study*. Fibres & Textiles in Eastern Europe, 2004. **12**(4): p. 62-64.
41. Goetzendorf-Grabowska, B., Z. Polus, M. Kiwala, A. Karaszewska, I. Kaminska, and I. Maczka, *Antibacterial Air Filter Nonwovens Modified by Poly(Lactide) Microspheres Containing Triclosan*. Fibres & Textiles in Eastern Europe, 2015. **23**(1): p. 114-119.
42. Monllor, P., M.A. Bonet, and F. Cases, *Characterization of the behaviour of flavour microcapsules in cotton fabrics*. European Polymer Journal, 2007. **43**(6): p. 2481-2490.
43. Rodrigues, S.N., I.M. Martins, I.P. Fernandes, P.B. Gomes, V.G. Mata, M.F. Barreiro, and A.E. Rodrigues, *Scentfashion®: Microencapsulated perfumes for textile application*. Chemical Engineering Journal, 2009. **149**(1-3): p. 463-472.
44. Sánchez, P., M.V. Sánchez-Fernandez, A. Romero, J.F. Rodríguez, and L. Sánchez-Silva, *Development of thermo-regulating textiles using paraffin wax microcapsules*. Thermochimica Acta, 2010. **498**(1-2): p. 16-21.
45. Yamato, Y., T. Yoshida, M. Kikuchi, M. Okamoto, K. Miyoshi, S. Fukuda, T. Fuse, T. Yamauchi, Y. Ogawa, and S. Mutagami, *Microcapsule, treating liquids containing the same, and textile structure having microcapsules adhering thereto*. 1993, Patent EP0436729A1.
46. EURACLI. *Performance des thermochrome EuraTherm®*. Available from: <http://www.euracli.fr/photo-thermochrome.php>. Consulté le: 15/01/16
47. Siler Marinkovic, S., D. Bezbradica, and P. Skundric, *Microencapsulation in textile industry*. Chem. Ind. Chem. Eng. Q, 2006. **12**(1): p. 58-62.
48. Gharsallaoui, A., G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, and R. Saurel, *Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview*. Food Research International, 2007. **40**(9): p. 1107-1121.
49. Duran, N. and P.D. Marcato, *Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review*. International Journal of Food Science and Technology, 2013. **48**(6): p. 1127-1134.
50. Chaudhry, Q. and L. Castle, *Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries*. Trends in Food Science & Technology, 2011. **22**(11): p. 595-603.
51. Arora, A. and G.W. Padua, *Review: Nanocomposites in Food Packaging*. Journal of Food Science, 2010. **75**(1): p. R43-R49.

52. Chen, L., G.E. Remondetto, and M. Subirade, *Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems*. Trends in Food Science & Technology, 2006. **17**(5): p. 272-283.
53. Rashidi, L. and K. Khosravi-Darani, *The Applications of Nanotechnology in Food Industry*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011. **51**(8): p. 723-730.
54. Dias, M.I., I. Ferreira, and M.F. Barreiro, *Microencapsulation of bioactives for food applications*. Food & Function, 2015. **6**(4): p. 1035-1052.
55. Bouwmeester, H., S. Dekkers, M.Y. Noordam, W.I. Hagens, A.S. Bulder, C. de Heer, S.E.C.G. ten Voorde, S.W.P. Wijnhoven, H.J.P. Marvin, and A.J.A.M. Sips, *Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009. **53**(1): p. 52-62.
56. Dasgupta, N., S. Ranjan, D. Mundekkad, C. Ramalingam, R. Shanker, and A. Kumar, *Nanotechnology in agro-food: From field to plate*. Food Research International, 2015. **69**: p. 381-400.
57. Madene, A., M. Jacquot, J. Scher, and S. Desobry, *Flavour encapsulation and controlled release - a review*. International Journal of Food Science and Technology, 2006. **41**(1): p. 1-21.
58. Soottitantawat, A., K. Takayama, K. Okamura, D. Muranaka, H. Yoshii, T. Furuta, M. Ohkawara, and P. Linko, *Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2005. **6**(2): p. 163-170.
59. Yoshii, H., A. Soottitantawat, X.-D. Liu, T. Atarashi, T. Furuta, S. Aishima, M. Ohgawara, and P. Linko, *Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2001. **2**(1): p. 55-61.
60. Gomez-Estaca, J., R. Gavara, and P. Hernandez-Munoz, *Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015. **29**: p. 302-307.
61. Liu, X.D., T. Atarashi, T. Furuta, H. Yoshii, S. Aishima, M. Ohkawara, and P. Linko, *Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavors by spray drying*. Drying Technology, 2001. **19**(7): p. 1361-1374.
62. McNamee, B.F., E.D. O'Riordan, and M. O'Sullivan, *Effect of partial replacement of gum Arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(7): p. 3385-3388.
63. Jordan, J., K.I. Jacob, R. Tannenbaum, M.A. Sharaf, and I. Jasiuk, *Experimental trends in polymer nanocomposites - a review*. Materials Science and Engineering a-Structural Materials Properties Microstructure and Processing, 2005. **393**(1-2): p. 1-11.
64. Robertson, G., *Active and intelligent packaging*, in *Food Science and Technology*. 2006. p. 285-311.
65. Onwulata, C.I., *Microencapsulation and functional bioactive foods*. Journal of Food Processing and Preservation, 2013. **37**(5): p. 510-532.
66. Kuorwel, K.K., M.J. Cran, J.D. Orbell, S. Buddhadasa, and S.W. Bigger, *Review of Mechanical Properties, Migration, and Potential Applications in Active Food Packaging Systems Containing Nanoclays and Nanosilver*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2015. **14**(4): p. 411-430.
67. Di Maio, L., P. Scarfato, E. Avallone, M.R. Galdi, and L. Incarnato, *Preparation and Characterization of Biodegradable Active PLA Film for Food Packaging*, in *Proceedings of Pps-29: The 29th International Conference of the Polymer - Conference Papers*, V. Alstadt, Editor. 2014. p. 338-341.
68. Liu, L.S., T.Z. Jin, V. Finkenstadt, C.K. Liu, P.H. Cooke, D.R. Coffin, K.B. Hicks, and C. Samer, *Antimicrobial Packaging Materials from Poly(Lactic Acid) Incorporated with Pectin-Nisaplin® Microparticles*. Journal of the Balkan Tribological Association, 2009. **15**(2): p. 237-252.

69. Woranuch, S. and R. Yoksan, *Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation*. Carbohydrate Polymers, 2013. **96**(2): p. 578-585.
70. Woranuch, S. and R. Yoksan, *Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging*. Carbohydrate Polymers, 2013. **96**(2): p. 586-592.
71. Devi, K.P., S.A. Nisha, R. Sakthivel, and S.K. Pandian, *Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane*. Journal of Ethnopharmacology, 2010. **130**(1): p. 107-115.
72. Yogalakshmi, B., P. Viswanathan, and C.V. Anuradha, *Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats*. Toxicology, 2010. **268**(3): p. 204-12.
73. Chen, H.D. and R. Yada, *Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development*. Trends in Food Science & Technology, 2011. **22**(11): p. 585-594.
74. Khater, H.F., *Ecosmart Biorational Insecticides: Alternative Insect Control Strategies*. 2012: INTECH Open Access Publisher.
75. de Oliveira, J.L., E.V. Ramos Campos, M. Bakshi, P.C. Abhilash, and L.F. Fraceto, *Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises*. Biotechnology Advances, 2014. **32**(8): p. 1550-1561.
76. Kah, M. and T. Hofmann, *Nanopesticide research: Current trends and future priorities*. Environment International, 2014. **63**: p. 224-235.
77. Kah, M., S. Beulke, K. Tiede, and T. Hofmann, *Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2012. **43**(16): p. 1823-1867.
78. Campos, E.V.R., J.L. de Oliveira, and L.F. Fraceto, *Applications of Controlled Release Systems for Fungicides, Herbicides, Acaricides, Nutrients, and Plant Growth Hormones: A Review*. Advanced Science, Engineering and Medicine, 2014. **6**(4): p. 373-387.
79. Boehm, A.L., I. Martinon, R. Zerrouk, E. Rump, and H. Fessi, *Nanoprecipitation technique for the encapsulation of agrochemical active ingredients*. Journal of Microencapsulation, 2003. **20**(4): p. 433-441.
80. Martin, L., S. Liparoti, G. Della Porta, R. Adami, J.L. Marques, J.S. Urieta, A.M. Mainar, and E. Reverchon, *Rotenone coprecipitation with biodegradable polymers by supercritical assisted atomization*. Journal of Supercritical Fluids, 2013. **81**: p. 48-54.
81. Asrar, J., Y.W. Ding, R.E. La Monica, and L.C. Ness, *Controlled release of tebuconazole from a polymer matrix microparticle: Release kinetics and length of efficacy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(15): p. 4814-4820.
82. Pereira, A.E.S., R. Grillo, N.F.S. Mello, A.H. Rosa, and L.F. Fraceto, *Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment*. Journal of Hazardous Materials, 2014. **268**: p. 207-215.
83. Taylor, R.L., G.S. Caldwell, and M.G. Bentley, *Toxicity of algal-derived aldehydes to two invertebrate species: Do heavy metal pollutants have a synergistic effect?* Aquatic Toxicology, 2005. **74**(1): p. 20-31.
84. Gross, E.M. and R. Sütfield, *Polyphenols with algicidal activity in the submerged macrophyte Myriophyllum Spicatum L*. Acta Horticulturae, 1994. **381**: p. 710-716.
85. Nakai, S., Y. Inoue, and M. Hosomi, *Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols*. Water Research, 2001. **35**(7): p. 1855-1859.

86. Geiger, S., E. Henry, P. Hayes, and K. Haggard, *Barley straw - Algae control literature analysis* Aquatic Scientific Resources, Portland, OR, 2005: p. pp 25.
87. hUallachain, D.O. and O. Fenton, *Barley (*Hordeum vulgare*)-induced growth inhibition of algae: a review*. Journal of Applied Phycology, 2010. **22**(5): p. 651-658.
88. Waybright, T.J., D.E. Terlizzi, and M.D. Ferrier, *Chemical characterization of the aqueous algistatic fraction of barley straw (*Hordeum vulgare*) inhibiting *Microcystis aeruginosa**. Journal of Applied Phycology, 2009. **21**(3): p. 333-340.
89. Laue, P., H. Bahrs, S. Chakrabarti, and C.E.W. Steinberg, *Natural xenobiotics to prevent cyanobacterial and algal growth in freshwater: Contrasting efficacy of tannic acid, gallic acid, and gramine*. Chemosphere, 2014. **104**: p. 212-220.
90. Guo, P., Y. Liu, and C. Liu, *Effects of chitosan, gallic acid, and algicide on the physiological and biochemical properties of *Microcystis flos-aquae**. Environmental Science and Pollution Research, 2015. **22**(17): p. 13514-13521.
91. Lu, Y., J. Wang, Y. Yu, W. Su, and F. Kong, *Inhibition of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze on *Microcystis aeruginosa* and isolation of the inhibition factors*. Biotechnology Letters, 2013. **35**(7): p. 1029-1034.
92. Ni, L., K. Acharya, G. Ren, S. Li, Y. Li, and Y. Li, *Preparation and characterization of anti-algal sustained-release granules and their inhibitory effects on algae*. Chemosphere, 2013. **91**(5): p. 608-615.
93. Ni, L., D. Li, S. Hu, P. Wang, S. Li, Y. Li, Y. Li, and K. Acharya, *Effects of artemisinin sustained-release granules on mixed alga growth and microcystins production and release*. Environmental Science and Pollution Research, 2015. **22**(23): p. 18637-18644.
94. Ni, L., X. Jie, P. Wang, S. Li, S. Hu, Y. Li, Y. Li, and K. Acharya, *Characterization of unsaturated fatty acid sustained-release microspheres for long-term algal inhibition*. Chemosphere, 2015. **120**: p. 383-390.
95. Ni, L., X. Jie, P. Wang, S. Li, G. Wang, Y. Li, Y. Li, and K. Acharya, *Effect of linoleic acid sustained-release microspheres on *Microcystis aeruginosa* antioxidant enzymes activity and microcystins production and release*. Chemosphere, 2015. **121**: p. 110-116.
96. Hausen, B.M. and W. Beyer, *The sensitizing capacity of the antioxidants propyl, octyl, and dodecyl gallate and some related gallic acid-esters*. Contact Dermatitis, 1992. **26**(4): p. 253-258.
97. Maldonado, O.S., R. Lucas, F. Comelles, M.J. Gonzalez, J.L. Parra, I. Medina, and J.C. Morales, *Synthesis and characterization of phenolic antioxidants with surfactant properties: glucosyl- and glucuronosyl alkyl gallates*. Tetrahedron, 2011. **67**(38): p. 7268-7279.
98. Losada Barreiro, S., C. Bravo-Diaz, F. Paiva-Martins, and L.S. Romsted, *Maxima in antioxidant distributions and efficiencies with increasing hydrophobicity of gallic acid and its alkyl esters. The pseudophase model interpretation of the "cutoff effect"*. Journal of agricultural and food chemistry, 2013. **61**(26): p. 6533-43.
99. Alonso, C., R. Lucas, C. Barba, M. Marti, L. Rubio, F. Comelles, J.C. Morales, L. Coderch, and J.L. Parra, *Skin delivery of antioxidant surfactants based on gallic acid and hydroxytyrosol*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2015. **67**(7): p. 900-908.
100. González, M.J., I. Medina, O.S. Maldonado, R. Lucas, and J.C. Morales, *Antioxidant activity of alkyl gallates and glycosyl alkyl gallates in fish oil in water emulsions: Relevance of their surface active properties and of the type of emulsifier*. Food Chemistry, 2015. **183**: p. 190-196.
101. Kubo, I., K. Fujita, K. Nihei, and A. Nihei, *Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(5): p. 1072-1076.

102. Król, E., A. de Sousa Borges, I. da Silva, C.R. Polaquini, L.O. Regasini, H. Ferreira, and D.-J. Scheffers, *Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes*. *Frontiers in Microbiology*, 2015. **6**: p.1-12.
103. Locatelli, C., F.B. Filippin-Monteiro, and T.B. Creczynski-Pasa, *Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013. **60**: p. 233-239.
104. Subramanian, A.P., A.A. John, M.V. Vellayappan, A. Balaji, S.K. Jaganathan, E. Supriyanto, and M. Yusof, *Gallic acid: prospects and molecular mechanisms of its anticancer activity*. *Rsc Advances*, 2015. **5**(45): p. 35608-35621.
105. Yamasaki, H., M. Uozaki, Y. Katsuyama, H. Utsunomiya, T. Arakawa, M. Higuchi, T. Higuti, and A.H. Koyama, *Antiviral effect of octyl gallate against influenza and other RNA viruses*. *International Journal of Molecular Medicine*, 2007. **19**(4): p. 685-688.
106. Thiesen, K., R. Klauck, N. Sors, M. Koehler, and S. Wendicke, *Allergic contact stomatitis to dodecyl gallate? A review of the relevance of positive patch test results to gallates*. 2013, Beiersdorf Ag.
107. Nihei, K., A. Nihei, and I. Kubo, *Molecular design of multifunctional food additives: Antioxidative antifungal agents*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52**(16): p. 5011-5020.
108. Leal, P.C., A. Mascarello, M. Derita, F. Zuljan, R.J. Nunes, S. Zacchino, and R.A. Yunes, *Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009. **19**(6): p. 1793-1796.
109. Ito, S., Y. Nakagawa, S. Yazawa, Y. Sasaki, and S. Yajima, *Antifungal activity of alkyl gallates against plant pathogenic fungi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2014. **24**(7): p. 1812-1814.
110. Jamshidian, M., E.A. Tehrany, and S. Desobry, *Antioxidants Release from Solvent-Cast PLA Film: Investigation of PLA Antioxidant-Active Packaging*. *Food and Bioprocess Technology*, 2011. **6**(6): p. 1450-1463.
111. Jamshidian, M., E.A. Tehrany, and S. Desobry, *Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film*. *Food Control*, 2012. **28**(2): p. 445-455.
112. Barla, F., H. Higashijima, S. Funai, K. Sugimoto, N. Harada, R. Yamaji, T. Fujita, Y. Nakano, and H. Inui, *Inhibitive Effects of Alkyl Gallates on Hyaluronidase and Collagenase*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2009. **73**(10): p. 2335-2337.
113. Marti, M., V. Martinez, M.J. Lis, J. Valldeperas, A. de la Maza, J.L. Parra, and L. Coderch, *Gallic acid vehiculized through liposomes or mixed micelles in biofunctional textiles*. *Journal of the Textile Institute*, 2014. **105**(2): p. 175-186.
114. Tan, J., G. Zhao, Y. Lu, Z. Zeng, and M.A. Winnik, *Synthesis of PMMA Microparticles with a Narrow Size Distribution by Photoinitiated RAFT Dispersion Polymerization with a Macromonomer as the Stabilizer*. *Macromolecules*, 2014. **47**(19): p. 6856-6866.
115. Tan, J.B., X. Rao, J.W. Yang, and Z.H. Zeng, *Monodisperse highly cross-linked "living" microspheres prepared via photoinitiated RAFT dispersion polymerization*. *Rsc Advances*, 2015. **5**(24): p. 18922-18931.
116. Wu, M., E. Dellacherie, A. Durand, and E. Marie, *Poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization (1): Dextran-based surfactants*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009. **69**(1): p. 141-146.
117. Legrand, P., S. Lesieur, A.I. Bochot, R. Gref, W. Raatjes, G. Barratt, and C. Vauthier, *Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007. **344**(1-2): p. 33-43.
118. Soppimath, K.S., T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, and W.E. Rudzinski, *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. *Journal of Controlled Release*, 2001. **70**(1-2): p. 1-20.

119. Fessi, H., J.P. Devissaguet, F. Puisieux, and C. Thies, *Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules*. 1988, Patent EP 0275796A1.
120. Leroueil-Le Verger, M., L. Fluckiger, Y.-I. Kim, M. Hoffman, and P. Maincent, *Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998. **46**(2): p. 137-143.
121. Paillard, A., *Franchissement de barrières biologiques, mécanisme d'action et devenir subcellulaire de nanovecteurs d'agents anticancéreux pour la thérapie des gliomes*. 2009, Thèse de doctorat de l'Université d'Angers, France.
122. Salvo, P., R. Verplancke, F. Bossuyt, D. Latta, B. Vandecasteele, C. Liu, and J. Vanfleteren, *Adhesive bonding by SU-8 transfer for assembling microfluidic devices*. Microfluidics and Nanofluidics, 2012. **13**(6): p. 987-991.
123. Gavory, C., A. Durand, J.-L. Six, C. Nouvel, E. Marie, and M. Leonard, *Polysaccharide-covered nanoparticles prepared by nanoprecipitation*. Carbohydrate Polymers. **84**(1): p. 133-140.
124. Schubert, S., J.T. Delaney, Jr., and U.S. Schubert, *Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid)*. Soft Matter, 2011. **7**(5): p. 1581-1588.
125. de Oliveira, A.M., E. Jäger, A. Jäger, P. Stepánek, and F.C. Giacomelli, *Physicochemical aspects behind the size of biodegradable polymeric nanoparticles: A step forward*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2013. **436**(0): p. 1092-1102.
126. Galindo-Rodriguez, S., E. Allemann, H. Fessi, and E. Doelker, *Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods*. Pharmaceutical Research, 2004. **21**(8): p. 1428-1439.
127. Lepeltier, E., C. Bourgaux, and P. Couvreur, *Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2014. **71**(0): p. 86-97.
128. Rao, J.P. and K.E. Geckeler, *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(7): p. 887-913.
129. Bodmeier, R. and J. McGinity, *The Preparation and Evaluation of Drug-Containing Poly(dl-lactide) Microspheres Formed by the Solvent Evaporation Method*. Pharmaceutical Research, 1987. **4**(6): p. 465-471.
130. Bodmeier, R. and J.W. McGinity, *Poly(lactic acid) microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by the solvent evaporation technique. I. Methods and morphology*. Journal of Microencapsul, 1987. **4**(4): p. 279-288.
131. Bodmeier, R. and J.W. McGinity, *Poly(lactic acid) microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by the solvent evaporation technique. II. Some process parameters influencing the preparation and properties of microspheres*. Journal of microencapsulation, 1987. **4**(4): p. 289-297.
132. Herrmann, J. and R. Bodmeier, *Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998. **45**(1): p. 75-82.
133. O'Donnell, P.B. and J.W. McGinity, *Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **28**(1): p. 25-42.
134. Giri, T.K., C. Choudhary, Ajazuddin, A. Alexander, H. Badwaik, and D.K. Tripathi, *Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery*. Saudi Pharmaceutical Journal.

135. Panyam, J., M.M. Dali, S.K. Sahoo, W. Ma, S.S. Chakravarthi, G.L. Amidon, R.J. Levy, and V. Labhassetwar, *Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles*. Journal of Controlled Release, 2003. **92**(1-2): p. 173-187.
136. Roustel, S., *Homogénéisation à haute pression des dispersions alimentaires liquides*. Techniques de l'ingénieur Opérations unitaires du génie industriel alimentaire, 2010. ref. article : f2710.
137. Bodmeier, R. and J.W. McGinity, *Solvent selection in the preparation of poly(DL-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method*. International Journal of Pharmaceutics, 1988. **43**(1-2): p. 179-186.
138. Sansdrap, P. and A.J. Moës, *Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres*. International Journal of Pharmaceutics, 1993. **98**(1-3): p. 157-164.
139. Lemoine, D. and V. Preat, *Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins*. Journal of Controlled Release, 1998. **54**(1): p. 15-27.
140. Mainardes, R.M. and R.C. Evangelista, *PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **290**(1-2): p. 137-144.
141. Fu, X., Q. Ping, and Y. Gao, *Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour in vitro of huperzine A-PLGA microspheres*. Journal of microencapsulation, 2005. **22**(7): p. 705-714.
142. Zambaux, M.F., F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude, and C. Vigneron, *Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method*. Journal of Controlled Release, 1998. **50**(1-3): p. 31-40.
143. Chognot, D., *Nanosphères de PLA/POE : nouveau procédé d'élaboration, caractérisation et encapsulation de la protéine C*. 2003.
144. Vauthier, C. and K. Bouchemal, *Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles*. Pharmaceutical Research, 2009. **26**(5): p. 1025-1058.
145. Iqbal, M., J.-P. Valour, H. Fessi, and A. Elaissari, *Preparation of biodegradable PCL particles via double emulsion evaporation method using ultrasound technique*. Colloid and Polymer Science, 2015. **293**(3): p. 861-873.
146. Bilati, U., E. Allemann, and E. Doelker, *Sonication parameters for the preparation of biodegradable nanocapsules of controlled size by the double emulsion method*. Pharmaceutical Development and Technology, 2003. **8**(1): p. 1-9.
147. Ibraheem, D., M. Iqbal, G. Agusti, H. Fessi, and A. Elaissari, *Effects of process parameters on the colloidal properties of polycaprolactone microparticles prepared by double emulsion like process*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. **445**(0): p. 79-91.
148. Rajesh H. Parikh, J.R.P., 1 Rajesh R. Dubey, Heena N. Soni, and Kishor N. Kapadia, *Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) microspheres containing 5-fluorouracil: Optimization of process parameters*. AAPS PharmSciTech, 2003. **4**(2): p. 14-21.
149. Li, W.I., K.W. Anderson, R.C. Mehta, and P.P. DeLuca, *Prediction of solvent removal profile and effect on properties for peptide-loaded PLGA microspheres prepared by solvent extraction/evaporation method*. Journal of Controlled Release, 1995. **37**(3): p. 199-214.
150. McGinity, J.W. and M. Iwata, *Preparation and uses of multi-phase microspheres*. . 1994: United states.
151. Leroux, J.C., E. Allemann, E. Doelker, and R. Gurny, *New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1995. **41**(1): p. 14-18.

152. Niwa, T., H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou, and Y. Kawashima, *Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior*. *Journal of Controlled Release*, 1993. **25**(1-2): p. 89-98.
153. Mora-Huertas, C.E., H. Fessi, and A. Elaissari, *Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods Critical comparison*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011. **163**(2): p. 90-122.
154. Kwon, H.Y., J.Y. Lee, S.W. Choi, Y.S. Jang, and J.H. Kim, *Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method*. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2001. **182**(1-3): p. 123-130.
155. Nasir, A., A. Kausar, and A. Younus, *A Review on Preparation, Properties and Applications of Polymeric Nanoparticle-Based Materials*. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 2015. **54**(4): p. 325-341.
156. Imbrogno, A., E. Piacentini, E. Drioli, and L. Giorno, *Preparation of uniform poly-caprolactone Microparticles by membrane emulsification/solvent diffusion process*. *Journal of Membrane Science*, 2014. **467**: p. 262-268.
157. Miladi, K., S. Sfar, H. Fessi, and A. Elaissari, *Drug carriers in osteoporosis: Preparation, drug encapsulation and applications*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013. **445**(1-2): p. 181-195.
158. Bindschaedler, C., R. Gurny, and E. Doelker, *Process for preparing a powder of water-insoluble polymer which can be redispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization thereof*. 1990, Google Patents.
159. Allemann, E., R. Gurny, and E. Doelker, *Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992. **87**(1-3): p. 247-253.
160. Allemann, E., R. Gurny, and E. Doelker, *Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process - influence of process parameters on particle-size*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992. **87**(1-3): p. 247-253.
161. De Jaeghere, F., E. Allemann, J.C. Leroux, W. Stevels, J. Feijen, E. Doelker, and R. Gurny, *Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: Influence on physical stability and in vitro cell uptake*. *Pharmaceutical Research*, 1999. **16**(6): p. 859-866.
162. Konan, Y.N., R. Cerny, J. Favet, M. Berton, R. Gurny, and E. Allemann, *Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxylphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003. **55**(1): p. 115-124.
163. Perugini, P., S. Simeoni, S. Scalia, I. Genta, T. Modena, B. Conti, and F. Pavanetto, *Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002. **246**(1-2): p. 37-45.
164. Zweers, M.L.T., G.H.M. Engbers, D.W. Grijpma, and J. Feijen, *Release of anti-restenosis drugs from poly(ethylene oxide)-poly (DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles*. *Journal of Controlled Release*, 2006. **114**(3): p. 317-324.
165. Nguyen, C.A., E. Allemann, G. Schwach, E. Doelker, and R. Gurny, *Synthesis of a novel fluorescent poly(D,L-lactide) end-capped with 1-pyrenebutanol used for the preparation of nanoparticles*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003. **20**(2): p. 217-222.
166. Zweers, M.L.T., G.H.M. Engbers, D.W. Grijpma, and J. Feijen, *In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide)*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **100**(3): p. 347-356.

167. Galindo-Rodriguez, S.A., F. Puel, S. Briancon, E. Allemann, E. Doelker, and H. Fessi, *Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **25**(4-5): p. 357-367.
168. Zhang, Z., D.W. Grijpma, and J. Feijen, *Poly(trimethylene carbonate) and monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(trimethylene carbonate) nanoparticles for the controlled release of dexamethasone*. Journal of Controlled Release, 2006. **111**(3): p. 263-270.
169. Zweers, M.L.T., D.W. Grijpma, G.H.M. Engbers, and J. Feijen, *The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size*. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 2003. **66B**(2): p. 559-566.
170. Fan, Y.F., Y.N. Wang, Y.G. Fan, and J.B. Ma, *Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **324**(2): p. 158-167.
171. Thomasin, C., H.P. Merkle, and B. Gander, *Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 2. Parameters determining microsphere formation*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998. **87**(3): p. 269-275.
172. Nesterenko, A., I. Alric, F.o. Silvestre, and V. Durrieu, *Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness*. Industrial Crops and Products. **42**(0): p. 469-479.
173. Nihant, N., C. Grandfils, R. Jerome, and P. Teyssie, *Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-co-glycolide) .4. Effect of the processing parameters on coacervation and encapsulation*. Journal of Controlled Release, 1995. **35**(2-3): p. 117-125.
174. Jeong, Y.-I., C.-S. Cho, S.-H. Kim, K.-S. Ko, S.-I. Kim, Y.-H. Shim, and J.-W. Nah, *Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles without surfactant*. Journal of Applied Polymer Science, 2001. **80**(12): p. 2228-2236.
175. Kostag, M., S. Köhler, T. Liebert, and T. Heinze, *Pure Cellulose Nanoparticles from Trimethylsilyl Cellulose*. Macromolecular Symposia, 2010. **294**(2): p. 96-106.
176. Fessi, H., F. Puisieux, J.P. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita, *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. International Journal of Pharmaceutics, 1989. **55**(1): p. R1-R4.
177. Lee, J., E.C. Cho, and K. Cho, *Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles*. Journal of Controlled Release, 2004. **94**(2-3): p. 323-335.
178. Akagi, T., T. Kaneko, T. Kida, and M. Akashi, *Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly( $\gamma$ -glutamic acid) with l-phenylalanine as a protein carrier*. Journal of Controlled Release, 2005. **108**(2-3): p. 226-236.
179. Jung, S.-W., Y.-I. Jeong, and S.-H. Kim, *Characterization of hydrophobized pullulan with various hydrophobicities*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **254**(2): p. 109-121.
180. Ryu, J.-G., Y.-I. Jeong, I.-S. Kim, J.-H. Lee, J.-W. Nah, and S.-H. Kim, *Clonazepam release from core-shell type nanoparticles of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(ethylene glycol)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) triblock copolymers*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **200**(2): p. 231-242.
181. Gander, B., P. Johansen, H. NamTran, and H.P. Merkle, *Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-lactide) by spray drying*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **129**(1-2): p. 51-61.
182. Nandiyanto, A.B.D. and K. Okuyama, *Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges*. Advanced Powder Technology, 2011. **22**(1): p. 1-19.

183. Palmieri, G.F., G. Bonacucina, P. Di Martino, and S. Martelli, *Spray-drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: Advantages and limits. I. Water-soluble drugs*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2001. **27**(3): p. 195-204.
184. Rizzi, K., R.J. Green, M. Donaldson, and A.C. Williams, *Production of pH-Responsive Microparticles by Spray Drying: Investigation of Experimental Parameter Effects on Morphological and Release Properties*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **100**(2): p. 566-579.
185. Meeus, J., M. Lenaerts, D.J. Scurr, K. Amsoms, M.C. Davies, C.J. Roberts, and G. Van Den Mooter, *The Influence of Spray-Drying Parameters on Phase Behavior, Drug Distribution, and In Vitro Release of Injectable Microspheres for Sustained Release*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **104**(4): p. 1451-1460.
186. Paudel, A., Z.A. Worku, J. Meeus, S. Guns, and G. Van den Mooter, *Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. **453**(1): p. 253-284.
187. Beckman, E.J., *Supercritical and near-critical CO<sub>2</sub> in green chemical synthesis and processing*. The Journal of Supercritical Fluids, 2004. **28**(2-3): p. 121-191.
188. Cooper, A.I., *Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide*. Journal of Materials Chemistry, 2000. **10**(2): p. 207-234.
189. Domingo, C. and J. Saurina, *An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: Towards green and sustainable pharmaceuticals: A review*. Analytica Chimica Acta, 2012. **744**: p. 8-22.
190. Tom, J.W. and P.G. Debenedetti, *formation of bioerodible polymeric microspheres and microparticles by rapid expansion of supercritical solutions*. Biotechnology Progress, 1991. **7**(5): p. 403-411.
191. Common, A., *Développement d'un procédé propre assisté par CO<sub>2</sub> supercritique pour la production de particules de polyamide: caractérisation et faisabilité*. 2011, Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse, France.
192. Mawson, S., K.P. Johnston, J.R. Combes, and J.M. Desimone, *Formation of poly(1,1,2,2-tetrahydroperfluorodecyl acrylate) submicron fibers and particles from supercritical carbon-dioxide solutions*. Macromolecules, 1995. **28**(9): p. 3182-3191.
193. Nalawade, S.P., *Polymer melt micronisation using supercritical carbon dioxide as processing solvent*. 2007, Thèse de doctorat de l'Université de Groningen, Pays-bas.
194. Gref, R., Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetsky, V. Torchilin, and R. Langer, *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres*. Science, 1994. **263**(5153): p. 1600-1603.
195. Bazile, D., C. Prudhomme, M.T. Bassoullet, M. Marlard, G. Spenlehauer, and M. Veillard, *Stealth me.peg-pla nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1995. **84**(4): p. 493-498.
196. Rabanel, J.-M., J. Faivre, S.F. Tehrani, A. Lalloz, P. Hildgen, and X. Banquy, *Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles*. Acs Applied Materials & Interfaces, 2015. **7**(19): p. 10374-10385.
197. Muranaka, M., K. Hirota, and T. Ono, *PEG-PLA nanoparticles prepared by emulsion solvent diffusion using oil-soluble and water-soluble PEG-PLA*. Materials Letters, 2010. **64**(8): p. 969-971.
198. Trimaille, T., C. Pichot, A. Elaissari, H. Fessi, S. Briancon, and T. Delair, *Poly(D,L-lactic acid) nanoparticle preparation and colloidal characterization*. Colloid and Polymer Science, 2003. **281**(12): p. 1184-1190.

199. Wu, M., L.M. Forero Ramirez, A. Rodriguez Lozano, D. Quémener, J. Babin, A. Durand, E. Marie, J.-L. Six, and C. Nouvel, *First multi-reactive dextran-based inisurf for atom transfer radical polymerization in miniemulsion*. Carbohydrate Polymers, 2015. **130**: p. 141-148.
200. Ferji, K., *Synthèse contrôlée et auto-organisation de glycopolymères amphiphiles à greffons polymères mésogènes, destinés à la vectorisation de principes actifs*. 2013, Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine
201. Laville, M., *Nanoparticules polymères de deuxième et troisième générations pour des applications thérapeutiques anti-cancer et anti-HIV*. 2013, Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine.
202. Rouzes, C., *Nanosphères à cœur de poly(acide lactique) et couronne de dextrane : élaboration, propriétés et applications biomédicales*. 2001, Thèse de doctorat de l'Institut Nationale Polytechnique de Lorraine.
203. Khalikova, E., P. Susi, and T. Korpela, *Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005. **69**(2): p. 306-325.
204. Monsan, P., S. Bozonnet, C. Albenne, G. Joucla, R.-M. Willemot, and M. Remaud-Siméon, *Homopolysaccharides from lactic acid bacteria*. International Dairy Journal, 2001. **11**(9): p. 675-685.
205. Covis, R., J. Desbrieres, E. Marie, and A. Durand, *Dilational rheology of air/water interfaces covered by nonionic amphiphilic polysaccharides. Correlation with stability of oil-in-water emulsions*. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. **441**: p. 312-318.
206. Covis, R., *Synthèse de polysaccharides amphiphiles à partir de dextrane et application à la stabilisation d'émulsions directes et inverses*. 2011.
207. Rouzes, C., R. Gref, M. Leonard, A.D. Delgado, and E. Dellacherie, *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): p. 557-565.
208. Ma, W.-j., X.-b. Yuan, C.-S. Kang, T. Su, X.-y. Yuan, P.-y. Pu, and J. Sheng, *Evaluation of blood circulation of polysaccharide surface-decorated PLA nanoparticles*. Carbohydrate Polymers, 2008. **72**(1): p. 75-81.
209. Kaewprapan, K., P. Inprakhon, E. Marie, and A. Durand, *Enzymatically degradable nanoparticles of dextran esters as potential drug delivery systems*. Carbohydrate Polymers, 2012. **88**(3): p. 875-881.
210. Rouzes, C., M. Leonard, A. Durand, and E. Dellacherie, *Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2003. **32**(2): p. 125-135.
211. Gref, R., J. Rodrigues, and P. Couvreur, *Polysaccharides grafted with polyesters: Novel amphiphilic copolymers for biomedical applications*. Macromolecules, 2002. **35**(27): p. 9861-9867.
212. Nouvel, C., J. Raynaud, E. Marie, E. Dellacherie, J.L. Six, and A. Durand, *Biodegradable nanoparticles made from polylactide-grafted dextran copolymers*. Journal of Colloid and Interface Science, 2009. **330**(2): p. 337-343.
213. Chen, A.-Z., Z. Zhao, S.-B. Wang, Y. Li, C. Zhao, and Y.-G. Liu, *A continuous RESS process to prepare PLA-PEG-PLA microparticles*. The Journal of Supercritical Fluids, 2011. **59**: p. 92-97.
214. Della Porta, G., R. Campardelli, and E. Reverchon, *Monodisperse biopolymer nanoparticles by Continuous Supercritical Emulsion Extraction*. The Journal of Supercritical Fluids, 2013. **76**: p. 67-73.
215. Sóti, P.L., Z.K. Nagy, G. Serneels, B. Vajna, A. Farkas, F. Van der Gucht, P. Fekete, T. Vigh, I. Wagner, A. Balogh, H. Pataki, G. Mező, and G. Marosi, *Preparation and comparison of spray dried and electrospun bioresorbable drug delivery systems*. European Polymer Journal, 2015. **68**: p. 671-679.

216. Watanabe, T., T. Ono, and Y. Kimura, *Continuous fabrication of monodisperse polylactide microspheres by droplet-to-particle technology using microfluidic emulsification and emulsion-solvent diffusion*. *Soft Matter*, 2011. **7**(21): p. 9894-9897.
217. Perez, A., R. Hernández, D. Velasco, D. Voicu, and C. Mijangos, *Poly (lactic-co-glycolic acid) particles prepared by microfluidics and conventional methods. Modulated particle size and rheology*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015. **441**: p. 90-97.
218. Khan, I.U., C.A. Serra, N. Anton, and T. Vandamme, *Microfluidics: A focus on improved cancer targeted drug delivery systems*. *Journal of Controlled Release*. **172**(3): p. 1065-1074.
219. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. *Nature*, 2006. **442**(7101): p. 368-373.
220. Kelly, B.T., J.-C. Baret, V. Taly, and A.D. Griffiths, *Miniaturizing chemistry and biology in microdroplets*. *Chemical Communications*, 2007(18): p. 1773-1788.
221. Song, H., D.L. Chen, and R.F. Ismagilov, *Reactions in droplets in microfluidic channels*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006. **45**(44): p. 7336-7356.
222. Huebner, A., S. Sharma, M. Srisa-Art, F. Hollfelder, J.B. Edel, and A.J. deMello, *Microdroplets: A sea of applications? Lab on a Chip*, 2008. **8**(8): p. 1244-1254.
223. Watts, P. and S.J. Haswell, *The application of micro reactors for organic synthesis*. *Chemical Society Reviews*, 2005. **34**(3): p. 235-246.
224. Golay, M.J.E., *Performance index for gas chromatographic columns*. *Nature*, 1957. **180**(4583): p. 435-436.
225. Terry, S.C., J.H. Jerman, and J.B. Angell, *Gas-chromatographic air analyzer fabricated on a silicon-wafer*. *Ieee Transactions on Electron Devices*, 1979. **26**(12): p. 1880-1886.
226. Atencia, J. and D.J. Beebe, *Controlled microfluidic interfaces*. *Nature*, 2005. **437**(7059): p. 648-655.
227. Martin-Banderas, L., M. Flores-Mosquera, P. Riesco-Chueca, A. Rodriguez-Gil, A. Cebolla, S. Chavez, and A.M. Ganán-Calvo, *Flow focusing: A versatile technology to produce size-controlled and specific-morphology microparticles*. *Small*, 2005. **1**(7): p. 688-692.
228. Kim, J.H., T.Y. Jeon, T.M. Choi, T.S. Shim, S.-H. Kim, and S.-M. Yang, *Droplet Microfluidics for Producing Functional Microparticles*. *Langmuir*. **30**(6): p. 1473-1488.
229. Pessi, J., H.A. Santos, I. Miroshnyk, J. Yliruusi, D.A. Weitz, and S. Mirza, *Microfluidics-assisted engineering of polymeric microcapsules with high encapsulation efficiency for protein drug delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014. **472**(1-2): p. 82-87.
230. Chen, P.W., R.M. Erb, and A.R. Studart, *Designer Polymer-Based Microcapsules Made Using Microfluidics*. *Langmuir*, 2012. **28**(1): p. 144-152.
231. Serra, C.A., B. Cortese, I.U. Khan, N. Anton, M.H.J.M. de Croon, V. Hessel, T. Ono, and T. Vandamme, *Coupling Microreaction Technologies, Polymer Chemistry, and Processing to Produce Polymeric Micro and Nanoparticles with Controlled Size, Morphology, and Composition*. *Macromolecular Reaction Engineering*, 2013. **7**(9): p. 414-439.
232. Khan, I.U., C.A. Serra, N. Anton, and T. Vandamme, *Continuous-flow encapsulation of ketoprofen in copolymer microbeads via co-axial microfluidic device: Influence of operating and material parameters on drug carrier properties*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013. **441**(1-2): p. 809-817.
233. Tumarkin, E. and E. Kumacheva, *Microfluidic generation of microgels from synthetic and natural polymers*. *Chemical Society Reviews*, 2009. **38**(8): p. 2161-2168.
234. Akbari, S. and T. Pirbodaghi, *Microfluidic encapsulation of cells in alginate particles via an improved internal gelation approach*. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2014. **16**(4): p. 773-777.

235. Young, C., K. Rozario, C. Serra, L. Poole-Warren, and P. Martens, *Poly(vinyl alcohol)-heparin biosynthetic microspheres produced by microfluidics and ultraviolet photopolymerisation*. *Biomicrofluidics*, 2013. **7**(4).
236. Duncanson, W.J., T. Lin, A.R. Abate, S. Seiffert, R.K. Shah, and D.A. Weitz, *Microfluidic synthesis of advanced microparticles for encapsulation and controlled release*. *Lab on a Chip*, 2012. **12**(12): p. 2135-2145.
237. Shim, T.S., S.-H. Kim, and S.-M. Yang, *Elaborate Design Strategies Toward Novel Microcarriers for Controlled Encapsulation and Release*. *Particle & Particle Systems Characterization*, 2013. **30**(1): p. 9-45.
238. Tabeling, P., *A brief introduction to slippage, droplets and mixing in microfluidic systems*. *Lab on a Chip*, 2009. **9**(17): p. 2428-2436.
239. Veser, G., *Experimental and theoretical investigation of H-2 oxidation in a high-temperature catalytic microreactor*. *Chemical Engineering Science*, 2001. **56**(4): p. 1265-1273.
240. Janasek, D., J. Franzke, and A. Manz, *Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems*. *Nature*, 2006. **442**(7101): p. 374-380.
241. Hitt, D.L. and N. Macken, *A simplified model for determining interfacial position in convergent microchannel flows*. *Journal of Fluids Engineering-Transactions of the Asme*, 2004. **126**(5): p. 758-767.
242. Kamholz, A.E., B.H. Weigl, B.A. Finlayson, and P. Yager, *Quantitative analysis of molecular interaction in a microfluidic channel: The T-sensor*. *Analytical Chemistry*, 1999. **71**(23): p. 5340-5347.
243. Larsen, M.U. and N.C. Shapley, *Stream spreading in multilayer microfluidic flows of suspensions*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(5): p. 1947-1953.
244. Zhao, C.-X., *Multiphase flow microfluidics for the production of single or multiple emulsions for drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **65**(11-12): p. 1420-1446.
245. Christopher, G., N. Noharuddin, J. Taylor, and S. Anna, *Experimental observations of the squeezing-to-dripping transition in T-shaped microfluidic junctions*. *Physical Review E*, 2008. **78**(3): p. 036317.
246. Thorsen, T., R.W. Roberts, F.H. Arnold, and S.R. Quake, *Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device*. *Physical Review Letters*, 2001. **86**(18): p. 4163-4166.
247. Bauer, W.-A.C., M. Fischlechner, C. Abell, and W.T.S. Huck, *Hydrophilic PDMS microchannels for high-throughput formation of oil-in-water microdroplets and water-in-oil-in-water double emulsions*. *Lab on a Chip*. **10**(14): p. 1814-1819.
248. Nie, Z., M. Seo, S. Xu, P.C. Lewis, M. Mok, E. Kumacheva, G.M. Whitesides, P. Garstecki, and H.A. Stone, *Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: effect of the viscosities of the liquids*. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2008. **5**(5): p. 585-594.
249. Roberts, C.C., R.R. Rao, M. Loewenberg, C.F. Brooks, P. Galambos, A.M. Grillet, and M.B. Nemer, *Comparison of monodisperse droplet generation in flow-focusing devices with hydrophilic and hydrophobic surfaces*. *Lab on a Chip*. **12**(8): p. 1540-1547.
250. Nisisako, T., T. Torii, and T. Higuchi, *Droplet formation in a microchannel network*. *Lab on a Chip*, 2002. **2**(1): p. 24-26.
251. Garstecki, P., M.J. Fuerstman, H.A. Stone, and G.M. Whitesides, *Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction - scaling and mechanism of break-up*. *Lab on a Chip*, 2006. **6**(3): p. 437-446.
252. Dreyfus, R., P. Tabeling, and H. Willaime, *Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels*. *Physical Review Letters*, 2003. **90**(14): p. 144505-1 - 144505-4.

253. Anna, S.L., N. Bontoux, and H.A. Stone, *Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels*. Applied Physics Letters, 2003. **82**(3): p. 364-366.
254. Takeuchi, S., P. Garstecki, D.B. Weibel, and G.M. Whitesides, *An axisymmetric flow-focusing microfluidic device*. Advanced Materials, 2005. **17**(8): p. 1067- 1072.
255. Tan, Y.C., J.S. Fisher, A.I. Lee, V. Cristini, and A.P. Lee, *Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting*. Lab on a Chip, 2004. **4**(4): p. 292-298.
256. Zhou, C., P. Yue, and J.J. Feng, *Formation of simple and compound drops in microfluidic devices*. Physics of Fluids, 2006. **18**(9).
257. Keohane, K., D. Brennan, P. Galvin, and B.T. Griffin, *Silicon microfluidic flow focusing devices for the production of size-controlled PLGA based drug loaded microparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. **467**(1–2): p. 60-69.
258. Teh, S.-Y., R. Lin, L.-H. Hung, and A.P. Lee, *Droplet microfluidics*. Lab on a Chip, 2008. **8**(2): p. 198-220.
259. Kobayashi, I., T. Takano, R. Maeda, Y. Wada, K. Uemura, and M. Nakajima, *Straight-through microchannel devices for generating monodisperse emulsion droplets several microns in size*. Microfluidics and Nanofluidics, 2008. **4**(3): p. 167-177.
260. Liu, H.J., M. Nakajima, and T. Kimura, *Production of monodispersed water-in-oil emulsions using polymer microchannels*. Journal of the American Oil Chemists Society, 2004. **81**(7): p. 705-711.
261. Ginn, B.T. and O. Steinbock, *Polymer surface modification using microwave-oven-generated plasma*. Langmuir, 2003. **19**(19): p. 8117-8118.
262. Sia, S.K. and G.M. Whitesides, *Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies*. Electrophoresis, 2003. **24**(21): p. 3563-3576.
263. Kim, H. and M.W. Urban, *Effect of discharge gases on microwave plasma reactions of imidazole on poly(dimethylsiloxane) surfaces: Quantitative ATR FT-IR spectroscopic analysis*. Langmuir, 1999. **15**(10): p. 3499-3505.
264. Maji, D., S.K. Lahiri, and S. Das, *Study of hydrophilicity and stability of chemically modified PDMS surface using piranha and KOH solution*. Surface and Interface Analysis. **44**(1): p. 62-69.
265. Arafat, A., M. Giesbers, M. Rosso, E.J.R. Sudhoelter, K. Schroen, R.G. White, L. Yang, M.R. Linford, and H. Zuilhof, *Covalent biofunctionalization of silicon nitride surfaces*. Langmuir, 2007. **23**(11): p. 6233-6244.
266. Rosso, M., M. Giesbers, A. Arafat, K. Schroen, and H. Zuilhof, *Covalently Attached Organic Monolayers on SiC and SixN4 Surfaces: Formation Using UV Light at Room Temperature*. Langmuir, 2009. **25**(4): p. 2172-2180.
267. Jokinen, V., P. Suvanto, and S. Franssila, *Oxygen and nitrogen plasma hydrophilization and hydrophobic recovery of polymers*. Biomicrofluidics, 2012. **6**(1): p. 016501-1 -016501-10.
268. Vickers, J.A., M.M. Caulum, and C.S. Henry, *Generation of hydrophilic poly(dimethylsiloxane) for high-performance microchip electrophoresis*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(21): p. 7446-7452.
269. Kawakatsu, T., G. Tragardh, C. Tragardh, M. Nakajima, N. Oda, and T. Yonemoto, *The effect of the hydrophobicity of microchannels and components in water and oil phases on droplet formation in microchannel water-in-oil emulsification*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **179**(1): p. 29-37.

270. Maan, A.A., K. Schroën, and R. Boom, *Spontaneous droplet formation techniques for monodisperse emulsions preparation – Perspectives for food applications*. Journal of Food Engineering, 2011. **107**(3–4): p. 334-346.
271. Yobas, L., S. Martens, W.-L. Ong, and N. Ranganathan, *High-performance flow-focusing geometry for spontaneous generation of monodispersed droplets*. Lab on a Chip, 2006. **6**(8): p. 1073-1079.
272. Orlu-Gul, M., A.A. Topcu, T. Shams, S. Mahalingam, and M. Edirisinghe, *Novel encapsulation systems and processes for overcoming the challenges of polypharmacy*. Current Opinion in Pharmacology, 2014. **18**: p. 28-34.
273. Nunes, J.K., S.S.H. Tsai, J. Wan, and H.A. Stone, *Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fibre synthesis*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2013. **46**(11).
274. Christopher, G.F. and S.L. Anna, *Microfluidic methods for generating continuous droplet streams*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2007. **40**(19): p. R319-R336.
275. Steinbacher, J.L., R.W.Y. Moy, K.E. Price, M.A. Cummings, C. Roychowdhury, J.J. Buffy, W.L. Olbricht, M. Haaf, and D.T. McQuade, *Rapid self-assembly of core-shell organosilicon microcapsules within a microfluidic device*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(29): p. 9442-9447.
276. Cho, S.-H., J.-B. Jun, J.-H. Ryu, and K.-D. Suh, *Preparation of monodisperse poly(divinylbenzene) macrobeads via a drop breaking and polymerization method*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2005. **254**(1–3): p. 1-7.
277. Dendukuri, D., K. Tsoi, T.A. Hatton, and P.S. Doyle, *Controlled Synthesis of Nonspherical Microparticles Using Microfluidics*. Langmuir, 2005. **21**(6): p. 2113-2116.
278. Nisisako, T., T. Torii, and T. Higuchi, *Novel microreactors for functional polymer beads*. Chemical Engineering Journal, 2004. **101**(1–3): p. 23-29.
279. Yeh, C.-H., Q. Zhao, S.-J. Lee, and Y.-C. Lin, *Using a T-junction microfluidic chip for monodisperse calcium alginate microparticles and encapsulation of nanoparticles*. Sensors and Actuators A: Physical, 2009. **151**(2): p. 231-236.
280. Kumachev, A., J. Greener, E. Tumarkin, E. Eiser, P.W. Zandstra, and E. Kumacheva, *High-throughput generation of hydrogel microbeads with varying elasticity for cell encapsulation*. Biomaterials, 2011. **32**(6): p. 1477-1483.
281. Choi, S.-W., Y. Zhang, and Y. Xia, *Fabrication of Microbeads with a Controllable Hollow Interior and Porous Wall Using a Capillary Fluidic Device*. Advanced Functional Materials, 2009. **19**(18): p. 2943-2949.
282. Dashtimoghadam, E., H. Mirzadeh, F.A. Taromi, and B. Nystrom, *Microfluidic self-assembly of polymeric nanoparticles with tunable compactness for controlled drug delivery*. Polymer, 2013. **54**(18): p. 4972-4979.
283. Shojaei-Zadeh, S., J.F. Morris, A. Couzis, and C. Maldarelli, *Highly crosslinked poly(dimethylsiloxane) microbeads with uniformly dispersed quantum dot nanocrystals*. Journal of Colloid and Interface Science, 2011. **363**(1): p. 25-33.
284. De Geest, B.G., J.P. Urbanski, T. Thorsen, J. Demeester, and S.C. De Smedt, *Synthesis of monodisperse biodegradable microgels in microfluidic devices*. Langmuir, 2005. **21**(23): p. 10275-10279.
285. Xu, S.Q., Z.H. Nie, M. Seo, P. Lewis, E. Kumacheva, H.A. Stone, P. Garstecki, D.B. Weibel, I. Gitlin, and G.M. Whitesides, *Generation of monodisperse particles by using microfluidics: Control over size, shape, and composition*. Angewandte Chemie-International Edition, 2005. **44**(5): p. 724-728.
286. Rossow, T., J.A. Heyman, A.J. Ehrlicher, A. Langhoff, D.A. Weitz, R. Haag, and S. Seiffert, *Controlled Synthesis of Cell-Laden Microgels by Radical-Free Gelation in Droplet Microfluidics*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(10): p. 4983-4989.

287. Huang, K.S., T.H. Lai, and Y.C. Lin, *Manipulating the generation of Ca-alginate microspheres using microfluidic channels as a carrier of gold nanoparticles*. Lab on a Chip, 2006. **6**(7): p. 954-957.
288. Yang, C.-H., K.-S. Huang, and J.-Y. Chang, *Manufacturing monodisperse chitosan microparticles containing ampicillin using a microchannel chip*. Biomedical Microdevices, 2007. **9**(2): p. 253-259.
289. Lin, Y.-S., C.-H. Yang, K. Lu, K.-S. Huang, and Y.-Z. Zheng, *Synthesis of agar microparticles using temperature-controlled microfluidic devices for Cordyceps militaris cultivation*. Electrophoresis, 2011. **32**(22): p. 3157-3163.
290. Abate, A.R., M. Kutsovsky, S. Seiffert, M. Windbergs, L.F.V. Pinto, A. Rotem, A.S. Utada, and D.A. Weitz, *Synthesis of Monodisperse Microparticles from Non-Newtonian Polymer Solutions with Microfluidic Devices*. Advanced Materials, 2011. **23**(15): p. 1757-+.
291. Lin, Y.-S., C.-H. Yang, C.-Y. Wang, F.-R. Chang, K.-S. Huang, and W.-C. Hsieh, *An Aluminum Microfluidic Chip Fabrication Using a Convenient Micromilling Process for Fluorescent Poly(DL-lactide-co-glycolide) Microparticle Generation*. Sensors, 2012. **12**(2): p. 1455-1467.
292. Kuehne, A.J.C. and D.A. Weitz, *Highly monodisperse conjugated polymer particles synthesized with drop-based microfluidics*. Chemical Communications, 2011. **47**(45): p. 12379-12381.
293. Fang, A., C. Gaillard, and J.-P. Douliez, *Template-Free Formation of Monodisperse Doughnut-Shaped Silica Microparticles by Droplet-Based Microfluidics*. Chemistry of Materials, 2011. **23**(21): p. 4660-4662.
294. Hung, L.-H., S.-Y. Teh, J. Jester, and A.P. Lee, *PLGA micro/nanosphere synthesis by droplet microfluidic solvent evaporation and extraction approaches*. Lab on a Chip, 2010. **10**(14): p. 1820-1825.
295. Valencia, P.M., P.A. Basto, L. Zhang, M. Rhee, R. Langer, O.C. Farokhzad, and R. Karnik, *Single-Step Assembly of Homogenous Lipid - Polymeric and Lipid - Quantum Dot Nanoparticles Enabled by Microfluidic Rapid Mixing*. Acs Nano, 2010. **4**(3): p. 1671-1679.
296. Kolishetti, N., S. Dhar, P.M. Valencia, L.Q. Lin, R. Karnik, S.J. Lippard, R. Langer, and O.C. Farokhzad, *Engineering of self-assembled nanoparticle platform for precisely controlled combination drug therapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(42): p. 17939-17944.
297. Xu, Q.B., M. Hashimoto, T.T. Dang, T. Hoare, D.S. Kohane, G.M. Whitesides, R. Langer, and D.G. Anderson, *Preparation of Monodisperse Biodegradable Polymer Microparticles Using a Microfluidic Flow-Focusing Device for Controlled Drug Delivery*. Small, 2009. **5**(13): p. 1575-1581.
298. He, T.X., Q.L. Liang, K. Zhang, X. Mu, T.T. Luo, Y.M. Wang, and G.A. Luo, *A modified microfluidic chip for fabrication of paclitaxel-loaded poly(l-lactic acid) microspheres*. Microfluidics and Nanofluidics, 2011. **10**(6): p. 1289-1298.
299. Seo, M., Z.H. Nie, S.Q. Xu, M. Mok, P.C. Lewis, R. Graham, and E. Kumacheva, *Continuous microfluidic reactors for polymer particles*. Langmuir, 2005. **21**(25): p. 11614-11622.
300. Othman, R., G.T. Vladisavljevic, and Z.K. Nagy, *Preparation of biodegradable polymeric nanoparticles for pharmaceutical applications using glass capillary microfluidics*. Chemical Engineering Science, 2015. **137**: p. 119-130.
301. Watanabe, T., Y. Kimura, and T. Ono, *Monodisperse polylactide microcapsules with a single aqueous core prepared via spontaneous emulsification and solvent diffusion*. RSC Advances. **4**(10): p. 4872-4877.
302. Feng, A. and J. Yuan, *Smart Nanocontainers: Progress on Novel Stimuli-Responsive Polymer Vesicles*. Macromolecular Rapid Communications, 2014. **35**(8): p. 767-779.
303. Venkatpurwar, V.P., S. Rhodes, K.A. Oien, M.A. Elliott, C.D. Tekwe, H.G. Jørgensen, and M.N.V.R. Kumar, *Drug- not carrier-dependent haematological and biochemical changes in a repeated dose study of*

- cyclosporine encapsulated polyester nano- and micro-particles: Size does not matter*. *Toxicology*, 2015. **330**: p. 9-18.
304. Stloukal, P., P. Kucharczyk, V. Sedlarik, P. Bazant, and M. Koutny, *Low Molecular Weight Poly(lactic acid) Microparticles for Controlled Release of the Herbicide Metazachlor: Preparation, Morphology, and Release Kinetics*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. **60**(16): p. 4111-4119.







# **Chapitre 2**

*Matériel et méthodes*



# Table des matières

<b>2.1. Réactifs et solvants</b> .....	<b>105</b>
<b>2.2. Méthodes et procédures expérimentales</b> .....	<b>106</b>
<b>2.2.1. Synthèse du dextrane modifié</b> .....	<b>106</b>
2.2.1.1. Procédure expérimentale.....	106
2.2.1.2. Détermination du taux de modification par RMN <sup>1</sup> H .....	107
<b>2.2.2. Caractérisation des SA (GO et GN)</b> .....	<b>109</b>
2.2.2.1. Détermination de la solubilité maximale des SA dans l'eau et dans les solutions de Dextrane modifié.....	109
2.2.2.2. Evaluation du pouvoir tensioactif des SA.....	111
2.2.2.3. Evaluation de la miscibilité des SA avec le PLA par MDSC.....	111
<b>2.2.3. Elaboration des particules</b> .....	<b>113</b>
2.2.3.1. Procédés discontinus : nanoprécipitation et émulsion-évaporation de solvant.....	113
2.2.3.2. Procédé continu : émulsion-diffusion en géométrie microfluidique .....	115
<b>2.2.4. Caractérisation des particules</b> .....	<b>120</b>
2.2.4.1. Granulométrie par diffraction laser.....	120
2.2.4.2. Microscopie électronique à transmission (MET).....	123
2.2.4.3. Microscopie optique.....	123
2.2.4.4. Encapsulation de SA dans les particules.....	124
<b>2.2.5. Propriétés de surface des particules recouvertes de Dextrane</b> .....	<b>125</b>
2.2.5.1. Détermination des taux de recouvrement en Dextrane des particules .....	125
2.2.5.2. Détermination de l'épaisseur de la couche de Dextrane à la surface des particules..	127
2.2.5.3. Stabilité colloïdale dans les solutions salines .....	130
<b>2.2.6. Suivi de la cinétique de libération</b> .....	<b>133</b>
2.2.6.1. Procédure par dialyse pour les nanoparticules : méthode indirecte.....	133
2.2.6.2. Procédure pour les microparticules.....	134
<b>2.2.7. Suivi de la dégradation du PLA par Chromatographie d'Exclusion Stérique</b> .....	<b>135</b>
2.2.7.1. Principe de la SEC.....	135
2.2.7.2. Procédures expérimentales .....	136
<b>2.2.8. Répétabilité des résultats et estimation des erreurs expérimentales</b> .....	<b>136</b>
2.2.8.1. Répétabilité.....	136
2.2.8.2. Incertitude sur le taux de recouvrement.....	137
2.2.8.3. Cinétiques de libération : barres d'erreurs.....	138
<b>2.3. Références bibliographiques</b> .....	<b>140</b>



## 2.1. Réactifs et solvants

Deux échantillons de PLA ont été utilisés au cours de cette thèse. Les particules élaborées à l'échelle du laboratoire ont été préparées à partir d'un échantillon de PLA amorphe fourni par Sigma-Aldrich alors qu'un échantillon de PLA semi-cristallin fourni par Natureplast a été utilisé pour préparer les particules à l'échelle pilote (Tableau 13).

**Tableau 13 : Comparaison entre les propriétés des échantillons de PLA fournis par Sigma Aldrich (utilisé à l'échelle du laboratoire) et Natureplast (utilisé à l'échelle pilote).**

Caractéristiques	PLA Sigma-Aldrich	PLA Natureplast
$\overline{M}_n$ (g/mol) <sup>a</sup>	4,8.10 <sup>4</sup>	4.10 <sup>4</sup>
$\mathcal{D}^b$	1,3	1,8
Ratio L/D	50/50	95/5
T <sub>g</sub> (°C) <sup>c</sup>	53	60
T <sub>f</sub> (°C) <sup>d</sup>	-	150
Prix	250 euros/5g	10 euros/kg

a et b : respectivement masse molaire moyenne en nombre et dispersité déterminées par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière multi-angle (SEC-MALS) dans le THF (voir paragraphe 2.2.7.1- chapitre 2).

c et d : respectivement température de transition vitreuse et température de fusion déterminées par calorimétrie différentielle à balayage modulée (MDSC) (voir paragraphe 2.2.2.3- chapitre 2)

Les réactifs nécessaires à la synthèse du dextrane modifié sont le dextrane natif T40 (produit par la bactérie *Leuconostoc Mesenteroïdes*), l'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAOH) ainsi que le 1,2 époxyoctane. Ils sont tous fournis par Sigma-Aldrich. Le solvant utilisé est le DMSO (grade HPLC, Sigma Aldrich). La procédure de synthèse du stabilisant macromoléculaire est décrite dans le paragraphe 2.2.1.1 de ce chapitre.

Le PVA hydrolysé (87%-89%) avec un  $\overline{M}_w = 13000- 23000$  g/mol fourni par Sigma-Aldrich été utilisé pour l'étude paramétrique d'élaboration des nanoparticules de PLA par nanoprécipitation.

Les SA étudiées sont l'acide gallique, le gallate d'éthyle, de propyle et de lauryle fournis par Sigma-Aldrich. Le gallate d'octyle est fourni par abcr. Le gallate de nonyle a été, quant à lui, synthétisé et fourni par le SRSMC (Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes

Moléculaires Complexes - UMR 7565), unité de recherche partenaire du projet BioCapTech.

L'eau déminéralisée (Milli-Q par le système de filtration Millipore) est utilisée pour l'élaboration des particules alors que l'eau désionisée est utilisée pour les dialyses. L'acétone, l'acétate d'éthyle (AcOEt), le dichlorométhane (DCM) et le tétrahydrofurane (THF) utilisés sont de qualité HPLC.

L'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), le chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) ainsi que le phénol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ ) font partie des réactifs utilisés et qui sont aussi fournis par Sigma-Aldrich.

## 2.2. Méthodes et procédures expérimentales

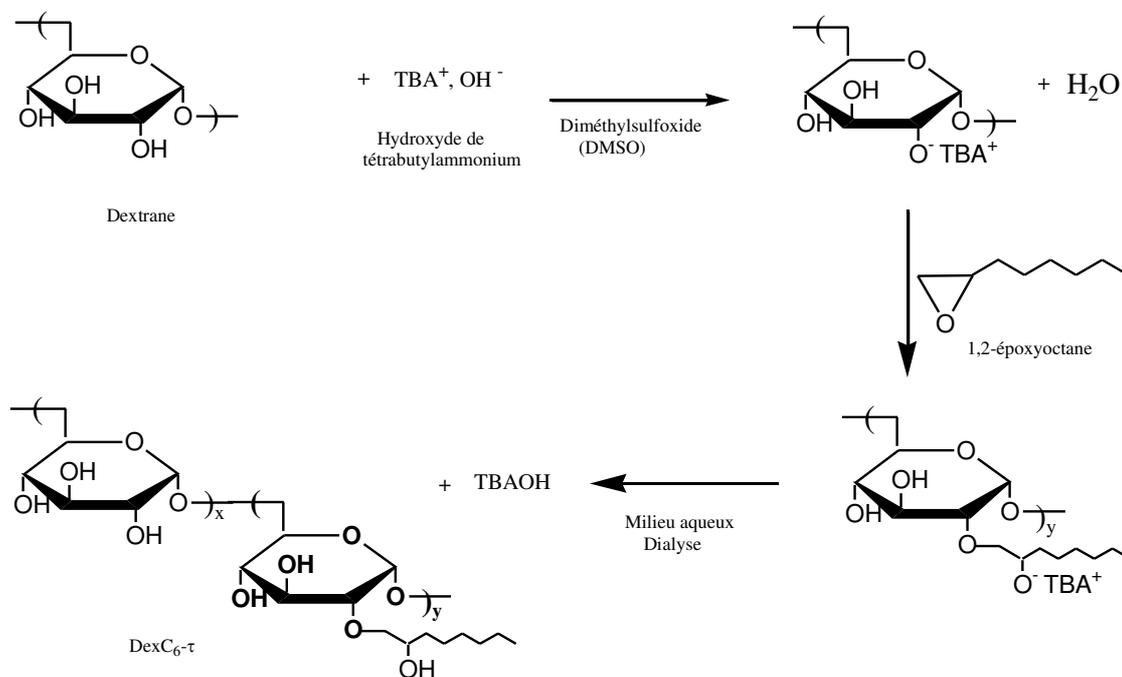
### 2.2.1. Synthèse du dextrane modifié

#### 2.2.1.1. Procédure expérimentale

Dans le but de synthétiser un  $\text{DexC}_6\text{-}\tau$  avec un taux de modification de l'ordre de 15%, une procédure a été adaptée des travaux effectués par Maxime Laville [1] et Elise Rotureau [2] (voir Figure 37). Pour cela, 10 g dextrane natif T40 sont dissous dans 100 mL de DMSO (grade HPLC, Sigma Aldrich) à 40°C. La solution est agitée pendant 1 h jusqu'à la solubilisation complète du dextrane natif. 25 g de TBAOH et 3,6 mL de 1,2 époxyoctane sont ensuite ajoutés et la solution obtenue est maintenue sous agitation à température ambiante pendant 48 h.

L'élimination du TBAOH et des sous-produits de réaction se fait par dialyse contre un mélange eau désionisée/éthanol 96 % (50/50 v/v) pendant 8 jours, puis contre de l'eau désionisée pendant 5 jours. L'eau de dialyse est changée 2 à 3 fois par jour. Après dialyse, la solution est lyophilisée pendant 48 h. Le rendement massique obtenu en dextrane modifié est quasi quantitatif.

Il est à noter que, bien qu'en opérant toujours dans les mêmes conditions, le taux de modification obtenu peut varier entre 13 et 23 %

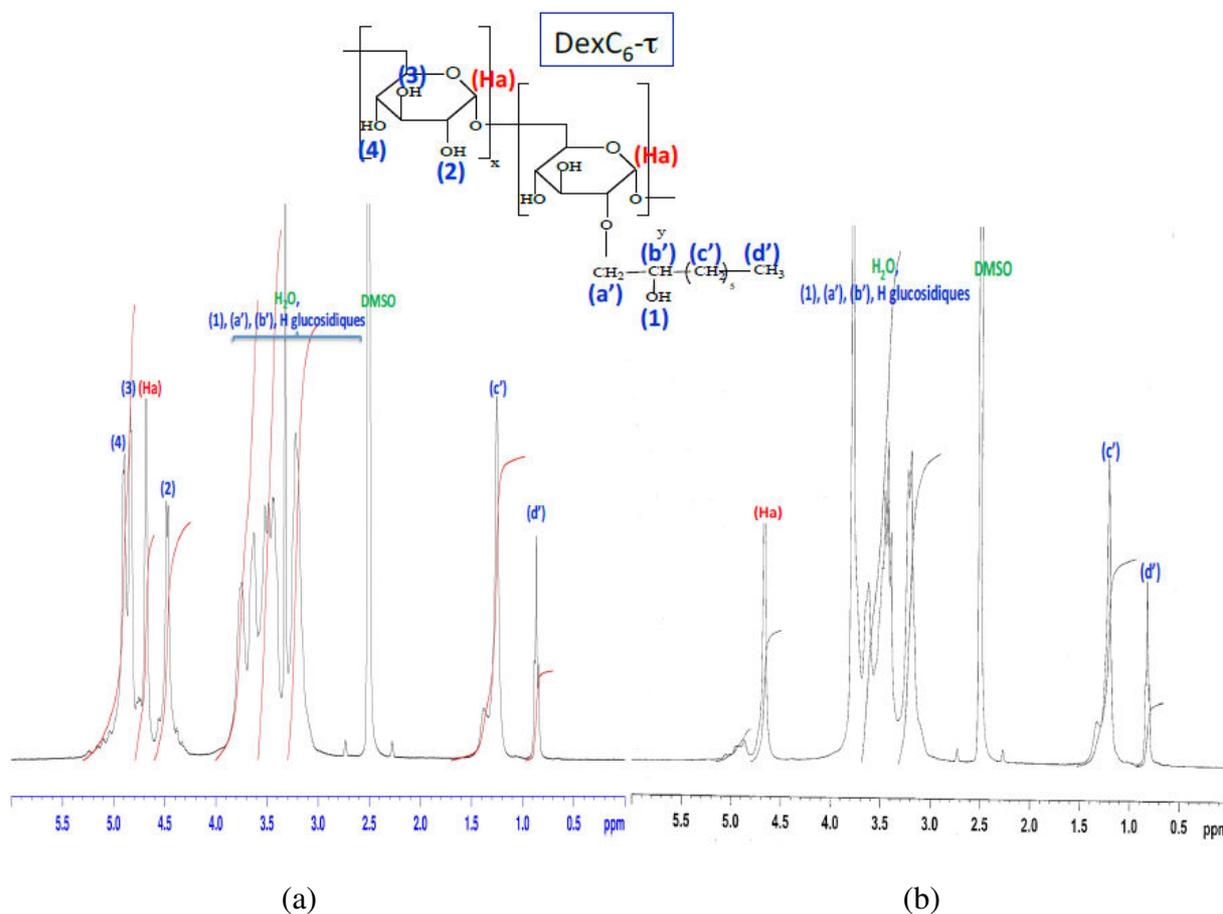


**Figure 37: Synthèse du DexC<sub>6</sub>-τ.**

La fluctuation de la température ambiante à laquelle se déroule la réaction est vraisemblablement la cause de la variation de  $\tau$  car le réacteur de synthèse n'a pas été thermostaté. Quoiqu'il en soit, nous verrons dans le chapitre III que les particules élaborées avec des dextrans dont le taux de modification varie entre 14 et 20%, présentent des caractéristiques très voisines.

### 2.2.1.2. Détermination du taux de modification par RMN <sup>1</sup>H

Le taux de modification d'un dextrane modifié est déterminé par une analyse RMN <sup>1</sup>H du polymère synthétisé. Les spectres RMN <sup>1</sup>H sont enregistrés à 25°C à l'aide d'un spectromètre Brüker Avance 300 MHz. Les spectres RMN <sup>1</sup>H des divers DexC<sub>6</sub> synthétisés sont réalisés dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> en présence de quelques gouttes de D<sub>2</sub>O pour éliminer les signaux relatifs aux protons hydroxyle des unités glucosidiques qui entourent le signal du proton anomère (Ha). En éliminant ces pics, le risque de surestimer l'intégration du Ha est réduit (Figure 38).



**Figure 38 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un DexC<sub>6</sub> dans le DMSO- $d_6$  analysé (a) sans D<sub>2</sub>O et (b) avec ajout de D<sub>2</sub>O.

Sur les spectres RMN  $^1\text{H}$  obtenus, nous pouvons identifier les 13 protons (c', d') de la chaîne alkyle (0,7-1,5 ppm), ainsi que le proton anomère (Ha) de chaque unité glucosidique du dextrane qui est situé vers 4,7 ppm. Les protons (a', b') de la chaîne alkyle résonnent sous le massif correspondant aux protons glucosidiques (3-4 ppm).

Le taux de modification peut être alors facilement calculé à partir des pics du Ha d'une unité dextrane et des pics c' et d' correspondants à 13 protons de la chaîne C<sub>6</sub>.

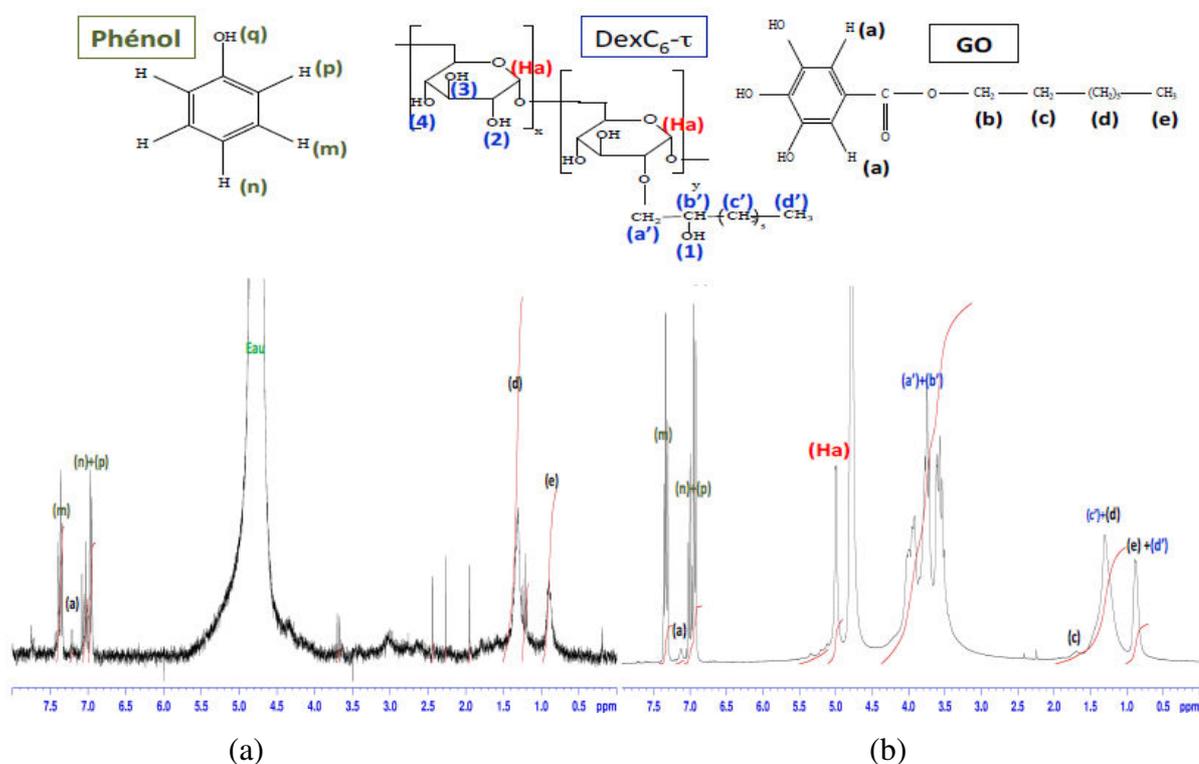
$$\tau = \frac{\left( \frac{A_{CH_2} + A_{CH_3}}{13} \right)}{A_{H_a}} \quad \text{Eq. 3}$$

Avec :  $A_{CH_2}$ ,  $A_{CH_3}$  et  $A_{H_a}$  correspondant respectivement à l'aire des pics attribués aux protons (c'), (d') et (Ha).

## 2.2.2. Caractérisation des SA (GO et GN)

### 2.2.2.1. Détermination de la solubilité maximale des SA dans l'eau et dans les solutions de Dextrane modifié

Les solubilités maximales, dans l'eau et dans des solutions de dextrane modifié, des SA étudiées (GO et GN) sont déterminées par RMN  $^1\text{H}$ . Afin d'évaluer cette solubilité maximale, il faut saturer une solution d'eau lourde ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ou de dextrane modifié dans  $\text{D}_2\text{O}$  (à une concentration bien déterminée) avec un excès de SA. Cette solution est mise sous agitation pendant 24 h puis centrifugée à 13000 rpm (18300 g) pendant 45 minutes. La concentration de SA dans le surnageant récupéré, après centrifugation, est égale à la solubilité maximale de cette SA dans la phase aqueuse étudiée.



**Figure 39: Exemple de spectres RMN  $^1\text{H}$  du GO à sa solubilité maximale dans : (a)  $\text{D}_2\text{O}$  (b) une solution de DexC<sub>6</sub> à ( $[\text{DexC}_6]=10$  g/L dans  $\text{D}_2\text{O}$ ), en utilisant le phénol comme référence externe.**

Pour déterminer la solubilité maximale des SA dans l'eau, une masse connue d'une molécule dite « référence externe » ( $m_{\text{réf}}$ ) est ajoutée à un volume exact ( $V_{\text{sol}}$ ) de la solution de  $\text{D}_2\text{O}$

saturée en SA. La référence externe utilisée dans notre cas est le phénol (ph) car aucun de ses pics caractéristiques n'interfère avec un des pics caractéristiques de la substance à doser (Figure 39). L'ajout d'une référence n'est pas indispensable dans le cas où l'on souhaite déterminer la solubilité des SA dans des solutions de dextrane modifié car ce dernier peut servir comme référence interne (pic du H anomère : Ha) pour calculer la solubilité maximale des SA. Cependant, l'ajout du phénol peut être un moyen supplémentaire de vérification de la validité des calculs des solubilités maximales des SA dans ces solutions.

Les solubilités maximales dans l'eau et dans les solutions de dextrane modifié sont calculées à partir des aires des pics (Eq. 4 et Eq. 5).

$$SM_{SA/Eau} = \frac{m_{ph} \cdot \left( \frac{A_a}{A_m} \right) \cdot \left( \frac{M_{SA}}{M_{ph}} \right)}{m_{sol} \cdot d_{sol}} \quad \text{Eq. 4}$$

$$SM_{SA/DexC_6-\tau} = \frac{m_{DexC_6-\tau} \cdot \left( \frac{A_a}{A_{Ha}} \right) \cdot \left( \frac{M_{SA}}{M_{DexC_6-\tau}} \right)}{2 \cdot m_{sol} \cdot d_{sol}} \quad \text{Eq. 5}$$

Avec :  $SM_{SA/eau}$  et  $SM_{SA/DexC_6-\tau}$ : solubilité maximale de la SA respectivement dans l'eau et dans une solution de dextrane modifié ;

SA : GO ou GN ;

$A_a$ ,  $A_m$  et  $A_{Ha}$ : aires respectives des 2 protons (a) de la SA (7,1 ppm pour GO ou GN), des 2 protons (m) du phénol (7,3 ppm) et du proton anomère (Ha) du DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (5 ppm) dans D<sub>2</sub>O ;

$M_{SA}$  : masse molaire de la SA utilisée : 282,33 g/mol pour le GO et 296,36 pour le GN ;

$M_{ph}$ : masse molaire du phénol (94,11 g/mol) ;

$M_{DexC_6-\tau}$ : masse molaire de l'unité monomère du DexC<sub>6</sub>- $\tau$  calculée par la formule :  $M_{DexC_6-\tau} = \tau \times M_{DexC_6-100} + (100 - \tau) \times M_{Dextrane}$

où  $\tau$ : le taux de modification du dextrane

$$M_{DexC_6-100} = 290 \text{ g/mol}$$

$$M_{Dextrane} = 162 \text{ g/mol}$$

$m_{sol}$  et  $d_{sol}$ : représentent respectivement la masse et la densité (densité du D<sub>2</sub>O : 1,11 g/cm<sup>3</sup>) de la solution de SA analysée.

### **2.2.2.2. Evaluation du pouvoir tensioactif des SA**

Des mesures de tension superficielle ont été réalisées pour des solutions aqueuses saturées en GO et en GN afin d'évaluer leur pouvoir tensioactif.

La technique de mesure de la tension superficielle ( $\sigma$ ) utilisée dans cette étude est celle de l'anneau de Lecomte Du Noüy. Ce système consiste à étirer un ménisque du liquide étudié au moyen d'un anneau en platine. Le fil doit avoir une section uniforme aussi circulaire que possible et le plan de l'anneau doit être parfaitement parallèle à la surface du liquide. Dans un premier temps, l'anneau est plongé sous la surface du liquide. La cuve contenant le liquide est ensuite lentement abaissée et l'on mesure simultanément la résultante verticale des forces s'exerçant sur l'anneau en s'étant au préalable affranchi du poids de l'anneau. Quand l'anneau atteint la surface, il ne la traverse pas mais l'étire en formant un ménisque, augmentant ainsi l'aire interfaciale.

Les solutions de SA ayant une concentration égale à leur solubilité maximale dans l'eau sont préparées suivant le protocole présenté (paragraphe 2.2.2.1). Pour les mesures de tension de surface, l'eau Milli-Q est utilisée pour préparer les solutions saturées en SA. Les mesures de tension superficielle sont effectuées à l'aide d'un tensiomètre Krüss K20 EasyDyne, automatique, qui donne directement la valeur de  $\sigma$ . Un bain thermostaté à 25°C est utilisé afin que la température de mesure soit identique pour tous les échantillons.

Les solutions à analyser sont placées dans des cristallisoirs utilisés comme des cellules de mesure. Ces derniers sont préalablement nettoyés avec de l'acide sulfurique afin d'éliminer toute trace organique puis rincés abondamment à l'eau, à l'acétone et enfin séchés. L'échantillon de solution, soit 20 mL, est introduit dans la cellule de mesure et laissé au repos 12 h pour permettre la saturation de l'interface par le tensioactif. Un temps d'attente d'un quart d'heure est respecté avant la mesure pour permettre la stabilisation en température.

Pour chaque échantillon, cinq mesures successives sont effectuées et une valeur moyenne est calculée.

### **2.2.2.3. Evaluation de la miscibilité des SA avec le PLA par MDSC**

La calorimétrie différentielle à balayage (ou Differential Scanning Calorimetry) est une technique permettant de suivre la variation d'enthalpie d'un échantillon en fonction du temps ou de la température, sous une atmosphère donnée. Cette méthode repose sur l'aspect différentiel de la mesure : deux fours jumeaux sont placés dans une enceinte calorimétrique, l'un contenant une référence (creuset vide) et l'autre un creuset contenant l'échantillon. La comparaison des

températures des deux fours, fournies par un thermocouple, permet à un générateur de puissance de moduler le flux thermique pour maintenir identiques les températures des deux fours. Ainsi, on peut mesurer l'énergie absorbée ou dégagée par l'échantillon analysé.

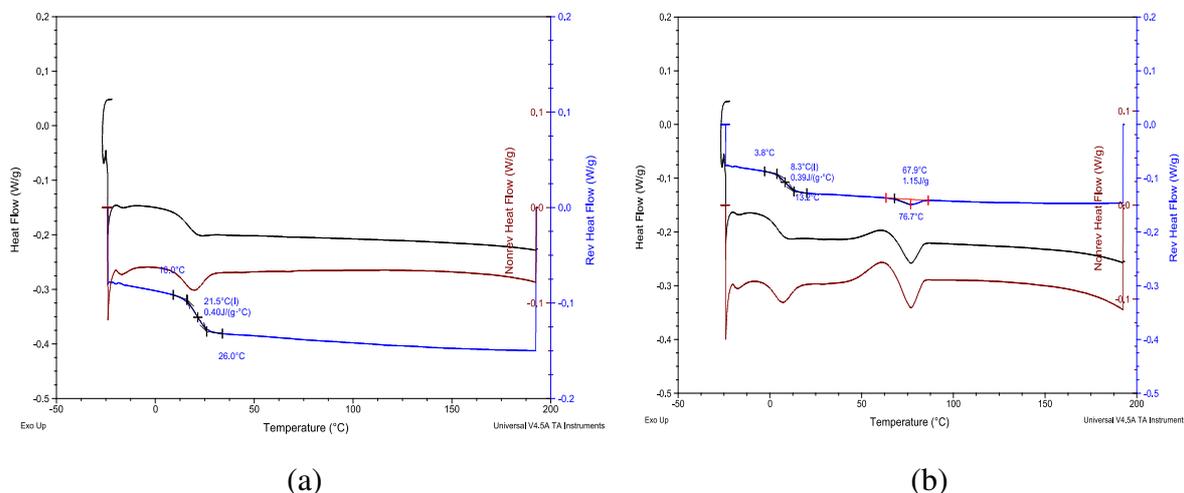
Il est alors possible de mettre en évidence et de quantifier certains phénomènes physiques (fusion, cristallisation) ou chimiques (variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) et de chaleur spécifique ( $C_p$ )). De ce fait, la pureté et/ou les caractéristiques de changement d'état d'un composé donné peuvent être étudiées. Dans le cas des polymères, il est notamment possible de déterminer la température de transition vitreuse  $T_g$ , l'existence de phases cristallines, la température de fusion  $T_f$  ou encore d'examiner la compatibilité d'un mélange de polymères ou d'un polymère avec une autre substance.

Les analyses réalisées au cours de cette thèse ont été effectuées par DSC modulée (MDSC). L'emploi de deux vitesses de chauffage : moyenne (linéaire) et modulée (sinusoïdale) permet d'obtenir en même temps une bonne résolution et une meilleure sensibilité comparativement à une DSC classique.

En MDSC, le flux de chaleur total est séparé 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.

Les analyses thermiques sont réalisées en utilisant un calorimètre Q2000, TA Instruments. La procédure consiste à faire subir à l'échantillon trois cycles de chauffage et de refroidissement de  $-25^\circ\text{C}$  à  $200^\circ\text{C}$  (ou  $220^\circ\text{C}$ ) sous flux continu d'azote avec une vitesse constante de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , en modulant  $\pm 1^\circ\text{C}$  chaque 40 s. Des masses connues d'échantillon (10 – 15 mg) sont introduites dans des creusets en aluminium (Tzero Aluminium) et placées dans le passeur automatique de l'appareil. Un creuset vide de masse connue servant de référence y est aussi placé.

Pour évaluer la miscibilité du PLA avec les SA étudiées, des mélanges PLA/SA sont préparés puis analysés par MDSC. La procédure de préparation des échantillons consiste à dissoudre pendant 24 h le mélange PLA/SA dans 2 mL d'acétone, qui est un solvant commun. L'acétone est ensuite évaporée à  $37^\circ\text{C}$  pendant 3 h dans une étuve ventilée (Thermoshaker). Le séchage est finalisé en mettant l'échantillon à l'étuve sous vide pendant toute une nuit à  $90^\circ\text{C}$ .



**Figure 40 : Thermogrammes obtenus par MDSC (a) pour un mélange PLA/GN 80/20 (b) pour un mélange PLA/GN 50/50.**

Les Figure 40 (a) et (b) représentent respectivement un thermogramme obtenu lorsque le PLA et la SA analysée sont bien miscibles ( $T_g$  du PLA modifiée, pas de pic de fusion de la SA) et un thermogramme enregistré dans le cas d’une miscibilité partielle de la SA avec le PLA ( $T_g$  modifiée et présence d’un pic de fusion attribué à la SA en excès).

## 2.2.3. Elaboration des particules

### 2.2.3.1. Procédés discontinus : nanopréciipitation et émulsion-évaporation de solvant

#### 2.2.3.1.1 La nanopréciipitation

10 mL d’une solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  à la concentration souhaitée sont préparés. Les phases organiques utilisées sont des solutions d’acétone (5 mL) contenant du PLA ou un mélange PLA/SA. La quantité de matière totale dans la phase organique a été maintenue égale à 50 mg pour toutes les expériences. Le débit d’addition de la phase organique dans la phase aqueuse est égal à 0,3 mL/min dans toutes les expériences.

Après addition dans la phase aqueuse, l’acétone est évaporée à 37°C pendant 1h30 dans le Thermoshaker. Les particules obtenues sont lavées dans le but d’éliminer le dextrane modifié non adsorbé à la surface des particules ainsi que la SA qui n’a pas été encapsulée. Le processus de lavage consiste à centrifuger trois fois la suspension de nanoparticules obtenue après évaporation de solvant (Centrifugeuse GR20-22 JOUAN avec un rotor ayant un diamètre de 14,5

cm, 13000 tr/min, 18300 g, pendant 45 minutes à 15°C). Après chaque centrifugation, le surnageant est retiré puis remplacé par 10 mL d'eau MilliQ et la suspension est redispersée durant 10 minutes dans un bain à ultrason.

La distribution de tailles des nanoparticules est déterminée avant et après les opérations de lavage pour chaque échantillon, par granulométrie laser.

#### **2.2.3.1.2 L'émulsion -évaporation de solvant (E-ES : huile/eau)**

Un volume  $v$  d'acétate d'éthyle (AcOEt) contenant du PLA ou un mélange PLA/SA à une concentration  $C$  est ajouté à une solution de Dex<sub>6</sub> à une concentration  $C'$ . Pour obtenir des nanoparticules, la solution est soumise à 1 min de vortex (pré-émulsification) puis soumise aux ultrasons dans la glace à des puissances et des temps variables. La sonde à ultrasons est couplée à un amplificateur Bioblock Scientific vibracell 75043, placé dans une enceinte capitonnée. Après émulsification, l'acétate d'éthyle est évaporé sous agitation à 37°C pendant 1h 30 min dans le Thermoshaker. Les particules obtenues sont lavées par centrifugation, ainsi que décrit ci-dessus pour la nanoprécipitation.

Il est à noter que les nanoparticules élaborées par émulsion-évaporation de solvant présentent dans certains cas, des tailles nettement plus petites que celles obtenues par nanoprécipitation. Dans ce cas, les centrifugations sont effectuées à 16000 tr/min (28000 g) pendant 45 minutes à 15°C.

Pour obtenir des microparticules avec des tailles situées dans le domaine 100  $\mu\text{m}$ -1000  $\mu\text{m}$ , la pré-émulsification s'effectue en mélangeant la phase organique et aqueuse sous agitation manuelle pendant 1 minute. L'émulsion obtenue est ensuite maintenue sous agitation magnétique pendant 30 minutes.

La suspension de particules est ensuite mise à évaporer à 37°C pendant 1h dans une étuve ventilée. Au bout de 30 minutes d'évaporation, 4 mL d'eau Milli-Q sont ajoutés à l'émulsion afin de limiter l'évaporation de l'eau qui risquerait de provoquer une agrégation irréversible des particules. Les particules obtenues sont ensuite centrifugées (13000 tr/min pendant 15 minutes à 15°C) et lavées. La redispersion dans un bain à ultrason n'est plus indispensable car les microparticules se redispersent facilement après chaque lavage.

Dans le cas des nanoparticules, la lyophilisation des suspensions conduit à une agrégation irréversible des particules. Pour éviter cette agrégation, les particules lavées sont lyophilisées (lyophilisateur LABCONCO) en présence d'un cryoprotecteur (D-(+)-Trehalose dihydrate, Sigma-Aldrich) à raison de 10 mg par mL de suspension.

### **2.2.3.2. Procédé continu : émulsion-diffusion en géométrie microfluidique**

#### **2.2.3.2.1 Procédure de fabrication du système microfluidique**

##### **a) Préparation du wafer (Substrat : support du moule)**

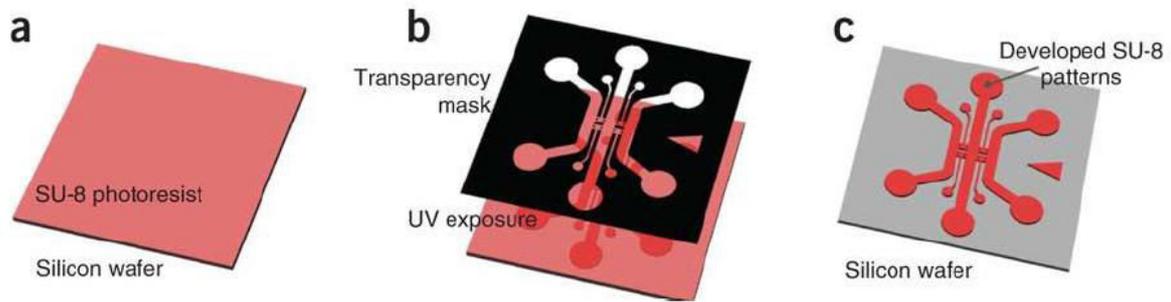
La première étape consiste à préparer le moule qui sera utilisé pour fabriquer les microsystèmes. Pour cela, un wafer en silicium est tout d'abord nettoyé et séché. La présence de la moindre impureté sur le wafer pourrait empêcher la résine d'adhérer à la surface et endommager le motif imprimé. Le nettoyage est réalisé en deux étapes. La première étape consiste à plonger le wafer dans l'acétone afin de dissoudre les dépôts organiques, puis dans un bain à ultrasons (10 min) et enfin à sécher ce substrat. La deuxième étape consiste à plonger le wafer dans de l'éthanol puis à le sécher. Une alternative à cette préparation consiste à nettoyer le substrat par une solution de « mélange piranha » (mélange eau oxygénée //acide sulfurique 1/3//2/3 (v/v)). Cette méthode n'a pas été utilisée dans notre cas.

##### **b) Dépôt et cuisson de la résine SU-8 sur le Wafer**

Le SU-8 est une résine photosensible négative couramment utilisée dans la fabrication de microsystèmes. Après avoir déposé la résine sur le wafer, nous attendons quelques secondes. Le cycle de fonctionnement de la tournette du spinner (SPIN150) est divisé en deux parties : dans un premier temps, il s'agit de faire tourner le substrat et la résine à 500 rpm pendant 10 secondes en appliquant une accélération de 100 rpm/s. Puis dans un second temps, il s'agit de faire tourner l'ensemble à 2000 rpm pendant 30 secondes en appliquant une accélération de 100 rpm/s. Dans notre cas, l'accélération est maintenue identique car le SPIN150 ne permet pas de modifier l'accélération entre deux étapes d'un même programme. La résine est versée sur le substrat directement à partir de la bouteille. Une fois le dépôt effectué, il est nécessaire de solidifier la résine à 95°C pendant 45 min.

##### **c) Exposition aux UV**

Cette étape sert à définir la forme du motif du moule qu'on souhaite obtenir par photolithographie. Pour cela, un masque formé de zones opaques et transparentes est déposé sur le wafer couvert par le film SU-8 photosensible. L'ensemble subit une exposition à la lumière UV pour amorcer la réaction de réticulation de la résine (Figure 41- (a) et (b)).



**Figure 41 : Exposition aux UV et développement d'une résine photosensible négative [3].**

La dose d'irradiation est ajustée en fonction de l'épaisseur du film. Elle dépend aussi bien du temps d'irradiation que de l'intensité de la lumière UV (à 365 nm). Une surexposition entraîne une dégradation du réseau: la création de radicaux libres permet une meilleure adhésion du film sur le substrat, mais diminue la résolution des surfaces texturées. C'est pourquoi un compromis entre l'adhésion et la résolution des microstructures doit être trouvé. Dans notre cas, nous avons choisi de travailler dans les conditions suivantes : 2 minutes d'irradiation à 50 % de la puissance maximale que peuvent fournir les émetteurs de l'appareil (~ 12,5 mW).

Une étape de développement de la résine est ensuite nécessaire (Figure 41 - (c)). Comme la résine SU-8 2100 est une résine négative, seules les parties non exposées aux rayons UV lors de l'insolation vont se dissoudre sous l'action du développeur SU-8. On trempe l'ensemble substrat et résine dans le développeur pendant 15 à 17 minutes sous agitation.

#### **d) Rinçage et séchage du moule**

Le wafer est ensuite nettoyé à l'éthanol pour enlever l'excédent de résine et séché. Nous avons dès lors un moule en résine SU-8 pour la réalisation d'un microsystème. L'ensemble du matériel utilisé est placé sous une hotte à flux laminaire qui, à l'aide de différents filtres, empêche l'entrée de toute poussière. Ces poussières pourraient boucher les microcanaux fabriqués.

#### **e) Coulage et démoulage du PDMS**

Une fois l'empreinte du moule en résine réalisée, il s'agit de fabriquer les microcanaux en utilisant le PDMS. Dans un premier temps, il faut peser et réaliser le mélange entre l'huile siliconée (base) et l'agent réticulant (Kit SYLGARD® 184 Silicone Elastomer fourni par Dow Corning). Pour obtenir un matériau ayant de bonnes propriétés mécaniques, un mélange

base/agent réticulant égal à 10/1 est utilisé. Le mélange est dégazé à l'aide d'une pompe à vide afin d'éliminer les bulles d'air. Le mélange de PDMS est ensuite versé sur le wafer de silicium. La cuisson est réalisée à 120°C pendant une heure ce qui permet d'obtenir les propriétés physiques attendues. Une fois que le PDMS est solidifié, le système doit refroidir avant de procéder au découpage et à la récupération des microsystèmes en PDMS sur lesquels se trouvent les empreintes du moule choisi.

#### **f) Traitement plasma et collage**

Cette étape permet d'assurer la bonne adhésion du PDMS à la lame de verre et ainsi d'avoir une étanchéité sans ajout de colle, qui pourrait obstruer les microcanaux. Le plasma oxygéné est utilisé pour assurer l'activation de la surface du PDMS et de la lame de verre qui permettra le collage irréversible des deux surfaces.

La plaque de PDMS sur laquelle l'empreinte du moule est gravée ainsi que la lame de verre sont introduites dans l'enceinte du dispositif du plasma oxygéné. Afin d'obtenir une enceinte contenant seulement de l'oxygène, on fait le vide jusqu'à 0,2 mbar, on introduit ensuite de l'oxygène jusqu'à 0,3 bar puis on refait de nouveau le vide jusqu'à 0,2 mbar. Cette opération est répétée trois fois pour bien purger l'enceinte de l'oxygène. Après cette étape, le vide est maintenu jusqu'à 0,1 mbar puis le plasma oxygéné est mis en marche pendant 40 s. Ensuite, l'oxygène est introduit progressivement dans l'enceinte tout en contrôlant la vanne d'oxygène. Au bout de 1 à 2 minutes, le vide est cassé avec l'oxygène. Une fois que le vide est cassé, il faut rapidement coller le PDMS à la lame de verre (en serrant bien les deux parties l'une contre l'autre). Pour assurer un bon collage des deux compartiments, nous avons remarqué que le fait de placer le microsystème collé à l'étuve pendant 2 heures à 60°C renforce la bonne adhésion du PDMS à la plaque de verre.

Les différentes étapes de fabrication d'un système microfluidique sont schématisées dans la Figure 42.

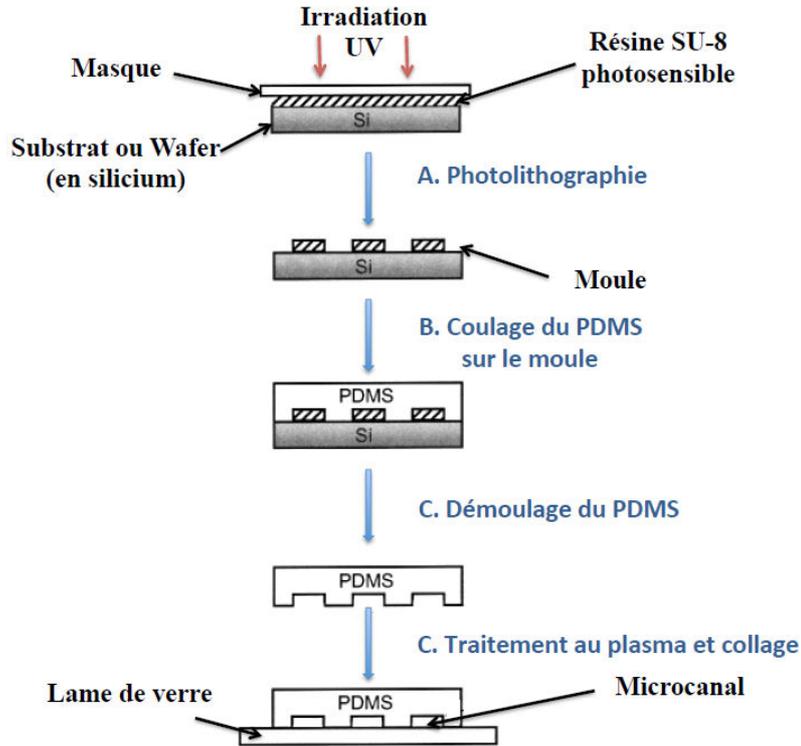


Figure 42 : Etapes de fabrication d'un système microfluidique (adaptée de McDonald et al [4]).

### 2.2.3.2.2 Dimension des canaux du microsystème fabriqué

Les dimensions du système microfluidique ont été déterminées précisément en utilisant un microscope optique.

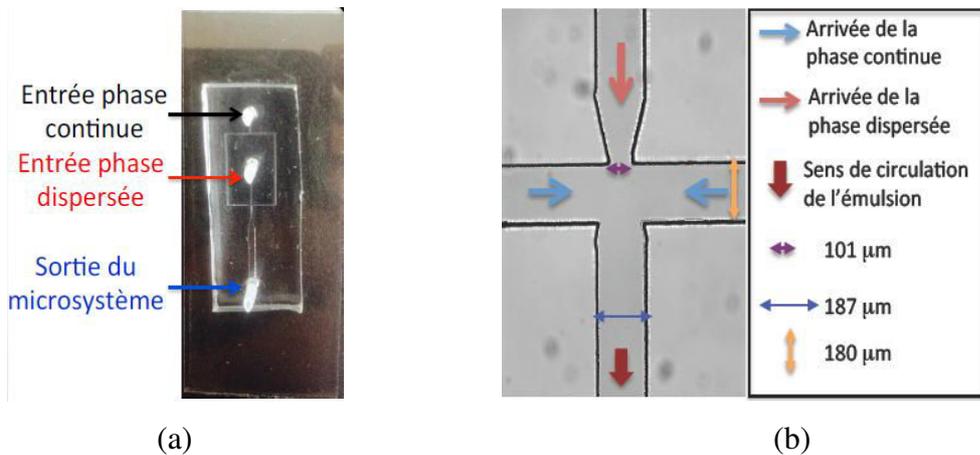


Figure 43 : Photographies du système microfluidique préparé (géométrie des microcanaux en FF) (a) en taille réelle (b) microscope optique avec un grossissement x 5 : zoom sur la constriction (jonction) en FF avec identification des dimensions du microsystème élaboré.

Le microsystème utilisé est un FF système formé de canaux rectangulaires. La largeur du canal est de 230  $\mu\text{m}$  et sa profondeur est de 47  $\mu\text{m}$ . Il est à noter que le canal amenant la phase dispersée en contact avec la phase continue présente un étranglement de diamètre égal à 200  $\mu\text{m}$  à l'intersection avec le canal où arrive la phase continue. L'ensemble des trois courants rencontre un deuxième rétrécissement ayant un diamètre égal à 116  $\mu\text{m}$  qui permet induit une accélération de la vitesse des deux phases à cet étranglement, ce qui augmente le cisaillement appliqué à la phase dispersée. Ce rétrécissement permet d'avoir une taille de goutte beaucoup plus petite que le diamètre du canal de sortie.

### ***2.2.3.2.3 Elaboration des particules par émulsion-diffusion en système microfluidique***

L'élaboration des microparticules du domaine 1  $\mu\text{m}$  -100  $\mu\text{m}$  a été réalisée par émulsion-diffusion dans le système microfluidique décrit précédemment (paragraphe 2.2.3.2.1). L'étape d'émulsification a lieu à l'intérieur du système microfluidique.

La phase aqueuse est une solution de DexC<sub>6</sub> (5 g/L) saturée en AcOEt et selon les cas saturée ou non en SA. La phase organique quant à elle est une solution dans l'AcOEt de PLA (10 g/L) ou d'un mélange PLA/GO (PLA 8 g/L et GO 2 g/L). Les entrées du système microfluidique ont été reliées à des seringues fixées sur des pousse seringues en utilisant des tubes en PTFE, permettant ainsi le contrôle du débit de chaque phase. Des aiguilles sont nécessaires pour assurer la connexion entre les seringues et les tubes en PTFE; Les seringues utilisées sont en verre avec un piston en PTFE fournies par la société « Hamilton ». Le volume de la seringue utilisée pour la phase dispersée est égal à 10 mL alors que celui utilisé pour la phase continue est égal à 100 mL. Les pousse seringues utilisées sont achetées de chez « Harvard Apparatus » et sont à double position permettant ainsi de fixer deux seringues en même temps et de mettre ainsi en fonctionnement deux microsystèmes en parallèle. Pour nos expériences, deux pousse seringues doubles sont utilisés. Chaque pousse seringue est dédié à une phase (continue ou dispersée). La formation des émulsions est observée à l'aide d'une caméra à haute résolution (CANON EOS 70D).

Après la formation de l'émulsion dans le microsystème (dans les conditions optimales), la dispersion doit être introduite directement dans un grand volume d'eau pour assurer une bonne diffusion de l'AcOEt à l'extérieur des gouttelettes permettant l'obtention de microparticules isométriques avec des tailles contrôlées.

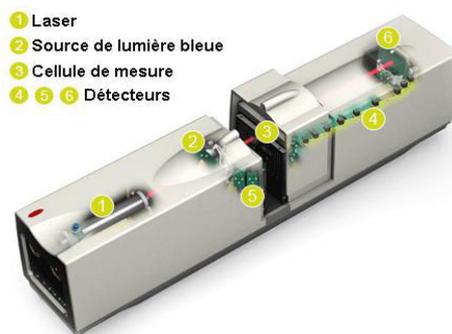
Par ce procédé, les suspensions de microparticules obtenues sont très diluées et les microparticules sont récupérées par filtration (filtre de porosité 1,2  $\mu\text{m}$ , système MilliPore) Les particules déposées sur le filtre sont abondamment rincées avec l'eau afin de bien éliminer le dextrane modifié non adsorbé à la surface des microparticules. Après les lavages, les microparticules sont récupérées et redispersées dans un faible volume d'eau (5 mL).

## 2.2.4. Caractérisation des particules

### 2.2.4.1. Granulométrie par diffraction laser

#### 2.2.4.1.1 Principe

Un granulomètre à diffraction laser a été utilisé pour caractériser les distributions de tailles des particules (Mastersizer 2000© Malvern Instruments-Cellule : Hydro 2000 $\mu\text{p}$ ).



**Figure 44 : Granulomètre Mastersizer 2000©.**

Le montage optique de ce granulomètre est un montage de Fourier inverse utilisant une lentille de 550 mm de distance focale. Les particules sont soumises à un faisceau laser focalisé. Le système utilise alternativement deux longueurs d'onde : l'une provenant d'un laser à gaz hélium-néon polarisé en vertical à 633 nm (faisceau rouge) et l'autre d'une diode électroluminescente émettant un faisceau bleu à 466 nm. La très grande stabilité en température, en puissance et en longueur d'onde du laser à gaz hélium-néon garantit la précision de la mesure des particules de plus grosses tailles. L'adjonction du faisceau bleu sur ce granulomètre permet d'augmenter la résolution submicronique mais également la sensibilité. L'appareil est utilisé en voie liquide et permet la mesure de taille de particules sur une gamme comprise entre 0,02 et 2000  $\mu\text{m}$ . Les résultats sont traités avec le logiciel Mastersizer 2000.

De nombreux modèles théoriques ont été développés afin de décrire le phénomène. En

particulier, la théorie de Mie permet de prévoir la diffusion de la lumière par les particules sphériques, en tenant compte de la manière dont la lumière traverse la particule ou est absorbée par celle-ci. Il faut alors connaître l'indice de réfraction et l'absorption des particules dans l'échantillon. Chaque taille de particule possède sa propre image de diffraction. Le Mastersizer capte les images de diffraction générées par l'ensemble des particules dans l'échantillon et, en se basant sur la théorie de Mie, calcule les tailles des particules et la distribution de celles-ci. En l'absence de particules, un faisceau laser (Hélium-Néon) converge au centre du détecteur grâce à la lentille placée en sortie de la cellule de mesure. En revanche, si des particules se trouvent dans la cellule de mesure, la lumière est diffractée sur les autres éléments du détecteur (cellules photosensibles réparties autour du point central et dont la surface augmente avec leur position angulaire). L'angle de déviation de la lumière est inversement proportionnel à la taille de la particule. La lentille a la particularité de récupérer la lumière diffusée par un ensemble de particules de même taille et de la superposer sur les mêmes portions du détecteur. Ainsi, l'image de diffraction obtenue rassemble la diffraction de toutes les particules de l'échantillon.

L'appareil donne alors la taille des particules sous la forme  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  et  $d(0,9)$  ainsi que la distribution des tailles en prenant comme base le volume des particules. Ainsi  $d(0,1)$  représente le diamètre de particule en dessous duquel se trouve 10% du volume de l'échantillon,  $d(0,5)$  le diamètre en dessous et au dessus duquel se situe 50% du volume de l'échantillon et  $d(0,9)$  le diamètre en dessous duquel se situe 90% du volume de l'échantillon.

#### **2.2.4.1.2 Détermination des paramètres de mesure**

La mesure par le Mastersizer nécessite la réalisation d'un blanc. Dans le cadre de ces travaux, le blanc est effectué avec une solution d'eau milliQ. Une SOP (Procédure Opératoire Standardisée dans laquelle les différents paramètres de mesure sont introduits (dispersant : Eau, indice de réfraction 1,3 ; indice de réfraction du PLA :1,4 ; vitesse d'agitation 1500 rpm) est lancée et la mesure peut débuter. Le blanc est effectué : l'appareil détecte l'image de diffraction du blanc qui sera ensuite soustraite à l'image de diffraction de l'échantillon.

Quelques gouttes de la suspension de particules sont alors ajoutées dans la cellule de mesure et l'analyse est effectuée. L'appareil donne alors la distribution de tailles en volume de particules ainsi que les valeurs  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  et  $d(0,9)$ .

**2.2.4.1.3 Généralités sur l'analyse d'une distribution de taille des particules**

Nous allons présenter les différents paramètres fournis par le Mastersizer après chaque mesure d'échantillon et définir les relations qui peuvent décrire au mieux les distributions de tailles obtenues (Figure 45).

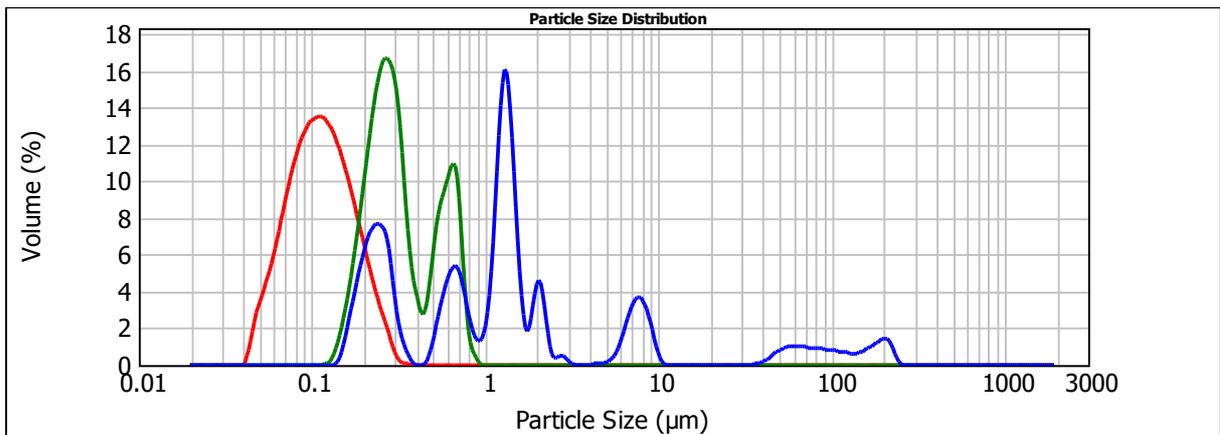
Les diamètres moyens en surface et en volume ainsi que la surface spécifique  $Sp$  ( $m^2/g$ ) sont définies de la manière suivante :

- $D[3,2] = \Sigma (f_i d_i^3) / \Sigma (f_i d_i^2)$ : diamètre moyen en surface (ou diamètre moyen de Sauter),
- $D[4,3] = \Sigma (f_i d_i^4) / \Sigma (f_i d_i^3)$ : diamètre moyen en volume,
- $Sp$  ( $m^2/g$ ) =  $6 / d * D[3,2]$  : surface spécifique, fournie par le granulomètre et calculée à partir du  $D[3,2]$ .

Avec  $d$  = masse volumique du polymère ; pour le PLA,  $d$  est égale à  $1,25 \text{ g/cm}^3$

Dans la littérature, différents paramètres sont utilisés pour décrire les résultats granulométriques obtenus. Parmi ces paramètres on peut citer l'étendue moyenne de la taille des particules (**Mean Range of particle size**) aussi appelé Span.

$$\text{Span: MR} = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad \text{Eq. 6}$$



**Figure 45: Comparaison entre trois distributions de taille de nanoparticules obtenues dans différentes conditions (-) Echantillon 1 (-) Echantillon 2 (-) Echantillon 3**

**Tableau 14: Comparaison entre les paramètres caractéristiques des nanoparticules des échantillons 1, 2 et 3.**

Echantillon	d (0,1) ( $\mu\text{m}$ )	d (0,5) ( $\mu\text{m}$ )	d (0,9) ( $\mu\text{m}$ )	D[3,2] ( $\mu\text{m}$ )	D[4,3] ( $\mu\text{m}$ )	Sp ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Span
<b>Echantillon 1</b>	0,065	0,112	0,196	0,101	0,196	47,3	1,1
<b>Echantillon 2</b>	0,194	0,296	0,656	0,300	0,367	16,0	1,6
<b>Echantillon 3</b>	0,215	1,214	9,582	0,581	13,112	8,3	7,7

Au cours de ces travaux de thèse, les mesures effectuées ayant été très nombreuses, il était de ce fait nécessaire de trouver des paramètres qui nous permettent de décrire et de comparer les différentes distributions de tailles obtenues sans avoir à présenter à chaque fois les distributions de tailles correspondant aux suspensions analysées. Pour une distribution monomodale en taille des particules, le Span est de l'ordre de 0,8 - 1,2. Le Span a été choisi comme paramètre pour décrire la largeur de la distribution de taille obtenue. Nous pouvons remarquer que sur les exemples donnés (Figure 45 et paramètres caractéristiques dans le Tableau 14), plus la distribution de tailles s'élargit et devient multimodale plus le Span est élevé.

#### 2.2.4.2. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les caractérisations morphologiques des particules entre 0,1 et 100  $\mu\text{m}$  sont effectuées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Philips CM200 opérant à 200 kV (résolution par point : 0,27 nm, résolution en lignes : 0,14 nm), équipé de deux caméras CCD (rapide et HR) et d'un spectromètre de dispersion d'énergie des photons X.

Dans le cas des nanoparticules, la procédure de préparation de l'échantillon est la suivante. Une goutte de la suspension est déposée sur une grille en cuivre. Après 3 minutes, l'excès de la solution est éliminé à l'aide d'un papier filtre. Une goutte d'une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 2% en masse (contrastant) est ensuite ajoutée sur la grille. Après 1 minute, l'excès de cette solution est absorbé à l'aide d'un papier filtre. La grille est finalement séchée pendant 5 minutes à l'air libre avant d'introduire l'échantillon dans le microscope.

Dans le cas des microparticules, l'agent contrastant n'est pas utilisé.

#### 2.2.4.3. Microscopie optique

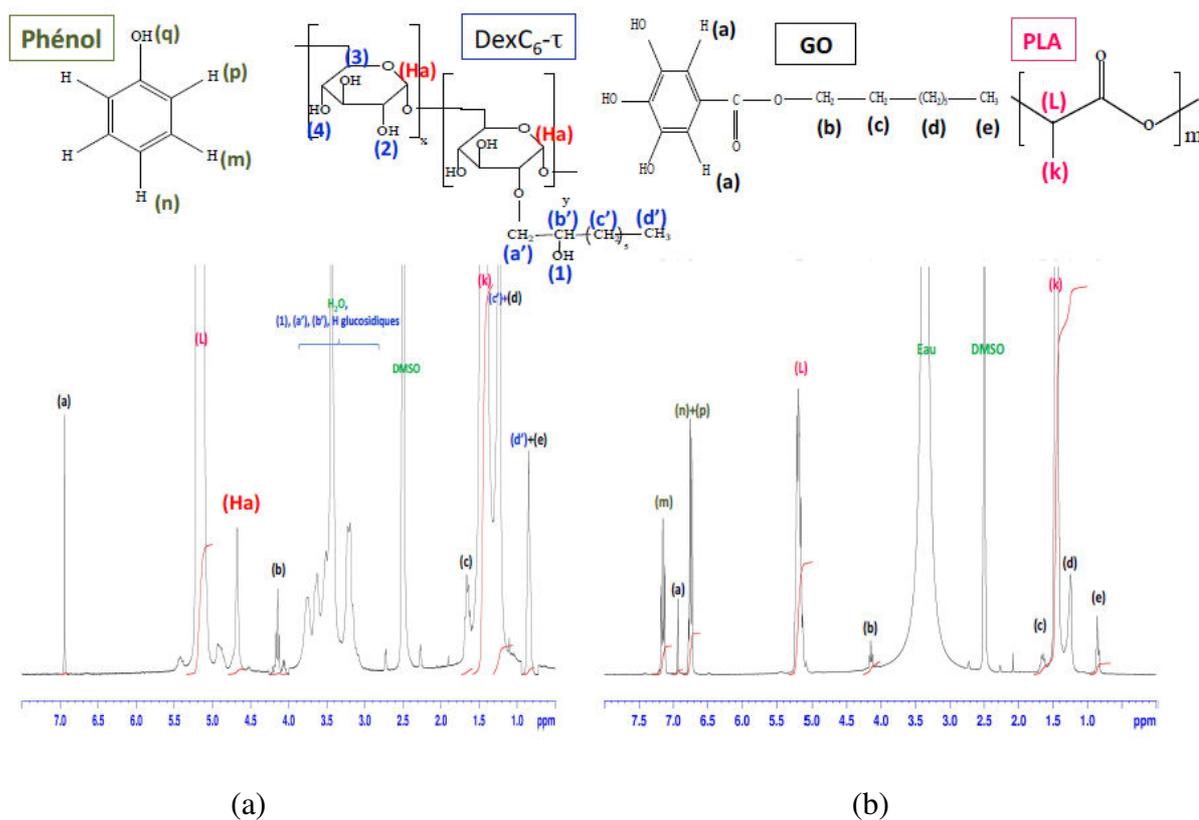
La caractérisation morphologique des microparticules entre 100  $\mu\text{m}$  et 1000  $\mu\text{m}$  a été réalisée

en utilisant un microscope optique (Zeiss).

Pour chaque analyse, une goutte de l'échantillon de microparticules a été déposée sur une lamelle de verre puis observée avec un microscope optique équipé d'une caméra.

#### 2.2.4.4. Encapsulation de SA dans les particules

La quantité de SA encapsulée dans les particules est déterminée par RMN  $^1\text{H}$  (Figure 46).



**Figure 46 :** Exemple de spectre RMN  $^1\text{H}$  de (a) nanoparticules de GO/PLA dans  $\text{DMSO-}d_6$  avec deux gouttes de  $\text{D}_2\text{O}$  (b) microparticules de GO/PLA dans  $\text{DMSO-}d_6$  en présence de phénol comme référence externe.

Le taux d'encapsulation ( $\text{TE}\%$ ) est défini comme étant le rapport de la masse de SA encapsulée ( $m_{\text{SA-encapsulée}}$ ) sur la masse SA introduite dans la phase organique initiale ( $m_{\text{SA-initiale}}$ ) (Eq. 7). Afin d'évaluer le taux d'encapsulation, un volume de 4 mL de chaque suspension de particules est prélevé, lavé et lyophilisé. Le solide obtenu est ensuite dissous dans 0,7 mL de  $\text{DMSO-}d_6$  en présence de deux gouttes de  $\text{D}_2\text{O}$ . La masse de SA totale encapsulée est calculée à partir de l'Eq. 8 sur chaque lot analysé (à partir du spectre RMN  $^1\text{H}$  des particules avant dialyse à  $t_0$ ).

$$TE(\%) = \left( \frac{m_{SA-encapsulée}}{m_{SA-initiale}} \right) \cdot 100 \quad \text{Eq. 7}$$

Avec :

$m_{SA-initiale}$  : Masse de SA initialement introduite dans la phase organique

$m_{SA-encapsulée}$  : Masse de SA encapsulée dans les particules. Cette masse est calculée à partir de l'équation

$$m_{SA-encapsulée}(mg / gPLA) = \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{A_a}{A_L} \right) \cdot \left( \frac{M_{SA}}{M_{PLA}} \right) \cdot 1000 \quad \text{Eq. 8}$$

où:

$M_{SA-encapsulée}$  : masse de SA encapsulée ;

$A_a$  et  $A_L$  : Aires correspondant respectivement aux 2 protons (a) de la SA (GO ou GN) (6,9 ppm) et au proton L du PLA (5,2 ppm) ;

$M_{SA}$  : Masse molaire de la SA utilisée : 282,33 g/mol pour le GO et 296,36 g/mol pour le GN ;

$M_{PLA}$  : Masse molaire de l'unité monomère du PLA : 72 g/mol.

## 2.2.5. Propriétés de surface des particules recouvertes de Dextrane

### 2.2.5.1. Détermination des taux de recouvrement en Dextrane des particules

Sur le spectre RMN  $^1H$  obtenu pour des nanoparticules (Figure 46 - (a)), il est possible d'identifier les pics relatifs aux protons du PLA et du DexC<sub>6</sub> et ainsi de quantifier la quantité de DexC<sub>6</sub> par rapport à la quantité de PLA présente. En utilisant les masses molaires des unités monomères de chacun de ces composés, il est ainsi possible d'évaluer la masse de DexC<sub>6</sub> présent à la surface des particules par unité de masse de PLA (Eq. 7).

$$m_{DexC_6-\tau} (mg / gPLA) = \left( \frac{A_{Ha}}{A_L} \right) \left( \frac{M_{DexC_6-\tau}}{M_{PLA}} \right) \quad \text{Eq. 9}$$

Avec :

$A_{Ha}$  et  $A_L$ : Aires respectives du proton anomère du DexC<sub>6-τ</sub> (4,7 ppm) et du proton du PLA (5,2 ppm).

$M_{DexC_6-\tau}$ : masse molaire de l'unité monomère du DexC<sub>6-τ</sub> calculée par la formule :

$$M_{DexC_6-\tau} = \tau \times M_{DexC_6-100} + (100 - \tau) \times M_{Dextrane}$$

où  $\tau$ : le taux de modification du dextrane

$$M_{DexC_6-100} = 290 \text{ g/mol}$$

$$M_{Dextrane} = 162 \text{ g/mol}$$

$$M_{PLA} : \text{Masse molaire de l'unité monomère du PLA (72 g/mol)}$$

En calculant la masse de DexC<sub>6-τ</sub> présente à la surface des particules par unité de masse de PLA, nous pouvons alors remonter au taux de recouvrement en divisant cette masse par la surface spécifique des particules (Eq. 8).

$$\Gamma (mg / m^2) = \frac{m_{DexC_6-\tau} (mg / gPLA)}{Sp} \quad \text{Eq. 10}$$

Avec :

$m_{DexC_6-\tau}$  : Masse du DexC<sub>6-τ</sub> présente à la surface des particules par gramme de PLA calculée à partir de l'Eq. 9 (mg/g PLA) ;

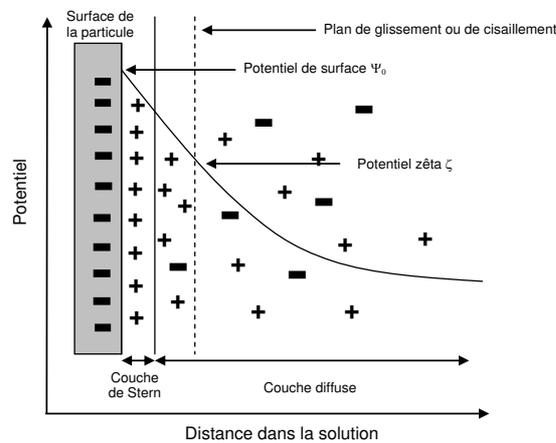
$Sp$  : Surface spécifique des particules déterminée à partir des résultats granulométriques (m<sup>2</sup>/g).

En pratique, le taux de recouvrement ne peut être déterminé que pour les nanoparticules car celles-ci possèdent une grande surface spécifique (plusieurs dizaines de m<sup>2</sup>/g PLA) et contiennent donc une quantité de dextrane suffisante pour la détermination par RMN <sup>1</sup>H. La surface spécifique des particules micrométrique est beaucoup trop petite (<1 m<sup>2</sup>/g PLA), pour que les signaux provenant du dextrane soient détectables.

### 2.2.5.2. Détermination de l'épaisseur de la couche de Dextrane à la surface des particules

#### 2.2.5.2.1 Notion de Potentiel Zêta (Zêtasizer)

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 (Figure 47). 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. La couche de Stern correspond à la région la plus proche de la surface et comporte des contre-ions fortement liés. La seconde couche (couche de Gouy-Chapman) est plus diffuse et son épaisseur dépend de la force ionique du milieu. Plus on s'éloigne de la surface de la particule, plus le potentiel de la couche diffuse diminue.



**Figure 47: Représentation de la double couche électrostatique à la surface d'une particule.**

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

Pour une particule donnée dans un champ électrique donné, quelle que soit la composition ionique du milieu, la distance de la surface au plan de cisaillement reste la même. En pratique, le

potentiel  $\zeta$  que nous avons évalué n'est pas celui mesuré par l'appareil (calculé en utilisant l'approximation de Smoluchowsky), mais est recalculé à partir de la mobilité électrophorétique  $\mu_E$  (exprimée en  $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) des particules, selon l'équation modifiée de Booth :

$$\zeta(mV) = 25,7 \left[ \frac{E}{f_1} - \frac{C_3 \left(\frac{E}{f_1}\right)^3 + C_4 \left(\frac{E}{f_1}\right)^4}{f_1 + 3C_3 \left(\frac{E}{f_1}\right)^2 + 4C_4 \left(\frac{E}{f_1}\right)^3} \right] \quad \text{Eq. 11}$$

où  $E = 7520 \mu_E$  et  $f_1$  est le facteur de correction de Henry qui tient compte de la déformation du champ électrique autour des particules. Les effets de relaxation sont pris en compte par les coefficients  $C_3$  et  $C_4$ . Une méthode permettant de déterminer  $f_1$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  et de calculer le potentiel  $\zeta$  à partir de la taille, de la mobilité électrophorétique  $\mu_E$  des particules, et de la concentration saline du milieu a été décrite par Deshiikan et Papadopoulos [5]. Cependant, lorsqu'une particule chargée est recouverte d'un polymère neutre et que la couche de polymère est supérieure à l'épaisseur du plan de cisaillement  $x$ , il y a déplacement de ce plan de cisaillement, de la distance  $x$  à une distance de la surface notée  $\Delta_{PZ}$ . On observe alors une diminution du potentiel  $\zeta$ , qui tend vers zéro au fur et à mesure que la quantité de polymère déposé et que l'épaisseur  $\Delta_{PZ}$  de la couche interfaciale augmentent. Gouy et Chapman ont alors proposé une relation exprimant l'évolution du potentiel  $\zeta$  en fonction du paramètre de Debye-Hückel  $k_h$  ( $\text{m}^{-1}$ ) et de l'épaisseur  $\Delta_{PZ}$  de la couche de polymère à la surface:

$$\ln \left[ \tanh \left( \frac{Z e \zeta}{4 k_B T} \right) \right] = \ln \left[ \tanh \left( \frac{Z e \psi_0}{4 k_B T} \right) \right] - k_H \times \Delta_{PZ} \quad \text{Eq. 12}$$

Avec :

- $\Psi_0$  le potentiel de la surface du cœur de la particule.
- $Z$  valence de la solution saline en présence
- $e$  : Charge élémentaire de l'électron :  $1,602176565 \cdot 10^{-19} \text{C}$
- $k_B$  : Constante de Boltzmann :  $1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$
- $T$  : Température absolue du milieu :  $298 \text{ K}$

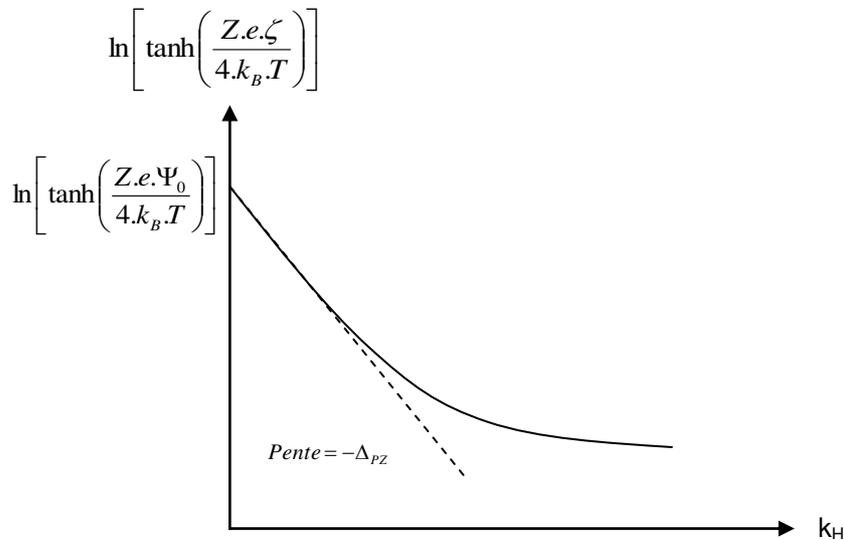
L'épaisseur de la couche diffuse quant à elle, est égale à l'inverse du paramètre  $k_H$  et dépend de la force ionique du milieu.

$$k_H (nm^{-1}) = 10^9 \left[ \frac{1000.e^2.Na.\sum_i (C_i.Z_i)^2}{\epsilon.k_B.T} \right]^{1/2} \quad \text{Eq. 13}$$

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

En mesurant le potentiel Zêta à différentes forces ioniques ( $C_i$ ) et en reportant  $\ln \left[ \tanh \left( \frac{Z e \zeta}{4 k_B T} \right) \right]$  en fonction de  $k_H$ , on obtient une courbe dont la pente à faible valeur de  $k_H$

est égale à  $\Delta_{PZ}$ , la distance de la surface au plan de cisaillement.  $\Delta_{PZ}$  peut être assimilée dans notre cas à l'épaisseur de la couche de dextrane recouvrant la surface des particules.



**Figure 48: Détermination de  $\Delta_{PZ}$ , d'après la mesure de potentiel  $\zeta$  au niveau du plan de cisaillement des particules, calculé par la relation de Gouy-Chapman, et en fonction du paramètre de Debye-Hückel  $k_H$ .**

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

#### **2.2.5.2.2 Principe de la mesure**

Le but est de mesurer le potentiel Zêta des nanoparticules à différentes concentrations en NaCl est de caractériser l'épaisseur électrocinétique de la couche interfaciale de dextrane.

La mobilité électrophorétique est mesurée dans des solutions de NaCl de concentration variable (de  $10^{-6}$  à  $10^{-2}$  mol/L) à l'aide de l'appareil Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments). Pour cela, quelques gouttes de suspension de nanoparticules sont ajoutées à 5 mL d'une solution de NaCl de façon que la concentration finale en nanoparticules soit d'environ 0,01 % en masse. La cuve d'analyse est tout d'abord rincée avec de l'eau Milli-Q, puis avec la suspension à analyser. Enfin, cette cuve est remplie avec la suspension de nanoparticules, en veillant à ne pas introduire de bulles d'air.

Les valeurs de potentiel sont tracées en fonction de la concentration en NaCl. A l'aide de l'équation de Booth modifiée, puis de la relation de Gouy et Chapmann, on parvient à estimer l'épaisseur de la couronne polysaccharide ( $\Delta_{PZ}$ ). Cette technique n'est applicable qu'aux nanoparticules.

#### **2.2.5. Stabilité colloïdale dans les solutions salines**

Les particules colloïdales sont toujours sujettes à un mouvement brownien et les collisions entre les particules qui en résultent sont fréquentes. La stabilité colloïdale des dispersions est donc déterminée par les interactions entre les particules pendant une collision. Les nanoparticules de PLA non recouvertes développent des interactions répulsives de nature électrostatique entre elles. Le recouvrement de la surface par une couche de dextrane amphiphile génère des interactions stériques répulsives entre les particules. La stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules a été caractérisée en évaluant la force ionique minimale conduisant à la floculation. L'augmentation de la force ionique écrantant les répulsions électrostatiques provenant du PLA, elle permet donc d'apprécier l'impact de la présence des boucles de dextrane en surface.

#### **2.2.4.2 Principe de la mesure de turbidimétrie**

Toutes les mesures de floculation ont été réalisées par turbidimétrie. En effet, l'instabilité du système se manifeste par une augmentation soudaine de la turbidité  $\tau$  de la dispersion. Quand le rayon des particules est inférieur à  $\lambda/5$ , la théorie de Rayleigh est applicable et la turbidité de la suspension est donnée par l'Eq. 14:

$$\tau = B.n_0.V^2 \quad \text{Eq. 14}$$

Avec :

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

De plus, la valeur de la turbidité peut-être obtenue à partir de la densité optique (DO) de la suspension selon l'Eq. 15 :

$$\tau = 2,303DO/l \quad \text{Eq. 15}$$

Avec l l'épaisseur de l'échantillon.

Dans le cas des microparticules, le rayon des particules est largement supérieur à  $\lambda/5$ . Dans ces conditions la théorie de Rayleigh n'est plus applicable. De ce fait, ces expériences n'ont été réalisées pour les suspensions de nanoparticules.

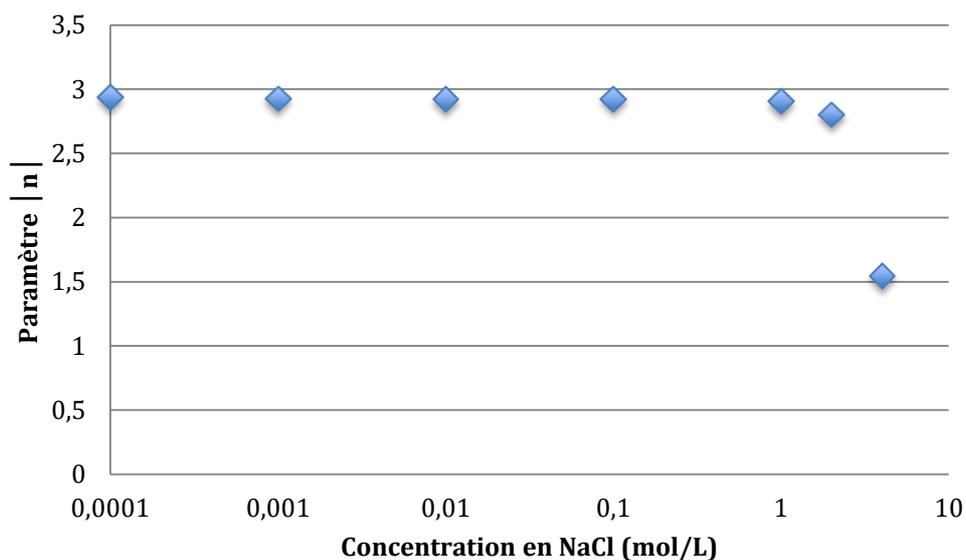
Sachant que la formation d'agrégats de particules conduit à une augmentation de la turbidité de la dispersion, la méthode de turbidimétrie consiste à mesurer la densité optique de la suspension, dans le domaine visible à l'aide d'un spectrophotomètre. Il est ainsi possible d'observer l'évolution d'un système colloïdal au cours du temps et/ou en fonction de la température. L'évolution de la turbidité en fonction du temps est donnée par l'Eq. 16:

$$\tau = B.n_0.V^2(1 + 2.k.n_0.t) \quad \text{Eq. 16}$$

Avec k la constante de vitesse de floculation.

En réalité, les courbes expérimentales  $\tau=f(t)$  s'incurvent rapidement car la diffusion de Rayleigh n'est plus applicable dès que les agrégats sont constitués de plus de deux particules. Long et al [6] ont alors imaginé une méthode permettant de détecter de faibles degrés de floculation pour les dispersions colloïdales. Cette technique est basée sur la mesure de la turbidité dans une plage adaptée de longueurs d'onde (400 – 600 nm), et sur le calcul de la pente des droites ( $\log DO$ ) en fonction de ( $\log \lambda$ ). La valeur absolue de cette pente ( $|\ln|$ ) est environ égale à 3-4 pour une diffusion de Rayleigh, en absence de diffusion multiple. Au fur et à mesure que la taille des particules augmente, la valeur de  $|\ln|$  diminue, du moins tant que les agrégats

présentent une taille intermédiaire entre les domaines d'application de la diffusion de Rayleigh et de la théorie de Mie. Enfin, il est important de souligner qu'en l'absence de diffusion multiple la valeur de  $|n|$  ne dépend pas de la concentration en latex de la dispersion colloïdale, dans les conditions utilisées.



**Figure 49: Exemple de suivi de la stabilité colloïdale de nanoparticules de PLA stabilisées par le DexC<sub>6</sub>-17 et élaborées par nanopréciipitation dans des solutions de NaCl à différentes concentrations.**

Une décroissance importante de la courbe  $|n|=f(\text{force ionique})$  correspond ainsi à une augmentation de la turbidité et donc à une floculation de la suspension. Plus le facteur  $|n|$  est grand et plus la taille des particules présentes dans la suspension est faible. La Figure 49 représente le facteur  $|n|$ , indicateur d'une floculation de la suspension, en fonction de la concentration en NaCl dans le milieu dans le cas de nanoparticules recouvertes de DexC<sub>6</sub>-17 préparées par le procédé de nanopréciipitation.

#### **2.2.4.3 Mode opératoire**

Nous avons mesuré la variation de DO des dispersions diluées dans plusieurs solutions de concentrations croissantes en NaCl :  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M,  $10^{-1}$  M, 1 M, 2 M et 4 M.

Des cuves spectrophotométriques sont remplies avec 3,5 mL de chaque solution de NaCl. 0,5 mL de suspension de nanoparticules sont ensuite ajoutés dans chaque cuve. Les cuves sont agitées manuellement et laissées au repos pendant une heure.

Les DO sont mesurées par un spectrophotomètre (UVikon-XL Bio-Tek Instruments) avec un balayage entre 450 nm et 700 nm (mesures tous les 50 nm). Pour chaque concentration en NaCl, la courbe log (DO) en fonction de log ( $\lambda$ ) est tracée et la pente  $|n|$  calculée. La courbe représentant les valeurs absolues des pentes  $n$  en fonction de la concentration en sel reflète la stabilité colloïdale des particules en fonction de la force ionique du milieu (Figure 49).

## 2.3. Suivi de la cinétique de libération

### 2.3.5. Procédure par dialyse pour les nanoparticules : méthode indirecte

La cinétique de libération de la SA à partir des nanoparticules est suivie par dialyse des particules contre un grand volume d'eau, à température ambiante, en utilisant une membrane (Spectra/Por<sup>®</sup> Membrane Dialysis Products, MWCO: 12–14 kD) fournie par SpectrumLabs<sup>®</sup>. La suspension de particules obtenue après lavage est répartie dans différents boudins de dialyse (4 mL de suspension dans une membrane ayant une longueur égale à 30 cm et une largeur égale à 10 mm). Les boudins sont mis à dialyser dans des éprouvettes contre 2 L d'eau distillée sous agitation (environ 200 rpm). L'eau utilisée pour la dialyse est changée en moyenne 2 fois par jours. Dans ces conditions de dialyse, les conditions « sink » sont vérifiées, à savoir que la concentration de SA libérée dans l'eau est toujours largement inférieure à sa concentration de saturation. Les suspensions dialysées sont ensuite prélevées une à une au cours du temps puis lyophilisées. Une analyse RMN <sup>1</sup>H, dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> en présence de 2 gouttes de D<sub>2</sub>O, de chaque échantillon prélevé au cours du temps permet de déterminer la quantité de SA qui n'a pas été libérée (présente à l'instant  $t$  dans les particules analysées) et de remonter par calcul à la quantité de SA libérée.

$$m_{SA\_libérée\ t} = m_{SA\_encapsulé\ t_0} - m_{SA\_encapsulé\ t} \quad \text{Eq. 17}$$

Avec :  $m_{SA\_libérée\ t}$  : Masse de SA libérée à l'instant  $t$

$m_{SA\_encapsulé\ t_0}$  : Masse de SA totale encapsulée calculée à partir de l'Eq. 8 en se basant sur le spectre RMN <sup>1</sup>H des particules avant dialyse, au temps  $t_0$

$m_{SA\_encapsulé\ t}$  : Masse de SA encore encapsulée à l'instant  $t$  calculée à partir de l'Eq. 8 en se basant sur le spectre RMN <sup>1</sup>H des particules dont la dialyse est arrêtée à l'instant  $t$ .

Il est à noter que, dans notre cas, pour avoir des spectres RMN <sup>1</sup>H bien interprétables, la

masse minimale de particules analysées doit être égale à 10 mg, ce qui correspond à 4 mL de suspension /boudin de dialyse.

### 2.3.6. Procédure pour les microparticules

Le suivi de la cinétique de libération des microparticules a été effectué dans un milieu tamponné (Tris(hydroxyméthyl)aminométhane/HCl 0,05M, pH=8,6). 20 mg d'azoture de sodium ont été ajoutés à 100 mL de solution tampon (0,02 % (w/w)) dans le but d'éviter un développement bactérien susceptible de se produire lorsque la libération se fait sur une longue durée (plusieurs mois).

Les microparticules sont réparties dans différents tubes Eppendorf de volume égal à 1,5 mL. Dans chaque tube, 20 mg de microparticules sont introduits dans 1 mL de la solution tampon. A ce pH, les esters d'acide gallique sont très solubles dans l'eau car les fonctions OH aromatiques sont déprotonées (pKa=8,16 pour le GO par exemple [7]) et les conditions « sink » sont éventuellement respectées. L'ensemble des tubes Eppendorf est mis sous agitation pendant plusieurs mois. Tous les 20 jours, l'agitation est arrêtée. Un des échantillons, de chaque lot de particules, est prélevé, centrifugé (mini centrifugeuse, 15 minutes à 13000 rpm/cycle), lavé 2 fois, congelé dans l'azote liquide, lyophilisé puis analysé par RMN <sup>1</sup>H (Figure 39-(b)) alors qu'un renouvellement du milieu de libération est appliqué aux autres échantillons.

Dans les conditions précédentes, l'hypothèse de la dégradation du PLA est envisageable et ne permet donc pas d'utiliser les signaux du PLA comme ceux d'une sonde interne. Nous avons alors utilisé une sonde externe pour doser la SA encapsulée dans les particules à un instant t donné. Ceci permet de remonter à la quantité libérée à l'instant t, à partir des 20 mg de particules introduites initialement, mais sans prendre en compte le PLA. Dans ce cas, le pic (b) de la SA sera comparé à un des pics caractéristiques du phénol utilisé ici comme référence. L'Eq. 17 est utilisée pour le calcul de la  $m_{SA-libérée/t}$  (Figure 39 (b)). Cependant, dans ces conditions, la  $m_{SA-encapsulée/t}$  sera définie par l'équation l'Eq. 18.

$$m_{MP-SA_{encapsulée/t}} = m_{ph} \cdot \left( \frac{A_a}{A_m} \right) \cdot \left( \frac{M_{SA}}{M_{ph}} \right) \quad \text{Eq. 18}$$

Avec :

$m_{MP-SA_{encapsulée/t}}$  : Masse de SA encapsulée dans les microparticules à l'instant t exprimée en mg ;

$m_{ph}$ : Masse de phénol introduite dans le volume de DMSO- $d_6$  utilisé pour dissoudre les microparticules analysées exprimée en mg ;

$A_a$  et  $A_m$ : Aires respectives des protons (a) de la SA (6,9 ppm pour GO et GN) et des protons (m) du phénol (7,15 ppm) ;

$M_{SA}$ : Masse molaire de la SA utilisée : 282,33 g/mol pour le GO et 296,36 g/mol pour le GN.

$M_{ph}$ : Masse molaire du phénol (94,11 g/mol).

## 2.4. Suivi de la dégradation du PLA par Chromatographie d'Exclusion Stérique

### 2.4.5. Principe de la SEC

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une chromatographie en phase liquide dans laquelle la phase stationnaire est un gel réticulé poreux disposé dans une colonne chromatographique et gonflé par la phase mobile. La séparation est basée sur la rétention sélective des macromolécules en solution en fonction de leur volume hydrodynamique. Le couplage de cette technique avec la diffusion de la lumière (SEC-MALLS) permet d'estimer les masses molaires moyennes des polymères sans avoir recours à un étalonnage, à condition que le  $dn/dc$  du polymère dans l'éluant soit connu.

La théorie de la diffusion de la lumière par des solutions de polymères émane des travaux de Debye et Zimm [8]. L'équation générale reliant l'intensité de la lumière diffusée par une solution diluée de polymère de masse molaire moyenne en masse  $\overline{M}_w$  à un angle  $\theta$  est la suivante :

$$\frac{KC}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{\overline{M}_w} \left( 1 + 2A_2C + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} R_g \sin^2 \frac{\theta}{2} \right)$$

$$K = \frac{4\pi^2 n^2}{\lambda N_A} \frac{dn}{dC} \quad \text{et} \quad \Delta R_\theta = \frac{I_\theta r^2}{I_0 V}$$

Avec :

$C$  : la concentration massique du polymère en solution

$A_2$ : le second coefficient de Viriel

$\lambda$  : la longueur d'onde incidente

$R_g$ : le rayon de giration moyen de la pelote macromoléculaire

$\theta$  : l'angle de mesure par rapport au rayon incident,

$N_A$ : le nombre d'Avogadro

$n$  : l'indice de réfraction du solvant,  $\Delta R_\theta$ : le rapport de Rayleigh

$I_\theta$ : l'intensité de la lumière diffusée par le volume  $V$ , mesurée à la distance  $r$  de l'échantillon et  $I_0$  l'intensité de la lumière incidente.

Dans notre étude, l'éluant est le THF. L'appareillage est constitué d'une pompe Waters 515 (débit = 1 mL/min), d'un dégazeur AF (waters in-line), d'une boucle d'injection de 100  $\mu$ L et d'une série de trois colonnes PLgel 5 $\mu$ m, 300 mm 7,5 mm, (10<sup>2</sup> Å, 10<sup>3</sup> Å, 10<sup>4</sup> Å) avec une pré-colonne de même type. Un détecteur de diffusion de la lumière de modèle mini Dawn Treos (Wyatt Technology Corporation) ( $\lambda = 658$  nm) est situé à la sortie des colonnes. Il est constitué de trois photodiodes qui mesurent l'intensité diffusée à 45, 90 et 140°. Un réfractomètre différentiel de type OPTILAB rex (Wyatt Technology Corporation) est également installé en série. L'appareil est équipé d'un passeur d'échantillon de type Waters 2707 et d'un régulateur de température qui permet de faire les analyses à 40 °C.

#### **2.4.6. Procédures expérimentales**

Une masse donnée de microparticules est récupérée puis dissoute dans le THF de manière à avoir des solutions de polymère de concentration égale à 5 g/L. Les solutions analysées par SEC sont préparées la veille dans le THF, puis filtrées sur des filtres Millex HA de 0,2  $\mu$ m. Le dn/dc utilisé est égal à 0,054 L/g.

Ces analyses nous ont permis de déterminer les masses molaires moyennes du PLA et d'apprécier sa dégradation éventuelle au cours des 4 mois de suivi de la libération.

### **2.5. Répétabilité des résultats et estimation des erreurs expérimentales**

#### **2.5.5. Répétabilité**

Les expériences effectuées au cours de cette thèse ont toutes été réalisées au moins deux fois dans des conditions identiques. Les résultats présentés dans ce manuscrit sont donc relatifs aux moyennes des résultats obtenus pour chaque expérience refaite au moins deux fois.

### 2.5.6. Incertitude sur le taux de recouvrement

L'incertitude sur les valeurs du taux de recouvrement a été estimée à partir d'un calcul faisant intervenir l'erreur expérimentale sur la masse de DexC<sub>6-τ</sub> (g/gPLA) ainsi que sur la surface spécifique.

Le taux de recouvrement est défini par l'Eq. 10. L'incertitude relative sur le taux de recouvrement est exprimée par l'Eq. 19.

$$\frac{\Delta(\Gamma)}{\Gamma} = \frac{\Delta(m_{DexC_{6-\tau}}(mg / gPLA))}{m_{DexC_{6-\tau}}(mg / gPLA)} + \frac{\Delta(Sp)}{Sp} \quad \text{Eq. 19}$$

Avec

$m_{DexC_{6-\tau}}(mg / gPLA)$  : définie par l'Eq. 9.

$Sp$  : surface spécifique et est égale à  $Sp = \frac{6}{d \cdot D[3,2]}$  (Cf. 2.2.4.1.3).

L'incertitude sur le taux de recouvrement peut alors être exprimée comme suit :

$$\frac{\Delta(\Gamma)}{\Gamma} = \frac{\Delta(A_{Ha})}{A_{Ha}} + \frac{\Delta(A_L)}{A_L} + \frac{\Delta(D[3,2])}{D[3,2]} \quad \text{Eq. 20}$$

Avec :  $\frac{\Delta(A_{Ha})}{A_{Ha}}$  : Incertitude relative sur l'aire du pic H anomère du dextrane modifié (Ha) correspondant à l'erreur expérimentale de la RMN <sup>1</sup>H : +/- 0,025.

$\frac{\Delta(A_L)}{A_L}$  : Incertitude relative sur l'aire du pic (L) du PLA correspondant à l'erreur expérimentale de la RMN <sup>1</sup>H : +/- 0,025.

$\frac{\Delta(D[3,2])}{D[3,2]}$  : Incertitude relative à la mesure du diamètre moyen en surface par granulométrie : +/- 0,10.

L'incertitude absolue est définie à partir de l'Eq. 20 :

$$\Delta(\Gamma) = 0,15 \cdot \Gamma \quad \text{Eq. 21}$$

Au cours de ces travaux de thèse la valeur maximale obtenue pour des taux de recouvrement non surestimés est égale à 3,5 mg/m<sup>2</sup> et la valeur minimale est de 2 mg/m<sup>2</sup>.

L'incertitude relative est alors comprise entre :

$$0,3 \leq \Delta(\Gamma) \leq 0,525$$

L'incertitude relative par rapport au taux de recouvrement sera maintenue égale à sa limite supérieure :  $\Delta(\Gamma) = 0,5$  pour tous les résultats présentés dans ce manuscrit.

### 2.5.7. Cinétiques de libération : barres d'erreurs

Pour les courbes de cinétique de libération, les limites des barres d'erreurs représentées sont estimées à partir d'un calcul d'incertitude, sur les % de SA libérées, faisant intervenir l'erreur expérimentale relative à la RMN <sup>1</sup>H.

Le calcul de l'incertitude absolue sur le % de SA libérée est détaillé ci-dessous.

Le % de SA libérée est définie comme suit :

$$\%SA_{libérée/t} = \frac{m_{SAlibérée/t}}{m_{SAencapsulée/t_0}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 22}$$

Estimer l'incertitude sur le %SA<sub>libérée/t</sub> revient à estimer l'incertitude absolue de  $\frac{m_{SAlibérée/t}}{m_{SAencapsulée/t_0}}$ .

L'incertitude relative est alors calculée de la manière suivante :

$$\Delta \left( \frac{m_{SAlibérée/t}}{m_{SAencapsulée/t_0}} \right) = \left( \frac{\Delta(m_{SAlibérée/t})}{m_{SAlibérée/t}} + \frac{\Delta(m_{SAencapsulée/t_0})}{m_{SAencapsulée/t_0}} \right) \cdot \frac{m_{SAlibérée/t}}{m_{SAencapsulée/t_0}} \quad \text{Eq. 23}$$

Il est à noter que l'incertitude relative calculée pour la masse de SA (indifféremment pour SA encapsulée ou libérée) peut s'exprimer sous la forme suivante :

$$\frac{\Delta(m_{SA})}{m_{SA}} = \frac{\Delta(A_a)}{A_a} + \frac{\Delta(A_L)}{A_L} + \frac{\Delta(m_{PLA})}{m_{PLA}} \quad \text{Eq. 24}$$

Avec :  $\frac{\Delta(m_{PLA})}{m_{PLA}}$  : Incertitude relative sur la masse du PLA (erreur de la balance), pour simplifier

les calculs nous allons négliger ce paramètre.

$\frac{\Delta(A_a)}{A_a}$  : Incertitude relative sur l'aire du pic (a) de la SA correspondant à l'erreur

expérimentale de la RMN  $^1\text{H}$  : +/- 0,025.

$\frac{\Delta(A_L)}{A_L}$  : Incertitude relative sur l'aire du pic (L) du PLA correspondant à l'erreur

expérimentale de la RMN  $^1\text{H}$  : +/- 0,025.

L'incertitude absolue peut alors s'exprimer à partir de l'Eq. 24 par :

$$\Delta(m_{SA}) = 0,05.m_{SA} \quad \text{Eq. 25}$$

En utilisant l'Eq. 25, le développement de l'Eq. 23 permet de calculer l'incertitude absolue

relative au rapport  $\frac{m_{SAlibérée t}}{m_{SAencapsulée t_0}}$  :

$$\Delta\left(\frac{m_{SAlibérée t}}{m_{SAencapsulée t_0}}\right) = 0,1 \quad \text{Eq. 26}$$

L'incertitude relative ou l'erreur évaluée par rapport au %SA encapsulée est alors égale à  $\pm 10\%$ .

Les limites des barres d'erreurs présentées sur les courbes de libération sont alors définies de la manière suivante :

- Limite inférieure = %SA - 10%
- Limite supérieure = %SA + 10%

### 3. Références bibliographiques

1. Laville, M., *Nanoparticules polymères de deuxième et troisième générations pour des applications thérapeutiques anti-cancer et anti-HIV*, 2013. Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine, France.
2. Rotureau, E., *Dextranes amphiphiles : adsorption aux interfaces liquide/liquide et application à la stabilisation d'émulsion*. Thèse de doctorat de l'Institut Nationale Polytechnique de Lorraine, France.
3. Shin, Y., S. Han, J.S. Jeon, K. Yamamoto, I.K. Zervantonakis, R. Sudo, R.D. Kamm, and S. Chung, *Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels*. Nat. Protocols, 2012. **7**(7): p. 1247-1259.
4. McDonald, J.C. and G.M. Whitesides, *Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices*. Accounts of Chemical Research, 2002. **35**(7): p. 491-499.
5. Deshiikan, S.R. and K.D. Papadopoulos, *Modified Booth equation for the calculation of zeta potential*. Colloid and Polymer Science, 1998. **276**(2): p. 117-124.
6. Long, J.A., D.W.J. Osmond, and B. Vincent, *The equilibrium aspects of weak flocculation*. Journal of Colloid and Interface Science, 1973. **42**(3): p. 545-553.
7. Boyd, I. and Beveridge. E.G., *Relationship between the antibacterial activity towards Escherichia coli NCTC 5933 and the physico-chemical properties of some esters of 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (Gallic acid)*. Microbios, 1979. **24**(97-98): p. 173-184.
8. Wyatt, P.J., *Light-scattering and the absolute characterization of macromolecules*. Analytica Chimica Acta, 1993. **272**(1): p. 1-40.





# Chapitre 3

*Elaboration et  
caractérisation de  
particules de PLA par des  
procédés discontinus*



## Table de matière

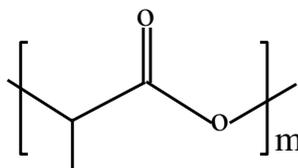
<b>3.1. Introduction et objectifs</b> .....	<b>147</b>
<b>3.2. Préparation de nanoparticules</b> .....	<b>150</b>
<b>3.2.1. Nanoprécipitation</b> .....	<b>150</b>
3.2.1.1. Mise au point de la nanoprécipitation .....	151
3.2.1.2. Préparation de nanoparticules de PLA en présence de DexC <sub>6</sub> -τ.....	153
<b>3.2.2. Emulsion-évaporation de solvant</b> .....	<b>161</b>
3.2.2.1. Elaboration des nanoparticules par E-ES.....	161
3.2.2.2. Caractérisation des nanoparticules de PLA obtenues.....	162
<b>3.3. Etude paramétrique de procédés pour l'obtention de microparticules</b> .....	<b>163</b>
<b>3.3.1. Précipitation</b> .....	<b>164</b>
<b>3.3.2. Emulsion-évaporation de solvant (E-ES)</b> .....	<b>166</b>
3.3.2.1. Emulsification avec les ultrasons.....	166
3.3.2.2. Emulsification par agitation mécanique .....	176
<b>3.4. Conclusion</b> .....	<b>188</b>
<b>3.5. Références bibliographiques</b> .....	<b>191</b>



### 3.1. Introduction et objectifs

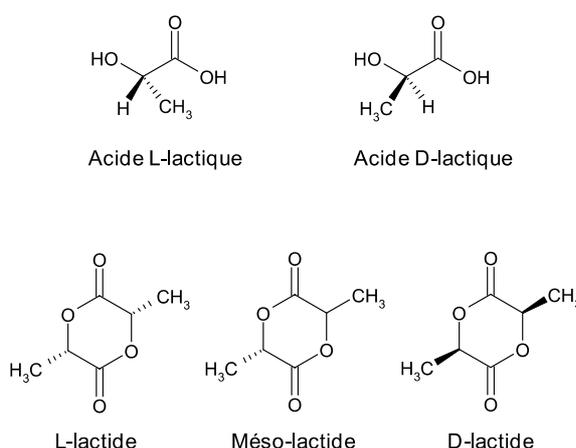
L'objectif du travail présenté dans ce chapitre est de définir les conditions de préparation de nanoparticules (diamètres entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$ ) et de microparticules (diamètres entre 1  $\mu\text{m}$  et 1000  $\mu\text{m}$ ) de PLA recouvertes par une couche hydrophile de dextrane. Une fois l'élaboration de ces particules maîtrisée, ces particules seront utilisées pour encapsuler l'acide gallique et ses esters (Cf. Chapitre 5).

Le PLA (Figure 50) est un polyester aliphatique qui peut être obtenu selon deux voies. D'une part, on a l'acide lactique racémique (un mélange 50/50 des énantiomères L- et D-) qui est obtenu par voie pétrochimique à partir de ressources non renouvelables. D'autre part, on a la voie fermentaire à partir de ressources renouvelables, telles que l'amidon et les sucres simples [1].



**Figure 50: Unité de répétition du PLA**

Les deux isomères L et D de l'acide lactique permettent de synthétiser 3 dimères cycliques différents (Figure 51).

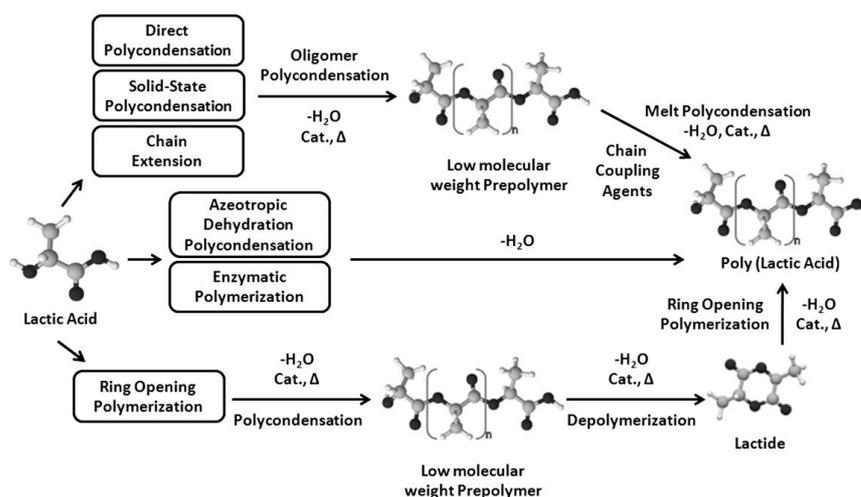


**Figure 51: Structure des différents isomères L et D de l'acide lactique ainsi que des dimères correspondants.**

L'acide lactique obtenu peut être utilisé comme monomère pour l'obtention de PLA par

polycondensation. Cependant, les polymères obtenus par cette voie sont limités à de faibles masses molaires moyennes.

Par dépolymérisation des oligomères de PLA, le lactide (dimère cyclique de l'acide lactique) est formé. Des PLA de masses molaires moyennes plus élevées peuvent ensuite être obtenus par polymérisation par ouverture de cycle du lactide [2, 3] .



**Figure 52: Méthodes de synthèse du PLA [4].**

Différents types de PLA avec des proportions variables en unité monomère L et D peuvent être obtenus. Le rapport en unité monomère L sur D a un effet sur les propriétés macromoléculaire du PLA synthétisé. En effet, ce rapport modifie la cristallinité du PLA, sa température de transition vitreuse ( $T_g$ ), sa température de fusion ( $T_f$ ) ainsi que le choix du procédé de mise en forme du polymère [5, 6].

Le PLA présente plusieurs avantages. Mis à part sa haute tenue mécanique et son aptitude à être thermoformé, il se trouve que c'est un polymère biocompatible et biodégradable. Pour cela, ces dernières années, l'intérêt porté à ce polymère ne cesse d'augmenter. Son domaine d'application s'étend de l'industrie de l'emballage aux applications biomédicales (sutures, implants, libération contrôlée...).

La dégradation enzymatique du PLA est connue. Cependant, sa dégradation par l'eau est bien plus rapide. La vitesse de dégradation du PLA dépend de nombreux paramètres (masse molaire, taux de cristallinité, pH et température du milieu dans lequel s'effectue l'hydrolyse) [3, 7]. La taille des objets constitués de ce polymère a également une influence sur la vitesse de dégradation du polymère. La dégradation des objets de petites dimensions (fils, nanoparticules) est bien contrôlée, alors que la dégradation des objets de plus grande taille (supérieur au mm)

(vis, plaques) est plus complexe. Ainsi, dans le cas d'objets massifs, la dégradation est plus rapide à l'intérieur qu'en surface. Ce phénomène est appelé dégradation hétérogène. Dans tous les cas, une fois que l'objet est placé dans un milieu aqueux, l'eau commence à pénétrer et des liaisons ester sont clivées par hydrolyse, conduisant à la formation d'extrémités acide carboxylique et d'acide lactique qui contribuent à l'acidification du milieu et autocatalysent la réaction hydrolytique [8, 9]. Concernant l'hydrolyse en surface, du PLA, l'autocatalyse est lente car les extrémités acides carboxyliques formées peuvent être neutralisées par le milieu tamponné environnant, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. En ce qui concerne l'hydrolyse à l'intérieur d'objets de taille nanométrique, les produits de dégradation (monomère, dimère, trimère, etc.) formés au cœur peuvent facilement diffuser et se solubiliser dans le milieu environnant, ce qui limite l'autocatalyse. Au contraire, l'autocatalyse s'exprime intégralement au cœur d'objets plus massifs, ce qui se traduit par une différenciation surface/intérieur de l'objet. L'acide lactique formé s'accumule au cœur de l'objet et l'autocatalyse s'accélère [10]. Cette différenciation s'amplifie au fur et à mesure de la dégradation, et, à la fin, les macromolécules de l'intérieur sont toutes réduites à des oligomères solubles qui migrent à travers la couche superficielle pour ne laisser qu'une coquille vide. Cette dernière continue alors à se dégrader à faible vitesse.

Compte tenu de l'application visée, le PLA a donc été choisi pour des raisons évidentes de biodégradabilité et de biocompatibilité de ses produits de dégradation [4, 11, 12].

L'utilisation des dérivés amphiphiles du dextrane pour la modification de surfaces hydrophobes et la formulation de nanoparticules à surface hydrophile a été étudiée au laboratoire et elle est très utilisée pour la formulation de nanoparticules à visée thérapeutiques essentiellement [13-20]. Dans le contexte de ce travail, les polymères amphiphiles obtenus par modification chimique du dextrane présentent aussi l'intérêt de comporter de nombreux groupements hydroxyle réactifs au sein des chaînes, qui pourront ensuite être mis à profit pour fixer ces particules de façon covalente sur des supports.

Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur la définition des conditions d'élaboration de particules à l'échelle du laboratoire, c'est-à-dire de volumes de suspensions de l'ordre de 10 mL. La question de la transposition de certains modes opératoires à une échelle supérieure (1 L) sera abordée au chapitre 6.

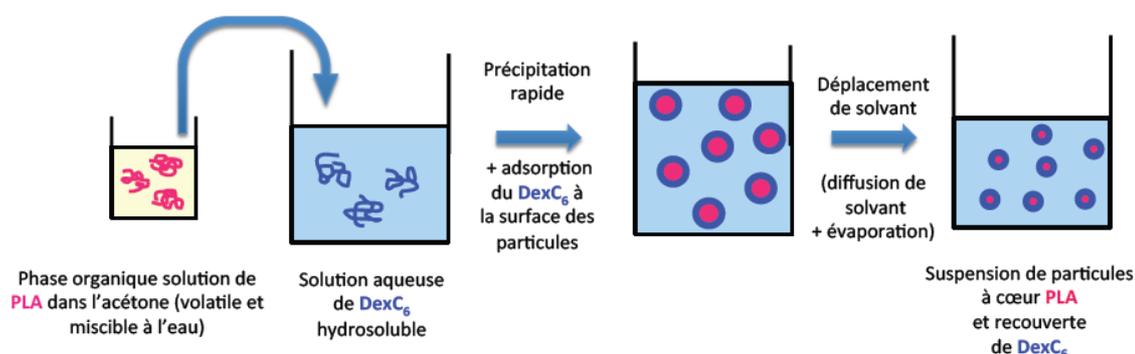
Comme nous avons pu le voir dans le chapitre consacré à l'état de l'art (Cf. chapitre bibliographique), les principaux procédés physico-chimiques utilisés pour l'obtention de ces particules sont basés, soit sur des méthodes de précipitation par diffusion de solvant, soit sur des méthodes d'émulsification H/E suivie de l'évaporation du solvant. Concernant cette seconde

méthode, selon le domaine de tailles de particules visé, l'émulsification peut être réalisée soit sous l'action d'ultrasons, soit sous l'action d'un cisaillement mécanique.

## 3.2. Préparation de nanoparticules

### 3.2.1. Nanoprécipitation

Nous avons d'abord opté pour la nanoprécipitation, méthode qui permet de fabriquer des particules submicroniques avec une agitation mécanique peu intense [21-23]. Le PLA qui forme le cœur de la particule est dissous dans l'acétone. Cette solution est ensuite additionnée goutte à goutte sous agitation modérée à une solution aqueuse dans laquelle est solubilisé le DexC<sub>6</sub>. La diffusion spontanée de l'acétone dans la phase aqueuse entraîne une précipitation du polymère et l'adsorption du DexC<sub>6</sub> en surface des particules. L'acétone est ensuite éliminée par évaporation au « Thermoshake ». Une suspension de nanoparticules de PLA recouvertes de chaînes de dextrane est alors obtenue (Figure 53).



**Figure 53: Préparation des nanoparticules par nanoprécipitation.**

L'acétone est un solvant classiquement utilisé pour la nanoprécipitation du PLA. Toutefois, le choix de l'acétone comme solvant est aussi fondé sur le fait que les molécules qui seront encapsulées (esters aliphatiques de l'acide gallique) y sont solubles. Nous reviendrons sur ce point au chapitre 5.

### 3.2.1.1. Mise au point de la nanoprécipitation

Le principe de la nanoprécipitation est bien décrit dans la littérature [21-24]. Nous avons en premier défini les conditions opératoires permettant d'obtenir des suspensions de nanoparticules aux caractéristiques répétables et avec des distributions granulométriques monomodales.

Dans ce but, le dispositif expérimental (Figure 54) a été mis au point. Dans un premier temps, ces expériences ont été faites en utilisant un échantillon commercial de PVA (poly(alcool vinylique)) comme stabilisant macromoléculaire en lieu et place du DexC<sub>6</sub>.

#### 3.2.1.1.1. Dispositif de la nanoprécipitation

La phase aqueuse contenant le stabilisant macromoléculaire est maintenue sous agitation dans un bécher. La solution organique de PLA dans l'acétone est injectée dans la phase aqueuse à l'aide d'une seringue. Cette dernière est fixée sur un pousse seringue qui permet de maintenir le débit d'injection égal à 0,3 mL/min (Figure 54).

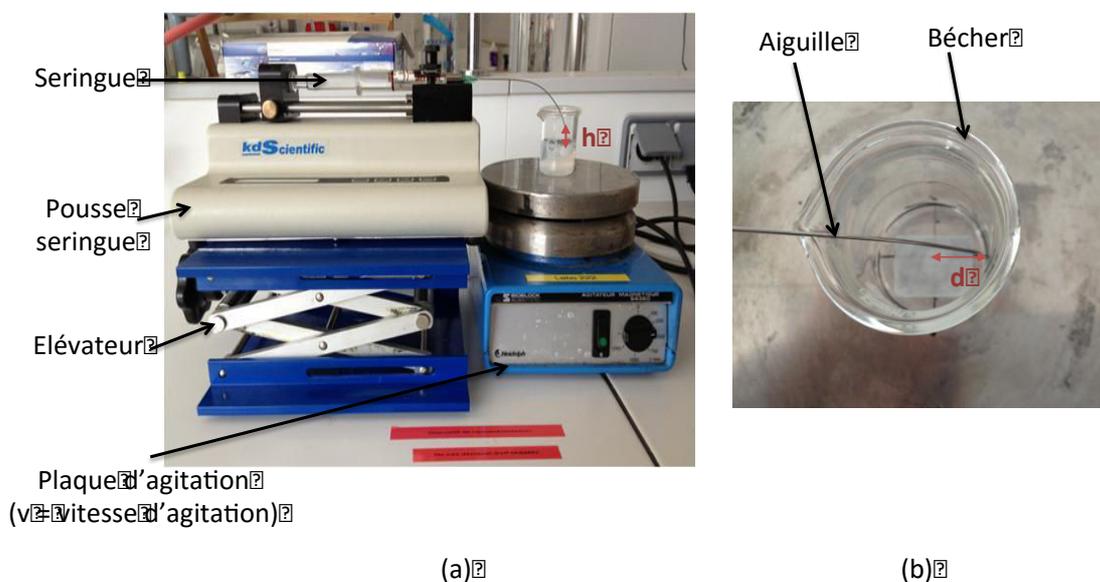


Figure 54: (a) Dispositif expérimental de nanoprécipitation (b) vue de dessus du bécher.

#### 3.2.1.1.2. Etude paramétrique de la nanoprécipitation

Dans cette partie, nous garderons inchangés les dimensions du bécher (volume égal à 25 mL et diamètre égal à 28 mm), la taille du barreau magnétique (25 mm), le débit d'injection de la solution organique (0,3 mL/min), le volume de phase aqueuse (10 mL), la concentration du PLA

dans la phase organique (10 mg/mL), le volume de phase organique (5 mL) et la concentration en PVA (10 g/L).

Les paramètres que nous avons fait varier sont :

- la distance (d) entre le centre du bécher et la pointe de l'aiguille (Figure 54-b).
- la position (h) qui représente la distance entre la pointe de l'aiguille et la surface du liquide (phase aqueuse) (Figure 54-a).
- la vitesse (v) de rotation du barreau magnétique (Figure 54-a).

En maintenant la vitesse de rotation du barreau magnétique égale à 250 rpm et en opérant avec une aiguille plongeant dans la phase aqueuse à une distance (h) égale à -2 cm par rapport à la surface de la phase aqueuse, l'influence de la position (d) de la pointe de l'aiguille a été testée. Aucune modification significative de la taille des particules n'a été observée (Tableau 15). Le Span (Cf.chapitre 2 - paragraphe 2.2.4.1) des distributions granulométriques est de l'ordre de 1, ce qui traduit une distribution des tailles de particules monomodale.

**Tableau 15 : Diamètres caractéristiques et Span des distributions de tailles de nanoparticules de PLA recouvertes de PVA en fonction de la position (d) de l'aiguille dans le bécher et en fonction de la hauteur (h) de l'aiguille dans le bécher. Pour les autres conditions voir texte.**

d (cm)	h (cm)	Position de l'aiguille	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span
1,2	-2	Près de la paroi du bécher	137	121	1,06
0,9	-2	Entre la paroi du bécher et le vortex	133	114	1,16
	-2	Plongée dans la solution	133	114	1,16
0,9	+1	Au-dessus de la solution	187	172	0,96
0,0	-2	Au centre du vortex	154	138	1,01

L'étude de l'influence de la hauteur h de l'aiguille sur la distribution des tailles et la taille moyenne des particules a été réalisée avec la vitesse d'agitation du barreau égale à 250 rpm et la distance d égale à 0,9 cm.

Les tailles des particules sont légèrement plus élevées quand l'injection se fait avec la pointe de l'aiguille située au-dessus de la phase aqueuse (Tableau 15). Une faible évaporation de l'acétone lorsque la pointe de l'aiguille est à l'extérieur de la phase aqueuse pourrait justifier cette variation. A partir de ces résultats, la position de l'aiguille a été fixée à h = -2 cm (aiguille plongeant dans la solution).

Deux valeurs de vitesse d'agitation ont été testées : 250 rpm et 500 rpm. Au-delà de 500 rpm, la formation de mousse est importante et les résultats obtenus ne sont plus reproductibles

(Tableau 16). La distribution des tailles des particules obtenues reste inchangée. Ces résultats nous permettent de mieux cerner le rôle de l'agitation mécanique dans le procédé de nanoprécipitation.

Cette agitation doit permettre une circulation rapide du fluide de façon à ce que l'interdiffusion de l'eau et de l'acétone conduise à la formation de nanoparticules dispersées dans l'ensemble du volume. Ainsi, la probabilité de collision entre particules en formation ou non recouvertes par le stabilisant DexC<sub>6</sub> se trouve minimisée. Par contre, la taille des particules individuelles formées par nanoprécipitation n'est pas influencée par cette vitesse d'agitation car les contraintes de cisaillement correspondantes sont bien trop faibles.

**Tableau 16: Diamètres caractéristiques et Span des suspensions de nanoparticules de PLA recouvertes de PVA en fonction de la vitesse d'agitation. Pour les autres conditions voir texte.**

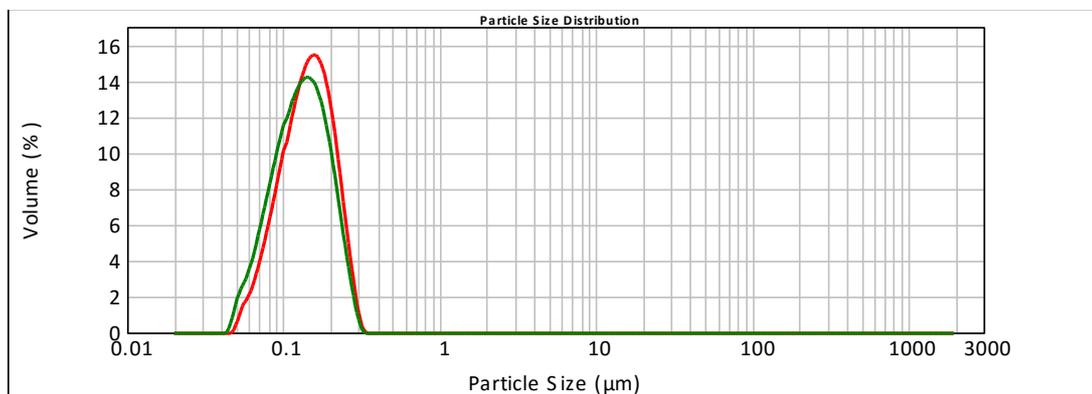
Vitesse d'agitation (rpm)	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span
250	133	114	1,16
500	130	117	1,05

Dans la suite de notre travail, les valeurs de d, h, et v seront fixées respectivement à 0,9 cm, -2 cm et 500 rpm.

### 3.2.1.2. Préparation de nanoparticules de PLA en présence de DexC<sub>6</sub>-τ

Les conditions opératoires définies précédemment ont été utilisées pour élaborer des nanoparticules recouvertes de dextrane modifié (DexC<sub>6</sub>-τ). La distribution des tailles de particules obtenue après évaporation de l'acétone en utilisant le DexC<sub>6</sub>-16 comme stabilisant est parfaitement superposable avec celle obtenue en utilisant le PVA (Figure 55).

Ce résultat est conforme à ce que l'on trouve dans la littérature, à savoir que la taille des particules produites par nanoprécipitation dépend essentiellement de la nature du polymère et de celle du solvant. Le rôle du stabilisant est avant tout de s'adsorber suffisamment vite à la surface des particules formées de façon à empêcher leur agrégation. La nature exacte du stabilisant n'a pas d'impact significatif sur la taille des particules individuelles. Dans le but de confirmer ce résultat, nous avons utilisé différents polymères amphiphiles dérivés du dextrane et différant par leur taux de substitution.



**Figure 55: Distributions de tailles des nanoparticules de PLA élaborées par nanopréciipitation en utilisant le **DexC<sub>6</sub>-16** ou le **PVA** comme stabilisant** (*phase organique : PLA (10 g/L) dans 5 ml d'acétone, phase aqueuse : stabilisant (10 g/L) dans 10 mL d'eau, débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse 0,3 mL/min,  $d = 0,9$  cm ;  $h = -2$  cm ; vitesse d'agitation = 500 rpm*).

### 3.2.1.2.1. Influence du taux de modification $\tau$ du DexC<sub>6</sub>- $\tau$

Des études précédentes du laboratoire ont démontré que les DexC<sub>6</sub> possèdent des propriétés tensioactives d'autant plus marquées que  $\tau$  augmente [16, 25].

Nous nous sommes intéressés à l'influence du taux de modification du dextrane sur la taille des particules élaborées par nanopréciipitation. La concentration du DexC<sub>6</sub>- $\tau$  dans la phase aqueuse a été fixée à 10 g/L (Tableau 17).

Comme nous pouvons le constater aucune variation notable des caractéristiques des objets n'a été observée avec la variation de  $\tau$  entre 14 et 21 %. Nous pouvons également remarquer que dans tous les cas, des distributions monomodales sont obtenues (Span~1). Les tailles des nanoparticules mesurées par granulométrie ne sont pas significativement différentes. Ceci confirme le résultat du paragraphe précédent, c'est-à-dire que le caractère tensioactif du stabilisant utilisé dans la nanopréciipitation n'est pas un paramètre qui, dans le groupe de polymères examinés, contrôle la taille des particules formées.

**Tableau 17 : Diamètres caractéristiques, Span et taux de recouvrement en fonction du taux de modification du dextrane modifié** (phase organique : PLA (10 g/L) dans 5 mL d'acétone, phase aqueuse : DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (10 g/L) dans 10 mL d'eau, débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse 0,3 mL/min ;  $d = 0,9$  cm;  $h = -2$  cm; vitesse d'agitation = 500 rpm).

$\tau$	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	$\Gamma \pm 0,5$ (mg/m <sup>2</sup> )
14	148	127	1,10	2,3
16	143	130	0,97	2,2
17	158	139	0,98	2,5
21	141	130	0,89	2,8

Ce résultat est important car, comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe décrivant la synthèse de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (Cf. chapitre 2 - paragraphe 2.2.1.2), les taux de modification  $\tau$  du dextrane (représentant le nombre de chaînes alkyles greffés par 100 unité glucose) sont difficilement contrôlables. Pour des conditions de synthèse voisines,  $\tau$  varie de 14 à 23 %. En pratique cela signifie qu'une certaine variabilité dans la production de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  ne doit pas impacter les caractéristiques des suspensions de nanoparticules produites par ce procédé.

Les taux de recouvrement des particules ont également été comparés et s'avèrent identiques à la précision expérimentale près (Tableau 17). Cette caractéristique dépend certainement de la nature exacte du stabilisant macromoléculaire. Cependant, pour une série homologue de polymères amphiphiles telle que celle utilisée dans ces expériences, la différence n'est pas significative.

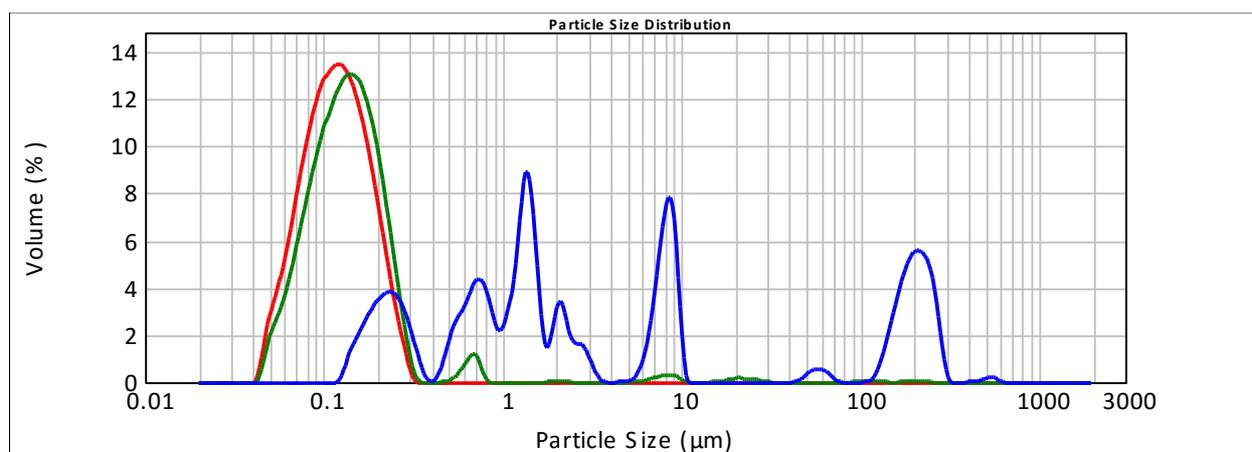
### 3.2.1.2.2. Récupération et conditionnement final des nanoparticules

Après élaboration, les nanoparticules sont lavées par centrifugation afin d'éliminer le DexC<sub>6</sub>- $\tau$  non adsorbé sur leur surface. Comme l'adsorption des dextrans amphiphiles est cinétiquement quasi-irréversible (cas de nombreux polymères amphiphiles), ces lavages ne modifient pas la quantité de polymère recouvrant la surface des particules. Les procédures expérimentales utilisées pour le lavage et la centrifugation des particules sont décrites dans le chapitre matériels et méthodes (paragraphe 2.2.3.1). Les nanoparticules centrifugées sont ensuite redispersées pendant 20 minutes aux ultrasons dans 10 mL d'eau. Les distributions des tailles de particules avant et après lavages sont superposables ce qui montre qu'une bonne redispersion est assurée et

confirme que la surface des particules est toujours recouverte d'une couche de polymère amphiphile (Figure 56).

Un conditionnement final des nanoparticules est également indispensable afin qu'elles puissent être utilisées ultérieurement comme vecteur de SA (Cf.chapitre 5). En effet, la conservation de suspensions aqueuses de nanoparticules renfermant une SA est difficilement envisageable en raison des risques importants de diffusion de la molécule active dans le surnageant et aussi du fait des volumes importants que cela représente. Une congélation rapide (dans l'azote liquide) suivie d'une lyophilisation permettra ainsi de stopper la diffusion et de figer la composition du système, en obtenant des nanoparticules sous forme solide. Cependant, il est nécessaire que les nanoparticules se redispersent facilement après ce traitement. Or une agrégation et irréversible des particules a été observée lors des essais de redispersion dans l'eau (Figure 56).

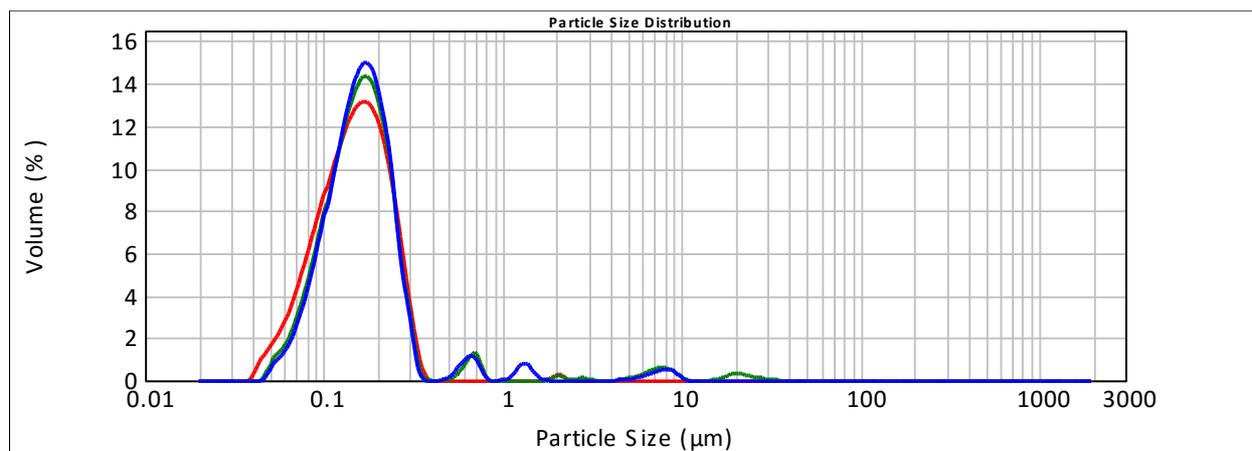
Cet effet peut-être expliqué par le fait que, pendant la congélation brutale de la solution aqueuse par l'azote liquide, l'eau se cristallise brusquement en amenant les particules à se concentrer dans la zone non cristallisée. La concentration en particules y augmente au fur et à mesure de la congélation jusqu'à induire une agrégation irréversible des particules.



**Figure 56: Distributions granulométriques de suspensions de nanoparticules de PLA élaborées par nanopréciipitation avant lavage, après lavage, après lyophilisation et redispersion** (phase organique : [PLA] = 10 g/L dans 5 mL d'acétone, phase aqueuse : [DexC<sub>6-14</sub>] = 10g/L dans 10 mL H<sub>2</sub>O débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse 0,3 mL/min, d = 0,9 cm; h = -2 cm; vitesse d'agitation=500 rpm).

Pour obtenir une redispersion parfaite des suspensions après lyophilisation, il est nécessaire d'ajouter un cryoprotecteur tel que le tréhalose (10 mg/mL de suspension) avant la lyophilisation (Figure 57) [26, 27]. Le cryoprotecteur établit de nombreuses liaisons hydrogène avec l'eau ainsi qu'avec la couche superficielle de dextrane. Les interactions entre le sucre et l'eau conduisent à

une phase amorphe congelée, [26, 27]. Les interactions entre les molécules de cryoprotecteur et la couche superficielle de dextrane vont limiter les interactions entre particules et faciliter la redispersion.



**Figure 57 : Distributions granulométriques de suspensions de nanoparticules de PLA élaborées par nanopréciipitation avant lavage, après lavage, après lyophilisation et redispersion en présence de tréhalose (10mg /mL de suspension) ([PLA] = 10 g/L dans 5 mL d'acétone, [DexC<sub>6-14</sub>] = 10 g/L dans 10 mL H<sub>2</sub>O, débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse, d, h, et vitesse d'agitation fixés respectivement à 0,3 mL/min, 0,9 cm, -2 cm et 500 rpm).**

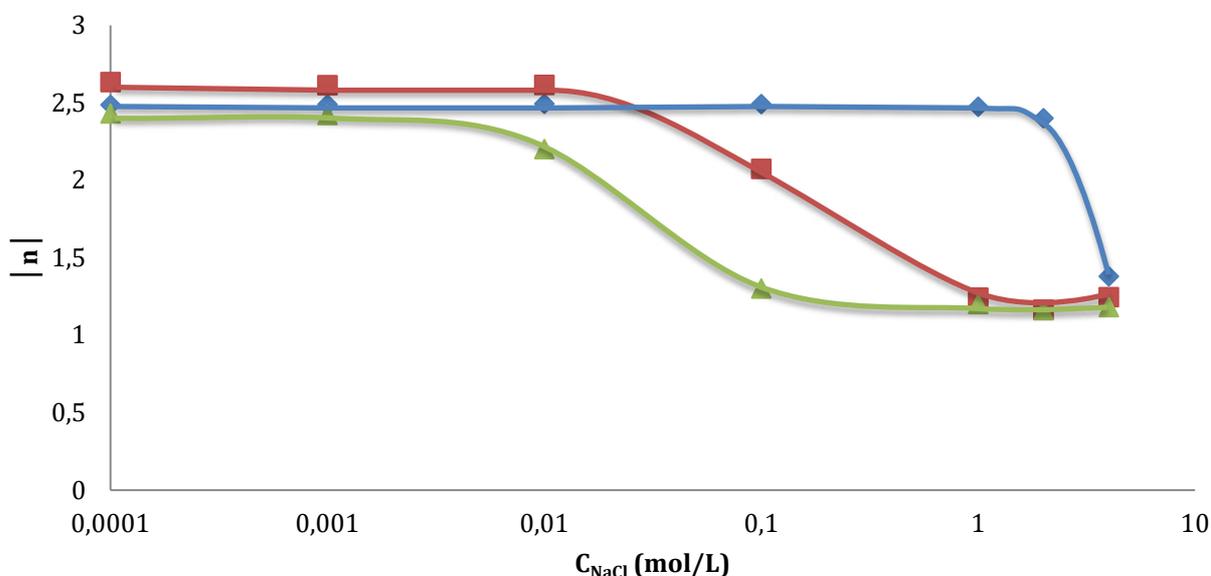
Dans ce travail, nous n'avons pas examiné l'influence de la quantité de tréhalose ajoutée à la suspension sur la distribution des tailles de particules obtenue après redispersion. Cependant, les résultats de la littérature indiquent que des quantités moins importantes pourraient être suffisantes [26, 28].

### 3.2.1.2.3. Stabilité colloïdale des nanoparticules de PLA

Les particules colloïdales dispersées dans un milieu sont toujours sujettes à un mouvement brownien et les collisions entre les particules qui en résultent sont fréquentes ce qui peut affecter leur stabilité. C'est une caractéristique importante pour l'application de libération contrôlée. Ainsi, la dispersion doit être aussi bien stable au stockage que lors de son utilisation. Cette stabilité colloïdale est reliée notamment à l'état de surface de la particule et à la force ionique du milieu de dispersion. Elle résulte d'un équilibre entre les forces attractives de Van der Waals et les forces répulsives existant entre les particules lorsque celles-ci se rapprochent [29]. Quand les forces attractives dominent, les particules adhèrent les unes aux autres et la dispersion floccule. Par contre, le système se maintient à l'état dispersé, si les forces répulsives sont suffisamment importantes. Alors que les forces de Van der Waals sont toujours attractives entre des particules

de même composition, la répulsion entre particules peut provenir de deux effets : répulsion électrostatique pour des particules de charge identique et répulsion stérique lorsqu'une couche de polymère est présente à la surface des particules. Pour que cette stabilisation stérique soit effective, cette couche de polymère en surface doit être suffisamment épaisse pour maintenir les particules à une distance supérieure à la portée des forces de van der Waals (plus généralement des interactions attractives quelles qu'elles soient).

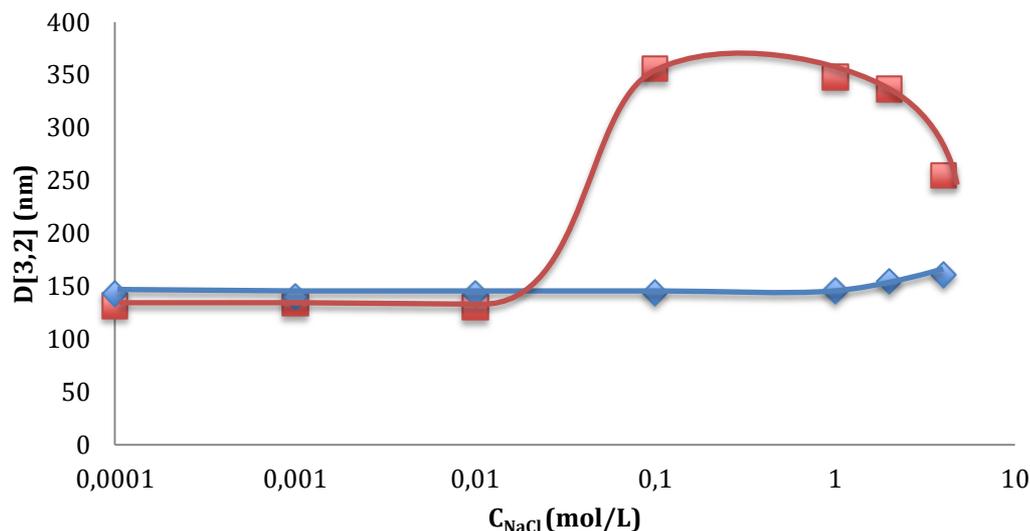
La stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules de PLA a été étudiée par turbidimétrie (spectroscopie UV-visible entre 450 nm et 650 nm) dans des solutions aqueuses de NaCl avec différentes forces ioniques (Figure 58). La turbidité des suspensions colloïdales peut être reliée à leur densité optique (DO). Celle-ci a donc été suivie en fonction de la concentration en NaCl dans le milieu dispersant. Cette étude permet d'obtenir le paramètre  $|n|$  (Cf. chapitre 2 - paragraphe 2.2.5.3) qui permet de détecter une variation de la taille des particules et leur floculation.



**Figure 58: Stabilité colloïdale de suspensions de nanoparticules de PLA élaborées par nanopréciipitation et recouvertes: (◆) de DexC<sub>6</sub>-17 ou (■) de DexC<sub>6</sub>-21 ou non recouvertes de dextrane modifié (▲) ( $[PLA] = 10$  g/L dans 5 mL d'acétone,  $[DexC_6-14] = 10$  g/L dans 10 mL H<sub>2</sub>O, débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse,  $d$ ,  $h$ , et vitesse d'agitation fixés respectivement à 0,3 mL/min, 0,9 cm, - 2 cm et 500 rpm).**

Dans le but de confirmer la relation directe entre le paramètre  $|n|$  et la taille des nanoparticules, des mesures granulométriques ont été réalisées pour les échantillons de nanoparticules de PLA recouvertes de DexC<sub>6</sub>-17 et celles recouvertes de DexC<sub>6</sub>-21 dont la stabilité dans les solutions salines a été suivie par turbidimétrie (Figure 59). Nous pouvons ainsi

voir qu'une augmentation du diamètre moyen en surface est observée à partir d'une concentration en NaCl égale à  $10^{-2}$  M et de 1 M respectivement pour les suspensions de nanoparticules recouvertes de DexC<sub>6</sub>-21 et DexC<sub>6</sub>-17. Ceci confirme les résultats obtenus par turbidimétrie et qui montrent qu'à partir des concentrations citées précédemment les suspensions de particules correspondantes flocculent. Dans la suite de ce travail, la stabilité colloïdale sera caractérisée par des mesures de turbidimétrie.



**Figure 59 : Suivi du D [3,2] des suspensions de nanoparticules de PLA élaborées par nanopréciipitation et recouvertes: (◆) de DexC<sub>6</sub>-17 ou (■) de DexC<sub>6</sub>-21 en fonction de la concentration en NaCl ( $[PLA] = 10$  g/L dans 5 mL d'acétone,  $[DexC_6-14] = 10$  g/L dans 10 mL H<sub>2</sub>O, débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse,  $d$ ,  $h$ , et vitesse d'agitation fixés respectivement à 0,3 mL/min, 0,9 cm, - 2 cm et 500 rpm).**

Les particules de PLA non recouvertes, flocculent à partir d'une concentration en NaCl de  $10^{-2}$  M. A cette concentration en NaCl, les forces attractives de Wan der Waals deviennent donc supérieures aux forces de répulsion électrostatiques à la suite de l'effet d'écrantage provenant de l'électrolyte en solution.

Avec des particules recouvertes de DexC<sub>6</sub>-17, la stabilité colloïdale est maintenue jusqu'à une concentration en NaCl égale à 1 M. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus précédemment au laboratoire avec des dérivés amphiphiles de dextrane (notamment des DexC<sub>6</sub>- $\tau$ ) [15, 16, 18, 25] et prouvent que la couche neutre de dextrane adsorbée à la surface des particules est à l'origine de forces de répulsion stérique. Ces dernières permettent de maintenir la stabilité colloïdale des suspensions dans les solutions salines de force ionique élevée (1 M) alors que les

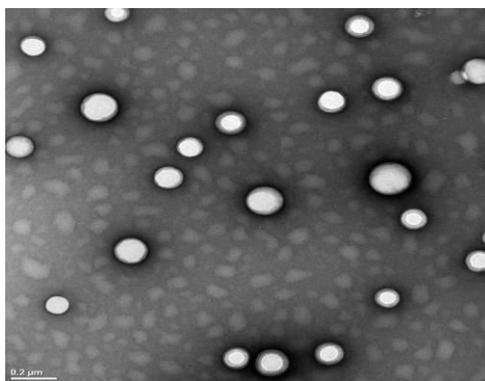
répulsions électrostatiques provenant de la surface du cœur de PLA (les seules à exister dans le cas de nanoparticules non recouvertes) n'ont plus aucun effet dans ces conditions.

Cependant, nous observons que les suspensions de nanoparticules recouvertes par le DexC<sub>6</sub>-21 ont un comportement similaire à des particules non recouvertes et flocculent à partir d'une concentration en NaCl de 10<sup>-2</sup> M. Une explication probable de ce phénomène de déstabilisation est que, à des taux de modification élevés, les groupements hydrophobes du dextrane modifié ne sont pas tous en contact avec la surface du PLA [30]. Ainsi, une partie des groupements hydrocarbonés se trouvent dans les boucles de polysaccharide en contact avec la solution aqueuse. Ceci entraîne l'agrégation des particules quand la force ionique augmente car la présence de ces groupements hydrocarbonés entraîne l'effondrement des boucles de polysaccharide qui se trouvent en conditions de mauvais solvant et ne produisent plus d'interactions répulsives entre particules

Suite à ces observations, nous n'avons utilisé comme stabilisants de nos différentes formulations étudiées que des DexC<sub>6</sub>- $\tau$  ayant des taux de modification compris entre 14 et 20%.

#### **3.2.1.2.4. Morphologie des nanoparticules de PLA stabilisées par le dextrane modifié**

Les nanoparticules élaborées ont été caractérisées par microscopie électronique à transmission (MET). Les conditions d'analyse sont décrites dans le chapitre 2 (paragraphe – 2.2.4.2). Les nanoparticules présentent une morphologie sphérique avec une distribution de tailles similaire à celle obtenue par l'analyse granulométrique de la suspension de nanoparticules (Figure 60). Ces observations viennent conforter les résultats de granulométrie laser.



**Figure 60: Micrographie MET de nanoparticules de PLA élaborées par nanoprécipitation (10 mg/mL de suspension) en présence de contrastant ([PLA] = 10 g/L dans 5 mL d'acétone, [DexC<sub>6</sub>-14] = 10 g/L dans 10 mL H<sub>2</sub>O, débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse, d, h, et vitesse d'agitation fixés respectivement à 0,3 mL/min, 0,9 cm, -2 cm et 500 rpm).**

### 3.2.2. Emulsion-évaporation de solvant

L'obtention de nanoparticules par ce procédé est très bien décrite dans la littérature [31-34] et a déjà été réalisée au laboratoire [18, 20]. La procédure expérimentale d'élaboration de nanoparticules par E-ES est détaillée dans le chapitre matériels et méthodes (paragraphe 2.2.3).

L'étude paramétrique de l'élaboration de nanoparticules par ce procédé a été effectuée en gardant la concentration en PLA dans la phase organique égale à 50 g/L. Le stabilisant macromoléculaire (DexC<sub>6</sub>- $\tau$ ) est dissous dans la phase aqueuse à une concentration égale à 10 g/L. Le volume de la phase aqueuse est maintenu à 10 mL.

#### 3.2.2.1. Elaboration des nanoparticules par E-ES

##### 3.2.2.1.1. Choix du solvant

Comme dans le cas de la nanoprécipitation, le choix du solvant organique se fonde sur la solubilité des molécules à encapsuler. Contrairement aux solvants chlorés (très souvent employés dans les travaux de la littérature), l'acétate d'éthyle s'est avéré être un très bon solvant, à la fois pour le PLA et les SA à encapsuler (voir chapitre 5 pour une discussion plus détaillée). Nous avons donc choisi d'utiliser ce solvant pour toutes les expériences qui vont suivre. L'acétate d'éthyle est partiellement miscible à l'eau, à raison de 1 mL/10 mL eau. Nous avons considéré que cette miscibilité n'est pas modifiée dans les solutions de DexC<sub>6</sub>- $\tau$ .

##### 3.2.2.1.2. Influence du taux de substitution $\tau$ du DexC<sub>6</sub>

De façon similaire à notre étude sur le procédé de nanoprécipitation, nous avons d'abord contrôlé l'influence de  $\tau$  sur les caractéristiques des particules obtenues, en termes de taille, redispersion après centrifugation et taux de recouvrement  $\Gamma$  en dextrane de la particule. Quelque soit le taux de modification, les dimensions des particules obtenues avant lavages sont identiques. Leurs distributions granulométriques sont monomodales avec un Span proche de 1 (Tableau 18).

Après lavage, les particules recouvertes de DexC<sub>6</sub>-22 ont tendance à s'agréger, avec apparition d'amas dont la taille est comprise entre 100 et 1000  $\mu\text{m}$ . Ceci peut être rapproché des résultats de stabilité colloïdale de suspensions de nanoparticules (cf. paragraphe 2.2.5.3) et est vraisemblablement dû au taux de substitution de ce polymère. Des groupements C<sub>6</sub> se trouvent

au sein des boucles de polysaccharide en contact avec la phase aqueuse. Ces groupements sont à l'origine d'une agrégation entre les particules lors des lavages par centrifugation.

**Tableau 18 : Tailles (d(0,5) et D[3,2]), distributions de tailles (Span) et taux de recouvrement des nanoparticules de PLA obtenues avec différents DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (avant et après les étapes de lavages) (phase organique :  $v = 2$  mL (50 mg PLA/ mL AcOEt) ; phase aqueuse non saturée en AcOEt : 10 mL DexC<sub>6</sub>-16, DexC<sub>6</sub>-20 ou DexC<sub>6</sub>-22, 10 g/L ; ultrason (US) : puissance (60 watts), 50% cycle actif, 2 min).**

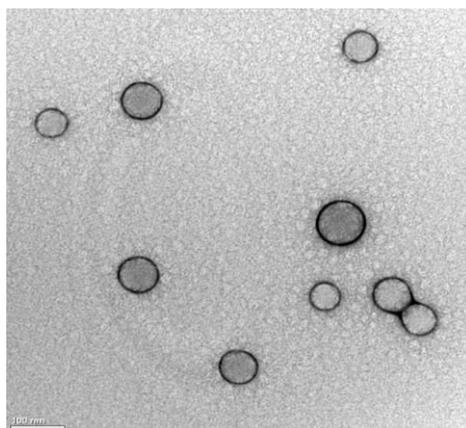
$\tau$	Avant lavages			Après lavages			$\Gamma(\pm 0,5)$ (mg/m <sup>2</sup> )
	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	
16	93	87	0,95	96	94	0,92	3,4
20	91	80	1,01	93	83	1,10	3,3
22	106	98	1,01	116	112	1800	nd

En ce qui concerne les taux de recouvrement en dextrane  $\Gamma$  des particules, aucune différence significative n'a été observée en fonction de  $\tau$ . Il est à noter que les  $\Gamma$  obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux précédemment obtenus au LCPM pour des nanoparticules de PLA élaborée par E-ES en utilisant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> comme solvant [16, 25]. On peut toutefois observer que les taux de recouvrement en dextrane  $\Gamma$  des particules obtenues par E-ES ( $3,4 \pm 0,5$  mg/m<sup>2</sup>) sont légèrement supérieurs à ceux des particules obtenues par nanoprécipitation ( $2,5 \pm 0,5$  mg/m<sup>2</sup>).

### 3.2.2.2. Caractérisation des nanoparticules de PLA obtenues

Les caractéristiques des nanoparticules de PLA obtenues par E-ES sont similaires à celles des nanoparticules élaborées par nanoprécipitation. Les nanoparticules obtenues sont bien stables lors des étapes de lavages (dès lors que le taux de substitution du dextrane ne dépasse pas 20%) et se redispersent parfaitement après lyophilisation en présence de cryoprotecteur. La stabilité colloïdale dans les solutions salines des suspensions de nanoparticules obtenues par E-ES confirme les résultats obtenus avec les suspensions de nanoparticules élaborées par nanoprécipitation : le taux de modification du dextrane joue un rôle important sur le maintien de la stabilité colloïdale dans les solutions salines à force ionique élevée. Le taux de modification du dextrane utilisé doit être compris entre 14% et 20%.

Le procédé d'élaboration des nanoparticules n'a pas d'influence sur les caractéristiques morphologiques ni sur la stabilité colloïdale des nanoparticules obtenues. Les nanoparticules élaborées ont été caractérisées par MET (Figure 61). Comme précédemment, nous observons que les nanoparticules présentent une morphologie sphérique avec une distribution de tailles similaire à celle obtenue par l'analyse granulométrique.



**Figure 61: Micrographie MET de nanoparticules de PLA élaborées par E-ES**  
(*phase organique : 2 mL PLA (50 mg PLA/mL AcOEt) ; phase aqueuse 10 mL DexC<sub>6</sub>-16, DexC<sub>6</sub>-20 ou DexC<sub>6</sub>-22, 10 g/L non saturée en AcOEt, US 60 watts, 50% cycle actif, 2min*).

Nous disposons donc de deux procédés permettant, à l'échelle du laboratoire, de préparer des particules de PLA recouvertes de chaînes de dextrane et ayant des distributions de tailles monomodales et centrées sur environ 100 nm.

### 3.3. Etude paramétrique de procédés pour l'obtention de microparticules

L'objectif de ce paragraphe est d'obtenir des particules de tailles micrométriques, avec des diamètres compris entre 1 et quelques centaines de micromètres environ (domaine n°2 et n°3 de la Figure 62), avec des distributions de tailles contrôlées et monomodales.

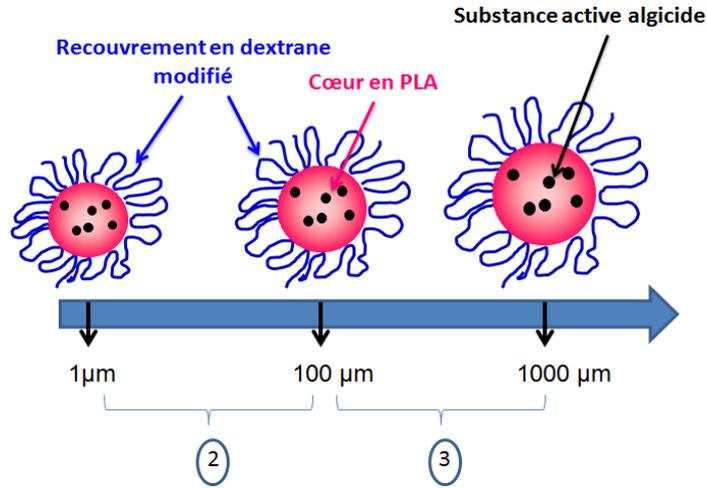


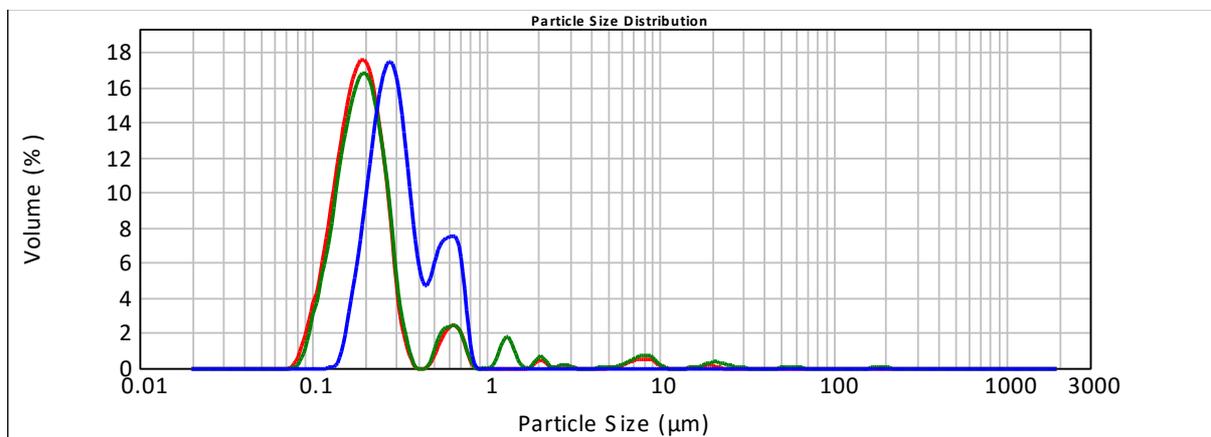
Figure 62: Microparticules de PLA recouvertes de DexC<sub>6</sub>-τ: domaines de tailles visés.

### 3.3.1. Précipitation

A notre connaissance, l'utilisation de la précipitation pour la préparation de microparticules (de façon analogue à la nanoprécipitation) n'est pas décrite dans la littérature.

Nous avons montré (paragraphe 3.2.1.1.2) que l'utilisation de solution de PLA dans l'acétone à la concentration de 10 g/L permet d'obtenir des particules dont le diamètre moyen  $D[3,2] \sim 140$  nm.

Nous avons donc essayé de préparer des microparticules en conservant le même procédé mais en augmentant significativement la concentration en PLA dans l'acétone. Pour cela, nous avons augmenté la concentration en PLA dans l'acétone, de 10 à 15, 20 et 25 g/L tout en gardant les conditions opératoires précédemment optimisées pour la nanoprécipitation (voir paragraphe 3.2.1.1.2).



**Figure 63 : Distribution de taille des particules obtenues pour différentes concentrations en PLA dans la phase organique: 15g/L, 20 g/L et 25 g/L** (volume de la phase organique = 5 mL, volume de la phase aqueuse 10 mL, concentration en DexC<sub>6</sub>-14 =10g/L, débit d’injection de la phase organique dans la phase aqueuse, d, h, et vitesse d’agitation fixés respectivement à 0,3 mL/min, 0,9 cm, -2 cm et 500 rpm).

**Tableau 19 : Caractéristiques de taille (d(0,5) et D[3,2]), de distribution de taille (Span) obtenues avec différentes concentrations en PLA, avant lavage des particules** (volume de la phase organique = 5 mL, volume de la phase aqueuse 10 mL, concentration en DexC<sub>6</sub>-14 =10g/L, débit d’injection de la phase organique dans la phase aqueuse, d, h, et vitesse d’agitation fixés respectivement à 0,3 mL/min, 0,9 cm, -2 cm et 500 rpm).

[PLA] (g/L)	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span
15	189	184	0,97
20	198	197	2,40
25	616	297	1,50

L'évolution de taille des particules en fonction de la concentration du PLA est bien observée (Figure 63 et Tableau 19). Cependant, le domaine de tailles des particules obtenues est toujours submicronique et il est difficile d'augmenter d'avantage la concentration en PLA. En effet, le principal problème rencontré est que l'aiguille de la seringue plongeant dans la phase aqueuse se bouche au bout d'un certain temps par précipitation du PLA. Ce phénomène est d'autant plus important que la concentration en PLA est élevée.

Nous avons alors tenté d'injecter la phase organique dans la phase aqueuse en gardant l'aiguille à l'extérieure de la phase aqueuse. Néanmoins, il s'est avéré que cette méthode n'est pas non plus adéquate car on obtient la formation d'un film de PLA à la surface de la phase aqueuse (phénomène déjà mis en évidence lors des essais de nanoprecipitation).

Pour une concentration en PLA en phase organique égale à 50 g/L, nous avons varié la vitesse d'agitation (entre 200 rpm et 400 rpm), le débit d'injection, la position de l'aiguille (dans/hors la phase aqueuse), le diamètre du bécher, le volume de la phase aqueuse (de 10 mL à 50 mL, en gardant la même concentration en DexC<sub>6</sub>). Cependant, tous ces essais se sont avérés infructueux, à savoir que la formation d'agrégats de PLA ou de films est observée dans tous les cas.

Nous n'avons pas réussi à obtenir des microparticules en utilisant cette technique de précipitation.

### **3.3.2. Emulsion-évaporation de solvant (E-ES)**

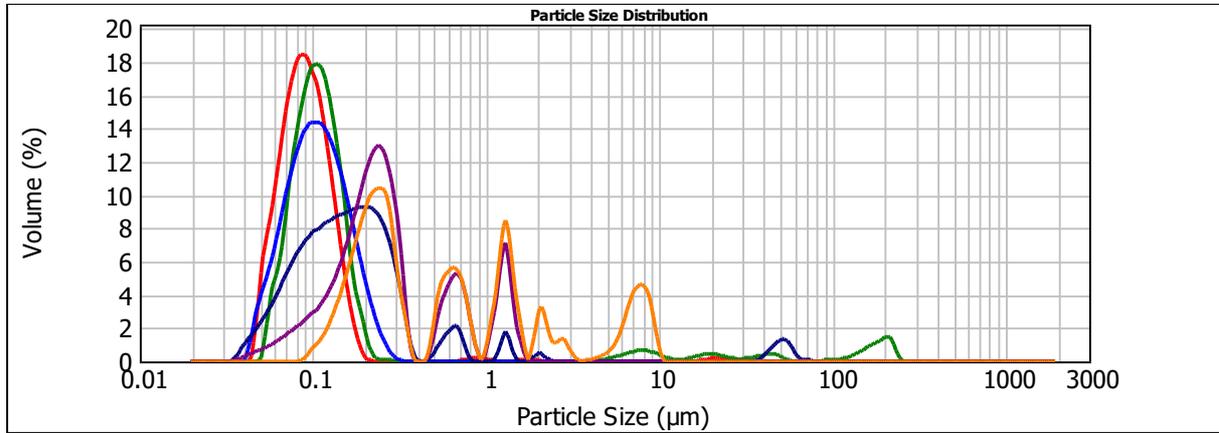
#### **3.3.2.1. Emulsification avec les ultrasons**

Nous avons d'abord repris les conditions expérimentales précédentes utilisant les ultrasons pour fournir de l'énergie lors de l'émulsification.

##### ***3.3.2.1.1. Expériences avec une énergie de sonification constante (60 watts)***

###### **a) Influence de la concentration en PLA**

Nous avons fait varier la concentration en PLA dans l'AcOEt de 25 à 250 g/L, en gardant constant le volume de la phase organique, le volume et la concentration en dextrane modifié de la phase aqueuse, la durée de la pré-émulsification au vortex ainsi que la durée et la puissance de la sonification (Figure 64 et Tableau 20).



**Figure 64: Distribution granulométrique des suspensions de particules obtenues avec différentes concentrations en PLA dans l’acétate d’éthyle (25, 50, 100, 150, 200 et 250 g PLA/L) (phase organique : PLA dans 2 mL AcOEt ; phase aqueuse : 10 mL DexC<sub>6</sub>-20 (10 g/L) saturée en AcOEt; Vortex : 1 min ; US : 60 watts 50% cycle actif 2min).**

**Tableau 20: Tailles (d(0,5) et D[3,2]) et distribution de tailles (Span) des suspensions de particules obtenues en fonction de la concentration en PLA dans la phase organique, avant les étapes de lavages (phase organique : PLA dans 2 mL AcOEt ; phase aqueuse : 10 mL DexC<sub>6</sub>-20 (10 g/L) saturée en AcOEt; Vortex : 1 min ; US : 60 watts 50% cycle actif 2min).**

[PLA] (g/L)	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span
25	90	86	0,84
50	92	81	1,02
100	105	96	1,09
150	163	140	1,39
200	239	207	4,34
250	504	350	12,43

Le diamètre moyen des particules augmente avec la concentration en PLA dans l’AcOEt mais également la largeur des distributions de tailles (surtout pour les concentrations en PLA supérieures à 150 g/L pour lesquelles le Span devient très élevé).

La solution contenant 250 g PLA/L AcOEt est extrêmement visqueuse, si bien qu’un film se forme à la surface du cristallisateur lors de l’évaporation. D’après les masses molaires moyennes de l’échantillon de PLA et en utilisant la relation de Mark-Houwink établie pour des solutions de

PLA dans l'AcOEt [35], la concentration critique de recouvrement est de l'ordre de 14 g/L. Les conditions pour lesquelles le Span augmente de façon significative correspondent donc à des concentrations en phase organique supérieures à 10 fois cette concentration critique, ce qui correspond au domaine dit « semi-dilué enchevêtré » et peut expliquer ces observations [36].

Après lavage des particules, les distributions granulométriques ne sont pas significativement modifiées. Les taux de recouvrement en dextrane,  $\Gamma(\text{mg/m}^2)$ , déterminés par RMN  $^1\text{H}$  sont tous du même ordre de grandeur, à l'erreur expérimentale près (Tableau 21).

**Tableau 21: Taux de recouvrement en dextrane des particules obtenues avec différentes concentrations en PLA, déterminés après lavage des particules.**

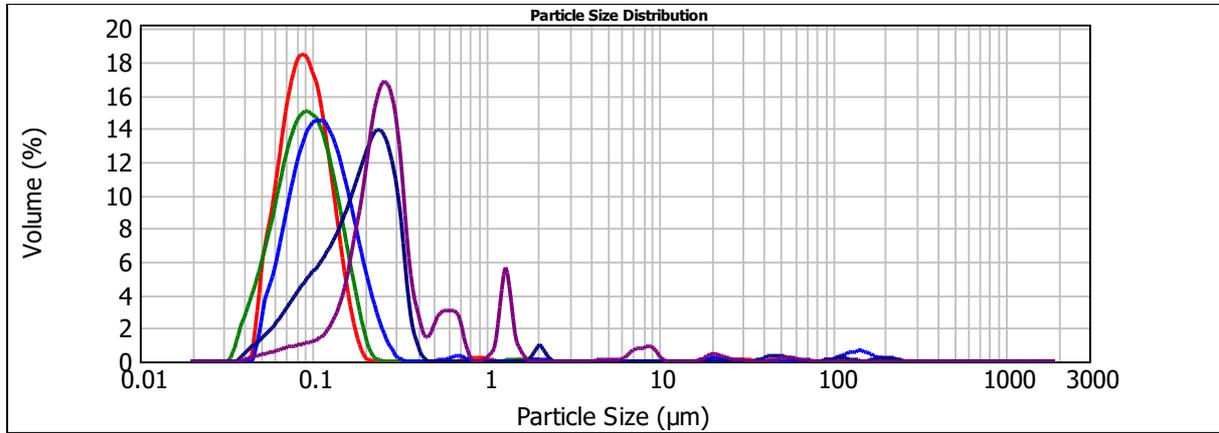
[PLA] (g/L)	25	50	100	150	200	250
$\Gamma (\pm 0,5)$ ( $\text{mg/m}^2$ )	2,7	2,5	2,3	2,5	3,0	3,3

En conclusion, l'augmentation de la concentration du PLA dans l'AcOEt ne semble pas permettre d'obtenir des microparticules de taille bien définie et dont la distribution de taille soit monomodale, notamment à cause des propriétés physiques de la phase organique.

#### **b) Influence du rapport volumique entre la phase organique et la phase aqueuse**

Toujours dans le but d'augmenter la taille des particules produites, nous avons augmenté le rapport volumique phase organique/phase aqueuse et tous les autres paramètres du procédé étant maintenus inchangés (Figure 65).

Le fait d'augmenter le rapport volumique phase organique/phase aqueuse entraîne une légère augmentation de la taille des particules, mais celles-ci restent toutefois submicroniques. Par ailleurs, les distributions de tailles s'élargissent et deviennent finalement multimodales (Tableau 22).



**Figure 65: Distribution granulométrique des suspensions de particules de PLA obtenues avec 1, 2, 3, 6, et 8 mL de phase organique (AcOEt - 50 g PLA/ L) et 10 mL de phase aqueuse saturée en AcOEt DexC<sub>6</sub>-20 à 10 g/L. Avant les étapes de lavages (Vortex 1 min, US : 60 watts, 50% cycle actif, 2 minutes).**

**Tableau 22: Tailles (d(0,5) et D[3,2]), distributions de tailles (Span) et taux de recouvrement par le DexC<sub>6</sub>-20 des particules de PLA obtenues avant les étapes de lavages en fonction du rapport volumique phase organique/phase aqueuse (phase organique : AcOEt - 50 mg PLA/ mL) et 10 mL de phase aqueuse saturée en AcOEt DexC<sub>6</sub>-20 -10 g/L. Vortex 1 min, US :60 watts, 50% cycle actif, 2 minutes).**

Volume de la phase organique (mL)	R*	d (0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span
1	0,1	90	86	0,84
2	0,2	92	81	1,02
3	0,3	109	104	1,16
6	0,6	193	152	1,17
8	0,8	263	242	3,87

\* : Rapport du volume de la phase organique/volume de la phase aqueuse

**Tableau 23: Taux de recouvrement en dextrane des particules obtenues, déterminé après lavage des particules (phase organique : AcOEt - 50 mg PLA/ mL) et 10 mL de phase aqueuse saturée en AcOEt DexC<sub>6</sub>-20 -10 g/L. Vortex 1 min, US :60 watts, 50% cycle actif, 2 minutes).**

PLA (mL)	1	2	3	6	8
$\Gamma (\pm 0,5)$ mg/m <sup>2</sup>	2,7	2,4	2,2	2,0	2,1

Les résultats obtenus (Tableau 23) indiquent une légère diminution des taux de recouvrements lorsque R augmente mais les différences sont peu significatives. La concentration en DexC<sub>6</sub>-20 restant dans la solution aqueuse ([DexC<sub>6</sub>]<sub>éq</sub>) après évaporation du solvant peut être calculée à partir de la surface spécifique (Sp) des particules obtenues et de la masse de PLA introduite (Tableau 24).

$$[DexC_6]_{éq} = \left[ m_{DexC_6} \right]_{initiale} - Sp \cdot \Gamma \cdot m_{PLA} / V_{aq} \quad \text{Eq. 27}$$

avec

$[DexC_6]_{éq}$  : Concentration de DexC<sub>6</sub>-τ dans la phase aqueuse après évaporation de solvant

$m_{DexC_6} \right]_{initiale}$  : Concentration initiale de DexC<sub>6</sub> dans la phase aqueuse.

Sp: Surface spécifique moyenne des particules (m<sup>2</sup>/g).

Γ: Taux de recouvrement des particules en DexC<sub>6</sub> (mg DexC<sub>6</sub>-τ / m<sup>2</sup>).

$m_{PLA}$  : Masse de PLA (mg).

$V_{aq}$ : Volume de la phase aqueuse égal à 10 mL dans ce cas

**Tableau 24: Concentration en DexC<sub>6</sub> dans la solution aqueuse à l'équilibre après évaporation de solvant (phase organique : AcOEt - 50 mg PLA/ mL) et 10 mL de phase aqueuse saturée en AcOEt DexC<sub>6</sub>-20 -10 g/L. Vortex 1 min, US :60 watts, 50% cycle actif, 2 minutes).**

<b>PLA (mL)</b>	1	2	3	6	8
<b>Sp (m<sup>2</sup>)</b>	61,5	58,2	48,4	27	22,2
<b>[DexC<sub>6</sub>]<sub>éq</sub> (g/L)</b>	9,2	8,6	8,4	8,4	8,1

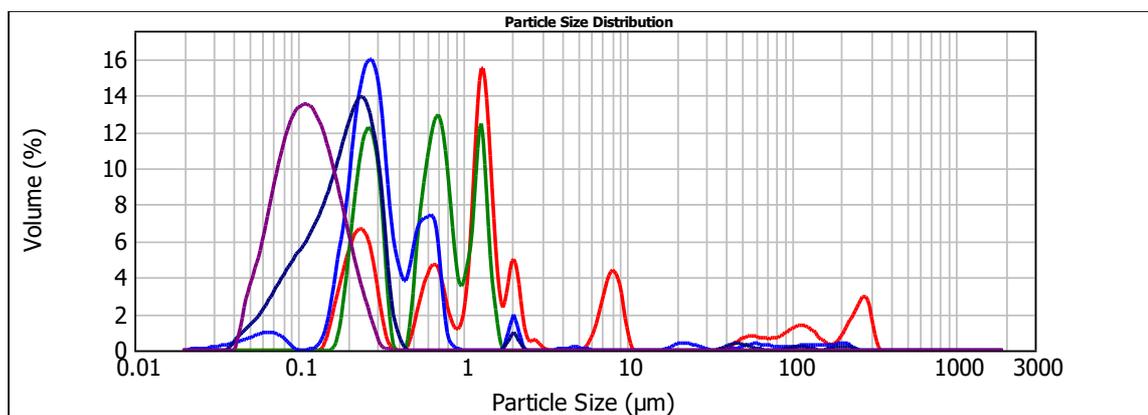
On peut constater (Tableau 24) que la concentration en DexC<sub>6</sub>-τ dans la phase aqueuse à l'équilibre reste dans tous les cas supérieure à 8 g/L donc amplement suffisante pour obtenir l'abaissement maximal de tension interfaciale et le plateau de l'isotherme d'adsorption du dextrane à la surface du PLA (1g/L dans les deux cas) [16, 17].

Des expériences ont également été effectuées avec des volumes de solution de PLA plus élevés mais dans tous les cas, un film de PLA se forme à la surface des cristallisoirs après

évaporation de l'AcOEt, traduisant une stabilité insuffisante de l'émulsion durant l'étape d'évaporation.

**c) Influence de la concentration en DexC<sub>6</sub>**

La dernière série d'expériences a consisté à diminuer la concentration du DexC<sub>6</sub>-τ dans la phase aqueuse. Le volume de la solution de PLA est de 6 mL (50 g PLA/L AcOEt), volume qui avait conduit, dans les conditions précédentes, à une distribution monomodale des tailles de particules (Figure 66, Tableau 15Tableau 25).



**Figure 66 : Distributions granulométriques des particules obtenues avant lavages avec [DexC<sub>6</sub>-20] = 1, 2, 5, 10, et 20 g/L dans une phase aqueuse saturée en AcOEt (V<sub>aq</sub>=10 mL) (phase organique : 6 mL d'acétate d'éthyle (50 mgPLA/mL), Vortex 1 min ; US : 60 Watts pendant 2 min, 50% cycle actif).**

**Tableau 25: Tailles (d(0,5) et D[3,2]) et distributions de tailles (Span) des suspensions de particules de PLA obtenues avant lavages avec différentes [DexC<sub>6</sub>-20] (phase aqueuse : v =10 mL, phase organique : 6 mL d'acétate d'éthyle (50mgPLA/mL), Vortex 1 min ; US : 60 Watts pendant 2 min, 50% cycle actif).**

[DexC <sub>6</sub> ] (g/L)	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span
1	1287	649	78
2	629	448	1,69
5	295	255	1,68
10	193	152	1,17
20	112	101	1,17

**Tableau 26: Taux de recouvrement en dextrane des particules obtenues après lavage des particules** (phase aqueuse :  $v = 10$  mL, phase organique : 6 mL d'acétate d'éthyle (50mgPLA/mL), Vortex 1 min ; US : 60 Watts pendant 2 min, 50% cycle actif).

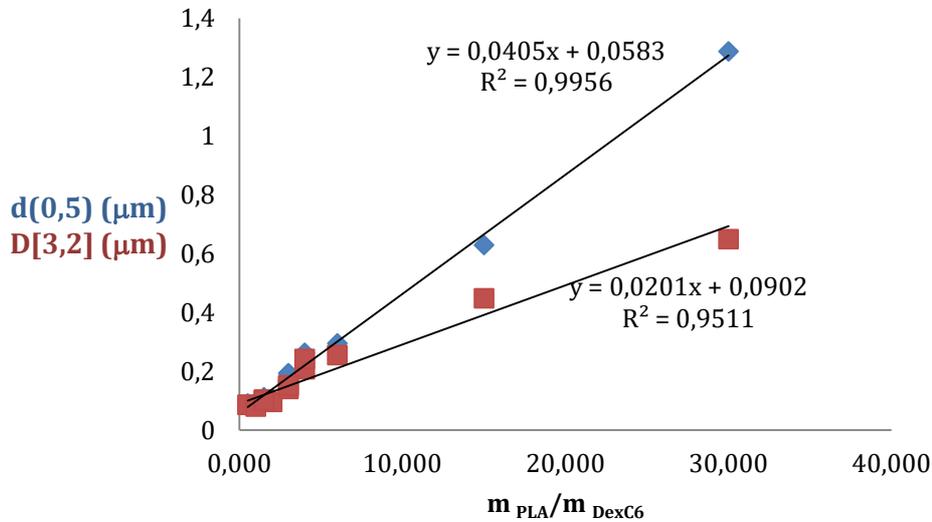
[DexC <sub>6</sub> ] (g/L)	1	2	5	10	20
$\Gamma(\pm 0,5)$ (mg/m <sup>2</sup> )	2,1	2,2	1,9	2,0	2,0

D'une manière générale, lorsque la concentration en dextrane dans la phase aqueuse diminue, la taille des particules augmente mais les distributions granulométriques s'élargissent (Figure 66, Tableau 25 et Figure 26). En dessous de 5 g/L en DexC<sub>6</sub>, les distributions sont multimodales et aucune population de taille bien définie n'est obtenue.

**d) Bilan des expériences utilisant une étape de sonification à puissance constante (60 watts) pendant 2 minutes**

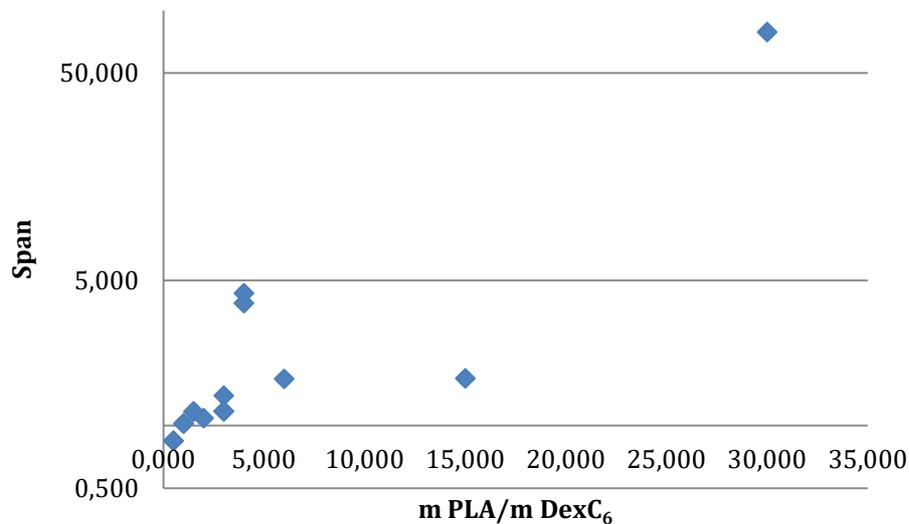
Afin de résumer l'ensemble des essais réalisées précédemment, nous avons représenté l'évolution du  $d(0,5)$  et du  $D[3,2]$  de l'ensemble des expériences précédentes en fonction du rapport  $V_{org} \times [PLA] / V_{aq} \times [DexC_6]$ , autrement dit le rapport entre la masse su PLA et la masse de DexC<sub>6-τ</sub>, noté  $m_{PLA}/m_{DexC_6}$  (Figure 67).

On peut noter que le  $d(0,5)$  et le  $D[3,2]$  augmentent de manière quasi linéaire avec  $m_{PLA}/m_{DexC_6}$ . Cette tendance est similaire à celle qui a été mise en évidence pour des émulsions de dodécane dans l'eau stabilisées par des DexC<sub>6-τ</sub> [19] et pour des nanoparticules de PLA stabilisées par des dérivés du dextrane modifiés par des groupements phénoxy [37]. Cette tendance démontre que l'étape d'émulsification est déterminante pour la taille des particules obtenues.



**Figure 67: Evolution du  $d(0,5)$  et du  $D[3,2]$  en fonction de  $m_{PLA}/m_{DexC6}$ .**

La largeur de la distribution de tailles des particules augmente de façon très accentuée lorsque le rapport  $m_{PLA}/m_{DexC6}$  dépasse 2,5 (Figure 68).



**Figure 68: Evolution du Span en fonction de  $m_{PLA}/m_{DexC6}$ .**

Ce n'est qu'avec les plus faibles concentrations en dextrane dans la phase aqueuse que l'on parvient à former des microparticules. Malgré cela, dans aucun des cas, nous n'avons pu éviter la formation conjointe de nanoparticules.

Dans le paragraphe suivant, nous étudierons l'influence de la puissance et de la durée de sonification, à de faibles concentrations en dextrane de manière à conserver un rapport  $m_{PLA}/m_{DexC6}$  élevé.

### 3.3.2.1.2. Influence de la puissance et de la durée de sonification à faible [DexC<sub>6</sub>]

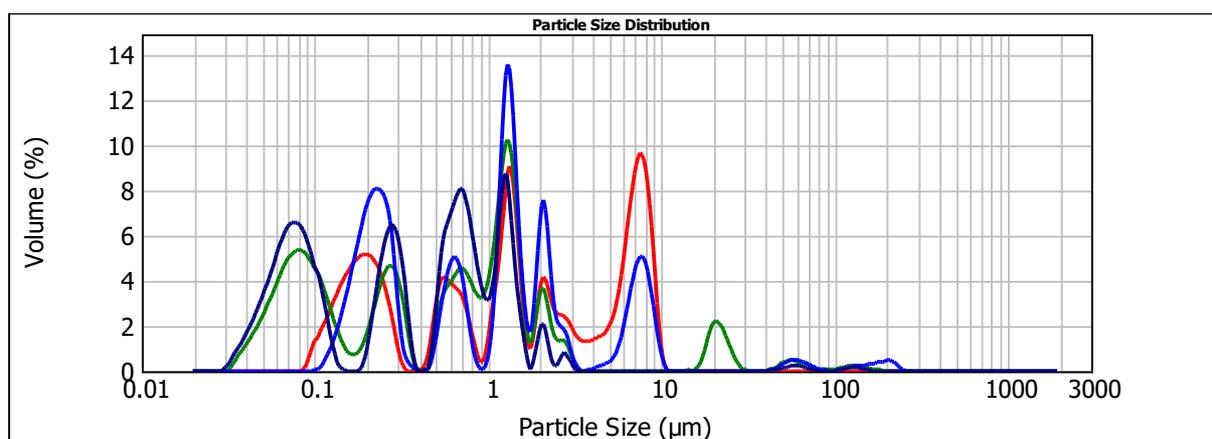
Dans le paragraphe précédent (3.3.2.1.1), les plus grandes particules sont obtenues en diminuant le rapport  $m_{PLA}/m_{DexC_6}$ , en particulier avec des solutions aqueuses à faible concentration en DexC<sub>6</sub>- $\tau$ . Ainsi, les expériences décrites dans ce paragraphe, ont été réalisées avec des solutions aqueuses ayant des concentrations en DexC<sub>6</sub>- $\tau$  inférieures ou égales à 2g/L.

Par ailleurs, nous verrons par la suite dans le paragraphe 3.3.2.2.2. que des nanoparticules de PLA sont systématiquement formées quand la solution est homogénéisée au vortex pendant plus de 20 s. Afin de limiter ce phénomène, les solutions n'ont été soumises par la suite que 15 s à l'agitation au vortex avant sonification, contrairement aux expériences précédentes (vortex 1 min).

#### a) Puissance de sonification

Des premiers essais ont été réalisés avec une puissance de 15 watts. Un film de PLA se forme à la surface de la suspension après sonification.

En augmentant la puissance à 30 watts, les distributions granulométriques des particules obtenues sont relativement comparables à celles des particules obtenues après émulsification à 60 watts (à concentration en dextrane équivalentes) et le Span des objets reste très élevé (Figure 69). Dans tous les cas, des distributions de tailles multimodales et très larges sont obtenues.



**Figure 69:** Distribution granulométrique des particules obtenues avec différentes concentrations en DexC<sub>6</sub> et différentes puissances de sonification (1 g DexC<sub>6</sub>/L, 60 watts, 2 g DexC<sub>6</sub>/L, 60 watts, 1 g DexC<sub>6</sub>/L 30 watts et 2 g DexC<sub>6</sub>/L, 30 watts) (phase organique : 6 mL PLA (50 mgPLA/mL), phase aqueuse : 10 mL DexC<sub>6</sub>-20 saturé en AcOEt, Vortex 15s, US : 2 min 50% cycle actif).

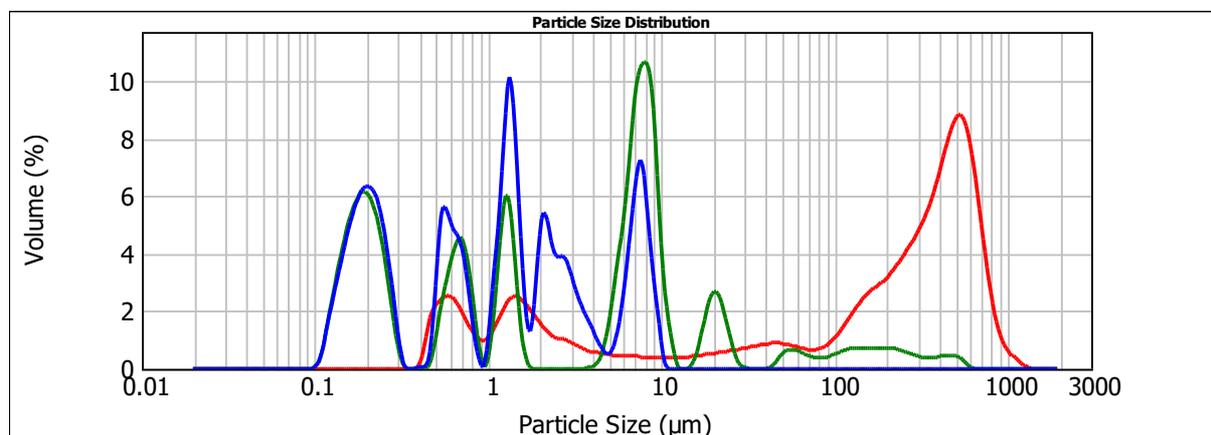
### b) Influence de la durée de sonification

Dans un second temps, nous avons fait varier la durée de sonification, de 2 min à 30 s, en maintenant la puissance des ultrasons à 30 watts, la concentration de la phase aqueuse en dextrane à 1 g/L, le volume de la solution de PLA à 6 mL et la concentration en PLA à 50 g/L. Dans tous les cas, les distributions de tailles de particules sont similaires à celles présentées dans la Figure 69.

La durée de la sonification n'a donc aucune influence significative sur la taille des particules obtenues.

### c) Influence de la concentration en DexC<sub>6-τ</sub>

L'utilisation d'une concentration en DexC<sub>6-τ</sub> inférieure à 1 g/L a été examinée (Figure 70).



**Figure 70: Distribution granulométrique des particules obtenues avec différentes concentrations en dextrane = 0,25 g DexC<sub>6</sub>/L, 0,5 g DexC<sub>6</sub>/L et 1 g DexC<sub>6</sub>/L (phase organique: 6 mL PLA (50 mgPLA/mL), phase aqueuse: 10 mL DexC<sub>6-20</sub>, x g/L saturée en AcOEt, vortex : 15 s, US : 30 watts, 1 min 50% cycle actif).**

Dans le cas où la concentration en DexC<sub>6-τ</sub> est égale ou supérieure à 0,5 g/L, les distributions granulométriques sont très étendues, avec la formation conjointe de nano- et microparticules. Dans le cas où la concentration en DexC<sub>6-τ</sub> est de 0,25 g/L, une population majoritaire de microparticules est obtenue. Toutefois, ces microparticules ont des tailles très élevées, avec une distribution relativement large, comprise entre 100 et 1000 μm.

Des expériences similaires ont été réalisées dans les mêmes conditions avec une durée de sonification réduite à 30 s. Dans ces conditions, les résultats obtenus sont identiques à ceux

présentés dans la Figure 70 ce qui confirme l'absence d'influence de la durée de sonification (paragraphe 3.3.2.1.2-a).

L'utilisation d'ultrasons comme moyen d'émulsification ne semble pas permettre d'obtenir des particules micrométriques de tailles maîtrisées avec des distributions granulométriques monomodales, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à d'autres méthodes d'émulsification.

### **3.3.2.2. Emulsification par agitation mécanique**

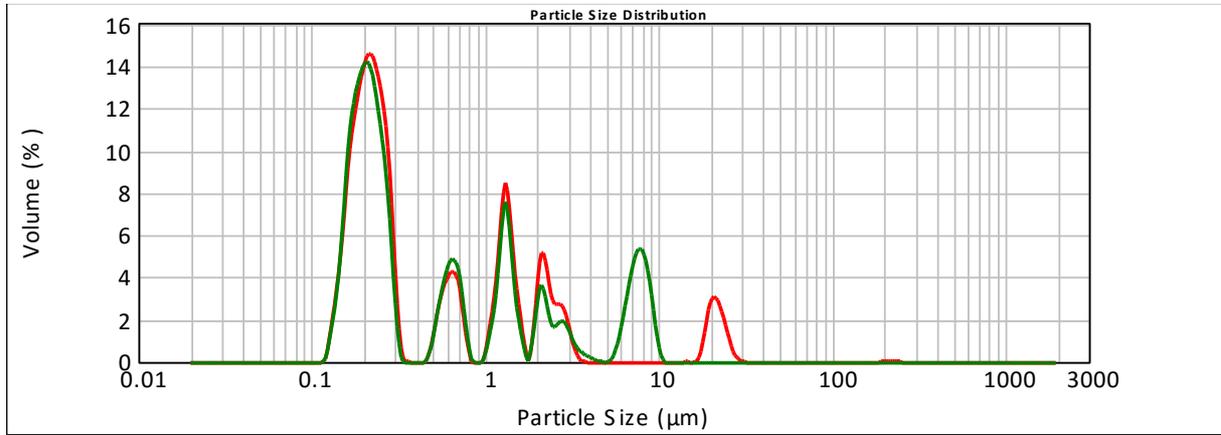
Dans ce paragraphe, les méthodes d'émulsification choisies sont cette fois basées sur le cisaillement du mélange H/E par l'utilisation d'un ultraturax (UT), d'un vortex ou d'une agitation magnétique.

#### **3.3.2.2.1. Ultraturax (UT)**

##### **a) Influence de la concentration du PLA**

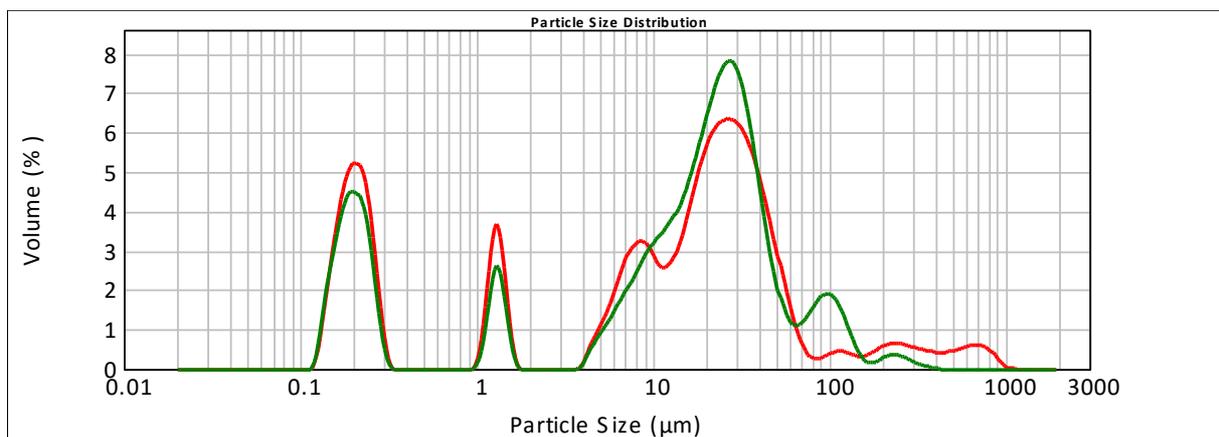
Les premiers essais d'émulsification avec l'UT ont été effectués en utilisant des concentrations de PLA égales 50 et 75 g/L, avec une concentration en DexC<sub>6</sub> égale à 5 g/L. La vitesse de l'UT a été fixée à 11000 rpm (P1). L'émulsification par UT a été effectuée directement sans pré-émulsification par un vortex. Au cours de l'émulsification, nous avons essayé de balayer l'UT dans la solution pour s'assurer que le même cisaillement était appliqué en tout point de notre système

Les distributions de tailles des particules sont quasiment identiques pour les deux concentrations en PLA (Figure 71). Dans tous les cas, les distributions sont multimodales avec un mélange de nano-et microparticules sur un intervalle très large.



**Figure 71: Distributions granulométriques des particules de PLA obtenues pour différentes concentrations en PLA (phase organique : 1 mL PLA 50 et 75 mg PLA / mL), phase aqueuse : 10 mL DexC<sub>6</sub>-18, 5 g/L saturée en AcOEt, UT 11000 rpm, 1 min).**

Pour tenter d'améliorer les résultats, nous avons augmenté le rapport  $m_{\text{PLA}}/m_{\text{DexC}_6}$  en utilisant une concentration en PLA dans la phase organique plus élevée, égale à 150 g/L (300 mg dans 2 mL) et en utilisant 10 mL d'une solution de DexC<sub>6</sub>-16 (5 g/L). Cette fois-ci, la phase aqueuse n'a pas été saturée en AcOEt contrairement aux autres expériences décrites dans ce chapitre. Compte tenu de la solubilité de l'AcOEt dans l'eau, cela revient à saturer la phase aqueuse en AcOEt, avec un volume de phase organique qui devient alors égal à 1 mL, et une concentration en PLA de 300 g/L. Cette façon de procéder permet de diminuer la concentration en PLA initiale dissoute dans l'acétate d'éthyle car les solutions de PLA dans l'AcOEt à 300 g/L sont très visqueuses et difficiles à prélever.



**Figure 72: Distributions granulométriques des particules de PLA obtenues pour deux lots réalisés dans les mêmes conditions et émulsifiés par UT (phase organique: 2 mL PLA (150 mgPLA/mL), phase aqueuse: 10 mL DexC<sub>6</sub>-16, 5 g/L non saturée en AcOEt, UT 11000 rpm, 1 min).**

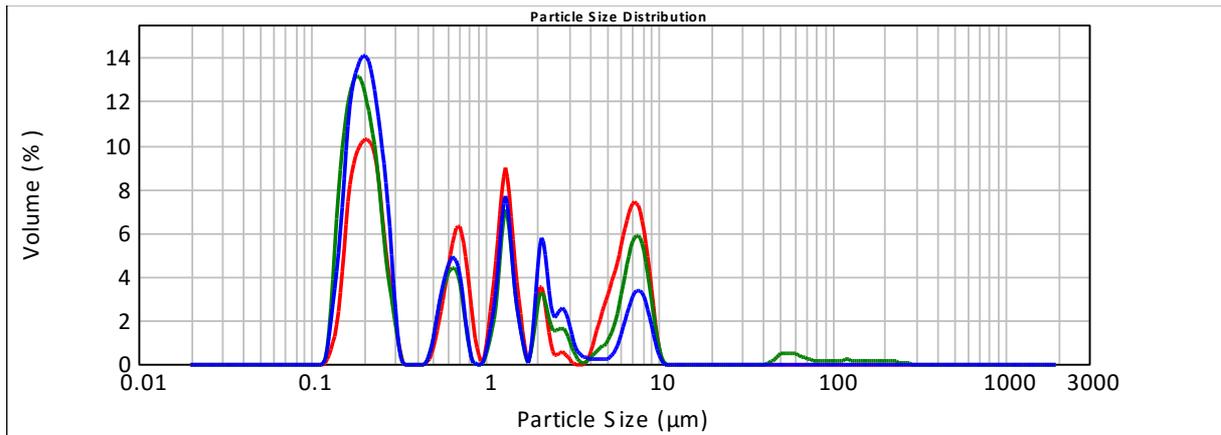
Les distributions de taille obtenues sont multimodales et témoignent de la présence aussi bien de particules nanométriques que de particules micrométriques (Figure 72). Néanmoins, la population de particules submicroniques est plus faible que précédemment et l'allure de la distribution est quasiment reproductible.

### b) Influence de la concentration en DexC<sub>6</sub>-18

Suite à ces résultats, il semblait donc intéressant d'étudier l'influence de la concentration en dextrane modifié sur la taille et la distribution granulométrique des particules pour des formulations utilisant une concentration en PLA égale à 50 g/L et à 300 g/L. Comme précédemment, la concentration en PLA égale à 300 g/L est obtenue par ajout de 2 mL de PLA, à la concentration de 150 g/L, dans une solution aqueuse de dextrane non saturée en AcOEt.

- $C_{PLA}=50$  g/L dans AcOEt

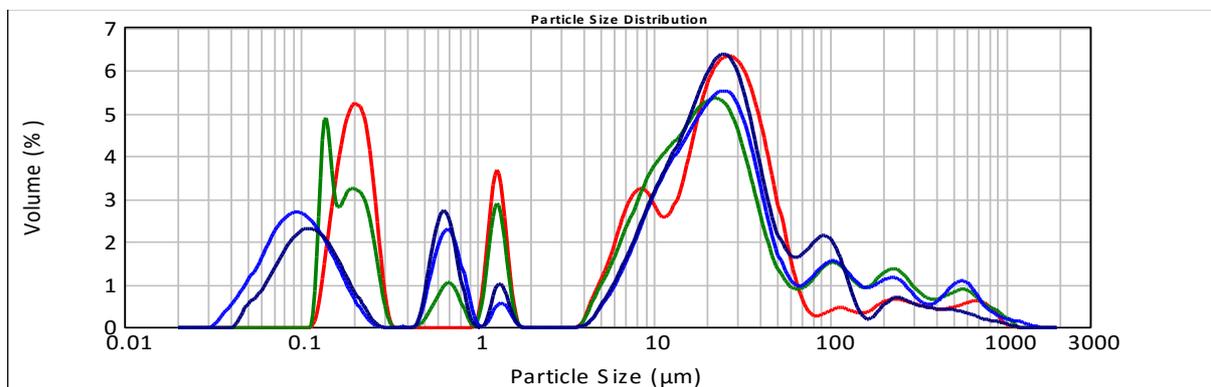
Les distributions granulométriques des particules de PLA obtenues avec différentes concentrations en dextrane modifié sont présentées dans la Figure 73.



**Figure 73: Distribution granulométrique des particules de PLA obtenues pour différentes concentrations en dextrane : 0,5, 1 et 5 g/L** (phase organique : 1 mL PLA (50 mg / mL), phase aqueuse : 10 mL DexC<sub>6</sub>-18, saturée en AcOEt, UT : 11000 rpm, 1 min).

- $C_{PLA}=300$  g/L dans AcOEt

Les distributions granulométriques des particules de PLA obtenues avec différentes concentrations en dextrane modifié sont présentées dans la Figure 74.



**Figure 74 : Distribution granulométrique des particules obtenues pour différentes concentrations en dextrane 2, 3, 5 et 10 g/L (2mL PLA (150 mg / mL) /10 mL DexC<sub>6</sub>-18 non saturé en AcOEt, UT 11000 rpm, 1 min).**

Compte tenu de la très grande polymétrie des distributions granulométriques obtenues dans ces séries d'expériences, il est difficile de tirer une conclusion quant à l'influence de la concentration en dextrane sur la taille des particules.

Pour conclure concernant les résultats obtenus en faisant varier le rapport  $m_{\text{PLA}} / m_{\text{DexC}_6}$ , toutes conditions expérimentales égales par ailleurs :

- les distributions granulométriques sont toutes multimodales, avec à la fois un mélange de nano- et microparticules de toutes tailles, dans des proportions variables mais toujours avec un Span très élevé (> à 2)
- l'évolution du  $d(0,5)$  et du  $D[3,2]$  en fonction de  $m_{\text{PLA}} / m_{\text{DexC}_6}$  est difficile à maîtriser et à interpréter (Tableau 27).

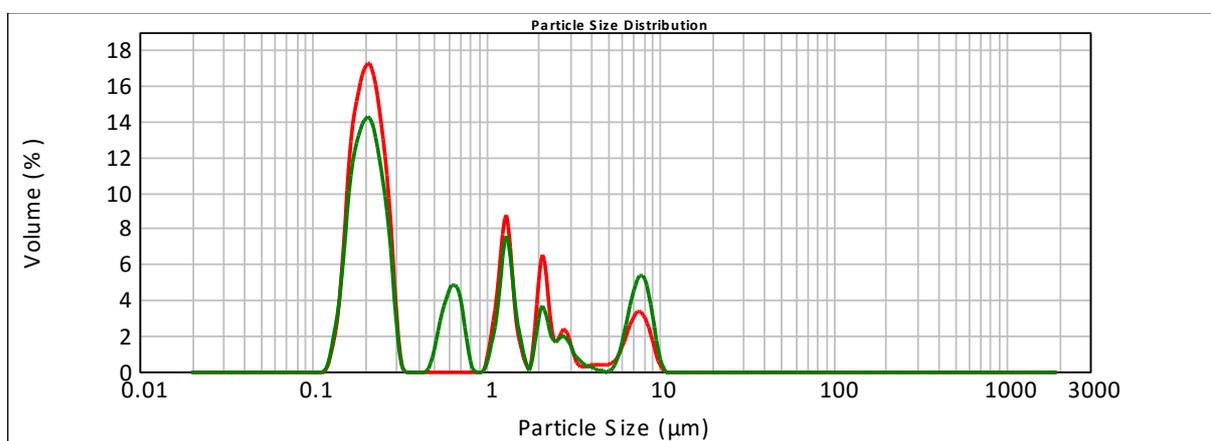
**Tableau 27: Evolution du  $d(0,5)$ , du  $D[3,2]$  et du Span en fonction de  $m_{\text{PLA}} / m_{\text{DexC}_6}$  pour les particules de PLA élaborées par émulsification par UT (UT 11000 rpm, 1 min, phase organique : \*1 mL AcOEt, 10 mL solution de DexC<sub>6</sub> saturée en AcOEt, \*\*2 mL AcOEt, 10 mL solution de DexC<sub>6</sub> non saturée en AcOEt).**

[PLA] g/L	[DexC6] g/L	$m_{\text{PLA}}/m_{\text{DexC}_6}$	$d(0,5)$ (µm)	$D[3,2]$ (µm)	Span
50 <sup>*</sup>	5	1	0,269	0,320	10,3
50 <sup>*</sup>	2	2,5	0,279	0,329	25
50 <sup>*</sup>	0,5	10	0,758	0,426	9,3
150 <sup>**</sup>	10	3	17	0,907	3,2
150 <sup>**</sup>	5	6	16	0,906	10,2
150 <sup>**</sup>	3	10	18	0,390	8,6
150 <sup>**</sup>	2	15	19	0,573	4,7

### c) Influence du temps d'émulsification

Nous avons réalisé quelques expériences en modifiant le temps d'émulsification. Les résultats sont présentés dans la Figure 75.

Aucune modification notable dans la taille des particules n'a été observée. Les distributions des tailles des particules ne sont pas modifiées par la diminution du temps d'émulsification, dans le domaine de temps étudié. Les distributions restent multimodales et le Span très élevé. L'utilisation de l'agitation mécanique par ultraturax durant l'étape d'émulsification ne permet donc pas d'atteindre les objectifs fixés en termes de distributions de tailles de particules micrométriques.

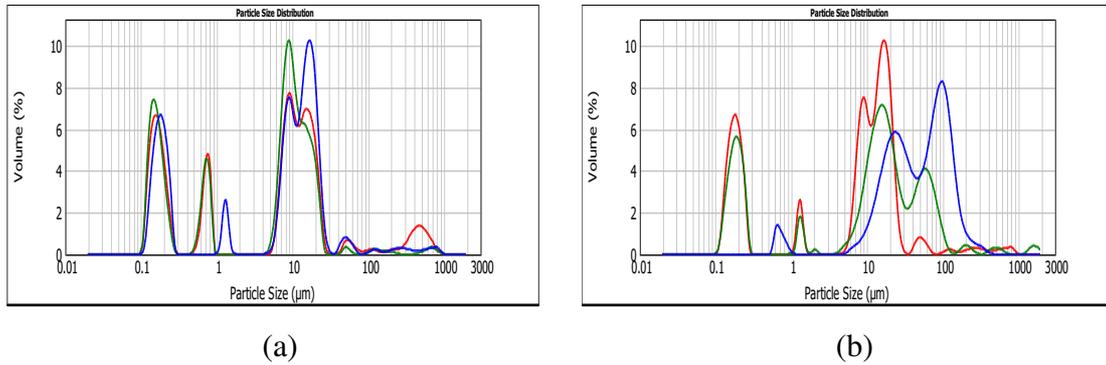


**Figure 75: Distribution granulométrique des particules obtenues pour différentes durées d'émulsification (30s, 1 min)** (phase organique: 1 mL PLA (75 mg / mL), phase aqueuse: 10 mL DexC<sub>6-18</sub> 5 g/L saturée en AcOEt, UT 11000 rpm).

#### 3.3.2.2.2. Vortex

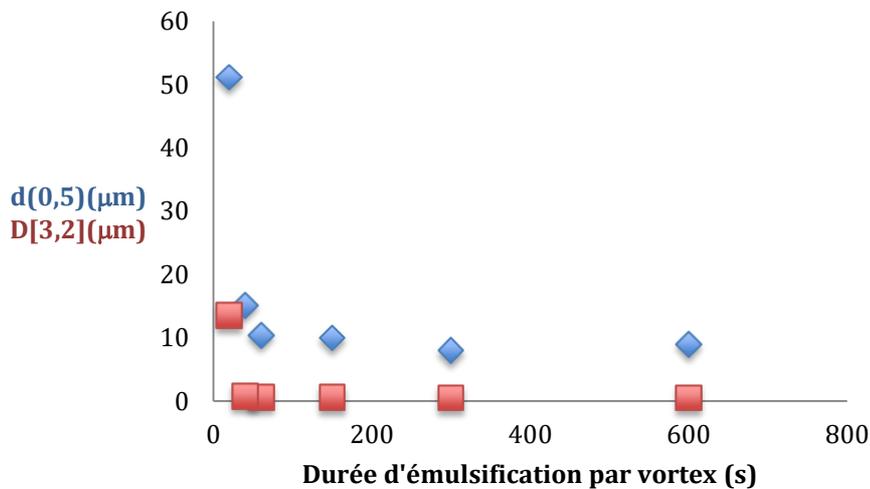
Dans ce paragraphe, nous avons utilisé le seul vortex comme méthode d'émulsification. Nous avons étudié l'influence du temps d'agitation au vortex pour une concentration en DexC<sub>6-20</sub> égale à 2, 1 ou 0,5 g/L. Nous avons également évalué l'influence de la concentration en PLA dans l'AcOEt, en la faisant varier de 50 à 10 g/L

A titre d'exemple, nous ne présenterons que les résultats obtenus avec une concentration en DexC<sub>6</sub> de 1g/L (dans une phase aqueuse de 10 mL d'eau saturée en acétate d'éthyle). Au cours de ces essais, la concentration du PLA a été gardée inchangée et égale à 50 g/L dans un volume d'AcOEt égal à 6 mL.



**Figure 76: Distributions granulométriques obtenues pour différentes durées d'émulsification (a) (10 min, 5 min, 2,5 min) et (b) (1 min, 40s, 20 s) (phase organique: 6mL PLA (50 mg / mL), phase aqueuse: 10 mL DexC<sub>6-20</sub> 1 g/L saturée en AcOEt).**

Les distributions de tailles de particules (Figure 76(a) et (b)) sont toutes multimodales quelque soit la durée d'émulsification par vortex.



**Figure 77: Evolution du (◆) d(0,5) et (■) D[3,2] en fonction de la durée d'émulsification par le vortex (phase organique : 6mL PLA (50 mg / mL), phase aqueuse : 10 mL DexC<sub>6-20</sub> 1 g/L saturée en AcOEt)**

Comme nous pouvons le constater (Figure 77), en diminuant la durée de l'émulsification la taille des particules augmente. En effet, la durée d'émulsification contrôle la taille des gouttelettes de PLA/AcOEt formées et donc celle des particules de PLA après évaporation du solvant organique. L'augmentation de la taille des particules peut être expliquée par le fait que lorsque la durée de cisaillement est très faible, le stabilisant n'a pas le temps de s'adsorber convenablement à la surface des gouttelettes pour les stabiliser. Des gouttelettes plus grandes se

forment lorsqu'une durée courte d'émulsification est utilisée. A partir d'une durée d'émulsification égale à 60 secondes, la taille des particules obtenues ne varie plus de façon sensible.

Ce procédé n'a pas été retenu pour l'élaboration de microparticules car indépendamment des temps de vortex utilisés, les distributions sont multimodales.

### **3.3.2.2.3. Agitation magnétique**

Afin de trouver des conditions plus favorables pour l'obtention de particules micrométriques, nous avons effectué plusieurs séries d'expériences en employant une agitation magnétique pour émulsifier la phase organique (PLA/AcOEt) dans une phase aqueuse de DexC<sub>6</sub>-16. Le détail de ce procédé est donné dans le chapitre matériels et méthodes (paragraphe - 2.2.3.1.2)

#### **a) Optimisation du procédé**

##### **i. Dispositif d'agitation**

Nous avons tout d'abord essayé d'optimiser la configuration du système d'agitation magnétique en étudiant l'influence de la longueur du barreau magnétique par rapport au diamètre du bécher utilisé. Trois types de barreaux de dimensions différentes ont été testés. Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Le diamètre du bécher utilisé a été fixé à 28 mm
- Phase aqueuse : 10 mL de solution de DexC<sub>6</sub>-16 à 5 g/L saturée en AcOEt
- Phase organique : 1 mL de solution de PLA à 150 g/L d'AcOEt
- Vitesse d'agitation : 500 rpm, durée d'émulsification 30 min.

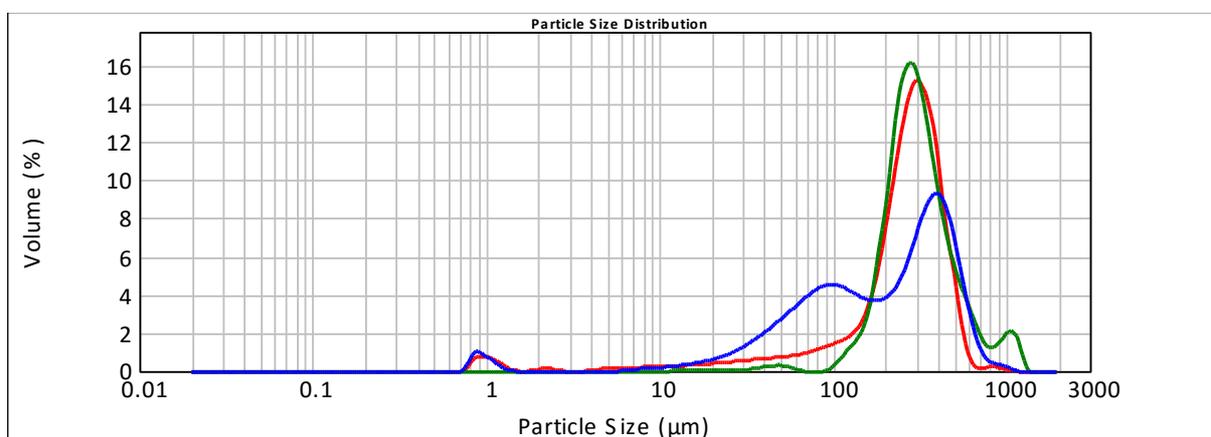
Lorsque le barreau magnétique est trop gros, un film de PLA finit par se former à la surface du barreau lors de la précipitation et dans le même temps, on observe la formation de gros agrégats. Dans le cas où le barreau magnétique est de dimension (25,5) (longueur  $l = 25$  mm et hauteur  $h = 5$  mm), on observe un film de PLA beaucoup plus faible sur le barreau que sur les autres barreaux utilisés. Le phénomène de formation de film de polymère est relativement marginal et vraisemblablement lié à la concentration élevée du PLA dans la phase organique. Afin de limiter cette formation de film, toutes les expériences qui suivront seront effectuées avec ce barreau magnétique.

Des essais préliminaires ont été effectués en variant la procédure d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse. L'ajout de la phase organique dans la phase aqueuse à l'aide d'un pousse seringue avec un débit fixé à 0,3 mL/min ainsi que l'injection en « one-pot » de la

phase organique dans la phase aqueuse pendant que cette dernière est mise sous agitation ne nous ont pas permis d'obtenir des émulsions avec des caractéristiques convenables. A chaque fois de grosses pertes en PLA sont occasionnées soit par le dépôt d'un film sur le barreau soit par formation d'agrégats en solution. C'est pourquoi une étape intermédiaire de pré-émulsification est nécessaire. Cette dernière est assurée par une agitation manuelle pendant une minute du tube contenant le mélange des deux phases (organique et aqueuse) permettant ainsi l'obtention d'une première émulsion grossière qui sera ensuite plus facilement cisailée par agitation magnétique.

## ii. Influence de la concentration en PLA

L'influence de la concentration du PLA utilisée pour la formulation de particules micrométriques a été étudiée. En effet comme nous l'avons vu précédemment, la concentration est un paramètre clé dans la formulation des émulsions H/E car elle peut modifier considérablement la viscosité de la phase organique.



**Figure 78: Distributions granulométriques des particules de PLA obtenues avant lavages en utilisant une concentration en PLA de 75g/L, 100g/L ou 150g/L dans 2 mL AcOEt.** (phase aqueuse : 10 mL DexC<sub>6</sub>-16 (5 g/L) non saturée en AcOEt, Vitesse d'agitation : 500 rpm, durée d'émulsification 30 min).

Comme précédemment décrit, dans le cas où la concentration en PLA dans l'AcOEt est égale à 150 g / L, on observe un léger dépôt de PLA sur le barreau magnétique. Ce dépôt a été retiré avant les mesures de tailles. Des microparticules de taille élevées sont obtenues des distributions de tailles de particules assez larges (Figure 78 et Tableau 28).

En revanche, dans le cas où la concentration en PLA est égale à 75 ou 100 g/L, des microparticules de tailles élevées sont obtenues, avec une distribution granulométrique beaucoup plus étroite. Dans ces deux derniers cas, les tailles obtenues sont comparables et les distributions de tailles sont quasiment superposables.

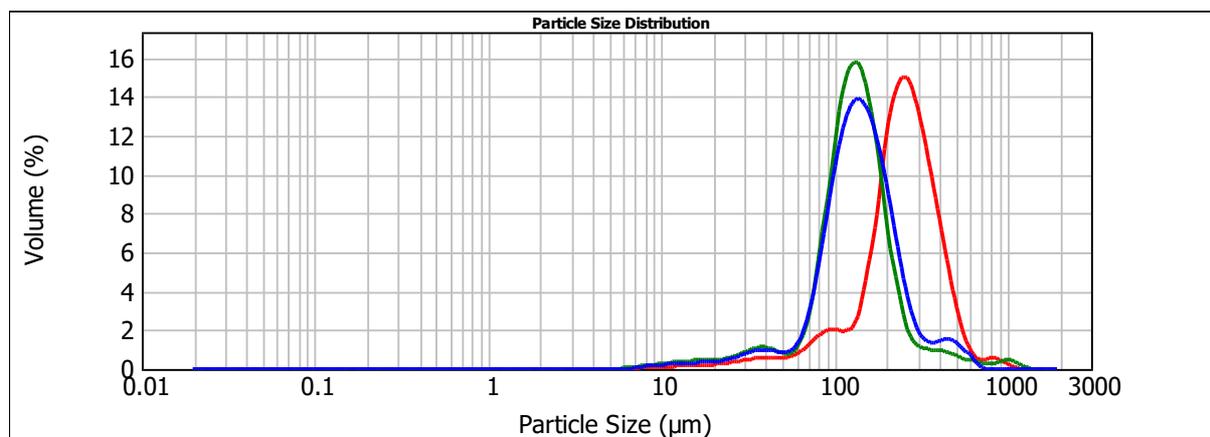
**Tableau 28: Evolution du d(0,5), du D[3,2] et du Span des particules de PLA obtenues avant lavages avec différentes concentrations en PLA (phase organique : 75g/L, 100g/L ou 150g/L dans 2 mL AcOEt, phase aqueuse : 10 mL DexC<sub>6</sub>-16 (5 g/L) non saturée en AcOEt, Vitesse d'agitation : 500 rpm, durée d'émulsification 30 min).**

[PLA] (mg/mL)	d(0,5) (µm)	D[3,2] (µm)	Span
75	276	34	1,31
100	298	262	1,29
150	362	138	1,75

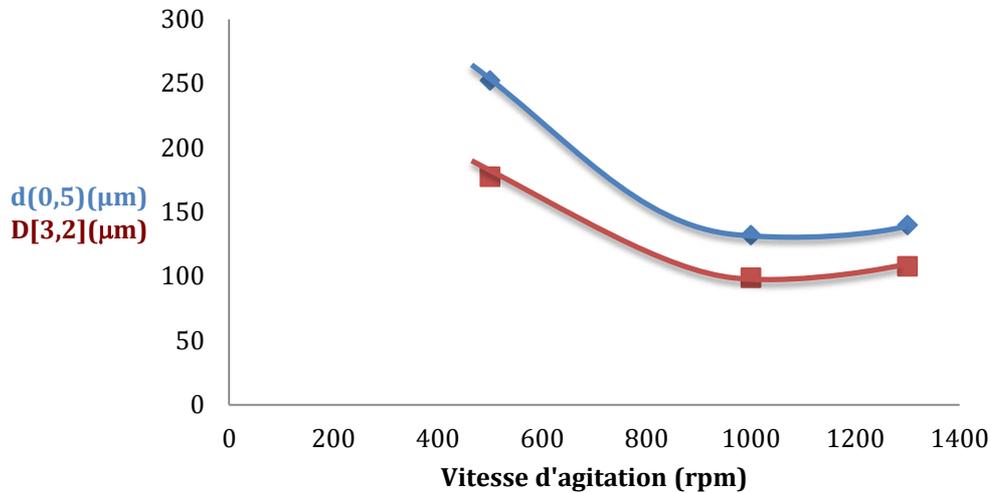
Sur la base de ces résultats, la concentration en PLA a été fixée à 100 g/L dans les essais qui vont suivre.

### iii. Influence de la vitesse d'agitation

Dans le but d'obtenir les distributions granulométriques les plus étroites possibles avec des tailles de particules bien définies, nous avons examiné l'influence de la vitesse d'agitation.



**Figure 79: Distributions granulométriques des particules obtenues en utilisant une vitesse d'agitation égale à : 500 rpm, 1000 rpm, et 1300 rpm (phase organique : 2 mL de PLA (100 mg / mL AcOEt), phase aqueuse : 10 mL DexC<sub>6</sub>-16 (5 g/L) non saturée en AcOEt, durée d'émulsification 30 min).**



**Figure 80: Evolution de la taille des particules obtenues en fonction de la vitesse d'agitation** (■) D (3,2) (◆) d(0,5) (phase organique : 2 mL de PLA (100 mg / mL AcOEt), phase aqueuse : 10 mL DexC<sub>6-16</sub> (5 g/L) non saturée en AcOEt, durée d'émulsification 30 min).

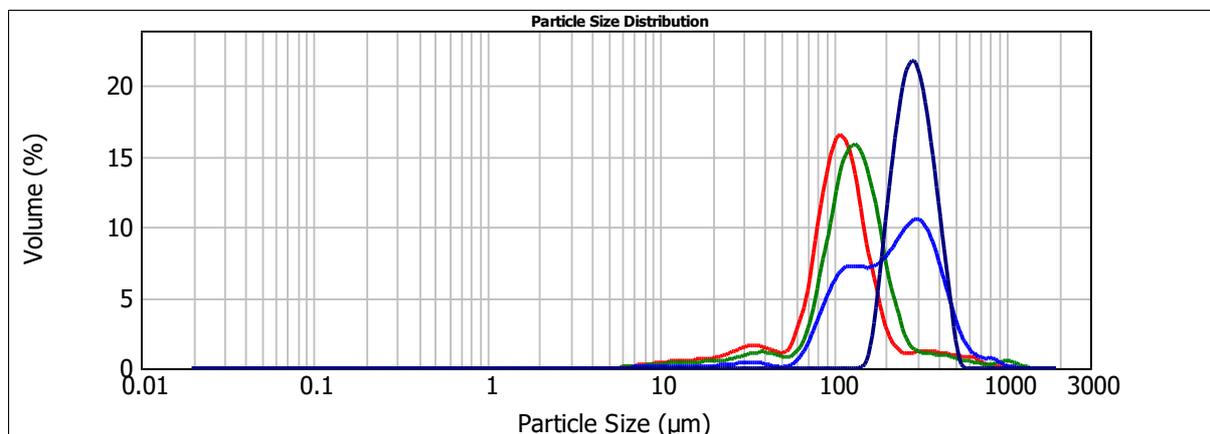
Nous pouvons constater que le fait d'augmenter la vitesse d'agitation de 500 à 1000 rpm permet de diminuer la taille des particules de manière assez significative. Dans ce dernier cas, le Span de la distribution en taille des particules est cependant légèrement plus élevé. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Sansdrap et al [38] qui ont étudié l'influence de la vitesse d'agitation sur la taille des particules de PLGA. La taille des particules de PLGA obtenues passe de 38,1 µm à 13,7 µm en augmentant la vitesse d'agitation de 250 rpm à 1600 rpm. En effet, l'augmentation de la vitesse d'agitation permet de fournir plus d'énergie ce qui favorise la division de la phase organique en gouttelettes de plus petites tailles.

Au delà de 1000 rpm, la taille des particules élaborées est de l'ordre de quelques centaines de micromètres et la vitesse d'agitation n'a plus d'influence détectable sur les distributions granulométriques mesurées.

Pour la suite, la vitesse d'agitation a été fixée à 1000 rpm.

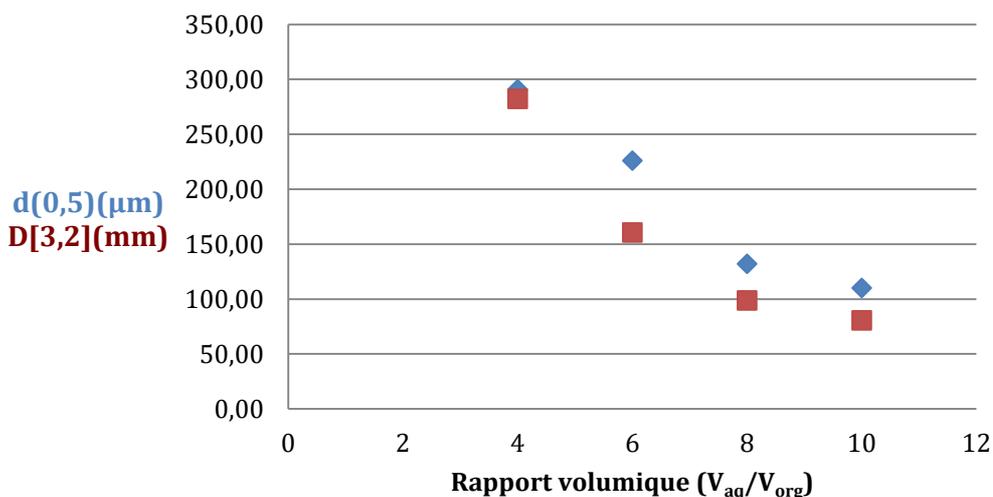
#### **iv. Influence du rapport volumique phase organique / phase aqueuse**

Le volume de phase aqueuse saturée en AcOEt a été varié de 10 à 4 mL, en gardant inchangé, le volume de phase organique (2 mL) (la Figure 81 et la Figure 82).



**Figure 81: Distributions granulométriques des particules de PLA avant lavage avec : 10, 8, 6, et 4 mL de phase aqueuse saturée en AcOEt (phase organique : 2 mL PLA (100 mg / mL AcOEt), phase aqueuse : x mL DexC6-16 5 g/L, vitesse d'agitation : 1000 rpm, durée d'émulsification : 30 min).**

A volume de phase organique constant, la diminution du volume de la phase aqueuse (de 10 à 4 mL) entraîne une augmentation de la taille des particules obtenues. Les distributions granulométriques obtenues sont décalées vers les tailles les plus élevées. Une distribution de taille monomodale et étroite est obtenue pour le plus faible rapport volumique phase aqueuse/phase organique.



**Figure 82: Evolution du (■)  $D[3,2]$  et (◆)  $d(0,5)$  en fonction du rapport volumique phase aqueuse /phase organique (x mL DexC<sub>6</sub>-16 5 g/L/ 2 mL PLA (100 mg / mL AcOEt), Vitesse d'agitation : 1000 rpm, durée d'émulsification 30 min).**

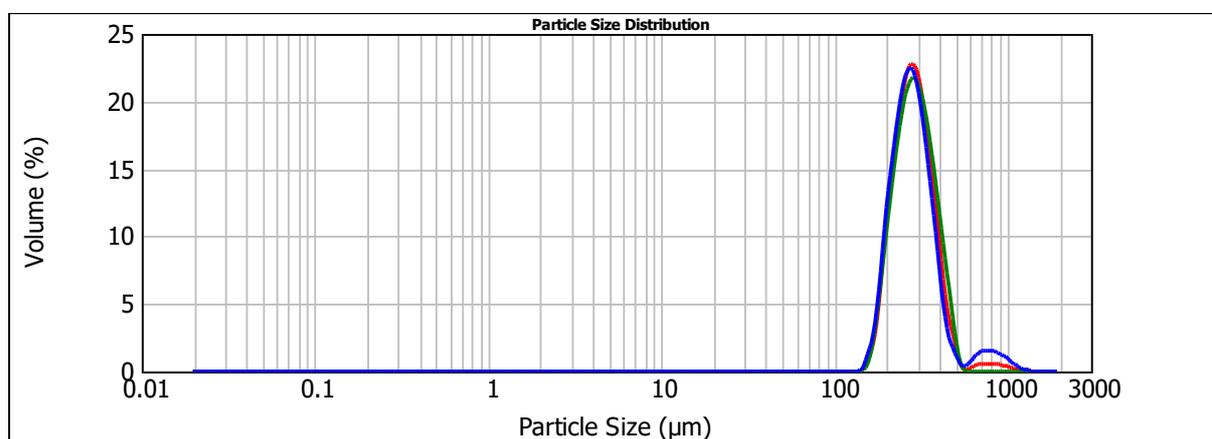
Suite à ces résultats, nous avons fixé le rapport volumique à 2. Ce rapport semble le plus adéquat pour avoir des distributions de tailles monomodales et bien définies avec des tailles bien contrôlées dans l'intervalle 100 µm – 1000 µm (Figure 62).

## b) Caractérisation des microparticules obtenues

### i. Stabilité aux lavages et à la lyophilisation

Les distributions de tailles de particules avant et après lavages et redispersion des suspensions ont été comparées. D'autre part les suspensions de particules, après les étapes de lavages ont été lyophilisées sans addition de cryoprotecteur puis leurs distributions de tailles de particules ont été contrôlées après redispersion dans l'eau (Figure 83).

Les résultats démontrent que, à toutes les étapes de traitement des suspensions de microparticules de PLA, les distributions de tailles de particules restent identiques.



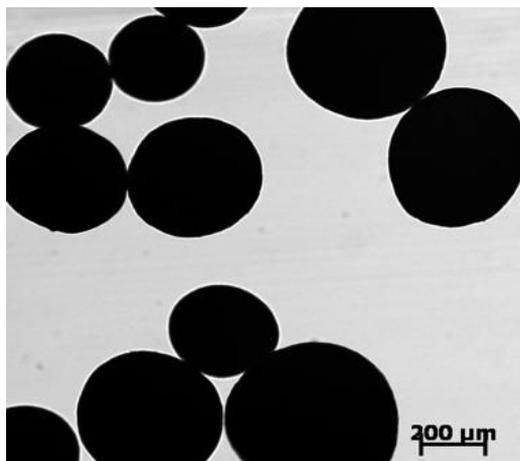
**Figure 83: Distributions de tailles de microparticules de PLA déterminées avant lavages, après lavages et après lyophilisation et redispersion** (phase organique : PLA 100g/L dans 2 mL d'AcOEt, phase aqueuse : 4 mL de DexC<sub>6</sub>-16 5g/L saturée en AcOEt, vitesse 1000 rpm, durée d'émulsification 30 minutes).

Il est à noter que cette fois les microparticules de PLA ont été lyophilisées sans aucun ajout de cryoprotecteur. La bonne redispersion après lyophilisation témoigne de la moindre sensibilité des microparticules à la congélation et à la lyophilisation par rapport aux nanoparticules. Cette redispersion est également une preuve indirecte de la présence des chaînes de dextrane en surface des particules. La présence de dextrane modifié en surface des particules n'a pas pu être vérifiée directement par RMN <sup>1</sup>H. En effet, compte-tenu de la faible surface spécifique des microparticules, les signaux du dextrane modifié dans ces conditions ne sont pas détectable notamment le signal du H anomère.

## ii. Morphologie des microparticules de PLA élaborées

Les microparticules élaborées dans les conditions optimisées ont été caractérisées par microscope optique (Figure 84).

Les microparticules obtenues présentent des morphologies sphériques. La comparaison entre la taille observée par microscope optique permet de confirmer les valeurs mesurées par granulométrie.



**Figure 84: Observation par microscope optique d'une suspension de microparticules de PLA élaborées par E-ES (phase organique : PLA 100g/L dans 2 mL d'AcOEt, phase aqueuse : 4 mL de DexC<sub>6</sub>-16 5g/L saturée en AcOEt, vitesse 1000 rpm, durée d'émulsification 30 minutes).**

## 3.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les études paramétriques de l'élaboration de particules nano- et micrométriques de PLA stabilisées par des DexC<sub>6</sub>- $\tau$ . Le but était de maîtriser l'élaboration de particules de PLA avant de commencer les essais d'encapsulation des SA dans ces vecteurs matriciels.

En premier lieu, nous nous sommes intéressées à l'élaboration des particules nanométriques du domaine n°1 (100 nm - 1  $\mu$ m) aussi bien par un procédé peu énergétique, la nanoprécipitation, que par un procédé très énergétique (Emulsion par US- évaporation de solvant). Des particules de tailles et morphologie contrôlées ont été alors obtenues. Les nanoparticules de PLA élaborées par E-ES présentent des tailles un peu plus faibles que celles obtenues par nanoprécipitation. Concernant la stabilité aux lavages et à la lyophilisation de ces nanoparticules, nous avons constaté que dans les deux cas, une bonne redispersion a lieu après lavages. Cependant, l'ajout

d'un cryoprotecteur (le tréhalose à raison de 10 mg/ mL de suspension) est indispensable pour assurer une bonne redispersion après la lyophilisation. La stabilité colloïdale dans les solutions salines a été aussi étudiée et nous avons pu mettre en évidence l'influence du taux de substitution du dextrane modifié sur cette propriété. En effet, pour des taux de substitution supérieurs à 20 %, les suspensions de nanoparticules sont moins stables dans les solutions salines que celles obtenues avec des dérivés du dextrane ayant des taux de substitution compris entre 14 et 20 %.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes fixés comme objectif d'élaborer des microparticules dans les domaines de tailles n°2 (1  $\mu\text{m}$  – 100  $\mu\text{m}$ ) et n°3 (100  $\mu\text{m}$  – 1000  $\mu\text{m}$ ), avec des tailles et des distributions de tailles bien maîtrisées. Après avoir testés différents procédés d'élaboration de microparticules par émulsion-évaporation de solvant (étape d'émulsification réalisée par ultrasons, UT, vortex ou encore agitation magnétique) ainsi qu'après avoir fait varier plusieurs paramètres de formulation (concentration en PLA ou en DexC<sub>6</sub>- $\tau$ , rapport volumique phase aqueuse/phase organique, puissance de sonification, vitesse d'agitation mécanique ...) aucun résultat n'a été concluant pour la préparation de particules dans le domaine n°2. Quand aux particules du domaine n°3, elles ont pu être élaborées et caractérisées avec succès par E-ES, par agitation magnétique. Les conditions optimales d'obtention de ces particules sont :

- Phase aqueuse : 4 mL d'une solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (5 g/L) saturée en AcOEt.
- Phase organique : 2 mL d'une solution de PLA (100g/L) dans AcOEt.
- Durée et vitesse d'émulsification : 1 minute de pré-émulsification manuelle puis 30 minutes d'émulsification à l'aide d'un barreau magnétique à une vitesse de 1000 rpm.

Les microparticules obtenues présentent l'avantage d'être stables aussi bien aux lavages qu'à la lyophilisation sans addition de cryoprotecteur.

Pour produire des microparticules ayant des tailles comprises dans le domaine n°2, des distributions de tailles étroites et des morphologies contrôlées, le procédé d'émulsion-évaporation de solvant, comportant une étape d'émulsification par agitation mécanique, semble adapté. Toutefois, nos résultats ont montré qu'il est difficile de maîtriser les conditions de formation des gouttes de phase organique en opérant l'émulsification avec les appareils disponibles à l'échelle du laboratoire, ce qui conduit à des distributions de tailles de particules très larges, mal définies et parfois peu répétables. L'utilisation de systèmes microfluidiques pour

réaliser l'étape d'émulsification nous a semblé une alternative intéressante et adaptée tant au domaine de tailles de particules visé (1  $\mu\text{m}$  – 100  $\mu\text{m}$ ) qu'à la mise en œuvre de conditions de cisaillement très bien définies conduisant à des distributions de tailles de particules étroites. Par ailleurs, l'usage de systèmes microfluidiques permet d'envisager la production de microparticules par un procédé continu. L'utilisation de systèmes microfluidiques pour la production de microparticules du domaine 2 sera décrite dans le chapitre 4.

### 3.5. Références bibliographiques

1. Drumright, R.E., P.R. Gruber, and D.E. Henton, *Polylactic Acid Technology*. Advanced Materials, 2000. **12**(23): p. 1841-1846.
2. Carothers, W.H., G.L. Dorough, and F.J.v. Natta, *Studies of polymerization and ring formation. X. The reversible polymerization of six-membered cyclic esters*. Journal of the American Chemical Society, 1932. **54**(2): p. 761-772.
3. Garlotta, D., *A literature review of poly(lactic acid)*. Journal of Polymers and the Environment, 2001. **9**(2): p. 63-84.
4. Lasprilla, A.J.R., G.A.R. Martinez, B.H. Lunelli, A.L. Jardini, and R. Maciel, *Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review*. Biotechnology Advances, 2012. **30**(1): p. 321-328.
5. Gupta, A.P. and V. Kumar, *New emerging trends in synthetic biodegradable polymers - Polylactide: A critique*. European Polymer Journal, 2007. **43**(10): p. 4053-4074.
6. Lasprilla, A.J.R., G.A.R. Martinez, B.H. Lunelli, A.L. Jardini, and R.M. Filho, *Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review*. Biotechnology Advances, 2012. **30**(1): p. 321-328.
7. Alexis, F., *Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly(lactic acid)-co-(glycolic acid)*. Polymer International, 2005. **54**(1): p. 36-46.
8. Li, S.M. and S. McCarthy, *Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide)*. Biomaterials, 1999. **20**(1): p. 35-44.
9. Li, S., S. Girod-Holland, and M. Vert, *Hydrolytic degradation of poly(dl-lactic acid) in the presence of caffeine base*. Journal of Controlled Release, 1996. **40**(1-2): p. 41-53.
10. Witt, C. and T. Kissel, *Morphological characterization of microspheres, films and implants prepared from poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: is the erosion controlled by degradation, swelling or diffusion?* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2001. **51**(3): p. 171-181.
11. Li, S. and S. McCarthy, *Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (DL-lactide)*. Biomaterials, 1999. **20**(1): p. 35-44.
12. Nampoothiri, K.M., N.R. Nair, and R.P. John, *An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research*. Bioresource Technology, 2010. **101**(22): p. 8493-8501.
13. Laville, M., *Nanoparticules polymères de deuxième et troisième générations pour des applications thérapeutiques anti-cancer et anti-HIV*. 2013, Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine, France.
14. Gavory, C., A. Durand, J.-L. Six, C. Nouvel, E. Marie, and M. Leonard, *Polysaccharide-covered nanoparticles prepared by nanoprecipitation*. Carbohydrate Polymers, 2011. **84**(1): p. 133-140.
15. Durand, A., E. Marie, E. Rotureau, M. Leonard, and E. Dellacherie, *Amphiphilic polysaccharides: Useful tools for the preparation of nanoparticles with controlled surface characteristics*. Langmuir, 2004. **20**(16): p. 6956-6963.
16. Rouzes, C., M. Leonard, A. Durand, and E. Dellacherie, *Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2003. **32**(2): p. 125-135.
17. Rouzes, C., *Nanosphères à cœur de poly(acide lactique) et couronne de dextrane : élaboration, propriétés et applications biomédicales*. 2001, Thèse de doctorat de l'Institut Nationale Polytechnique de Lorraine, France.

18. Rouzes, C., R. Gref, M. Leonard, A.D. Delgado, and E. Dellacherie, *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): p. 557-565.
19. Rotureau, E., M. Leonard, E. Marie, E. Dellacherie, T.A. Camesano, and A. Durand, *From polymeric surfactants to colloidal systems (1): Amphiphilic dextrans for emulsion preparation*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2006. **288**(1-3): p. 131-137.
20. Nouvel, C., J. Raynaud, E. Marie, E. Dellacherie, J.L. Six, and A. Durand, *Biodegradable nanoparticles made from polylactide-grafted dextran copolymers*. Journal of Colloid and Interface Science, 2009. **330**(2): p. 337-343.
21. Legrand, P., S. Lesieur, A. Bochot, R. Gref, W. Raatjes, G. Barratt, and C. Vauthier, *Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **344**(1-2): p. 33-43.
22. Schubert, S., J.T. Delaney, Jr., and U.S. Schubert, *Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid)*. Soft Matter, 2011. **7**(5): p. 1581-1588.
23. Lepeltier, E., C. Bourgaux, and P. Couvreur, *Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2014. **71**(0): p. 86-97.
24. Fessi, H., J.P. Devissaguet, F. Puisieux, and C. Thies, *Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles* 1992.
25. Laville, M., J. Babin, I. Londono, M. Legros, C. Nouvel, A. Durand, R. Vanderesse, M. Leonard, and J.-L. Six, *Polysaccharide-covered nanoparticles with improved shell stability using click-chemistry strategies*. Carbohydrate Polymers, 2013. **93**(2): p. 537-546.
26. Fonte, P., S. Soares, A. Costa, J.C. Andrade, V. Seabra, S. Reis, and B. Sarmento, *Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying*. Biomatter, 2012. **2**(4): p. 329-39.
27. Fonte, P., S. Soares, F. Sousa, A. Costa, V. Seabra, S. Reis, and B. Sarmento, *Stability Study Perspective of the Effect of Freeze-Drying Using Cryoprotectants on the Structure of Insulin Loaded into PLGA Nanoparticles*. Biomacromolecules, 2014. **15**(10): p. 3753-3765.
28. Saez, A., M. Guzman, J. Molpeceres, and M.R. Aberturas, *Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(3): p. 379-387.
29. Tadros, T., *Interparticle interactions in concentrated suspensions and their bulk (Rheological) properties*. Advances in Colloid and Interface Science, 2011. **168**(1-2): p. 263-277.
30. Fournier, C., M. Leonard, E. Dellacherie, M. Chikhi, H. Hommel, and A.P. Legrand, *EPR spectroscopy analysis of hydrophobically modified dextran-coated polystyrene*. Journal of Colloid and Interface Science, 1998. **198**(1): p. 27-33.
31. Bodmeier, R. and J.W. McGinity, *The preparation and evaluation of drug-containing poly(DL-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method*. Pharmaceutical Research, 1987. **4**(6): p. 465-471.
32. Jeffery, H., S.S. Davis, and D.T. Ohagan, *The preparation and characterization of poly(Lactide-co-Glycolide) microparticles. I. Oil- in-Water Emulsion solvent evaporation* International Journal of Pharmaceutics, 1991. **77**(2-3): p. 169-175.
33. Rao, J.P. and K.E. Geckeler, *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(7): p. 887-913.

34. Desgouilles, S., C. Vauthier, D. Bazile, J. Vacus, J.L. Grossiord, M. Veillard, and P. Couvreur, *The design of nanoparticles obtained by solvent evaporation: A comprehensive study*. Langmuir, 2003. **19**(22): p. 9504-9510.
35. Xu, K., A. Kozluca, E.B. Denkbaz, and E. Piskin, *Synthesis of PDLLA homopolymers with different molecular weights*. Journal of Applied Polymer Science, 1996. **59**(3): p. 561-563.
36. P., P. and H. D., *Polymères en solution*. Techniques de l'ingénieur Plastochimie et analyse physico-chimique, 1997(ref. article : a3050).
37. Chiewpattanakul, P., R. Covis, R. Vanderesse, B. Thanomsub, E. Marie, and A. Durand, *Design of polymeric nanoparticles for the encapsulation of monoacylglycerol*. Colloid and Polymer Science, 2010. **288**(9): p. 959-967.
38. Sansdrap, P. and A.J. Moës, *Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres*. International Journal of Pharmaceutics, 1993. **98**(1-3): p. 157-164.







# Chapitre 4

*Elaboration de  
microparticules de PLA par  
microfluidique*



## Table des matières

<b>4.1. Introduction</b> .....	201
<b>4.2. Choix de la géométrie et du matériau constituant le microsystème microfluidique</b> .....	201
<b>4.2.1. Géométrie</b> .....	202
<b>4.2.2. Matériau</b> .....	204
<b>4.3. Modification de la surface du PDMS</b> .....	204
<b>4.3.1. Procédures expérimentales</b> .....	206
<b>4.3.2. Résultats et discussion</b> .....	208
<b>4.4. Mise au point des conditions de formation de l'émulsion</b> .....	214
<b>4.5. Elaboration des particules par microfluidique</b> .....	216
<b>4.5.1. Emulsion-Evaporation de solvant</b> .....	217
<b>4.5.2. Emulsion-Diffusion de solvant</b> .....	218
4.5.2.1. Diffusion dans le volume minimal nécessaire .....	218
4.5.2.2. Diffusion dans un volume d'eau égal à 3 fois le volume minimal.....	220
<b>4.6. Etude paramétrique de la taille des gouttelettes formées et des particules obtenues</b> .....	221
<b>4.6.1. Variation des débits en gardant un rapport R constant</b> .....	222
<b>4.6.2. Influence de la variation du rapport R sur la taille des particules</b> .....	223
<b>4.7. Caractérisation des microparticules de PLA</b> .....	227
<b>4.7.1. Redispersion des microparticules après lavages</b> .....	227
<b>4.7.2. Caractérisation par microscope optique : morphologie des microparticules</b> .....	228
<b>4.7.3. Taux de recouvrement par le Dex<sub>6-15</sub></b> .....	229
<b>4.8. Conclusion</b> .....	232
<b>4.9. Références bibliographiques</b> .....	233



## 4.1. Introduction

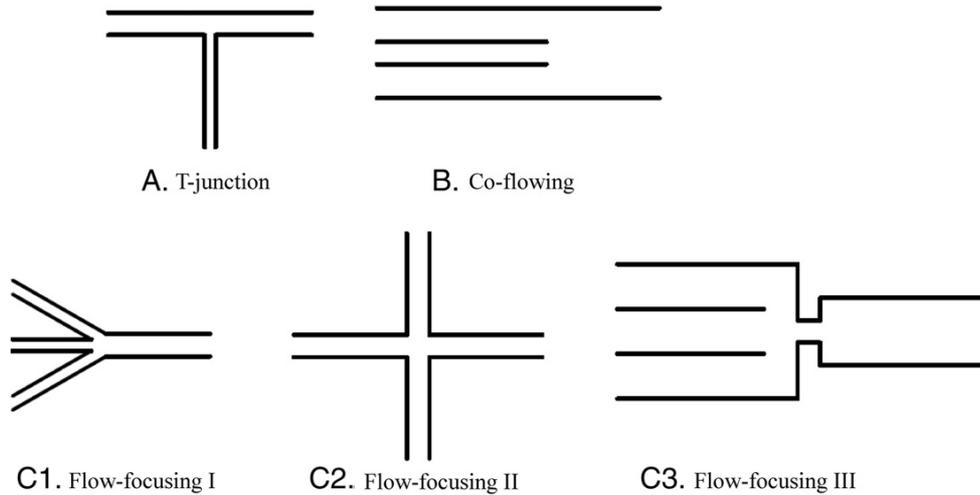
Dans le but d'élaborer des particules micrométriques sphériques ayant une taille bien contrôlée entre 1 et 100  $\mu\text{m}$  (domaine 2), nous avons opté pour la technologie microfluidique. En effet, les méthodes conventionnelles comme la nanoprécipitation et l'E-ES de solvant ne nous ont pas permis d'obtenir des particules dans cette gamme de taille avec une distribution de taille étroite. L'utilisation de procédés microfluidiques pour l'élaboration de particules est relativement récente et ces procédés sont en plein développement (cf. chapitre bibliographique – paragraphe 1.3). En particulier, l'emploi de polymères amphiphiles comme stabilisants des gouttes formées a été très peu utilisé et jamais dans le cas des dextrans modifiés.

Dans ce chapitre, nous commencerons par présenter la procédure suivie pour rendre hydrophile la surface d'une plaque de PDMS puis la procédure suivie pour rendre hydrophile les surfaces des systèmes microfluidiques fabriqués à partir de PDMS. Ensuite nous décrirons leur utilisation pour former des émulsions directes. Ces dernières permettront de produire des particules par émulsion/évaporation ou émulsion/diffusion. Enfin, nous exposerons la méthode de récupération des microparticules mise au point et nous détaillerons leurs caractéristiques.

La microfluidique diphasique a pour objet la manipulation de deux fluides immiscibles introduits dans un système de dimensions micrométriques. La rencontre de deux fluides immiscibles dans un canal microfluidique aboutit à la formation d'émulsions ou d'un co-écoulement en fonction des propriétés physico-chimiques des fluides, des conditions d'écoulement et de l'état de surface des matériaux utilisés pour la fabrication du canal [1-10].

## 4.2. Choix de la géométrie et du matériau constituant le microsystème microfluidique

Plusieurs facteurs ont une influence sur la formation de l'émulsion à l'intérieur du microsystème ainsi que sur la taille des gouttelettes formées. Parmi ces facteurs, on peut citer la géométrie des canaux constituant les microsystèmes ainsi que la nature des matériaux utilisés. Dans la littérature [11], plusieurs géométries de microsystèmes ont été utilisées pour l'élaboration d'émulsions. Parmi les géométries de microcanaux les plus connues on trouve : la jonction en T, la géométrie en « co-flowing » et le « flow-focusing (FF) » (Figure 85).



**Figure 85: Géométries les plus utilisées des microcanaux en microfluidique [11].**

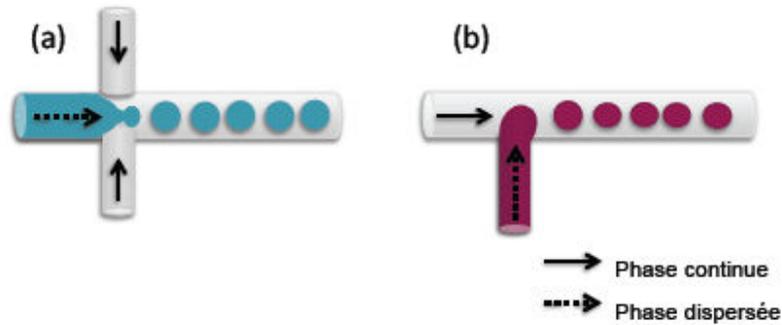
Les matériaux les plus souvent utilisés pour la fabrication des microsystèmes sont le verre et le silicium. Cependant, l'utilisation de ces matériaux est très coûteuse et leurs procédés de fabrication sont assez compliqués. Ces dernières années, plusieurs nouveaux matériaux ont été développés et utilisés pour la fabrication de systèmes microfluidiques parmi lesquels nous pouvons citer le PDMS [12-15] le PMMA [16, 17], le polycarbonate (PC) [18, 19] et le poly(téréphtalate d'éthylène) (PET) [20].

Dans ce qui suit, nous allons présenter la géométrie du microcanal utilisé, ainsi que les caractéristiques du matériau choisi pour l'élaboration de l'émulsion à l'intérieur du microsystème.

#### 4.2.1. Géométrie

Comme nous l'avons déjà présenté dans le chapitre bibliographique (cf. chapitre 1 – paragraphe 1.3), le processus de formation de gouttelettes à l'intérieur d'un système microfluidique repose sur la mise en contact de deux phases liquides, une devenant la phase dispersée et l'autre la phase continue (non miscible ou partiellement miscible à la phase dispersée), à l'intérieur d'un microcanal. Une zone de cisaillement entre les deux fluides non miscibles est produite dans la jonction (appelée aussi constriction dans le cas d'une géométrie en FF) là où ils se rencontrent. Ce cisaillement, ainsi que les forces de pression qui vont étrangler la phase dispersée, vont déformer l'interface entre les deux fluides jusqu'à la génération d'une goutte.

Dans ce qui suit, nous allons brièvement rappeler le principe d'obtention de gouttelettes à l'intérieur de microcanaux en géométries en T et en FF.



**Figure 86: Formation des gouttelettes à l'intérieur de microsystemes ayant une géométrie (a) en Flow-Focusing (b) en T.**

Le principe de la jonction T (b sur la Figure 86) repose sur le fait que la phase dispersée est amenée dans le canal principal, où circule la phase continue, par un canal secondaire perpendiculaire à celui-ci [10]. Le cisaillement à l'intersection conduit à la formation puis au détachement successif des gouttes. Dans le cas de la géométrie en FF, la phase dispersée est injectée au milieu de deux entrées de phase continue. Le cisaillement de la phase continue s'exerce sur les deux cotés de l'entrée de phase dispersée : elle est ainsi pincée par la phase continue jusqu'à la formation d'une goutte. Le co-flux laminaire ainsi créé passe à travers une constriction, ce qui l'affine et induit éventuellement la rupture du jet en gouttelettes. La taille des gouttes formées diminue avec la diminution du rapport  $Q_c/Q_d$ .

La géométrie en FF présente l'avantage de pouvoir former des gouttelettes avec des tailles pouvant indifféremment être plus grandes ou plus petites que la taille de la constriction du système utilisé et dont la taille est contrôlée par les débits de phase continue et dispersée[1]. Dans des conditions bien contrôlées de flux ou de pression, la taille des gouttes obtenues est extrêmement reproductible. Par ailleurs, la fréquence de formation des gouttes est plus élevée que celle obtenue avec une géométrie en T. Selon Seemann et al. [21], la fréquence de production de gouttelettes dans un système en FF peut atteindre ou dépasser les 1000 hertz selon les conditions opératoires utilisées [22, 23] alors que, pour une géométrie T, la fréquence est de quelques centaines de hertz. Compte-tenu de ces différents avantages attribués à la géométrie en FF, nous l'avons choisie pour élaborer les systèmes microfluidiques utilisés dans la suite du chapitre.

### 4.2.2. Matériau

Nous avons choisi le PDMS comme matériau pour fabriquer les systèmes microfluidiques. Le PDMS présente de bonnes propriétés optiques, il est assez transparent et présente une stabilité thermique et chimique compatible avec de nombreuses applications. D'autre part, la facilité d'utilisation, la rapidité ainsi que le faible coût de fabrication des systèmes en PDMS permet l'utilisation de ce matériau pour la réalisation des prototypes de microfluidique et pour la fabrication de toute structure de dimensions micrométriques [24-28].

La fabrication de microsystèmes en PDMS pour l'élaboration d'émulsions comporte plusieurs étapes. La procédure de fabrication ainsi que les dimensions des canaux du système microfluidique utilisé sont décrites dans le chapitre 2 (paragraphe 2.2.3.2.1).

## 4.3. Modification de la surface du PDMS

Le PDMS, comme nous l'avons déjà présenté ci-dessus, possède plusieurs avantages pour la fabrication des microsystèmes microfluidiques. Néanmoins, il est hydrophobe ce qui n'est pas favorable pour former des émulsions directes H/E dans de tels microsystèmes. En effet, lorsque les parois sont hydrophobes, on a tendance à former des gouttes d'huile dans de l'eau et quand les parois sont hydrophiles, on a tendance à former des gouttes d'eau dans l'huile. La solution était donc de trouver un traitement adéquat qui permettrait de rendre la surface du PDMS hydrophile pendant une durée suffisante.

La modification de la surface du PDMS a fait l'objet de nombreux travaux [29-31]. Plusieurs méthodes ont été proposées dans le but d'améliorer la mouillabilité par l'eau de la surface du PDMS. Nous pouvons répartir ces traitements en deux classes :

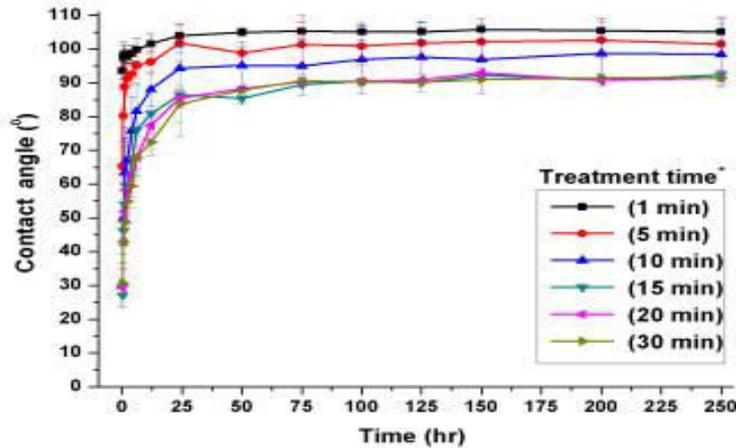
- Traitements par voie sèche : le traitement au plasma est l'une des méthodes les plus utilisées pour la modification de surface du PDMS. Par définition, le plasma est un gaz partiellement ionisé dans lequel une certaine proportion d'électrons et d'ions se trouvent libres et où le nombre de charge positives est égal au nombre de charges négatives [31]. Ce traitement repose sur l'activation de la surface du PDMS en utilisant le plasma associé à l'un des gaz suivant : l'oxygène [32], l'azote [33] ou l'argon [34] qui se dissocient et réagissent avec la surface du PDMS. Le traitement du PDMS par décharge de corona a été aussi évoqué dans la littérature. L'effet corona correspond à la formation d'un champ de haute énergie électromagnétique près de la surface qui a pour conséquence une

ionisation importante de cette dernière. Dans la région ionisée, diverses espèces sont présentes (ions, radicaux libres, électrons, molécules dans un état excité). Les radicaux libres permettent d'oxyder la surface du PDMS traité [35]. Le PDMS traité par le plasma est très hydrophile mais pour une durée très limitée, de sorte qu'au bout d'une heure le PDMS retrouve quasiment son hydrophobie d'origine.

- Traitements par voie humide : ce type de traitement consiste à déposer une couche adéquate sur la surface du PDMS par une adsorption physique d'un polymère amphiphile chargé ou par dépôt de multicouches de polyélectrolytes [36] ou par traitement chimique par un mélange de piranha et de potasse par exemple [37].

Des nouveaux traitements de surface qui combinent un traitement par voie sèche avec un traitement par voie humide ont été récemment développés. Hemmila et al. [27] ont associé un traitement au plasma oxygéné avec une formation de brosses de polymère par « grafting from » (PEG) ou « grafting to » (PVP ou PEG) pour rendre hydrophile la surface du PDMS. Une très bonne hydrophilie a été obtenue à l'issue de ces différents traitements, attestée par des angles de contact avec l'eau autour de 30°. De plus, l'hydrophilie a été maintenue pendant au moins 6 mois.

Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser une méthode de modification chimique pour rendre la surface du PDMS hydrophile. Nous nous sommes basés sur les travaux de Maji et al. [37] qui ont développé un traitement en deux étapes. D'abord un premier traitement avec du piranha (un mélange d'eau oxygéné et d'acide sulfurique  $H_2O_2/H_2SO_4$  (2/3)) est appliqué pendant 15 minutes. Ce traitement sert à décaper la surface et à assurer le clivage des groupements méthyle (-CH<sub>3</sub>) des chaînes du PDMS. La surface est ensuite rincée avec de l'eau Milli-Q. La deuxième étape consiste à traiter la surface avec de l'hydroxyde de potassium (KOH 1M) qui permettra l'oxydation des sites clivés en groupements polaires hydrophiles (silanol: Si-OH) ce qui rendra la surface nettement plus hydrophile. Ce traitement a été optimisé par Maji et al. qui ont montré que son utilisation permet d'avoir un faible angle de contact (27°). Néanmoins, ce traitement de surface ne permet pas de maintenir une très bonne hydrophilie pendant une longue durée. En effet, au bout de 25 h, l'angle de contact est revenu à 85°. Ceci ne laisse pas assez de temps pour produire une quantité suffisante de particules (Figure 87). La courbe correspondant aux conditions utilisées dans nos expériences est celle représentée par les triangles verts dans les travaux de Maji et al., pour laquelle la durée des étapes de traitement du PDMS avec du piranha puis avec de la potasse est de 15 minutes pour chacune.



**Figure 87: Suivi de l'angles de contact en fonction du temps pour des gouttes d'eau sur des surfaces de PDMS traitées avec du  $H_2O_2/H_2SO_4$  -2/3 + KOH (1M) avec différents temps de traitement [37].**

Actuellement, et sauf erreur ou omission de notre part, ce traitement n'a jamais été directement appliqué dans un système microfluidique fabriqué en PDMS et la faisabilité de son utilisation n'a pas été vérifiée.

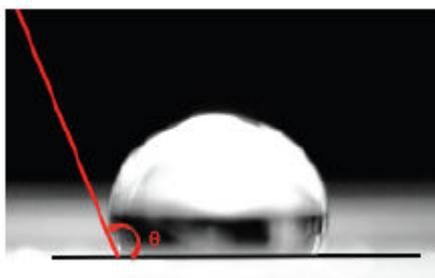
Dans notre cas, l'intérêt d'utiliser des systèmes microfluidiques à surface hydrophile est de pouvoir préparer des émulsions directes à l'intérieur de ces systèmes. La phase continue qui sera utilisée est une solution de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (5g/L) saturée en AcOEt. Le dextrane modifié du fait de son caractère amphiphile serait susceptible de s'adsorber sur la surface PDMS et pourrait ainsi la recouvrir d'une couche de chaînes de polysaccharide hydrophile. Nous avons cherché à savoir si la présence de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  pouvait provoquer une hydrophilisation de la surface du PDMS et de ce fait venir en complément voire en substitution d'un des traitements de surface déjà employés.

Dans ce but, nous avons choisi de vérifier l'efficacité du traitement avec le piranha et la potasse selon la procédure décrite dans la littérature et d'évaluer l'effet de la présence du DexC<sub>6</sub>- $\tau$  sur l'état de surface des canaux en PDMS à l'aide d'une série d'expériences décrites ci-après.

#### 4.3.1. Procédures expérimentales

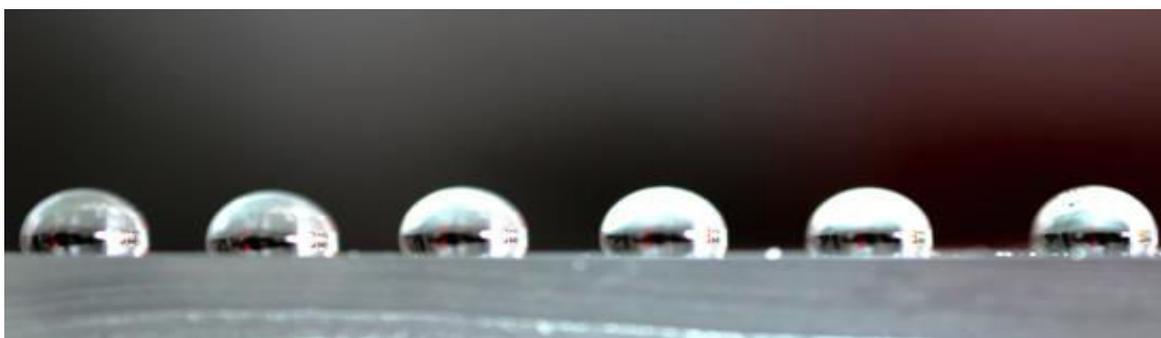
Afin de déterminer l'effet de différents traitements sur l'état de surface du PDMS, des mesures d'angles de contact ont été effectuées immédiatement après chaque traitement et au cours du temps. Le PDMS a été coulé dans des boîtes de Petri de façon à avoir une des surfaces de la plaque de PDMS bien collée à la surface du récipient. Sinon, le PDMS flotte sur le liquide utilisé pour le traitement de surface, ce qui peut créer une hétérogénéité (des zones bien traitées

et d'autres non). Après chaque traitement, des petites plaques de PDMS traitées sont découpées puis rincées à l'eau milli-Q ensuite séchées avec un gaz inerte (le  $N_2$  a été utilisé dans notre cas). Des gouttes d'eau milli-Q ayant une résistivité égale à  $18,4 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  ont été déposées, à l'aide d'une seringue Hamilton ( $10 \mu\text{L}$ ), sur les plaques de PDMS traitées ou non. Le volume de chaque goutte déposée est égal à  $5 \mu\text{L}$  aux erreurs expérimentales près. Les images des gouttes ont été prises par une caméra à haute résolution (CANON EOS 70D) et les valeurs des angles de contact ont été estimées à l'aide d'un rapporteur numérique (application Protractor sur le système d'exploitation IOS). La Figure 88 présente un exemple de mesure d'angle de contact pour une goutte d'eau déposée sur une surface de PDMS non traitée.



**Figure 88: Mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée sur une surface de PDMS non traitée**

Pour chaque traitement de surface, la valeur retenue de l'angle de contact est une moyenne d'un minimum de 7 mesures relatives à des gouttes déposées sur la même plaque de PDMS à différents endroits (Figure 89).



**Figure 89: Dépôt de 6 gouttes d'eau sur une même surface de PDMS : cette photo a été prise pour une surface de PDMS non traitée ( $\theta = 112^\circ$ )**

Dans le but d'évaluer le maintien ou non de l'hydrophilie de la surface de PDMS après le traitement, des séries de mesures d'angles de contact ont aussi été effectuées à différents

intervalles de temps. Le Tableau 29 regroupe le descriptif de chaque traitement de surface effectué.

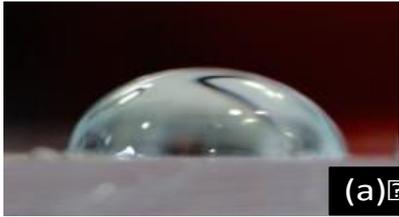
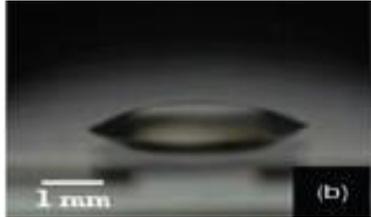
**Tableau 29: Différents traitements appliqués aux plaques de PDMS**

Traitement	Descriptif
A	PDMS natif ou PDMS non traité.
B	PDMS traité avec une solution de mélange piranha [ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ -2/3] pendant 15min puis lavé avec de l'eau Milli-Q puis traité avec de la potasse 1M pendant 15min et lavé avec de l'eau Milli-Q.
C-n	PDMS traité avec une solution de mélange piranha [ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ -2/3] pendant 15min puis rincé avec de l'eau Milli-Q puis traité avec de la potasse 1M pendant 15min et lavé avec de l'eau Milli-Q. La plaque de PDMS est ensuite immergée dans une solution de DexC <sub>6</sub> -17 (5g/L) saturée en AcOEt. n étant la durée (en heures) du contact de la plaque de PDMS avec la solution de dextrane modifié.
D-n	La plaque de PDMS est traitée avec une solution de DexC <sub>6</sub> -17 (5g/L) saturée en AcOEt. n étant la durée (en heures) du contact de la plaque de PDMS avec la solution de dextrane modifié.

### 4.3.2. Résultats et discussion

Au cours des premières expériences, nous avons mesuré les angles de contact de gouttes d'eau sur du PDMS natif et sur du PDMS traité selon la méthode de Maji et al [37]. Avec la surface non traitée, l'angle de contact mesuré expérimentalement est égal à  $112^\circ$  ce qui est en parfait accord avec les données de la littérature. Brent et al [32] ont obtenu un angle de contact d'une goutte d'eau sur une surface de PDMS non traitée égal à  $112 \pm 2^\circ$ . Après avoir réalisé le traitement B l'angle de contact d'une goutte d'eau sur la surface a une valeur égale à  $70^\circ$ . Cette valeur démontre qu'on augmente bien le caractère hydrophile de la surface du PDMS par ce traitement. Cependant cette valeur est différente de la valeur obtenue par Maji et al. qui, en effectuant le même traitement, trouvent un angle de  $27^\circ$  (Tableau 30). L'expérience a été refaite à plusieurs reprises et cet écart entre les deux valeurs a été confirmé même si les expériences ont été effectuées à notre connaissance dans des conditions similaires à celles décrites par Maji et al.

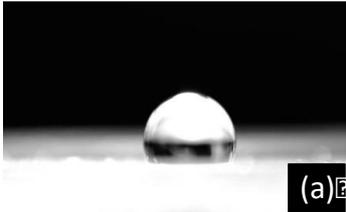
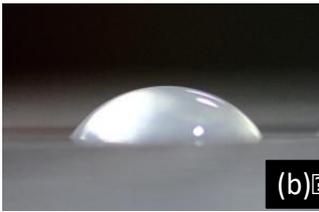
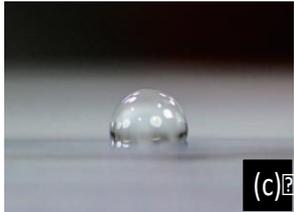
**Tableau 30: Images et valeurs de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur la surface du PDMS ayant subi le traitement B (a) au laboratoire (b) par l'équipe de Maji et al.**

Traitement	B (réalisé au laboratoire)	B (Maji et al)
Image		
Angle de contact (°)	70	27

Ces résultats peuvent être expliqués en considérant que la variation de l'angle de contact, dans la première heure suivant le traitement est très accentuée (cf. Figure 87) et que l'angle atteint une valeur proche ou légèrement supérieure à  $60^\circ$  en moins d'une heure (malheureusement le graphe présenté dans la publication ne détaille pas cette zone). Au bout de 10 jours, Maji et al notent que l'angle de contact (mesuré sur la surface traitée dans les conditions optimales) augmente de  $27^\circ$  à  $92,4^\circ$ . Cette diminution du caractère hydrophile de la surface a été attribuée par plusieurs auteurs à la réorientation progressive au cours du temps des groupements hydrophiles présents à la surface vers l'intérieur du matériau polymère [31, 37, 38]. En effet, les chaînes présentes à la surface du polymère sont plus mobiles que celles présentes au cœur du matériau [39]. D'autres auteurs ont évoqué la migration d'espèces ayant de faibles masses molaires de l'intérieur de la plaque de PDMS vers la surface lui conférant ainsi un caractère de plus en plus hydrophobe. Concernant la nature exacte de ces espèces, les auteurs évoquent des chaînes linéaires de PDMS non réticulées ou encore des molécules résiduelles de l'agent de réticulation [40].

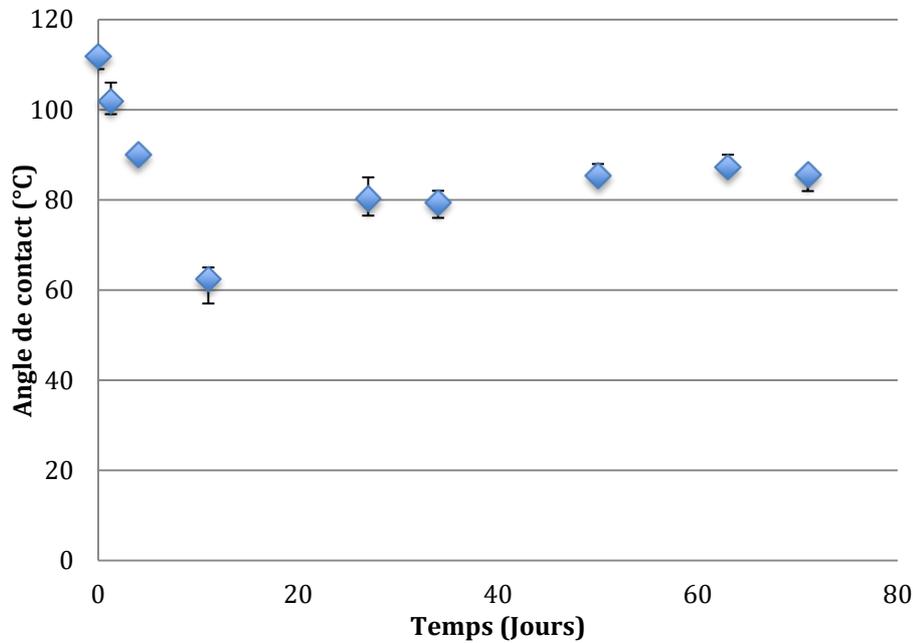
Dans le but d'étudier l'influence de la présence du DexC<sub>6</sub>- $\tau$  sur l'hydrophilie de la surface du PDMS, deux séries de mesures d'angle de contact ont été effectuées (C-30 et D-30, cf. Tableau 29) avec ou sans traitement par le mélange piranha et la solution de KOH (Tableau 31).

**Tableau 31: Comparaison entre les angles de contacts de gouttes d'eau sur une surface de PDMS ayant subi ou pas un traitement avec du DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (a) PDMS natif (b) surface ayant subi le traitement B et un traitement avec une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5g/L) pendant 30h (c) surface traitée pendant 30h avec une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5g/L).**

Traitement	A	C-30	D-30
Image			
Angle de contact (°)	112	53	102

Les résultats montrent que le traitement de la surface du PDMS par la solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5g/L) permet d'augmenter son hydrophilie, c'est-à-dire de diminuer la valeur de l'angle de contact. Ainsi, le traitement B permet d'obtenir un angle de contact autour de 70° (Tableau 30) et si ce traitement est suivi par une immersion dans une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5g/L), l'angle de contact diminue encore jusqu'à 53°. Une explication possible de cette diminution de l'angle de contact en présence de dextrane modifié est qu'à la suite de la mise en contact avec le mélange piranha et la solution de KOH, les macromolécules de dextrane modifié peuvent s'adsorber à la surface du PDMS et augmenter encore l'hydrophilie de la surface en la recouvrant par les chaînes de polysaccharide. L'hypothèse de l'adsorption physique du dextrane modifiée se trouve confortée par la mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur une surface de PDMS traitée pendant 30 heures avec une solution de Dextrane modifié. Cette fois-ci, l'angle de contact a une valeur de 102° au lieu de 112° pour une surface de PDMS non traitée. Cette diminution est cohérente avec l'hypothèse de l'adsorption du dextrane modifié à la surface du PDMS et montre que le processus est assez lent.

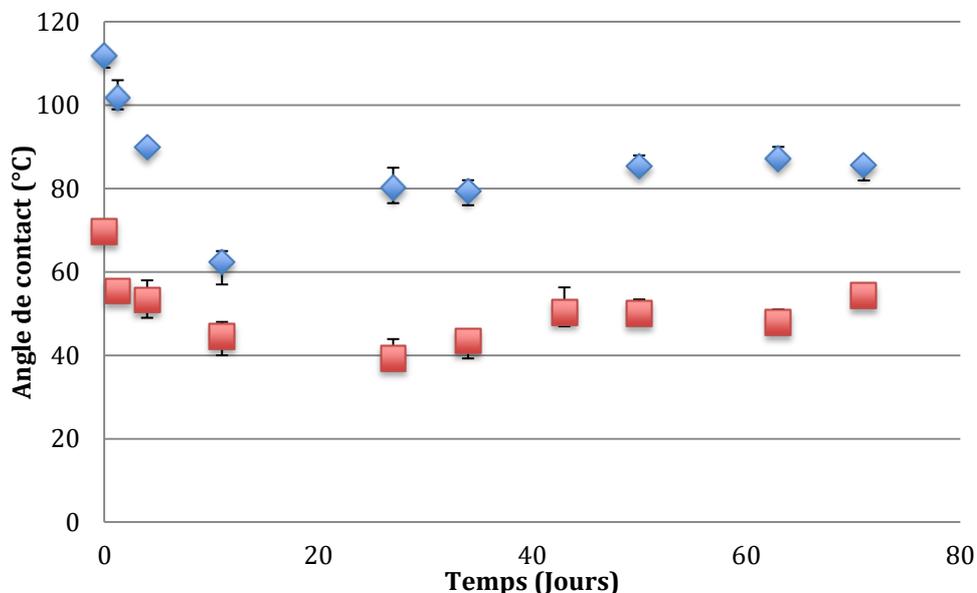
Afin de confirmer que l'utilisation du DexC<sub>6</sub>-17 à lui seul pouvait assurer à long terme la bonne hydrophilie de la surface du PDMS, nous avons suivi l'évolution de l'angle de contact au cours du temps tout en gardant l'échantillon de PDMS immergé dans une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5g/L) saturée en AcOEt (Figure 90).



**Figure 90: Evolution de l'angle de contact des gouttes d'eau sur une surface de PDMS natif conservée dans une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5g/L) saturée en AcOEt (Traitement D).**

Le suivi de l'angle de contact au cours du temps montre que la surface devient progressivement hydrophile et se stabilise après 71 jours à 85°. Ceci est attribué à la cinétique d'adsorption du dextrane modifié à la surface du PDMS natif.

En comparant le résultat du traitement de la surface de PDMS par le mélange piranha et la solution de potasse (B) avec celui résultant du traitement par une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (D), il apparaît clairement que le traitement B nécessite des temps de contact beaucoup plus courts. Toutefois, il est aussi établi que l'hydrophilie obtenue après le traitement B diminue significativement dans les 10 jours qui suivent. En considérant que le DexC<sub>6</sub>-17 sera toujours présent dans la phase aqueuse continue, nous avons envisagé que son adsorption conduirait à maintenir le caractère hydrophile de la surface de PDMS traitée sur une durée plus longue que lorsque seuls le mélange piranha et la solution de KOH sont utilisés. Afin de vérifier cette supposition, nous avons suivi l'évolution au cours du temps de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur une surface de PDMS traitée en premier lieu avec du Piranha et du KOH (1M) puis immergée dans une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5g/L) saturée en AcOEt (traitement C, Figure 91).

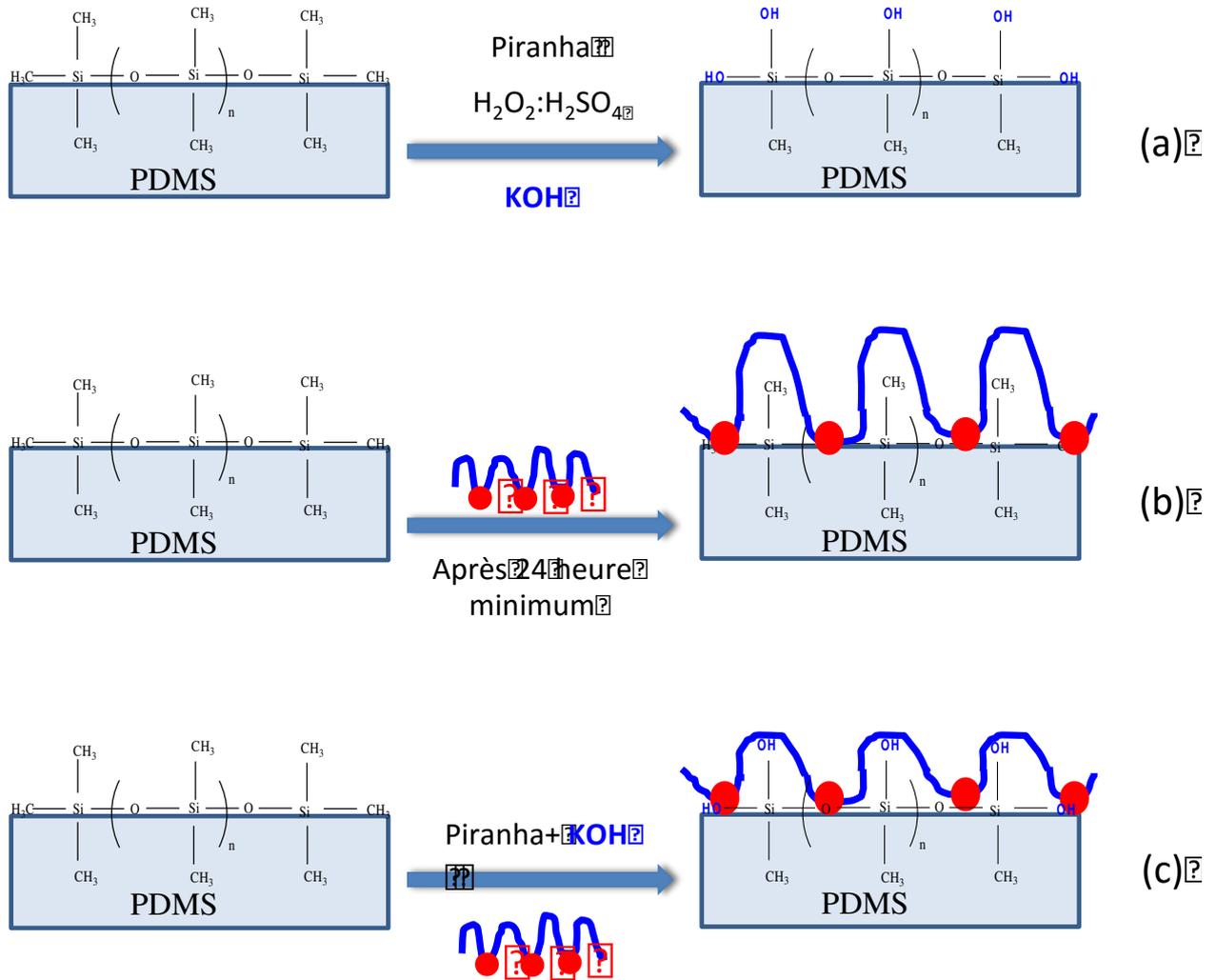


**Figure 91: Evolution des mesures des angles de contacts des gouttes d'eau en fonction du temps sur une (◆) surface du PDMS native conservée dans une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5g/L) saturée en AcOEt (Traitement D) (■) surface du PDMS traitée avec du piranha et de la potasse puis conservée dans une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5g/L) (Traitement C).**

Pour la surface traitée selon la procédure C, l'angle de contact mesuré diminue de façon beaucoup plus rapide que dans le cas du traitement D, et demeure faible même après 71 jours (54,3° au bout de 71 jours, Figure 91). L'hydrophilie de la surface est parfaitement maintenue pendant toute la durée de l'expérience. Pendant cette durée, aucun signe du retour à l'état hydrophobe de la surface du PDMS n'a été noté. Le dextrane modifié contribue donc à conserver le caractère hydrophile de la surface du PDMS obtenu par le traitement B.

Rappelons que Maji et al ont montré qu'une plaque de PDMS traitée avec le traitement B commence à retrouver son hydrophobie 25h après la fin du traitement. Au bout de 11 jours, l'angle de contact mesuré est égal à 92° alors qu'en présence de DexC<sub>6</sub>-17, cet angle est toujours inférieur à 55° après 71 jours.

Pour résumer, les hypothèses établies par rapport aux différents mécanismes d'hydrophilisation de la surface du PDMS natif en fonction du traitement réalisé sont schématisées dans la Figure 92.

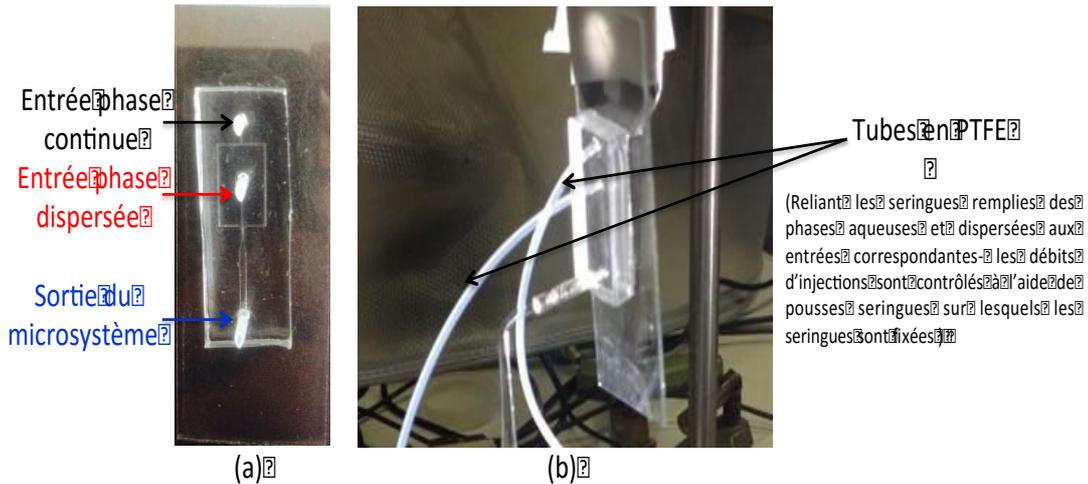


**Figure 92: Mécanismes d'hydrophilisation de la surface du PDMS (a) par un traitement chimique avec du piranha et du KOH (b) par l'adsorption du DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (c) par combinaison du traitement chimique avec l'adsorption du DexC<sub>6</sub>- $\tau$ .**

L'étude de la mouillabilité de la surface par ces différents traitements appliqués montre que le dextrane modifié joue un rôle important d'une part dans l'hydrophilisation de la surface du PDMS et d'autre part dans maintien de cette hydrophilie au cours du temps. Ceci démontre donc que le dextrane modifié, outre son rôle de stabilisant des gouttes formées, va aussi contribuer à l'hydrophilie de la surface des canaux et ainsi la maintenir sur toute la durée de fabrication des particules. De plus, un traitement préalable de la surface des canaux par circulation de la solution de dextrane amphiphile (analogue du traitement D) devrait permettre d'employer le système microfluidique en PDMS sans recourir à un autre traitement de surface. Nous vérifierons ces différentes hypothèses lors de la préparation des microparticules.

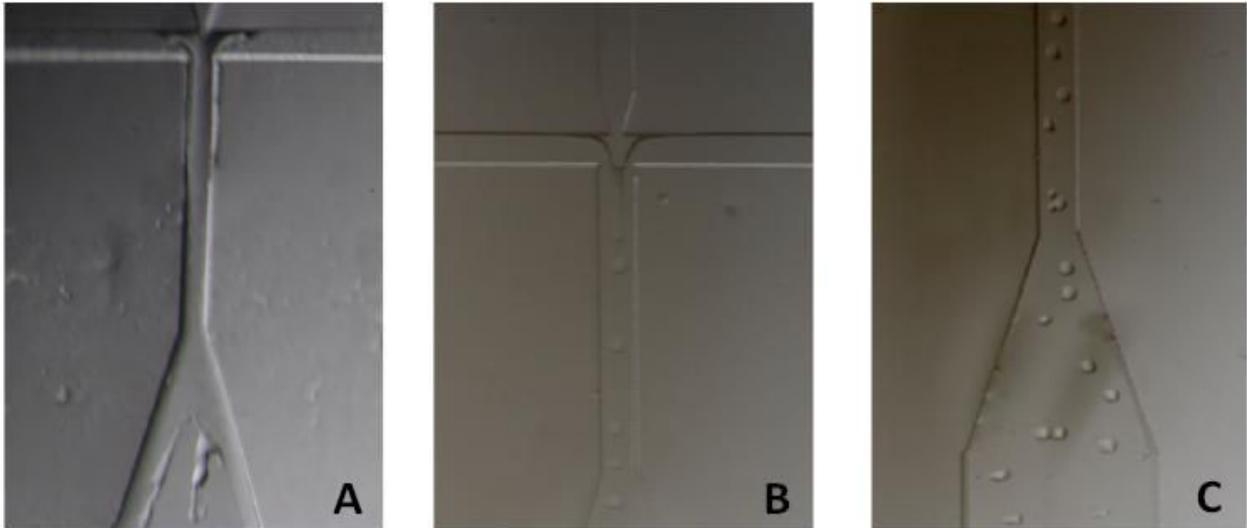
#### 4.4. Mise au point des conditions de formation de l'émulsion

En se basant sur les résultats du traitement de surface des plaques de PDMS, nous avons appliqué les traitements B et C aux microsystèmes. Nous avons évalué la possibilité de former une émulsion à l'intérieur du microsystème après l'application de chaque traitement.



**Figure 93: (a) "Flow-Focusing" PDMS-microsystème fabriqué au laboratoire (b) microsystème relié à l'aide des tubes de PTFE aux seringues contenant la phase continue et la dispersée – Microsystème prêt à l'utilisation.**

Des essais préliminaires ont été effectués pour évaluer la possibilité d'utiliser directement le système microfluidique sans traitement préliminaire avec du piranha/ KOH (1M) (traitement B). Pour ces premiers essais, la phase continue (DexC<sub>6</sub>-τ (10g/L) saturée en AcOEt) a été mise en circulation dans le microsystème (Figure 93) pendant 1h (essai 1) ou 30h (essai 2) avant d'entamer l'émulsification.



**Figure 94: Evaluation de l'émulsification à l'intérieur du microsystème : (A) système traité avec du DexC<sub>6</sub>-17 pendant 1 h (essai 1 : pas de formation d'émulsion) (B) système traité avec DexC<sub>6</sub>-17 pendant 30 h (essai 2 : formation de l'émulsion): formation des gouttelettes au niveau de la jonction (C) système traité avec DexC<sub>6</sub>-17 pendant 30 h (essai 2 : formation de l'émulsion): état des gouttelettes formées au-delà de la jonction. (Débit de la phase dispersée :  $Q_d = 0,1 \text{ mL/h}$ , débit de la phase continue:  $Q_c = 10 \text{ mL/h}$ ).**

Dans le cas de l'essai 1, aucune formation d'émulsion n'a eu lieu à l'intérieur du microsystème. Les images révèlent que la phase dispersée mouille la surface des microcanaux montrant ainsi que la surface du PDMS n'a pas acquis un caractère hydrophile suffisant pour que l'émulsification se produise. Ce résultat peut s'interpréter en considérant que le contact avec la solution de DexC<sub>6</sub>-17 pendant une heure ne laisse pas le temps au dextrane modifié de s'adsorber suffisamment à la surface du PDMS, ce qui serait cohérent avec nos mesures d'angles de contact. Pour l'essai 2, nous avons réussi à obtenir une émulsion H/E. Ceci indique que la surface du PDMS a acquis un caractère hydrophile suffisant pour permettre la formation de l'émulsion huile dans eau. Cependant, cette dernière n'a été obtenue qu'à partir d'un rapport de débit de phase continue par rapport à la phase dispersée (R) égal à 100 ( $Q_c = 10 \text{ mL/h}$ ,  $Q_d = 0,1 \text{ mL/h}$ ) et les gouttelettes formées n'étaient pas uniformes. Toutefois, cela démontre que si le système microfluidique est mis en contact pendant une durée suffisante avec la phase aqueuse contenant le DexC<sub>6</sub>-17, la formation de l'émulsion devient possible. Ce résultat est encore une fois cohérent avec nos mesures d'angle de contact. A notre connaissance, c'est la première fois qu'il est proposé d'utiliser un stabilisant polymère pour contrôler l'état de surface d'un système microfluidique.

Nous avons aussi testé la possibilité d'appliquer le traitement B au microsystème. Pour cela, une solution de Piranha a été introduite à l'aide d'une seringue dans le microsystème. Ce dernier

était laissé au repos pendant 15 minutes. Ensuite, le microsysteme a été lavé avec de l'eau Milli-Q pendant 5 minutes. Par la suite, nous avons introduit de la même manière la solution de potasse (1M). Nous l'avons laissé pendant 15 minutes à l'intérieur des canaux du microsysteme. Ces derniers ont été ensuite rincés en faisant passer une solution d'eau milli-Q dans le systeme pendant 5 minutes.

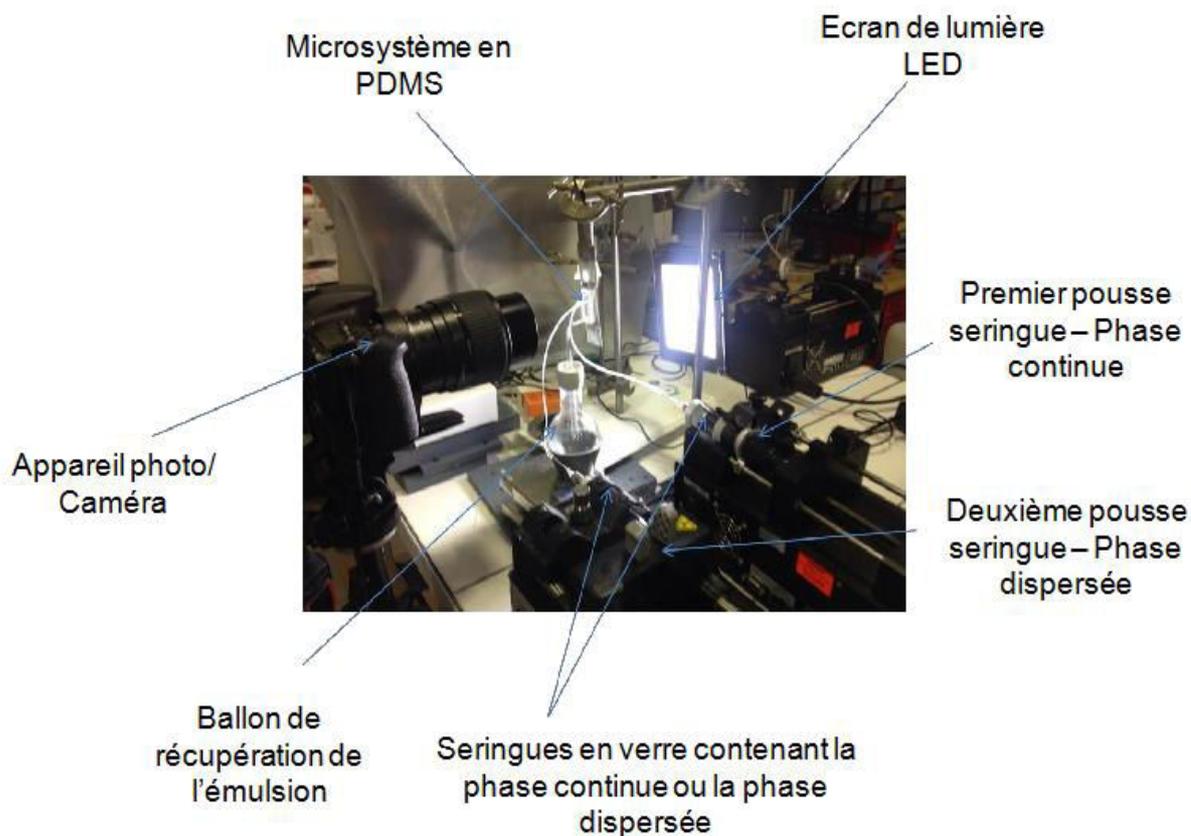
Dans le cas de l'utilisation du mélange piranha et de la solution de potasse, le systeme est utilisable au bout de seulement 40 min (le temps nécessaire pour réaliser le traitement de surface) et permet de préparer des émulsions huile dans eau avec des tailles de gouttelettes isométriques. Ce résultat est parfaitement cohérent avec nos mesures d'angles de contact après application du traitement B. A notre connaissance, ce sont les premiers travaux montrant la possibilité de l'hydrophilisation des canaux d'un microsystemes microfluidique en PDMS par le traitement B (optimisé par Maji et al. [37]).

Nous avons donc choisi pour ce travail, de combiner les deux traitements afin de cumuler leurs avantages. Les microsystemes ont été d'abord traités par le mélange piranha et la solution de potasse, ce qui permet de les utiliser très vite. Le contact avec la phase aqueuse contenant le DexC<sub>6</sub>-17 conduit à maintenir le caractère hydrophile de la surface et permet ainsi l'utilisation du dispositif sur des durées supérieures à un mois.

## **4.5. Elaboration des particules par microfluidique**

Une fois que le traitement conduisant à une surface hydrophile a été maîtrisé, nous avons pu élaborer des émulsions formées de gouttes uniformes avec des diamètres inférieurs à 200  $\mu\text{m}$ . Nous avons testé différentes méthodes pour éliminer le solvant organique volatil dans le but d'avoir des distributions de tailles de particules les plus étroites possibles. Les méthodes les plus utilisées dans la littérature sont l'émulsion-évaporation et l'émulsion-diffusion. Nous avons mis au point un dispositif expérimental qui permet d'assurer la récupération de l'émulsion. Dans les premiers essais, un tube en PTFE a été utilisé pour transférer l'émulsion formée dans le microsysteme à l'extérieur. Cependant, un phénomène de coalescence a été observé dans le tube en PTFE. Cette déstabilisation de l'émulsion a été attribuée au caractère hydrophobe du PTFE. Nous avons essayé alors d'adapter le systeme de récupération de manière à utiliser un tube hydrophile à la sortie du microsysteme permettant ainsi de préserver l'état de l'émulsion. Nous avons alors opté pour l'utilisation d'une pipette pasteur coudée relié à la sortie du microsysteme. Le verre étant un matériau hydrophile, il n'aura pas d'influence sur la déstabilisation de

l'émulsion formée : aucune coalescence des gouttelettes de l'émulsion n'a été observée dans le capillaire en verre. Ce dernier a été fixé sur le col du ballon de récupération à l'aide d'un septum (Figure 95). L'émulsion se trouve alors soit récupérée dans le ballon vide dans le cas où une étape d'évaporation du solvant organique aura lieu par la suite (émulsion-évaporation), soit dispersée dès la sortie du microsystème dans un grand volume d'eau (émulsion-diffusion).



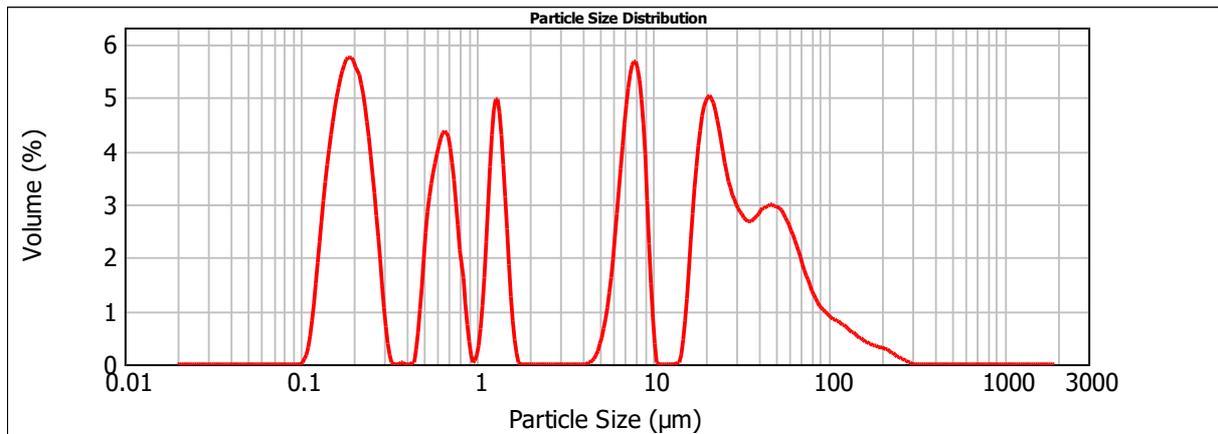
**Figure 95: Dispositif expérimental de fabrication des microparticules par microfluidique**

Les essais d'optimisation de la récupération des particules ont été effectués en utilisant un débit de phase continue égal à 4 mL/h et un débit de phase dispersée égal à 0,1 mL/h.

#### **4.5.1. Emulsion-Evaporation de solvant**

Des essais d'élaboration de particules par émulsion-évaporation de solvant ont été réalisés. Pour cela, nous avons essayé de récupérer les émulsions formées pendant 7 h dans le microsystème dans un ballon. Le contenu de ce dernier est ensuite mis dans un Thermoshaker à 37°C pendant 48h afin d'évaporer l'AcOEt (obtention des microparticules) et une partie de l'eau

(pour concentrer la suspension de microparticules). Après l'étape d'évaporation, des mesures de tailles ont été effectuées sur les lots de microparticules (Figure 96).



**Figure 96: Exemple de distribution des tailles de particules obtenue après élimination de l'AcOEt par évaporation à l'étuve rotative pendant 48H (conditions d'élaboration de l'émulsion :  $Q_c = 4 \text{ mL/h}$ ,  $Q_d = 0,1 \text{ mL/h}$ , durée = 7 h).**

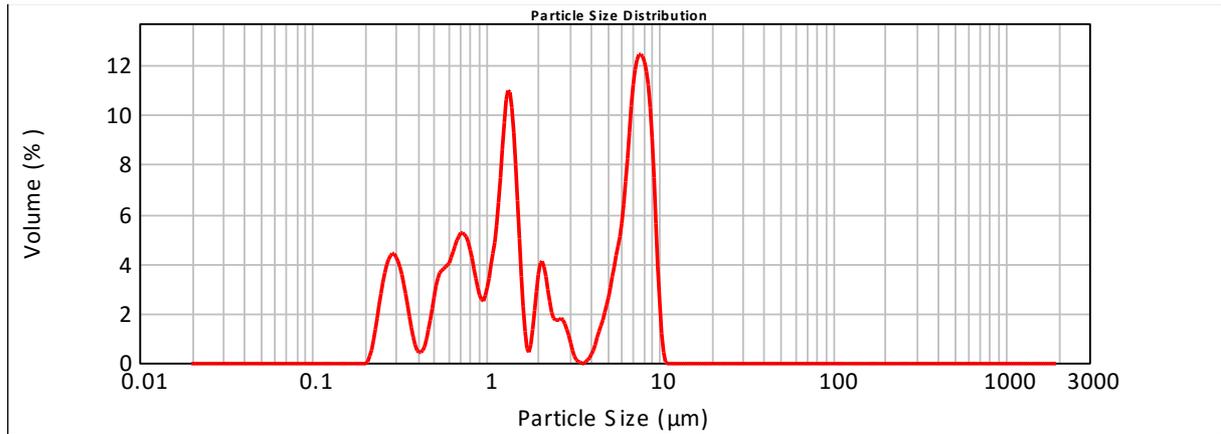
Comme nous pouvons le constater, la distribution de tailles est multimodale. La présence de microparticules avec une taille supérieure à  $30 \mu\text{m}$  peut être expliquée par la formation d'agrégats au cours de l'évaporation. Néanmoins, la présence de particules nanométriques dans les suspensions de particules analysées est plus difficile à expliquer. Après un certain nombre d'essais, nous ne sommes pas parvenus à trouver des conditions expérimentales conduisant à des distributions de tailles de particules monomodales. Nous avons attribué ce résultat à la durée nécessaire pour produire une quantité de gouttes suffisante et à la difficulté de contrôler les conditions d'évaporation pendant toute cette étape. Nous avons décidé de faire appel à un autre procédé, l'émulsion-diffusion de solvant.

## 4.5.2. Emulsion-Diffusion de solvant

### 4.5.2.1. Diffusion dans le volume minimal nécessaire

L'émulsion-diffusion présente le désavantage de conduire à une dilution importante des suspensions préparées. De ce fait, nous avons cherché à utiliser un volume d'eau minimal lors de l'étape de diffusion. L'AcOEt est miscible avec l'eau jusqu'à 10% (v/v). Le débit de la phase dispersée lors de la formation de l'émulsion à l'intérieur du microsystème est de  $0,1 \text{ mL/h}$ . Si le système fonctionne pendant 24 h, le volume d'AcOEt qui doit être extrait est égal à 2,4 mL. Un

volume d'eau égal à 24 mL, serait donc théoriquement suffisant pour extraire par diffusion la totalité de cet AcOEt. Plusieurs émulsions ont été élaborées par microfluidique pendant 24 h. A la sortie de chaque microsystème, l'émulsion était directement diluée dans un ballon contenant 30 mL d'eau (voisin du volume calculé théoriquement). Les distributions de tailles obtenues sont toutes similaires et multimodales (Figure 97).

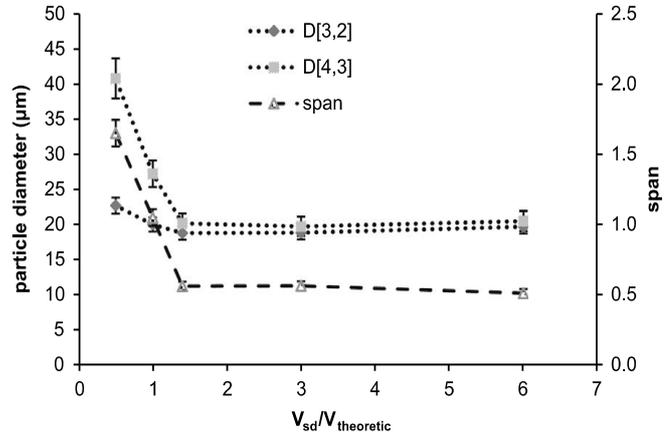


**Figure 97: Exemple de distribution de taille de microparticules obtenues par émulsion-diffusion de solvant (conditions opératoires :  $Q_c = 4 \text{ mL/h}$ ,  $Q_d = 0,1 \text{ mL/h}$ , durée = 24 h, Volume de diffusion = 30 mL).**

D'autres auteurs se sont intéressés à l'influence du volume d'eau sur le temps de solidification de microparticules PCL ainsi que sur leur distribution de tailles (caractérisée par les diamètres moyens en surface et en volume et le span) dans le cas d'un procédé combinant émulsification par membrane et diffusion [41] (Figure 98).

$V_{sd}$ (L)	$V_{sd}/V_{theoretic}$	Diffusion condition	Droplets solidification time
4.2	6	Unsaturated	Instantaneous
2.1	3	Unsaturated	Instantaneous
1	1.4	Unsaturated	0.25 h
0.7	1	Saturated	1.5 h
0.35	0.5	Oversaturated	2 h

(a)



(b)

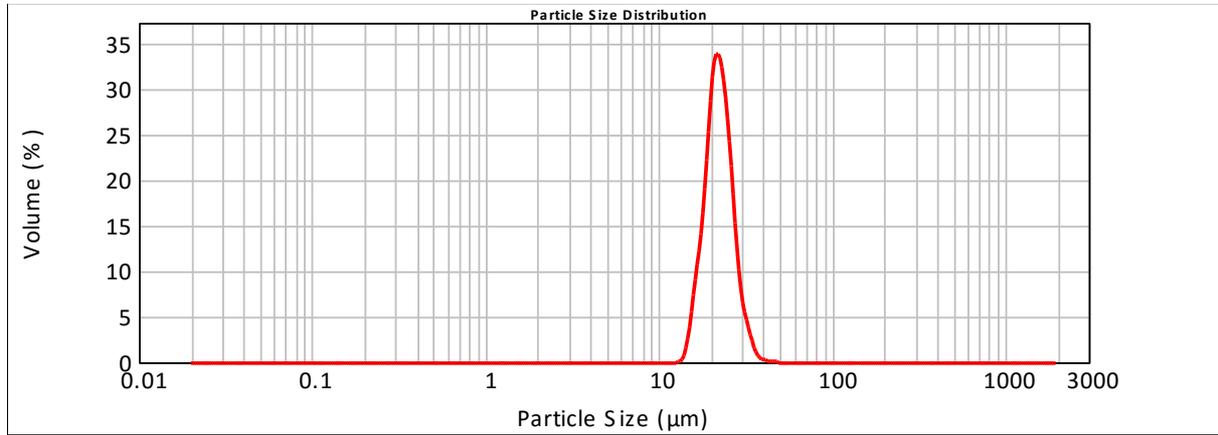
**Figure 98: (a) Conditions expérimentales dans lesquelles les essais de l'influence de la diffusion du solvant ont été effectués ainsi que le temps nécessaire pour obtenir les microparticules (b) Evolution de la taille et de la distribution de taille des particules en fonction du rapport (volume expérimental utilisé pour la diffusion ( $V_{sd}$ ) /volume théorique ( $V_{theoretic}$ )).**

Ces résultats montrent que le temps de récupération des particules ainsi que leurs distributions de tailles sont relativement sensibles au volume utilisé pour la diffusion du solvant. Les auteurs trouvent que lorsque le volume utilisé pour la diffusion est supérieur ou égal à 3 fois le volume théorique (volume d'eau minimal nécessaire pour diffuser la totalité de l'AcOEt), ils observent une diffusion instantanée du solvant et l'obtention de particules avec des distributions de tailles monomodales étroites.

#### 4.5.2.2. Diffusion dans un volume d'eau égal à 3 fois le volume minimal

En nous fondant sur ces résultats [41], nous avons utilisé un volume de diffusion 3 fois plus important que le volume théorique nécessaire pour solubiliser la totalité de l'AcOEt. En reprenant les memes conditions expérimentales que les essais représentés dans la Figure 97 ( $Q_c = 4$  mL/h,  $Q_d = 0,1$  mL/h, temps d'émulsification dans le microsysteme = 24 h, volume de diffusion = 100 mL).

On observe que la taille des microparticules obtenues est bien maitrisée et la distribution granulométrique correspondante est monomodale et étroite (Figure 99).



**Figure 99:** Exemple de distribution de tailles d’un lot de microparticules obtenu par microfluidique en utilisant un volume de diffusion supérieur à 3 fois le volume théorique nécessaire pour la diffusion de l’AcOEt (*conditions opératoires:  $Q_c = 4 \text{ mL/h}$ ,  $Q_d = 0,1 \text{ mL/h}$ , durée = 24 h, volume de diffusion = 100 mL*)

**Tableau 32 :** Caractéristiques relatifs à la taille des microparticules obtenues par diffusion de solvant dans un volume égale à  $\approx 3$  fois le volume théorique nécessaire pour diffuser le volume d’AcOEt présent dans l’émulsion

$Q_c/Q_d$ (mL/h // mL/h)	Volume de diffusion (mL)	$d(0,5)$ ( $\mu\text{m}$ )	$D[3,2]$ ( $\mu\text{m}$ )	$S_p$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
4/0,1	100	22	21	0,221

L’élaboration et la récupération des microparticules étant maîtrisées, nous nous sommes ensuite focalisés sur l’augmentation du rendement de production des particules tout en gardant une taille de microparticules assez faible ( $\sim 20 \mu\text{m}$ ) et des distributions de taille monomodales.

#### 4.6. Etude paramétrique de la taille des gouttelettes formées et des particules obtenues

Dans cette partie, nous avons essayé de contrôler la taille des particules obtenues après diffusion de solvant. Pour cela, l’enjeu était de trouver un compromis entre la taille des particules (contrôlée par la taille des gouttes formées dans le microsystème) et leur fréquence de formation (la quantité de particules formées par unité de temps). En effet, une taille de particules plus petite implique l’utilisation d’une faible concentration en PLA ou d’un rapport R ( $Q_c/Q_d$  : débit de la

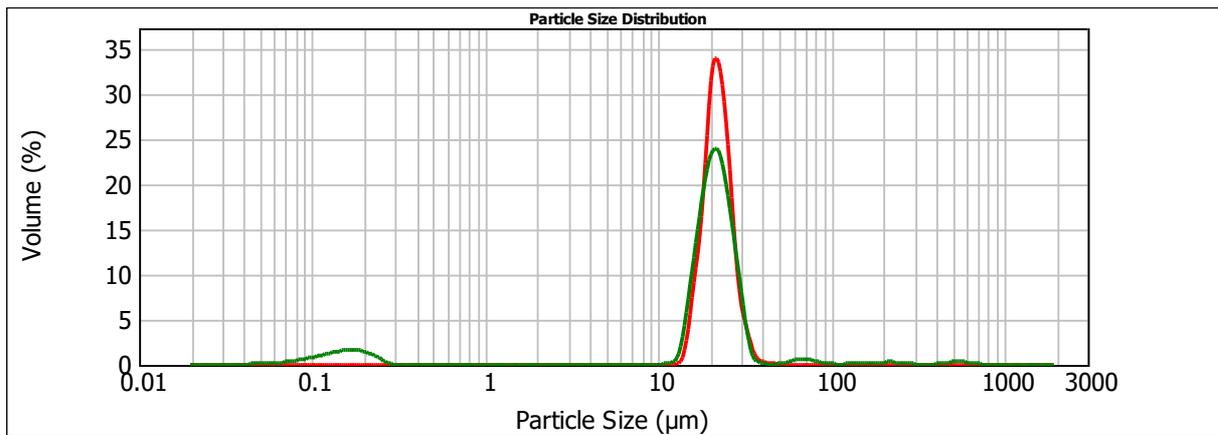
phase continue/débit de la phase dispersée) plus grand ce qui conduit à la formation d'une plus petite quantité de particules par unité de temps.

#### 4.6.1. Variation des débits en gardant un rapport R constant

Dans la première partie d'optimisation de la méthode de récupération, nous avons travaillé avec  $Q_d = 0,1$  mL/h et  $Q_c = 4$  mL/h. Nous avons augmenté le débit de la phase dispersée en gardant identique le rapport  $R = Q_c/Q_d = 40$ . Les résultats montrent qu'en gardant le même R les distributions de tailles des lots préparés sont parfaitement superposables (Figure 100, Tableau 33).

**Tableau 33: Comparaisons des distributions de tailles du lot  $Q_c/Q_d$  8/0,2 et du lot  $Q_c/Q_d$  4/0,1 après lavages**

$Q_c/Q_d$ (mL/h // mL/h)	d (0,5) ( $\mu\text{m}$ )	D[3,2] ( $\mu\text{m}$ )	Sp ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
8/0,2	21	1,4	3,3
4/0,1	22	21	0,221



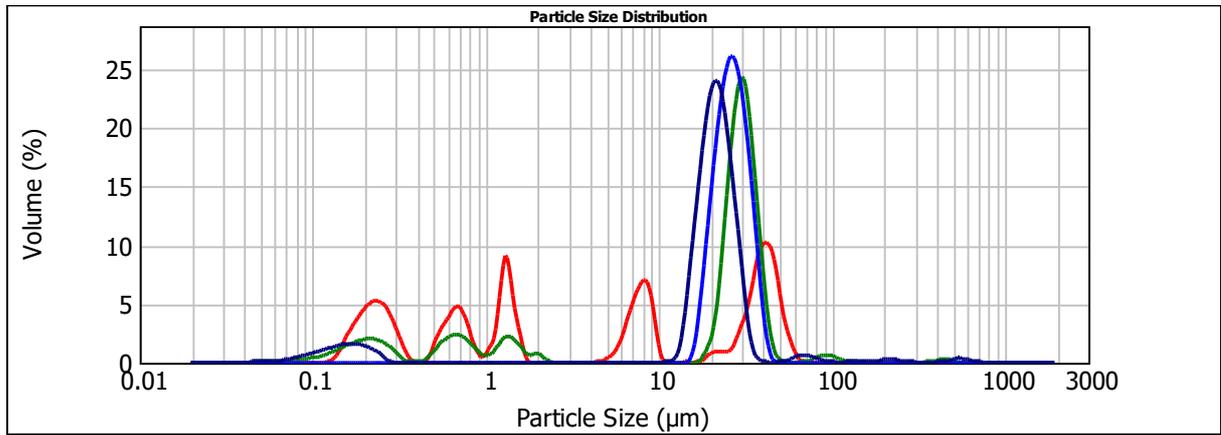
**Figure 100: Distribution de taille de microparticules obtenues par microfluidique avec un rapport de débit égal à 40 : ( - )  $Q_d = 0,2$  mL/h et  $Q_c = 8$  mL/h ( - )  $Q_d = 0,1$  mL/h et  $Q_c = 4$  mL/h**

En effet, le maintien du même rapport R permet d'appliquer une même contrainte de cisaillement sur la phase dispersée est d'avoir une même taille de gouttelettes et par la suite une même taille de microparticules. Nous n'avons pas essayé d'augmenter encore les débits des

phases continues et dispersées, car sur la durée de l'expérience, la quantité de DexC<sub>6-τ</sub> à utiliser devenait trop importante.

#### 4.6.2. Influence de la variation du rapport R sur la taille des particules

Dans cette partie, nous avons fait varier le rapport R entre les débits des phases continue et dispersée, afin de cerner l'influence de ce paramètre sur la taille des gouttelettes de l'émulsion ainsi que sur la taille des particules obtenues après diffusion du solvant et après lavages.



**Figure 101: Distributions de tailles des microparticules de PLA élaborées par microfluidique en variant la valeur du rapport R: ( - ) R = 13,33 ( - ) R = 16,66 ( - ) R = 20 ( - ) R = 40**

Les distributions de tailles des particules sont étroites et monomodales, sauf dans le cas où le R = 13,33. Pour les séries de particules précédentes, nous avons observé aussi leurs morphologies par le microscope optique. Nous avons ensuite essayé d'estimer le diamètre  $D_p$  des particules obtenues théoriquement à partir de celles des gouttelettes formées. Pour cela nous avons utilisé l'Eq.1 qui fait intervenir le diamètre des gouttelettes, la fraction massique du PLA dans le solvant utilisé ainsi que la masse volumique du PLA et du solvant organique.

$$D_p = D_g \cdot \left( \frac{1}{1 + \left( \frac{1 - x_{PLA}}{x_{PLA}} \right) \left( \frac{\rho_{PLA}}{\rho_{AE}} \right)} \right)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Eq. 28}$$

avec

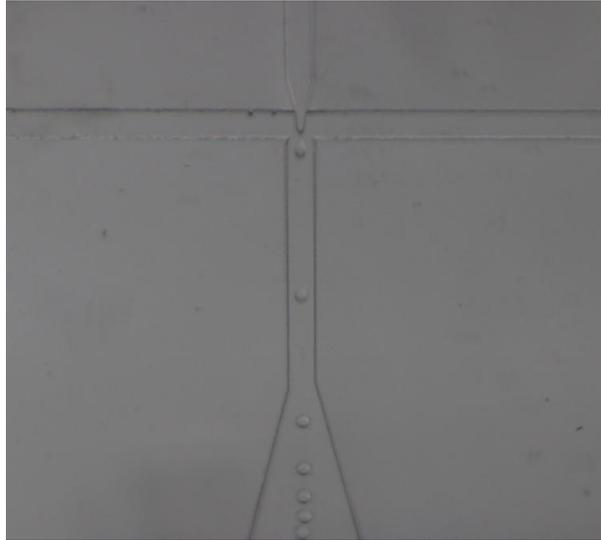
$D_g$  : diamètre des gouttelettes de l'émulsion formée dans le microsystème (μm)

$x_{PLA}$  : fraction massique du PLA dans l'AcOEt=0,01 (-)

$\rho_{AE}$  : masse volumique de l'AcOEt = 0,902 (g mL<sup>-1</sup>)

$\rho_{PLA}$  : masse volumique du PLA et qui est égale à 1,26 (g mL<sup>-1</sup>)

Cette équation repose sur l'hypothèse simple que chaque gouttelette de phase organique conduit à une unique particule suite à la diffusion de l'AcOEt. De plus, on observe que les gouttelettes se forment d'une manière reproductible et uniforme à l'intérieur du microsystème (Figure 102).



**Figure 102: Formation des gouttelettes de PLA/AcOEt dans une solution aqueuse saturée en AcOEt de DexC<sub>6</sub>-18 dans un microsystème en PDMS  $Q_d = 0,3$  mL/h et  $Q_c = 6$  mL/h**

Les tailles des gouttelettes et les tailles des particules correspondantes sont récapitulées dans le Tableau 34.

**Tableau 34: Comparaison des distributions de tailles de particules élaborées par microfluidique avec différents rapports  $Q_c/Q_d$**

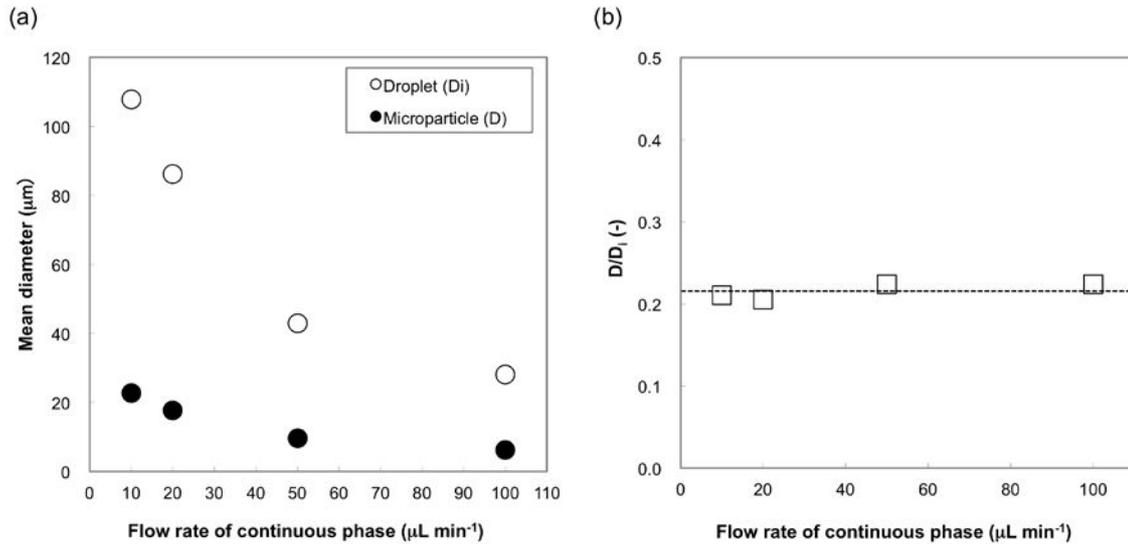
$Q_c/Q_d$ (mL/h)/(mL/h)	4/0,3	5/0,3	6/0,3	8/0,2
<b>R</b>	13,33	16,66	20	40
<b>d(0,5)</b> ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	6	28	22	21
<b>D[3,2]</b> ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	0,8	1,2	21	1,5
<b>Span</b> <sup>a</sup>	7,50	1,32	0,69	0,54
<b>Surface spécifique</b> <sup>a</sup> ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	6,3	3,9	2,2	3,3
<b>Diamètre des gouttelettes</b> <sup>b</sup> ( $D_g$ ) ( $\mu\text{m}$ )	103	96	86	80
<b>Diamètre théorique des particules</b> <sup>c</sup> ( $D_p$ ) ( $\mu\text{m}$ )	20	19	17	15

a: Mesurés par granulométrie.

b: Taille moyenne des gouttes déterminé par analyse d'image en utilisant le logiciel MatLab. Les gouttes formées dans les microsystèmes sont isométriques. Les valeurs présentées dans ce tableau sont la moyenne d'une vingtaine de gouttes dont la taille est mesurée par MatLab.

c: Calculé à partir de l'Eq. 28.

Les résultats présentés dans le Tableau 34, démontrent que l'Eq.1 conduit à une estimation du diamètre de particule cohérente avec les mesures granulométriques en particulier avec le d(0,5). Dans nos conditions, le diamètre des microparticules obtenues est 5 fois plus faible que le diamètre des gouttelettes initialement formées à l'intérieur du microsystème. Watanabe et al [42, 43] ont étudié l'élaboration de microparticules de PLA stabilisés par le PEG-b-PLA. Avec un débit de phase dispersée constant (1  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) et une concentration en polymère et en stabilisant fixée à 10 g/L, la taille des gouttelettes formées dans le microsystème varie entre 110  $\mu\text{m}$  et 30  $\mu\text{m}$  selon le débit de la phase continue.

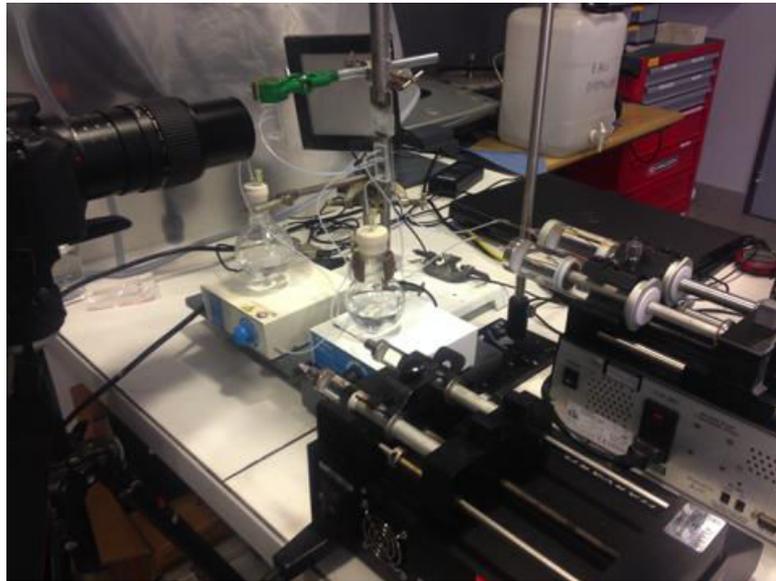


**Figure 103: (a) Evolution du diamètre des gouttelettes formées à l'intérieur du microsystème et du diamètre des microparticules correspondantes récupérées après diffusion du solvant (b) Evolution du facteur de rétrécissement ( $D/D_i$ ) en fonction du débit de la phase continue [43]**

Comme nous pouvons le constater, le facteur de rétrécissement représentant le rapport entre la taille des microparticules obtenues sur la taille des gouttelettes est constant indépendamment du  $Q_c$  appliqué (Figure 103). Le diamètre des gouttelettes est 5 fois plus important que le diamètre des microparticules correspondantes (obtenues après diffusion du solvant). Ceci vient conforter le fait que le rapport des diamètres des gouttes et des particules est contrôlé par la concentration du polymère dans la phase organique, ainsi que le prévoit l'Eq.1.

Lorsque  $Q_c/Q_d \geq 20$ , les valeurs du span sont inférieures à 0,7 témoignant ainsi d'une distribution granulométrique monomodale et assez étroite. De plus, en comparant les résultats obtenus avec un rapport  $Q_c/Q_d$  égal à 20 et 40, nous ne constatons pas de différences significatives. De point de vue productivité, il est plus intéressant de travailler en fixant les débits de phase continue et dispersée respectivement à  $Q_c = 6$  mL/h et  $Q_d = 0,3$  mL/h.

Dans le but d'augmenter encore la masse de microparticules élaborée par heure, nous avons utilisé des pousses seringues à doubles positions qui permettent de faire fonctionner deux seringues en même temps en leur appliquant le même débit. Ainsi, les deux microsystèmes pouvaient fonctionner en parallèle (Figure 104). Pour l'élaboration des microparticules par microfluidique, lors de l'extrapolation du procédé de l'échelle labo à l'échelle industrielle l'enjeu serait d'augmenter les masses de particules obtenues par unité de temps. Ceci pourrait être réalisable en réalisant la mise en parallèle de plusieurs systèmes (stratégie dite de « parallélisation »).

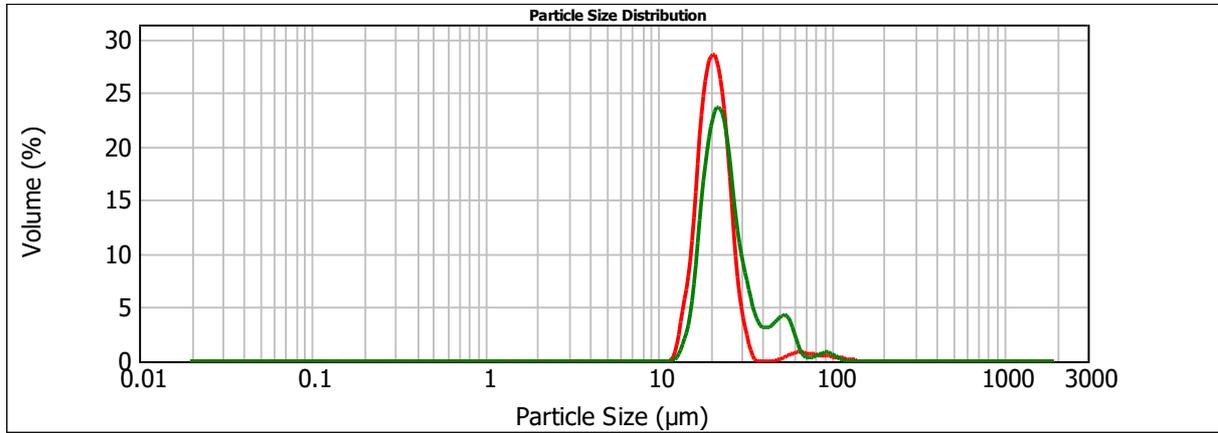


**Figure 104 : Dispositif expérimental de fabrication des microparticules avec deux microsystèmes**

## **4.7. Caractérisation des microparticules de PLA**

### **4.7.1. Redispersion des microparticules après lavages**

La récupération par centrifugation des particules lavées était très difficile du fait de la faible quantité de microparticules obtenue pour chaque lot (pertes importantes). Un dispositif de filtration sur un papier de porosité  $1,2 \mu\text{m}$  s'est avéré beaucoup plus adapté. Une fois les particules filtrées, celles-ci sont lavées à deux reprises avec de l'eau milli-Q. Les particules filtrées sont récupérées en grattant délicatement sur le papier filtre à l'aide d'une spatule. Ces particules sont ensuite redispersées dans 10 mL d'eau. Pour avoir une masse suffisante ( $\sim 45 \text{ mg}$ ) de particules qui peut être filtrée et récupérée puis redispersée, il faut fabriquer des particules pendant au moins 15 heures. Pour éviter tout problème d'apparition d'objets nanométriques après filtration, il faut bien nettoyer au préalable à l'eau Milli-Q le papier filtre utilisé dans le but d'éliminer toutes les impuretés et les poussières qui peuvent y être collées.

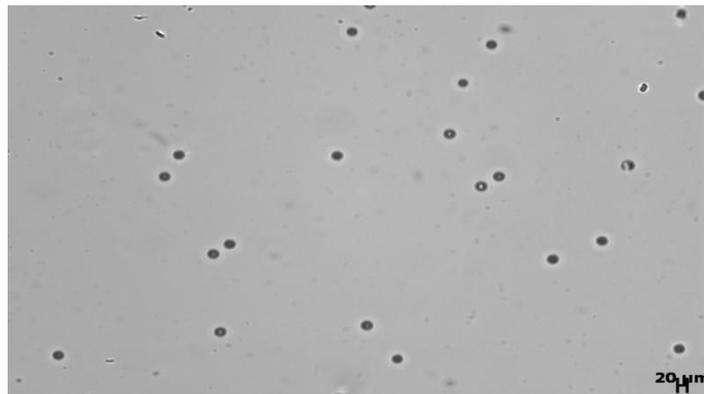


**Figure 105 : Distributions de taille des microparticules obtenues par microfluidique après filtration et lavages : lots de microparticules élaborées en utilisant  $Q_d = 0,3$  mL/h et  $Q_c = 6$  mL/h.**

Les distributions de taille des particules de PLA obtenues avant et après lavages et filtration sont superposables (Figure 105), ainsi cette méthode de lavage et de récupération apparaît la plus adéquate.

#### 4.7.2. Caractérisation par microscope optique : morphologie des microparticules

Les microparticules élaborées ont été caractérisées par microscopie optique avant lavages.

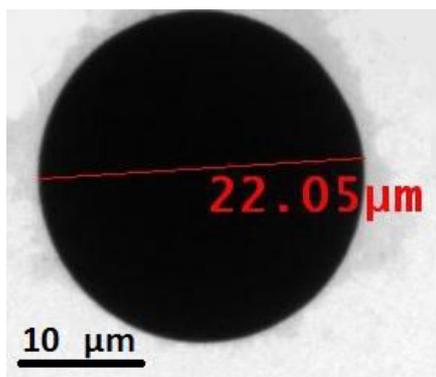


**Figure 106 : Microparticules de PLA élaborées en utilisant un rapport de débits  $Q_c/Q_d$  (6 mL/h // 0,3 mL/h) égal à 20. Photographie prise avec un microscope optique avant lavage.**

Les microparticules obtenues sont bien sphériques et les particules présentes dans ces photos ont un diamètre proche de 20  $\mu\text{m}$  (Figure 106). Ceci est en parfaite adéquation avec les valeurs mesurées par granulométrie ( $d(0,5) = 22 \mu\text{m}$ ) et avec les valeurs estimées par le calcul. Ces résultats confirment bien qu'on forme des microparticules de PLA isométriques avec une taille

bien contrôlée. Les caractérisations morphologiques réalisées par microscopie électronique à transmission (MET) sur un lot lavé et élaboré dans les mêmes conditions ont confirmé l'obtention de particules de PLA bien sphériques avec un diamètre  $\sim 20 \mu\text{m}$  (Figure 107).

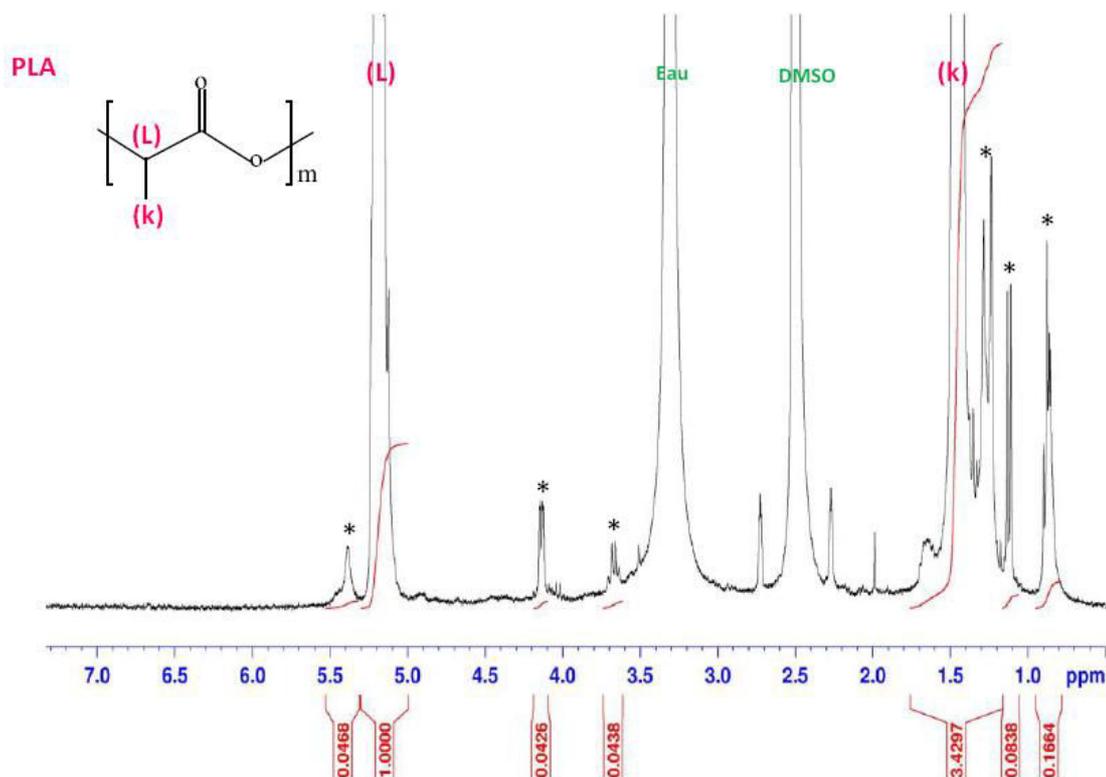
Ces résultats démontrent que le lavage n'a pas d'influence sur la taille car aucun changement n'a été noté aussi bien avant qu'après lavage.



**Figure 107 : Micrographie MET d'une particule de PLA élaborée par microfluidique en utilisant un rapport  $Q_c/Q_d$  (6 mL/h / 0,3 mL/h) égal à 20 (après lavages)**

#### **4.7.3. Taux de recouvrement par le DexC<sub>6</sub>-15**

Des microparticules de PLA élaborées par microfluidique dans les conditions optimisées ( $R = 20$ ,  $Q_c = 6\text{mL/h}$  ;  $Q_d = 0,3 \text{ mL/h}$ ) ont été lyophilisées puis dissoutes dans du DMSO- $d_6$  afin d'être analysées par RMN  $^1\text{H}$ .



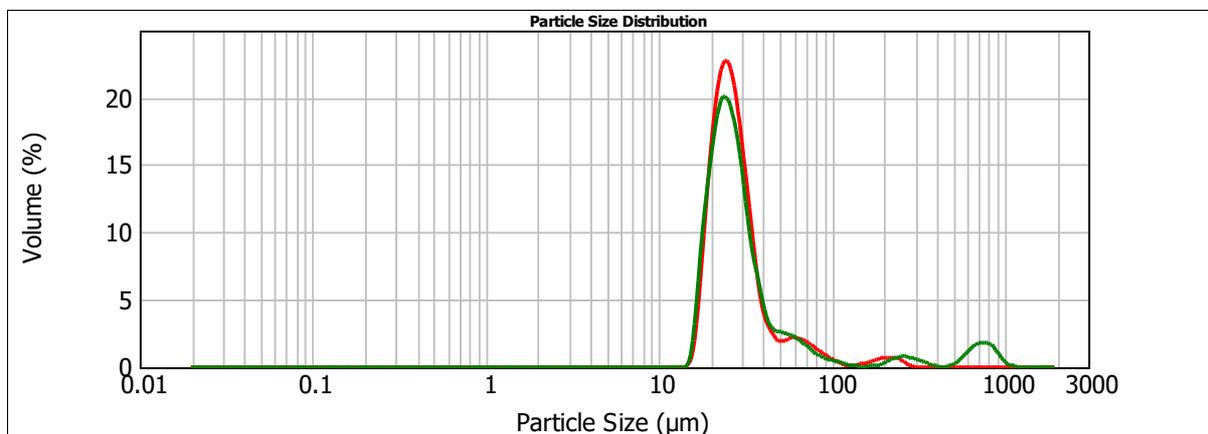
\* : pics non identifiés

**Figure 108: Spectre RMN $^1\text{H}$  dans DMSO- $d_6$  des microparticules du Lot 1 après filtration et lyophilisation.**

L'exploitation du spectre RMN  $^1\text{H}$ , ne nous permet pas de détecter la présence du dextrane modifié ni de déterminer le taux de recouvrement des particules en DexC $_6$ - $\tau$ . En effet, du fait de la taille des microparticules la quantité de DexC $_6$ - $\tau$  adsorbée en surface est trop faible pour que l'on puisse détecter des signaux caractéristiques.

Nous avons alors pensé à utiliser le potentiel zêta pour prouver la présence du dextrane modifié en surface en partant du fait que les particules non recouvertes présentent un potentiel zêta négatif (à cause des groupements acide des extrémités de chaînes). Malheureusement, nous ne pouvons pas utiliser cette méthode car la taille des particules obtenues ( $\sim 20\mu\text{m}$ ) est supérieure à la taille maximale acceptable pour avoir des mesures fiables (inférieure à  $10\mu\text{m}$ ).

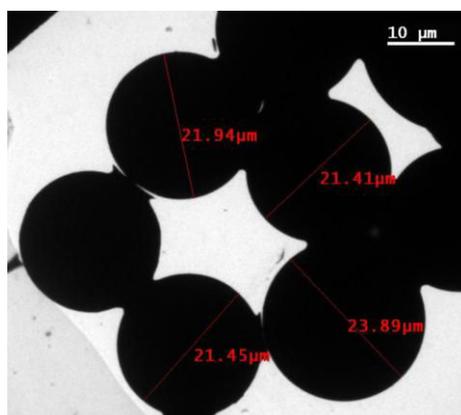
Afin de prouver indirectement la présence du DexC $_6$ - $\tau$  à la surface des microparticules, nous avons lyophilisé les microparticules de PLA en absence de cryoprotecteur et évalué ensuite l'aptitude de ces particules à se redisperser après lyophilisation. La Figure 109 représente les distributions de taille d'un lot de microparticules déterminées avant lavages et après lyophilisation et redispersion.



**Figure 109 : Distribution de taille de microparticules de PLA élaborées par microfluidique en utilisant un  $Q_c = 6$  mL/h et un  $Q_d = 0,3$  mL/h (-) avant lavages (-) après lyophilisation**

Les résultats confirment bien qu'on a une très bonne redispersion des microparticules en absence de cryoprotecteur. Les distributions de tailles sont bien superposables.

Des micrographies MET ont été réalisées sur des particules de PLA lyophilisées et redispersées après lyophilisation.



**Figure 110 : Micrographie MET d'un lot de particules de PLA lyophilisées puis redispersées**

La bonne redispersion des microparticules après lyophilisation sans utilisation de cryoprotecteur prouve bien la présence du DexC<sub>6</sub>-τ à la surface des microparticules élaborées. Dans le cas des microparticules micrométrique ayant une taille supérieure à 100 µm, nous avons montré que les microparticules s'agrègent d'une manière irréversible lorsqu'aucun stabilisant n'est utilisé. La présence du DexC<sub>6</sub>-τ a permis de maintenir la stabilité des microparticules obtenues. Nous nous sommes basés sur ces résultats pour confirmer la présence du stabilisant macromoléculaire à la surface des microparticules. Le dextrane modifié est le seul constituant présent dans notre formulation initiale et qui pourrait prévenir l'agrégation des microparticules élaborées.

## 4.8. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons l'objectif d'élaborer des microparticules de PLA recouvertes de dextrane modifié avec une distribution de tailles comprise entre 1 et 100  $\mu\text{m}$  (domaine 2). Pour cela, nous avons utilisé un procédé continu en plein développement qui est la microfluidique. Ce procédé, était utilisé pour la première fois pour des systèmes PLA/ DexC<sub>6</sub>- $\tau$  et a nécessité plusieurs étapes de mise au point et d'optimisation.

Nous avons tout d'abord présenté deux nouvelles techniques d'hydrophilisation de la surface du PDMS. La première technique consiste à traiter la surface du PDMS avec un mélange de Piranha/ KOH (1M) (traitement B) qui sera ensuite immergé dans une solution de dextrane modifié (5g/L) saturée en AcOEt (phase continue utilisée pour l'élaboration des microparticules). La deuxième technique était de laisser le PDMS dans la solution de dextrane modifié le temps nécessaire à l'adsorption de ce dernier à la surface assurant ainsi son hydrophilisation. La validité de ces deux traitements a été vérifiée par un suivi au cours du temps (71 jours) des angles de contact de gouttes d'eau sur les surfaces traitées. Les conditions optimales de maintien de l'hydrophilie de la surface sont obtenues en combinant le traitement chimique à l'adsorption du dextrane modifié.

Une fois l'hydrophilisation de la surface du PDMS maîtrisée, nous avons appliqué ces traitements sur les microsystèmes microfluidiques et nous avons ensuite optimisé l'élaboration des émulsions H/E dans ces systèmes et la récupération des microparticules correspondantes. Des particules avec des diamètres voisins de 20  $\mu\text{m}$  ont été obtenues en utilisant un microsystème traité avec du Piranha/ KOH (1M) et en utilisant une phase continue constituée par du DexC<sub>6</sub>-17 (5g/L) saturée en AcOEt.

## 4.9. Références bibliographiques

1. Anna, S.L., N. Bontoux, and H.A. Stone, *Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels*. Applied Physics Letters, 2003. **82**(3): p. 364-366.
2. Dreyfus, R., P. Tabeling, and H. Willaime, *Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels*. Physical Review Letters, 2003. **90**(14): p.144505-1 - 144505-4.
3. Garstecki, P., et al., *Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction - scaling and mechanism of break-up*. Lab on a Chip, 2006. **6**(3): p. 437-446.
4. Garstecki, P., et al., *Formation of monodisperse bubbles in a microfluidic flow-focusing device*. Applied Physics Letters, 2004. **85**(13): p. 2649-2651.
5. Garstecki, P., H.A. Stone, and G.M. Whitesides, *Mechanism for flow-rate controlled breakup in confined geometries: A route to monodisperse emulsions*. Physical Review Letters, 2005. **94**(16): p.164501-1 - 164501-4.
6. Kim, S.-H., S.-H. Kim, and S.-M. Yang, *Patterned Polymeric Domes with 3D and 2D Embedded Colloidal Crystals using Photocurable Emulsion Droplets*. Advanced Materials, 2009. **21**(37): p. 3771-3775.
7. Stone, H.A., *Dynamics of Drop Deformation and Breakup in Viscous Fluids*. Annual Review of Fluid Mechanics, 1994. **26**: p. 65-102.
8. Teh, S.-Y., et al., *Droplet microfluidics*. Lab on a Chip, 2008. **8**(2): p. 198-220.
9. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 368-373.
10. Xu, J.H., et al., *Preparation of highly monodisperse droplet in a T-junction microfluidic device*. Aiche Journal, 2006. **52**(9): p. 3005-3010.
11. Zhao, C.-X., *Multiphase flow microfluidics for the production of single or multiple emulsions for drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews. **65**(11-12): p. 1420-1446.
12. Blake, A.J., et al., *Multilayer PDMS microfluidic chamber for controlling brain slice microenvironment*. Lab on a Chip, 2007. **7**(7): p. 842-849.
13. McDonald, J.C., et al., *Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. Electrophoresis, 2000. **21**(1): p. 27-40.
14. Azmayesh-Fard, S.M., E. Flaim, and J.N. McMullin, *PDMS biochips with integrated waveguides*. Journal of Micromechanics and Microengineering. **20**(8).
15. Fleger, M. and A. Neyer, *PDMS microfluidic chip with integrated waveguides for optical detection*. Microelectronic Engineering, 2006. **83**(4-9): p. 1291-1293.
16. Yu, H., et al., *Low temperature and deformation-free bonding of PMMA microfluidic devices with stable hydrophilicity via oxygen plasma treatment and PVA coating*. RSC Advances, 2014. **5**(11): p. 8377-8388.
17. Zhang, H., et al., *Miscible Organic Solvents Soak Bonding Method Use in a PMMA Multilayer Microfluidic Device*. Micromachines, 2014. **5**(4): p. 1416.
18. Jankowski, P., et al., *Hydrophilic polycarbonate chips for generation of oil-in-water (O/W) and water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions*. Microfluidics and Nanofluidics, 2012. **14**(5): p. 767-774.
19. Jiang, J., et al., *A single low-cost microfabrication approach for polymethylmethacrylate, polystyrene, polycarbonate and polysulfone based microdevices*. Rsc Advances, 2015. **5**(45): p. 36036-36043.

20. Liu, A.L., et al., *Plastified poly(ethylene terephthalate) (PET)-toner microfluidic chip by direct-printing integrated with electrochemical detection for pharmaceutical analysis*. *Talanta*, 2006. **68**(4): p. 1303-1308.
21. Seemann, R., et al., *Droplet based microfluidics*. *Reports on Progress in Physics*, 2012. **75**(1).
22. Ong, W.L., et al., *Experimental and computational analysis of droplet formation in a high-performance flow-focusing geometry*. *Sensors and Actuators a-Physical*, 2007. **138**(1): p. 203-212.
23. Yobas, L., et al., *High-performance flow-focusing geometry for spontaneous generation of monodispersed droplets*. *Lab on a Chip*, 2006. **6**(8): p. 1073-1079.
24. Anderson, J.R., et al., *Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping*. *Analytical Chemistry*, 2000. **72**(14): p. 3158-3164.
25. Duffy, D.C., et al., *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(23): p. 4974-4984.
26. Wang, L., et al., *Chemical and physical modifications to poly(dimethylsiloxane) surfaces affect adhesion of Caco-2 cells*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010. **93A**(4): p. 1260-1271.
27. Hemmila, S., et al., *Rapid, simple, and cost-effective treatments to achieve long-term hydrophilic PDMS surfaces*. *Applied Surface Science*, 2012. **258**(24): p. 9864-9875.
28. Wu, J. and N.Y. Lee, *One-step surface modification for irreversible bonding of various plastics with a poly(dimethylsiloxane) elastomer at room temperature*. *Lab on a Chip*, 2014. **14**(9): p. 1564-1571.
29. Zhou, J., et al., *Surface modification for PDMS-based microfluidic devices*. *Electrophoresis*, 2012. **33**(1): p. 89-104.
30. Zhou, J.W., A.V. Ellis, and N.H. Voelcker, *Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices*. *Electrophoresis*, 2010. **31**(1): p. 2-16.
31. Makamba, H., et al., *Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels*. *Electrophoresis*, 2003. **24**(21): p. 3607-3619.
32. Ginn, B.T. and O. Steinbock, *Polymer surface modification using microwave-oven-generated plasma*. *Langmuir*, 2003. **19**(19): p. 8117-8118.
33. Jokinen, V., P. Suvanto, and S. Franssila, *Oxygen and nitrogen plasma hydrophilization and hydrophobic recovery of polymers*. *Biomicrofluidics*, 2012. **6**(1): p. 016501-1 - 016501-10.
34. Kim, H. and M.W. Urban, *Effect of discharge gases on microwave plasma reactions of imidazole on poly(dimethylsiloxane) surfaces: Quantitative ATR FT-IR spectroscopic analysis*. *Langmuir*, 1999. **15**(10): p. 3499-3505.
35. Ryan, T.D., K. Donghwan, and P. Jaesung, *Formation of liposomes using a 3D flow focusing microfluidic device with spatially patterned wettability by corona discharge*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2012. **22**(5): p. 055003.
36. Bauer, W.-A.C., et al., *Hydrophilic PDMS microchannels for high-throughput formation of oil-in-water microdroplets and water-in-oil-in-water double emulsions*. *Lab on a Chip*. **10**(14): p. 1814-1819.
37. Maji, D., S.K. Lahiri, and S. Das, *Study of hydrophilicity and stability of chemically modified PDMS surface using piranha and KOH solution*. *Surface and Interface Analysis*. **44**(1): p. 62-69.
38. Fritz, J.L. and M.J. Owen, *Hydrophobic recovery of plasma-treated polydimethylsiloxane*. *Journal of Adhesion*, 1995. **54**(1-2): p. 33-45.

39. Bodas, D., J.-Y. Rauch, and C. Khan-Malek, *Creation of a Stable Hydrophilic Poly(dimethyl siloxane) Surface by the Plasma-Induced Cross linking of Monomers*. Journal of Applied Polymer Science, 2011. **120**(3): p. 1426-1430.
40. Eddington, D.T., J.P. Puccinelli, and D.J. Beebe, *Thermal aging and reduced hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2006. **114**(1): p. 170-172.
41. Imbrogno, A., et al., *Preparation of uniform poly-caprolactone Microparticles by membrane emulsification/solvent diffusion process*. Journal of Membrane Science, 2014. **467**: p. 262-268.
42. Watanabe, T., T. Ono, and Y. Kimura, *Continuous fabrication of monodisperse polylactide microspheres by droplet-to-particle technology using microfluidic emulsification and emulsion-solvent diffusion*. Soft Matter, 2011. **7**(21): p. 9894-9897.
43. Watanabe, T., *Structural Control of Monodisperse Polylactide Microspheres by Microfluidic Emulsification and Solvent Diffusion*. 2014, Thèse de doctorat de l'université d'Okayama, Japon.







# Chapitre 5

*Etude de l'encapsulation et de la  
libération des esters de l'acide  
gallique*



## Table des matières

<b>5.1. Introduction</b>	<b>243</b>
<b>5.2. Choix des substances actives à encapsuler</b>	<b>243</b>
5.2.1. Tests de solubilité dans l'eau	243
5.2.2. Tests de solubilité dans les solvants organiques	244
5.2.3. Tests de miscibilité entre le PLA et les SA choisis	245
5.2.4. Stabilité des esters d'acide gallique encapsulés dans le PLA	248
<b>5.3. Encapsulation des SA dans les nanoparticules</b>	<b>248</b>
5.3.1. Solubilité des SA dans les solutions aqueuses de dérivés amphiphile du dextrane	248
5.3.2. Etude de l'adsorption compétitive éventuelle des SA à la surface des particules	250
5.3.2.1. Propriétés tensioactives du GO	250
5.3.2.2. Propriétés de surface de particules de PLA préparées par nanopréciipitation en présence d'une phase aqueuse saturée en SA	251
5.3.3. Etude paramétrique de l'encapsulation des SA dans des NP élaborées par nanopréciipitation	253
5.3.3.1. Influence du rapport SA/PLA	254
5.3.3.2. Influence de la composition de la phase aqueuse	258
5.3.4. Etude paramétrique de l'encapsulation des SA dans des nanoparticules élaborées par E-ES	264
5.3.4.1. Influence de la saturation/non saturation de la phase aqueuse en Acétate d'éthyle	264
5.3.4.2. Elaboration de nanoparticules avec différentes compositions initiales (SA/PLA) dans la phase organique	266
5.3.4.3. Elaboration de nanoparticules avec différentes compositions de phase aqueuse	271
5.3.5. Comparaison entre les caractéristiques des nanoparticules élaborées par nanopréciipitation et par E-ES	273
<b>5.4. Encapsulation des SA dans les microparticules</b>	<b>279</b>
5.4.1. Microparticules élaborées par microfluidique (Emulsion-diffusion)	279
5.4.1.1. Phase continue non saturée en GO	279
5.4.1.2. Phase continue saturée en GO	280
5.4.2. Microparticules élaborées par Emulsion-Evaporation de solvant	283
5.4.2.1. Influence de la %W <sub>SA initiale</sub> dans la phase organique	284
5.4.2.2. Influence de la nature de la SA encapsulée	285
5.4.2.3. Stabilité aux lavages et à la lyophilisation	286
5.4.2.4. Morphologie des microparticules	287
<b>5.5. Libération du GO et du GN encapsulés</b>	<b>288</b>
5.5.1. Généralités	288
5.5.2. Libération à partir des nanoparticules	288
5.5.2.1. Etude des mécanismes de libération	288
5.5.2.2. Cinétiques de libération	291
5.5.3. Libération des SA à partir des microparticules préparées par E-ES avec émulsification par agitation magnétique	297
5.5.3.1. Suivi de la dégradation du PLA	299
5.5.3.2. Mise en évidence du gonflement des microparticules	301
<b>5.6. Conclusion</b>	<b>303</b>
<b>5.7. Références Bibliographiques</b>	<b>306</b>



## 5.1. Introduction

L'objectif majeur de cette thèse était d'élaborer d'une manière maîtrisée des particules de PLA recouvertes de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  renfermant des SA, ayant un effet algicide ou algistatique. Les substances actives modèles, choisies dans le cadre du projet BioCapTech pour le traitement des milieux aquatiques, sont l'acide gallique et ses esters aliphatiques (Cf. Chapitre 1 -paragraphe 1.1.3).

Nous présenterons tout d'abord les critères qui nous ont permis de restreindre notre étude d'encapsulation à deux esters de l'acide gallique : le gallate d'octyle (GO) et le gallate de nonyle (GN).

Dans un second temps, nous décrirons une étude paramétrique de l'encapsulation des SA choisies dans des particules nanométriques et micrométriques, élaborées par les procédés définis dans les deux chapitres précédents.

Nous présenterons ensuite les cinétiques de libération des SA encapsulées. Une comparaison entre la libération du GO et du GN à partir des nanoparticules et des microparticules de PLA a été effectuée. Les résultats obtenus seront commentés, au regard des résultats décrits dans la littérature pour ce type de vecteurs.

## 5.2. Choix des substances actives à encapsuler

Une évaluation de la solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques de l'acide gallique et de ses esters a été effectuée. Le but de ces premiers tests est de déterminer, d'une part, les SA qui sont susceptibles d'être encapsulées dans le cœur hydrophobe des particules de PLA et d'autre part, de choisir les solvants organiques adéquats qui seront utilisés pour la nanopréciipitation, pour l'E-ES ou pour E-DS. Une analyse par MDSC de la miscibilité des SA choisies avec le PLA a par ailleurs été réalisée.

### 5.2.1. Tests de solubilité dans l'eau

Les SA étudiées sont l'acide gallique et ses esters d'alkyle, avec des chaînes aliphatiques linéaires de 2 à 12 atomes de carbone (Cf. Chapitre 1 - paragraphe 1.1.3). Les valeurs des solubilités dans l'eau de ces SA ont été trouvées dans la littérature [1] et/ou déterminées expérimentalement (Tableau 35) en suivant la procédure détaillée dans le chapitre 2 (paragraphe 2.2.2.1).

**Tableau 35: Solubilité dans l'eau des différentes substances actives.**

Substance active	Solubilité <sub>Littérature</sub> (g/L) <sup>a</sup>	Solubilité <sub>Expérimentale</sub> (g/L) <sup>b</sup>
<b>Acide gallique (AG)</b>	15,30	-
<b>Gallate d'éthyle (GE)</b>	10,03	-
<b>Gallate de propyle (GP)</b>	3,39	-
<b>Gallate d'octyle (GO)</b>	0,014	0,009
<b>Gallate de nonyle (GN)</b>	-	0,0086
<b>Gallate de lauryle (GL)</b>	0,0006	0,0027

a : Valeur données par la littérature [1] (T°=25°C, pH =7)

b : Valeur déterminées expérimentalement selon le protocole décrit dans le chapitre 2 (T°=Température ambiante, eau Milli-Q)

De l'acide gallique au gallate de lauryle (GL), une diminution prévisible de la solubilité dans l'eau est observée, lorsque la longueur de la chaîne hydrocarbonée augmente (Tableau 35). D'un point de vue plus quantitatif, le logarithme de la solubilité des esters dans l'eau diminue de façon linéaire avec l'augmentation du nombre d'atomes de carbone dans le groupement hydrocarboné aliphatique. Cette tendance est très générale et se retrouve par exemple avec les n-alcane [2]. Des essais préliminaires d'encapsulation des SA (par nanopréciipitation et E-ES) ont permis de montrer que les SA les plus hydrophiles et donc les plus solubles dans l'eau (AG, GE et GP) ne peuvent pas être encapsulées dans les particules de PLA (au mieux, 4% d'encapsulation pour le GP). En effet, ces SA diffusent rapidement dans l'eau au cours de l'élaboration des particules, ceci étant de toute évidence lié à un faible coefficient de partage huile/eau. A l'inverse, les très faibles solubilités dans l'eau du GO, GN et GL laissent présager une encapsulation beaucoup plus efficace. C'est pourquoi nous avons examiné ces SA de façon plus détaillée.

### 5.2.2. Tests de solubilité dans les solvants organiques

Afin de pouvoir élaborer des particules de PLA/SA par nanopréciipitation, E-ES ou E-DS (microfluidique), il faut choisir des solvants organiques miscibles ou non dans l'eau en fonction du procédé utilisé. Le critère de choix est la bonne solubilité du PLA et des SA sélectionnés.

Pour cela, des solutions de GO, de GN et de GL ont été préparées dans différents solvants organiques à une concentration égale à 10 g/L. La solubilité ou non des SA dans différents solvants organiques a été évaluée visuellement (Tableau 36).

**Tableau 36: Evaluation de la solubilité du GO, du GN et du GL dans l'acétone, le THF, l'acétate d'éthyle et le DCM.**

	Acétone (totalement miscible*)	THF (totalement miscible*)	AcOEt (partiellement miscible **)	DCM (non miscible ***)
GO	++	++	++	-
GN	++	++	++	-
GL	++	++	++	+

\* Miscibilité avec l'eau \*\*miscibilité avec l'eau : 1 mL/10 mL H<sub>2</sub>O \*\*\* miscibilité avec l'eau : 1 mL/100 mL H<sub>2</sub>O

++ : Obtention d'un liquide limpide instantanément

+ : Obtention d'un liquide limpide après chauffage à 38°C pendant 4h

- : insoluble (même après chauffage à 38°C pendant 4h)

Le GO, le GN ainsi que le GL sont solubles aussi bien dans l'acétone que dans le THF (Tableau 36), solvants utilisables pour la nanopréciptation.

En ce qui concerne le PLA, Hilal et al. [3] ont montré que le PLA est légèrement plus soluble dans l'acétone que dans le THF, en prenant en compte des paramètres de solubilité de Hansen, calculés pour le PLA et le solvant. Par ailleurs, l'acétone présente une température d'ébullition (56°C) un peu plus faible que celle du mélange azéotropique THF/eau (65°C).

Nous avons donc choisi d'utiliser l'acétone pour la nanopréciptation, de manière à faciliter l'étape d'évaporation du solvant. L'AcOEt a été retenu comme solvant pour l'élaboration de particules par E-ES ainsi que par E-DS, car il permet de solubiliser facilement les SA étudiées, contrairement au DCM.

### 5.2.3. Tests de miscibilité entre le PLA et les SA choisies

La faible solubilité dans l'eau de la SA choisie n'est pas le seul paramètre qui influence le taux d'encapsulation et la cinétique de libération. Ces propriétés dépendent également de la miscibilité entre la SA et le matériau formant le cœur des particules, le PLA dans notre cas. L'évaluation de la miscibilité entre les différentes SA et le PLA a été effectuée par MDSC (Cf. chapitre 2 - paragraphe 2.2.2.3). Le PLA que nous avons utilisé, pour l'élaboration de particules à l'échelle du laboratoire, est un échantillon de poly(D,L-lactide) amorphe qui possède une température de transition vitreuse proche de 53°C. Les SA sont cristallines et présentent donc un

pic de fusion sur les thermogrammes. L'analyse par MDSC de mélanges SA/PLA permet en premier lieu de déterminer miscibilité maximale de la SA avec le PLA (Tableau 37).

**Tableau 37: Détermination expérimentale (par MDSC) et estimation (relation de Fox) des valeurs de la  $T_g$  de mélanges SA/PLA.**

Mélange	$W_{SA}$ dans le mélange (PLA+SA) <sup>a</sup> (%)	$T_g$ (valeurs expérimentales) <sup>b</sup> (°C)	$T_g$ (valeurs calculées) <sup>c</sup> (°C)	Présence d'un pic de fusion <sup>d</sup>	Température au pic de fusion (°C)	Miscibilité (SA/PLA)
PLA	0	52,9		-	-	-
GO	100	-	-	+	90,3	-
GN	100	-	-	+	82,5	-
PLA+GO	10,6	40,0	41,4	-	-	Totale
	20,1	30,9	31,7	-	-	Totale
	25,0	27,0	27,0	-	-	Totale
	30,2	23,5	22,1	-	-	Totale
	40,2	15,7	13,2	+	74,8	Partielle
	50,2	9,9	4,7	+	80,8	Partielle
PLA+GN	9,3	42,1	41,9	-	-	Totale
	20,2	30,0	29,9	-	-	Totale
	24,9	26,9	25,1	-	-	Totale
	30,1	21,5	19,8	-	-	Totale
	39,9	13,6	10,4	+	76,7	Partielle
	50,1	8,3	1,3	+	71,0	Partielle
PLA+GL	10,3	39,3	42,5	-	-	Totale
	20,0	31,9	33,3	+	79,0	Partielle
	25,0	27,3	28,7	+	75,0	Partielle
	32,1	23,8	22,5	+	74,9	Partielle
	40,0	18,0	15,9	+	74,7	Partielle
	50,0	10,1	7,9	+	82,0	Partielle

a: Pourcentage massique de la SA dans les mélanges SA/PLA analysés

b: Valeurs déterminées expérimentalement à partir des thermogrammes.

c: Valeurs calculées avec la relation de Fox (Eq. 29) à partir des fractions massiques introduites.

d: Présence d'un pic de fusion sur le thermogramme du mélange.

Lorsque la SA est parfaitement miscible au PLA, le mélange SA/PLA présente une unique transition thermomécanique, la transition vitreuse. En effet, les différentes SA ont un effet plastifiant sur le PLA et la diminution de la  $T_g$  du mélange SA/PLA est d'autant plus marquée que le rapport massique SA/PLA augmente. Pour certaines compositions du mélange, on obtient un matériau dont la  $T_g$  est proche voire inférieure à la température ambiante, ce qui, comme nous

le montrerons par la suite, aura des effets notables sur la stabilité colloïdale des suspensions. La variation de  $T_g$  avec la quantité de SA dans la zone de miscibilité totale peut être comparée à celle prévue par la relation de Fox (Eq. 29) [4].

$$\frac{1}{T_g} = \frac{W_{polymère}}{T_{g\ polymère}} + \frac{W_{plastifiant}}{T_{g\ plastifiant}} \quad \text{Eq. 29}$$

Dans l'Eq. 29,  $W_{polymère}$  et  $W_{plastifiant}$  sont les fractions massiques respectivement du polymère (PLA dans notre cas) et du plastifiant (SA dans notre cas), la  $T_{g\ polymère}$  est la température de transition vitreuse du polymère pur et la  $T_{g\ plastifiant}$  est la température de transition vitreuse du plastifiant, estimée à partir de sa température de fusion (Eq.2).

$$T_{g\ plastifiant} = \frac{2}{3} T_{f\ plastifiant} \quad \text{Eq. 30}$$

Dans l'Eq. 29 et l'Eq. 30, toutes les températures sont exprimées en K.

Pour les mélanges correspondant à une miscibilité totale, la relation de Fox conduit à des valeurs calculées comparables aux valeurs expérimentales (Tableau 37). Ce résultat est cohérent avec l'idée d'une miscibilité totale des SA avec le PLA tant que la quantité de SA ne dépasse pas une valeur critique, qui dépend de la structure chimique de la SA. Ici, il apparaît que lorsque le nombre d'atomes de carbone du groupement hydrocarboné aliphatique de l'ester augmente, le domaine de miscibilité avec le PLA se réduit. Cette observation peut être reliée à la diminution de la polarité de la SA, qui limite sa miscibilité avec le PLA (polymère polaire).

A des concentrations en SA supérieures à la concentration critique de miscibilité, on détecte sur les thermogrammes un pic de fusion qui traduit la formation d'inclusions cristallines de SA. Dans ce cas, on notera une différence plus significative entre les  $T_g$  calculées par la relation de Fox et celles mesurées expérimentalement. A notre connaissance, les propriétés plastifiantes des esters de l'acide gallique n'ont pas été rapportées dans la littérature. Cependant, ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec d'autres plastifiants du PLA amorphe tels que les esters de l'acide citrique [5].

Au regard des différents résultats obtenus, nous avons choisi de limiter notre étude à l'encapsulation du GO et du GN dans le PLA.

#### **5.2.4. Stabilité des esters d'acide gallique encapsulés dans le PLA**

Avant de débiter les études concernant l'optimisation de l'encapsulation des SA dans les nanoparticules de PLA, nous avons dans un premier temps, vérifié que les esters d'acide gallique ne s'hydrolysent pas lorsqu'ils sont encapsulés dans le PLA, qui constitue un environnement relativement acide du fait des groupements acide carboxylique présents aux extrémités des chaînes.

Pour ce faire, 2 mL d'AcOEt contenant 50 mg de PLA et 50 mg de GO sont émulsionnés par sonication dans 10 mL d'une solution de DexC<sub>6</sub>-14, 10 g/L, selon le protocole décrit dans le chapitre 2 (paragraphe 2.2.3.1.2).

Après lavages, la suspension de particules est laissée sous agitation dans 15 mL d'eau pendant 144 h. Des prélèvements sont effectués au cours du temps et analysés par RMN <sup>1</sup>H. L'intégration des protons CH<sub>2</sub> en α du groupement -O-CO- (pic à 4,12 ppm) par rapport aux protons du PLA reste identique pour tous les prélèvements (initial et après 24, 72 ou 144 h). Ceci indique que les esters d'acide gallique sont stables dans la matrice de PLA sur la période de temps étudiée.

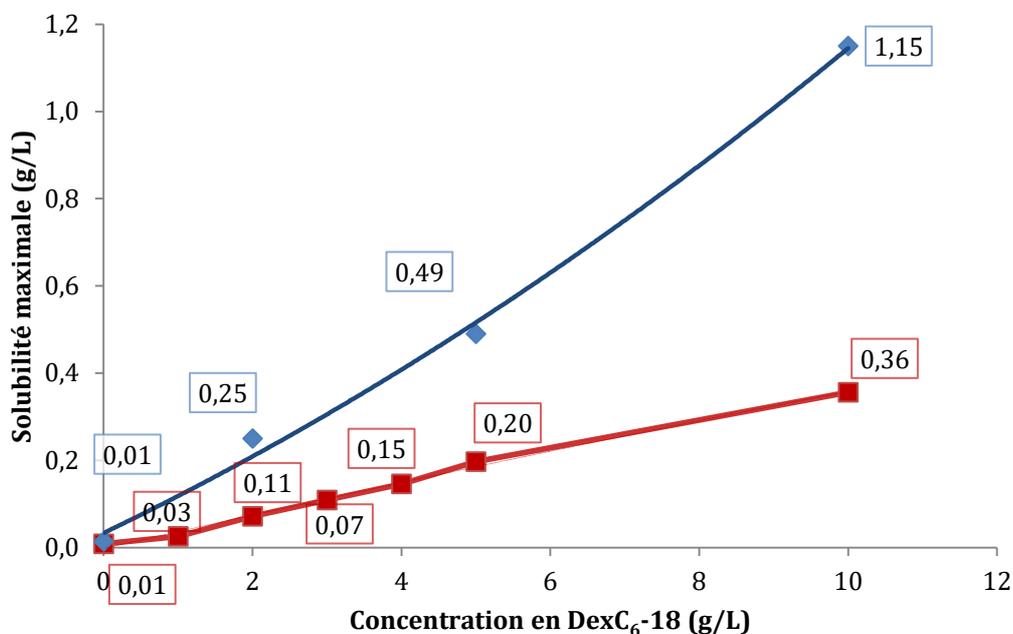
### **5.3. Encapsulation des SA dans les nanoparticules**

Dans cette partie, nous décrirons l'effet de différents paramètres de formulation ayant une influence sur la taille, la distribution des tailles de particules ainsi que sur les quantités encapsulées de substances actives et la stabilité colloïdale des suspensions dans des solutions salines. Les particules étudiées sont élaborées par nanopréciipitation et/ou par E-ES.

#### **5.3.1. Solubilité des SA dans les solutions aqueuses de dérivés amphiphile du dextrane**

Nous avons dans un premier temps étudié la solubilité du GO et GN dans des solutions de DexC<sub>6</sub>-τ à différentes concentrations (Cf. chapitre 2 - paragraphe 2.2.2.1).

La solubilité des SA augmente fortement avec la concentration en DexC<sub>6</sub>-τ, et ceci de manière quasi-linéaire (Figure 111). Cette augmentation de la solubilité s'explique par le fait que les agrégats hydrophobes formés par le DexC<sub>6</sub>-τ permettent de solubiliser ces SA.



**Figure 111: Variation de la solubilité maximale du GO (-) et GN (-) dans des solutions de DexC<sub>6</sub>-18 (GN) et DexC<sub>6</sub>-21 (GO) à différentes concentrations en DexC<sub>6</sub>- $\tau$ .**

Vraisemblablement, les SA (GO ou GN) sont associées avec les macromolécules de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  sous la forme d'agrégats colloïdaux dans lesquels les groupements aliphatiques des SA se regroupent avec les groupements hydrocarbonés des polysaccharides amphiphiles. Un calcul estimatif rapide montre que les agrégats colloïdaux formés contiennent en moyenne une molécule de GO pour 3 groupements hydrocarbonés (du DexC<sub>6</sub>-21) et une molécule de GN pour 8 groupements hydrocarbonés (du DexC<sub>6</sub>-18). Il est possible que des interactions polaires ou via des liaisons hydrogène s'établissent entre les groupements hydroxyle des SA et des unités glucose des chaînes de polysaccharides mais nous n'en avons aucune indication. Des interactions entre des esters de l'acide gallique et des micelles de tensioactifs ioniques et non ioniques ont déjà été rapportées [6].

### 5.3.2. Etude de l'adsorption compétitive éventuelle des SA à la surface des particules

#### 5.3.2.1. Propriétés tensioactives du GO

La structure chimique des deux SA retenues, le GO et le GN, montre que ce sont des molécules amphiphiles. A notre connaissance, un seul article rapporte les propriétés tensioactives de certains esters de l'acide gallique, parmi lesquels le GO [7]. Les auteurs ont démontré que le GO se comporte comme un tensioactif et ont caractérisé son comportement à l'interface eau/air (Tableau 38). Nous avons comparé ces propriétés à celles du DexC<sub>6</sub>-15, déterminées lors de travaux antérieurs.

**Tableau 38: Comparaison des propriétés tensioactives du DexC<sub>6</sub>-15 et du GO à l'interface eau/air à 25 °C.**

	GO	DexC <sub>6</sub> -15
$\sigma_{\min}$ (mN/m)	42,2 <sup>a</sup>	34 <sup>b</sup>
Concentration pour atteindre $\sigma_{\min}$ (mM de groupements hydrocarbonés)	0,03 <sup>a</sup>	≈ 0,83 <sup>b</sup>
$\Gamma_{\max}$ (mol/m <sup>2</sup> )	6,6×10 <sup>-6</sup> <sup>a</sup>	2,8×10 <sup>-6</sup> <sup>b</sup>
Tension superficielle d'une solution aqueuse saturée de GO (mN/m) <sup>c</sup>	50,2	---
Tension superficielle d'une solution aqueuse de DexC <sub>6</sub> -15 à 10 g/L <sup>c</sup>	---	34

a: Données de [7]

b: Données de [8]

c: Mesures expérimentales effectuées durant ce travail

Les mesures expérimentales réalisées avec une solution aqueuse saturée en GO et une solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>-15 à 10 g/L sont cohérentes avec les données de la littérature (Tableau 39) malgré une différence dans le cas du GO dont nous n'avons pas l'explication. Ces données montrent que l'effet tensioactif du DexC<sub>6</sub>-15 est plus marqué que celui du GO. Toutefois, le GO, tout comme le GN, pouvant être considéré comme un tensioactif non ionique, cette propriété peut intervenir de différentes façons lors de la fabrication des particules. L'adsorption du polymère amphiphile aux interfaces peut se trouver modifiée, ce qui pourrait nuire à la stabilité des suspensions de particules produites. La morphologie du cœur des particules pourrait être

modifiée sous l'effet d'une accumulation préférentielle des SA (GO ou GN) aux interfaces (liquide-liquide et/ou solide/liquide).

Dans le but de clarifier ce point, nous avons réalisé une série d'essais visant à déterminer si le GO interagit avec le polysaccharide amphiphile lors de la préparation des particules et quelles sont les conséquences de ces interactions.

### 5.3.2.2. Propriétés de surface de particules de PLA préparées par nanopréciptation en présence d'une phase aqueuse saturée en SA

Des nanoparticules de PLA ont été élaborées par nanopréciptation en utilisant différentes compositions de la phase aqueuse : une phase aqueuse constituée d'eau uniquement, une phase aqueuse constituée d'eau saturée en GO (0,014 g/L), une solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>-17 (10 g/L) et enfin une solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>-17 (10g/L) saturée en GO (1,15 g/L). Dans tous les cas, la phase organique utilisée est une solution de PLA à 10 g/L dans 5 mL d'acétone.

Les particules obtenues ont été caractérisées par granulométrie afin de déterminer la taille ainsi que la distribution granulométrique des particules obtenues (Tableau 39). La stabilité colloïdale des suspensions de particules a été examinée en fonction de la force ionique (Figure 112).

**Tableau 39: Evolution des diamètres d(0,5), D (3,2), du Span (avant lavages) et du taux de recouvrement en DexC<sub>6</sub>-17 des nanoparticules de PLA élaborées en utilisant différentes phases aqueuses : solution de GO à sa solubilité maximale, solution de DexC<sub>6</sub>-17 (10 g/L) ou solution de DexC<sub>6</sub>-17 (10 g/L) saturée en GO avec un volume de phase aqueuse égal à 10 mL (phase organique : 50 mg PLA dans 5 mL d'acétone).**

Composition de la phase aqueuse	[GO] <sup>a</sup> (g/L)	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	Γ (±0,5) <sup>b</sup> (mgDexC <sub>6</sub> /m <sup>2</sup> PLA)
H <sub>2</sub> O	/	189	184	0,89	-
GO (solubilité maximale)	0,014	170	155	0,98	-
DexC <sub>6</sub> -17 (10 g/L)	0	151	131	1,03	2,5
DexC <sub>6</sub> -17 (10 g/L) saturée en GO	1,15	206	167	1,09	2,3

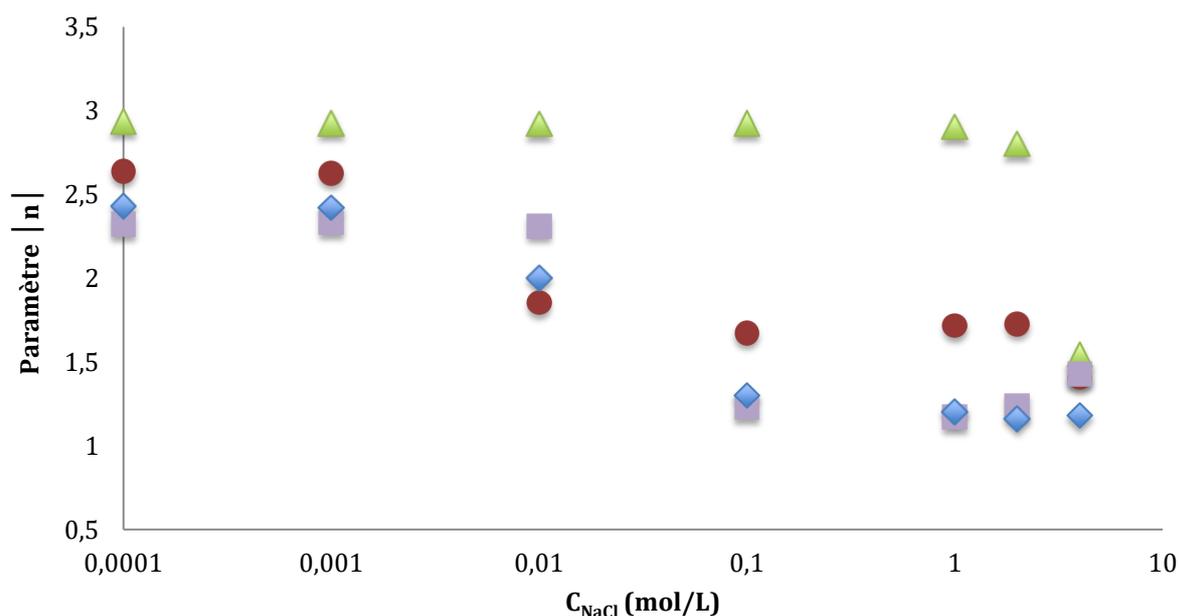
a : concentration en GO dans 10 mL de phase aqueuse

b: Taux de recouvrement des particules déterminé par RMN <sup>1</sup>H (Cf. chapitre 2- paragraphe 2.2.5.1)

Quelle que soit la composition de la phase aqueuse, les suspensions de particules produites ont des caractéristiques voisines avant les étapes de lavages. Cependant, en l'absence de DexC<sub>6-17</sub>, seules les particules préparées en présence d'eau saturée en GO peuvent être facilement redispersées après lavages. Ce n'est pas le cas des particules de PLA préparées en présence d'eau uniquement qui s'agrègent irréversiblement lors des étapes de lavages. Ce premier résultat démontre que le GO s'adsorbe à la surface des particules de PLA en l'absence de polymère amphiphile dans la phase aqueuse.

Les deux essais réalisés avec une phase aqueuse contenant du DexC<sub>6-17</sub> ont conduit à des suspensions de nanoparticules avec des taux de recouvrement identiques à la précision des mesures. Ceci démontre que le GO ne modifie pas sensiblement la quantité de polymère adsorbé. Toutefois, dans la solution de DexC<sub>6-17</sub> saturée en GO, les deux constituants sont associés probablement sous la forme d'agrégats dans lesquels les groupements hydrocarbonés aliphatiques des molécules de GO se rassemblent avec les groupements hydrocarbonés du DexC<sub>6-17</sub> (voir paragraphe 5.3.1).

Afin de vérifier si le GO s'adsorbe ou non à la surface des nanoparticules de PLA lorsque celles-ci sont préparées en présence de DexC<sub>6-17</sub>, nous avons comparé les stabilités colloïdales en milieu salin des suspensions obtenues (Tableau 39, Figure 112).



**Figure 112: Evolution du paramètre |n| en fonction de la concentration en NaCl pour les particules de PLA préparées en utilisant comme phase aqueuse : (◆) de l'eau, (●) de l'eau saturée en GO, (▲) une solution de DexC<sub>6-17</sub> à 10 g/L et (■) une solution de DexC<sub>6-17</sub> à 10 g/L saturée en GO.**

Les suspensions de nanoparticules de PLA non recouvertes ou recouvertes par le GO ne sont plus stables à partir d'une concentration en NaCl égale à  $10^{-3}$  M, au-delà de laquelle un phénomène de floculation est détecté. Les molécules de GO adsorbées ne peuvent pas être à l'origine de répulsions stériques entre les particules.

Dans le cas où les nanoparticules sont préparées en présence de DexC<sub>6</sub>-17, aucun phénomène de floculation des particules n'est détecté jusqu'à des concentrations de 1 M en NaCl. Ainsi que nous l'avons discuté dans le chapitre 3, la couche de DexC<sub>6</sub>-17 adsorbé génère des répulsions stériques qui empêchent l'agrégation des particules.

Dans le cas de suspensions de nanoparticules de PLA préparées en présence d'une solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>-17 saturée en GO (1,15 g/L), un phénomène de floculation est détecté au-delà de  $10^{-2}$  M en NaCl. Comme le taux de recouvrement par le DexC<sub>6</sub>-17 n'est pas significativement modifié par la présence du GO dans la phase aqueuse, c'est la conformation des macromolécules présentes en surface des particules qui doit être affectée. Les molécules de GO interagissent fortement avec les groupements hydrocarbonés du DexC<sub>6</sub>-17 (nous avons estimé 1 molécule de GO pour 3 groupements C<sub>6</sub>), ce qui peut entraîner la formation d'une couche superficielle beaucoup plus compacte et par suite peu efficace pour empêcher l'agrégation des particules. De plus, cette couche compacte contenant des molécules de GO peut avoir tendance à se contracter davantage quand la force ionique augmente.

### **5.3.3. Etude paramétrique de l'encapsulation des SA dans des NP élaborées par nanopréciipitation**

Le protocole de préparation de particules contenant le GO ou le GN par nanopréciipitation est identique à celui utilisé pour la préparation de nanoparticules de PLA (Cf. Chapitre 2 - paragraphe 2.2.3.1.1). La SA à encapsuler est dissoute avec le PLA dans la phase organique. Les objectifs de cette étude étaient :

- l'obtention de particules de PLA/SA de tailles nanométriques, avec des distributions de tailles monomodales et assez étroites.
- l'obtention de particules facilement redispersables après les étapes de lavages.
- maximiser les rendements d'encapsulation et les taux de charge en SA.

Pour ce faire, nous avons considéré trois paramètres : le rapport SA/PLA dans la phase organique, la saturation ou non de la phase aqueuse en SA et la concentration en DexC<sub>6</sub>- $\tau$  dans la phase aqueuse.

### 5.3.3.1. Influence du rapport SA/PLA

En faisant varier le rapport massique SA/PLA, l'objectif était d'augmenter la quantité de SA encapsulée par gramme de PLA, tout en gardant une taille et distribution de taille de particules contrôlée et monodisperse.

Nous avons alors fait varier la fraction massique initiale en SA dans la phase organique en gardant fixe la quantité de matière totale dans cette phase ainsi que son volume (respectivement fixés à 50 mg de SA+PLA et 5 mL d'acétone). Les fractions massiques en SA testées sont 3%, 20%, 30% et 50%.

**Tableau 40: Evolution des  $d(0,5)$ ,  $D[3,2]$ , du Span et taux de recouvrement en DexC<sub>6</sub>- $\tau$  des nanoparticules de PLA/SA élaborées avec différentes fractions massiques initiales de SA dans la phase organique (quantité de matière totale PLA+SA dans la phase organique égale à 50 mg dans 5 mL d'acétone, phase aqueuse = 10 mL de solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  à 10 g/L).**

SA	W <sub>SA</sub> initiale <sup>a</sup> (%)	Avant lavages			Après lavages			$\Gamma (\pm 0,5)^b$ (mgDexC <sub>6</sub> /m <sup>2</sup> )
		d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	
GO	0	143	130	0,97	138	118	1,17	2,3
	3	140	125	1,09	163	162	0,73	2,2
	20	164	146	1,08	172	178	0,95	nd
	30	134	120	1,08	145	140	1,02	2,0
	50	131	119	1,02	173	170	89,86	2,3
GN	0	143	130	0,97	138	118	1,17	2,3
	3	139	125	1,02	160	153	0,69	2,4
	20	124	112	1,13	134	118	1,17	1,9
	30	125	111	1,24	138	119	1,22	1,8

a : Fraction massique du GO introduite initialement dans la phase organique

b : Taux de recouvrement des particules déterminé par RMN <sup>1</sup>H (Cf. chapitre 2- paragraphe 2.2.5.1)

Lorsque la W<sub>GO</sub> ou W<sub>GN</sub> initiale est égale ou inférieure à 30%, la composition de la phase organique n'a pas d'influence significative sur la taille et la distribution de taille des particules obtenues (Tableau 40). Les nanoparticules ont des tailles comprises entre 120 - 180 nm, que ce soit avant ou après lavages. Elles se redispersent parfaitement après lavages et présentent des distributions de tailles monomodales et relativement étroites (Spans mesurés inférieurs ou proches de 1).

Par contre, lorsque la fraction massique initiale en GO est égale à 50%, les particules présentent une distribution de taille monomodale avant lavages mais s'agrègent après les étapes de lavages. La distribution de tailles devient multimodale et très polymétrique, ce qui se traduit par un Span très élevé. Le Tableau 41 représente la masse de SA encapsulée par g de PLA, ainsi que les taux d'encapsulation et la fraction massique en SA dans les particules de PLA obtenues.

**Tableau 41: Masse de SA encapsulée, taux d'encapsulation et fraction massique de SA encapsulée pour les particules préparées avec différentes fractions massiques initiales de SA (quantité de matière totale PLA+SA dans la phase organique égale à 50 mg dans 5 mL d'acétone, phase aqueuse : 10 mL de solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>-τ 10 g/L).**

SA	$W_{SA\text{ initiale}}^a$ (%)	Masse de SA encapsulée (mg/gPLA)	TE <sup>b</sup> (%)	$W_{SA\text{ dans les NP}}^c$ (%)
GO	3	7,7	24,9	0,76
	20	34,1	13,6	3,30
	30	55,0	12,8	5,21
	50	99,6	10,0	9,06
GN	3	5,15	16,7	0,51
	20	31,6	12,6	3,10
	30	38,8	9,1	3,70

- a: Fraction massique de la SA introduite initialement dans la phase organique
- b: Taux d'encapsulation représentant la masse de SA par rapport à la masse de SA initialement introduite
- c: Fraction massique de la SA encapsulée dans le cœur des nanoparticules de PLA

Les résultats obtenus montrent bien qu'en augmentant la fraction massique en SA initialement introduite dans la phase organique ( $W_{SA\text{ initiale}}$ ), on augmente de manière significative la quantité de SA encapsulée par gramme de PLA. La quantité maximale de GO encapsulée est de 55 mg/g PLA pour une composition massique initiale dans la phase organique 70% PLA/ 30% GO. Pour le GN, des quantités légèrement plus faibles sont encapsulées, soit 38,8 mg/g PLA pour une composition massique initiale identique.

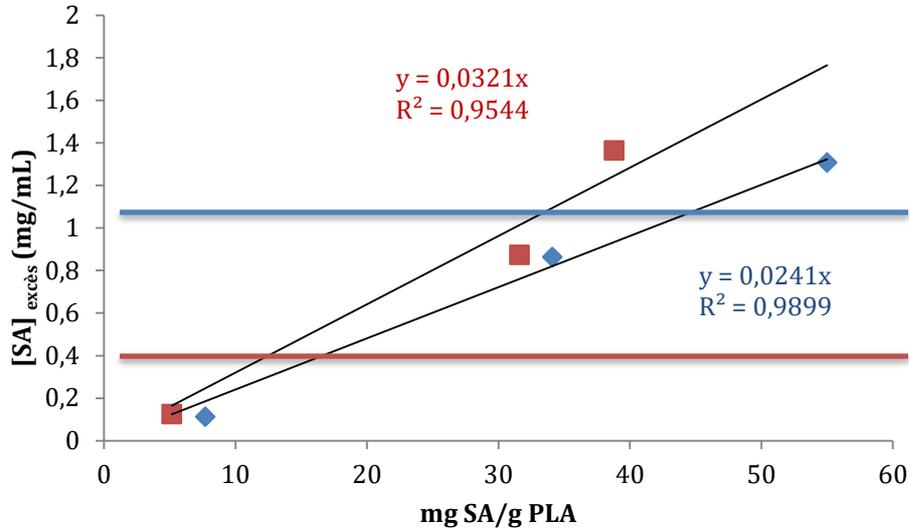
Néanmoins, nous pouvons remarquer que, dans tous les cas, les  $W_{SA\text{ dans les NP}}$  sont relativement faibles.

Ceci peut être expliqué d'une part par la petite taille des particules qui conduit à une diffusion rapide de la SA dans la phase aqueuse et d'autre part par une grande solubilité des SA dans le

mélange phase aqueuse DexC<sub>6</sub>-τ /acétone formé lors de la précipitation, ce qui conduirait à de faibles taux d'encapsulation.

Pour vérifier cela, nous avons calculé la concentration en SA dans la solution de DexC<sub>6</sub>-τ après l'étape d'évaporation du solvant par différence entre la quantité de SA initiale introduite et la quantité de SA encapsulée dans les nanoparticules, en négligeant les pertes très faibles de SA encapsulée lors des lavages à l'eau. Cette concentration sera désignée par le terme « concentration en excès ». La Figure 113 représente la concentration en SA en excès en fonction de la quantité de SA encapsulée par g de PLA. Les droites horizontales représentent la limite de solubilité de la SA dans une solution de DexC<sub>6</sub>-τ (10 g/L). Nous pouvons remarquer que dans certains cas la concentration en SA en excès est très supérieure à la solubilité maximale de la SA dans une solution de DexC<sub>6</sub>-τ (10 g/L). Rappelons, de plus, que du fait de son adsorption à la surface des particules et de l'aire interfaciale importante, la concentration réelle en DexC<sub>6</sub>-τ est significativement inférieure à 10 g/L. Prenons le cas du GO par exemple, pour une fraction massique initiale en GO égale à 30%, la concentration du GO en excès calculée dans la phase aqueuse est égale à 1,3 g/L. Cette concentration est supérieure à la solubilité maximale du GO dans une solution de DexC<sub>6</sub>-τ (10 g/L) qui est égale à 1,15 g/L.

Pour expliquer ces résultats il faut admettre qu'une partie de la SA solubilisée dans le mélange acétone/ DexC<sub>6</sub>-τ précipite dans la solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>-τ lorsque l'acétone est totalement évaporée. Par ailleurs, il est également possible que la solubilité de la SA à 37°C (température utilisée pour l'évaporation du solvant) soit supérieure à celle mesurée à température ambiante, ce qui pourrait également conduire à une augmentation de la concentration en SA dans la solution de DexC<sub>6</sub>-τ puis à une précipitation. Cet excès de SA n'est pas détecté lors de la caractérisation thermique des particules lyophilisées (un pic de fusion serait attendu). Il est vraisemblablement éliminé lors des lavages successifs des suspensions de particules.



**Figure 113: Evolution de la concentration en excès de la SA en fonction de la quantité de SA encapsulée par g PLA: (v) nanoparticules PLA/GO, (v) nanoparticules PLA/GN. Les droite horizontales (—) et (—) représentent respectivement les limites de solubilité du GO et du GN dans une solution de  $[DexC_{6-\tau}] = 10 \text{ g/L}$  (phase organique : 50mg de (PLA+SA) dans 5 mL d'acétone, phase aqueuse : 10 mL de solution aqueuse de  $DexC_{6-\tau}$ , 10 g/L).**

Enfin, dans le but de comparer quantitativement les résultats obtenus, nous proposons un modèle simplissime. Nous admettons que, la quantité de SA encapsulée par g de PLA lors de la nanopréciptation est contrôlée par un équilibre de partage entre la phase aqueuse contenant l'acétone et les particules de PLA gonflées par l'acétone avant et pendant l'évaporation de l'acétone. Lorsque l'évaporation de l'acétone est suffisante pour que les particules de PLA deviennent solides, les phénomènes de transfert de matière entre les deux phases deviennent beaucoup plus lents, ce qui fige la quantité de SA encapsulée dans les particules. Nous caractériserons cet « équilibre de partage » par un « coefficient de partage » noté  $K_p$ . Les valeurs de  $K_p$  sont définies par l'Eq. 31 et peuvent être évaluées par l'inverse des pentes des droites représentées dans la Figure 113. Par définition, plus la valeur de  $K_p$  est élevée, plus l'encapsulation de la SA est favorisée. Pour le GO, on obtient un  $K_p$  de l'ordre de 40 et pour le GN, on obtient un  $K_p$  de l'ordre de 30.

$$K_p = \frac{\text{mg SA encapsulée/g PLA}}{\text{mg SA/g phase aqueuse}} \quad \text{Eq. 31}$$

Il est difficile de comparer les valeurs de  $K_p$  déterminées au cours de nos travaux avec des valeurs de la littérature. A notre connaissance, l'influence du coefficient de partage d'une SA

donné (entre les particules gonflées par le solvant organique et la phase aqueuse contenant ce même solvant) sur la quantité de SA encapsulée n'a pas été évoquée dans la littérature. Les  $K_p$  présents dans la littérature caractérisent plutôt le partage de la SA encapsulée entre le cœur des particules et le milieu dans lequel elle est libérée [9].

### **5.3.3.2. Influence de la composition de la phase aqueuse**

Afin d'augmenter la quantité de SA incorporée dans les particules de PLA ainsi que les rendements d'encapsulation, en nous fondant sur le modèle simplissime d'équilibre de partage, nous avons exploré deux stratégies : la pré-saturation de la phase aqueuse en SA et la réduction de la concentration en  $\text{DexC}_6\text{-}\tau$  dans phase aqueuse.

Dans ces essais, la concentration en PLA+SA dans la phase organique a été maintenue égale à 10 g/L. Nous n'avons pas envisagé d'augmenter la concentration en PLA+SA dans l'acétone cela conduit à la formation de particules présentant une distribution de taille très large, comme nous l'avons montré lors de la préparation de particules de PLA (cf. chapitre 3 - paragraphe 3.3.1).

#### ***5.3.3.2.1. Elaboration de nanoparticules de PLA/GO avec une phase aqueuse initialement saturée en GO***

Une série d'expériences a été menée en utilisant alternativement une phase aqueuse saturée ou non en GO. Les résultats obtenus en termes de granulométrie et d'encapsulation sont comparés (Tableau 42 et Tableau 43).

Le fait de saturer la phase aqueuse en GO n'a pas d'influence sur la taille et les distributions de tailles des nanoparticules élaborées. Dans tous les cas, les particules se redispersent facilement après lavages (Tableau 42). En ce qui concerne l'encapsulation (Tableau 43), on constate que la masse de GO encapsulée dans les particules de PLA préparées en utilisant une phase aqueuse saturée en GO, sans ajout de GO dans la phase organique, n'est pas négligeable. Ceci indique une diffusion du GO de la phase aqueuse vers la phase organique. Ainsi notre modèle simplissime d'équilibre de partage trouve ici un élément de justification expérimentale.

**Tableau 42: Evolution des d(0,5), D[3,2], Span et taux de recouvrement en DexC<sub>6-τ</sub> des nanoparticules PLA/GO élaborées en utilisant une phase aqueuse DexC<sub>6-τ</sub> (10 g/L) saturée ou non en GO (phase organique : 50 mg de (PLA+GO) dans 5 mL d'acétone, phase aqueuse : V<sub>aq</sub>= 10 mL DexC<sub>6-τ</sub>, 10 g/L).**

W <sub>GO</sub> initiale <sup>a</sup> (%)	Saturation de la phase aqueuse <sup>b</sup>	Avant lavages			Après lavages			Γ (±0,5) <sup>c</sup> (mgDexC <sub>6-τ</sub> /m <sup>2</sup> )
		d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	
0	+	166	151	0,86	168	153	0,87	2,51
20	-	164	146	1,08	172	178	0,95	nd
20	+	150	128	1,14	160	142	1,25	2,50
30	-	134	120	1,08	145	140	1,02	2,03
30	+	152	129	1,31	178	159	1,29	2,37

- a : Fraction massique du GO introduite initialement dans la phase organique  
 b : (-) phase aqueuse non saturée en GO, (+) phase aqueuse saturée en GO (1,15 mg/L)  
 c : Taux de recouvrement des particules déterminé par RMN <sup>1</sup>H (Cf. chapitre 2- paragraphe 2.2.5.1)

**Tableau 43: Comparaison entre les caractéristiques des nanoparticules PLA/GO élaborées en utilisant une phase aqueuse DexC<sub>6-τ</sub> (10g/L) saturée ou non en GO (phase organique : 50 mg de (PLA+GO) dans 5 mL d'acétone, phase aqueuse : v = 10 mL DexC<sub>6-τ</sub>, 10 g/L).**

W <sub>GO</sub> initiale <sup>a</sup> (%)	Saturation de la phase aqueuse <sup>b</sup>	Masse de GO encapsulée (mg/gPLA)	TE <sup>c</sup> (%)	W <sub>GO</sub> dans les NP <sup>d</sup> (%)
0	+	21,6	9,4	2,1
20	-	34,1	13,6	3,3
20	+	55,3	10,2	5,2
30	-	55	12,8	5,2
30	+	134	17,7	11,8

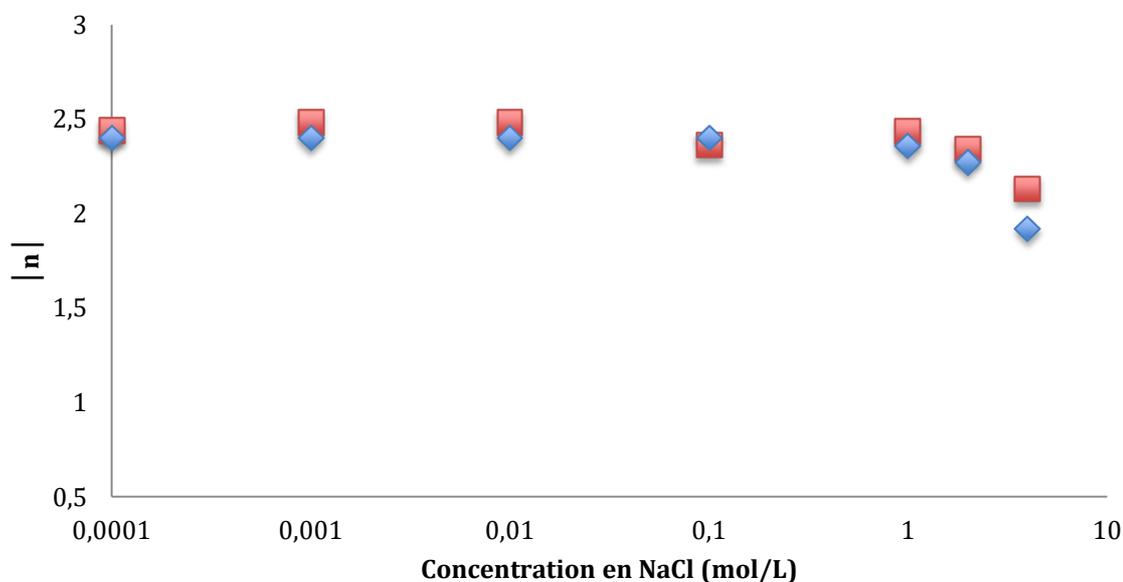
- a: Fraction massique de la SA introduite initialement dans le mélange SA/PLA solubilisé dans la phase organique  
 b: (+) Solution de DexC<sub>6-τ</sub> saturée en GO ; (-) Solution de DexC<sub>6-τ</sub> non saturée en GO (-)  
 c: Taux d'encapsulation représentant la masse de SA par rapport à la masse de SA initialement introduite (dans la phase aqueuse et dans phase organique)  
 d: Fraction massique de la SA encapsulée dans le cœur des nanoparticules de PLA

Lorsque le GO est introduit initialement dans la phase organique, on constate que, les TE (%) ne varient pas significativement, que la solution aqueuse soit ou non saturée en GO. Toutefois, la

quantité de GO encapsulé par g de PLA augmente de manière sensible, en raison de l'augmentation de la quantité totale de GO introduite initialement (phase aqueuse + phase organique).

Ainsi que nous l'avons montré en début de ce chapitre, le GO possède les propriétés d'un tensioactif non ionique et sa présence dans la phase aqueuse au moment de la préparation des particules réduit la stabilité colloïdale des suspensions de particules produites. Une agrégation est détectée lorsque la force ionique dépasse 0,01 M. Ce résultat a été constaté avec des particules produites avec une phase aqueuse saturée en GO mais sans addition de GO dans la phase organique.

Nous avons examiné la stabilité colloïdale des suspensions de particules préparées avec 30 % de SA dans le mélange PLA/SA (Tableau 42) en fonction de la force ionique (Figure 114).



**Figure 114: Stabilité colloïdale de suspensions de nanoparticules élaborées par nanopréciipitation en fonction de la force ionique : Evolution du paramètre  $|n|$  en fonction de la concentration en NaCl pour des particules (■) de PLA/GO ( $W_{GO\text{initial}} (\%) = 30$ ) préparées en présence d'une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (10 g/L), (◆) de PLA/GO ( $W_{GO\text{initial}} (\%) = 30$ ) préparées en présence d'une solution de DexC<sub>6</sub>-17 (10 g/L) saturée en GO.**

Aucune agrégation n'est détectée jusqu'à une concentration en NaCl de 1 M, ce qui traduit une très bonne stabilité colloïdale pour les deux suspensions de nanoparticules. Donc, lorsque le GO est ajouté dans la phase organique, le fait d'utiliser une phase aqueuse saturée en GO lors de la préparation ne modifie en rien la stabilité colloïdale des suspensions obtenues. Ce résultat peut

sembler contradictoire avec celui observé sans ajouter de GO dans la phase organique et l'explication n'est pas évidente. Une interprétation possible est que la présence du GO dans la phase organique contribue à plastifier les particules au moment de leur formation, ce qui fait qu'elles restent fluides plus longtemps. Cet intervalle de temps supplémentaire permet aux agrégats mixtes formés par le GO et le polysaccharide amphiphile de se dissocier et de conduire à une adsorption d'objets moins compacts en surface des particules produites. Ceci conférerait aux particules finales une meilleure stabilité colloïdale, comparable à celle des particules produites avec une phase aqueuse non saturée en GO.

#### **5.3.3.2.2. *Elaboration de nanoparticules PLA/GN avec différentes concentrations en DexC<sub>6</sub>-18 dans la phase aqueuse***

Nous avons montré que la solubilité des SA dans la phase aqueuse diminue lorsque la concentration en DexC<sub>6</sub>- $\tau$  diminue. Par conséquent, réduire cette concentration dans la phase aqueuse reviendrait à déplacer l'équilibre de partage en faveur des particules. Cette étude a été réalisée avec le GN comme SA modèle.

En dessous d'une concentration en DexC<sub>6</sub>- $\tau$  de 3 g/L, les particules présentent une distribution multimodale et très polymétrique avant les étapes de lavages (Tableau 44). Des résultats comparables ont été obtenus lors de la préparation de nanoparticules de PLA par E-ES (Cf. Chapitre 3 – paragraphe 3.3.2.1.1.3). En effet, lorsque la concentration en DexC<sub>6</sub>- $\tau$  diminue, la quantité de dextrane disponible pour s'adsorber à la surface des particules diminue, d'où la formation de grosses particules [10]. Cependant nous observons que le taux de recouvrement en dextrane de ces particules est très élevé, ce qui peut paraître contradictoire. Pour expliquer ce résultat, on peut raisonnablement penser que les grosses particules sont en fait des agrégats de nanoparticules avec un faible taux de recouvrement en dextrane. La surface spécifique de ces agrégats composites serait donc sous estimée, ce qui conduit à une surestimation du taux de recouvrement en dextrane de ces particules.

Avec une concentration en DexC<sub>6</sub>-18 égale à 3 g/L, les nanoparticules formées ne s'agrègent pas avant lavages. Néanmoins, ces particules s'agrègent après lavages. Pour les raisons précédemment décrites, il est possible que le taux de recouvrement en dextrane soit surévalué. Un faible taux de recouvrement en dextrane de ces particules pourrait expliquer leur agrégation pendant les lavages comportant des étapes de centrifugation.

Avec une concentration en DexC<sub>6</sub>-18 supérieure à 3 g/L, les particules sont facilement redispersables après les étapes de lavages. Le taux de recouvrement en dextrane des particules augmente légèrement avec la concentration en dextrane dans la phase aqueuse (Tableau 44).

**Tableau 44: Evolution des d(0,5), D[3,2], Span et taux de recouvrement des nanoparticules de PLA/GN élaborées avec différentes concentration en DexC<sub>6</sub>-18 (phase organique : 50 mg de (PLA+GN avec  $W_{GN\ initial} = 20\%$ ) dans 5 mL d'acétone, phase aqueuse :  $V_{aq} = 10\text{ mL}$  d'une solution de DexC<sub>6</sub>-18).**

[DexC <sub>6</sub> -18] <sup>a</sup> (g/L)	Avant lavages			Après lavages			$\Gamma (\pm 0,5)^b$ (mgDexC <sub>6</sub> /m <sup>2</sup> PLA)
	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	
1	8140	437	11,88	197	221	42,35	6,88
2	249	275	31,80	194	258	77,15	4,93
3	122	104	1,47	199	206	46,21	1,62
4	114	100	1,40	146	126	1,53	1,58
5	112	97	1,32	133	117	1,53	1,65
10	161	148	1,06	159	143	0,96	2,13

a : Concentration en DexC<sub>6</sub>-18 dans 10 mL d'eau

b : Taux de recouvrement des particules déterminé par RMN <sup>1</sup>H (Cf. chapitre 2- paragraphe 2.2.5.1)

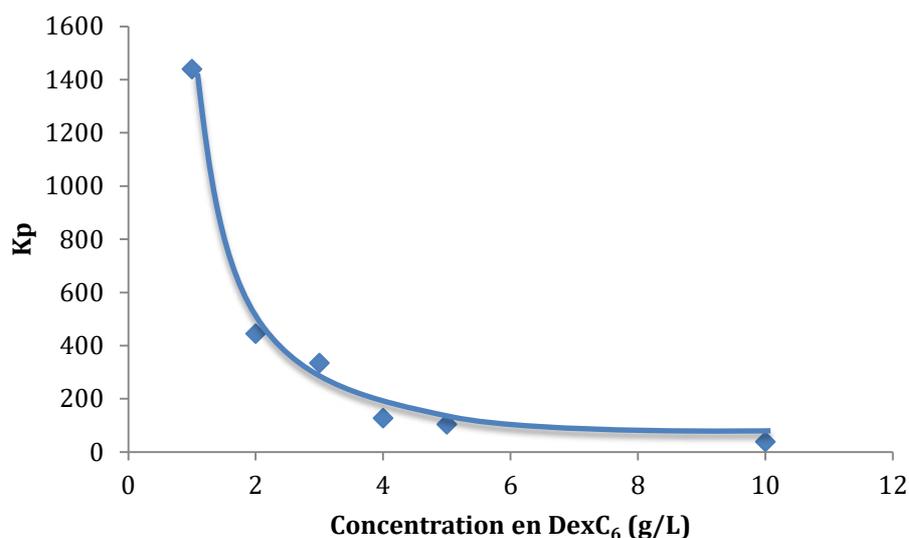
Les différents taux de charge en GN ainsi que les différents rendements d'encapsulation obtenus montrent clairement une augmentation de la quantité de GN encapsulée et du taux d'encapsulation en passant d'une concentration en DexC<sub>6</sub>-18 de 10 g/L à 1 g/L (Tableau 45).

La Figure 115 représente l'évolution des coefficients de partage K<sub>p</sub> calculés en fonction de la concentration en DexC<sub>6</sub>-τ dans la phase aqueuse (évalués comme précédemment Eq. 31). Les résultats obtenus montrent clairement une augmentation du K<sub>p</sub> quand la concentration en dextrane diminue. Ceci est vraisemblablement lié à la diminution de solubilité du GN dans la phase aqueuse lorsque la concentration de la phase aqueuse en DexC<sub>6</sub>-18 diminue, d'où une augmentation des quantités de GN encapsulées et par conséquent du taux d'encapsulation.

**Tableau 45:  $T_g$  des nanoparticules PLA/GN calculée à partir de la loi de Fox ou déterminées expérimentalement par MDSC (Phase organique : 50 mg de (PLA+GN) avec  $W_{GN\text{ initiale}} = 20\%$  dans 5 mL d'acétone, phase aqueuse :  $V_{aq} = 10\text{ mL DexC}_6\text{-18 } 10\text{ g/L}$ ).**

[DexC <sub>6</sub> -18] <sup>a</sup> (g/L)	Masse de GN encapsulée (mg/gPLA)	TE <sup>b</sup> (%)	W <sub>GN</sub> dans les NP <sup>c</sup> (%)	T <sub>g</sub> calculée <sup>d</sup>	T <sub>g</sub> Expérimentale <sup>e</sup>
1	213	85,2	17,6	33,2	nd
2	160	64	13,8	36,8	nd
3	143	57,2	12,5	38,3	nd
4	84,1	33,6	7,8	43,6	nd
5	73,3	29,3	6,8	44,8	46,1
10	32,9	13,2	3,2	49,0	47,7

- a: Concentration en DexC<sub>6</sub>-18 dans 10 mL d'eau
- b: Taux d'encapsulation représentant la masse de SA par rapport à la masse de SA initialement introduite
- c: Fraction massique du GN encapsulée dans le cœur des nanoparticules de PLA
- d: T<sub>g</sub> calculée à partir de la relation de Fox (Cf. Eq. 29)
- e: T<sub>g</sub> déterminée par analyse d'un échantillon lyophilisé de nanoparticules de PLA/GN par MDSC



**Figure 115: Evolution des Kp calculés en fonction de la concentration en DexC<sub>6</sub>-18 dans la phase aqueuse.**

### **5.3.4. Etude paramétrique de l'encapsulation des SA dans des nanoparticules élaborées par E-ES**

L'influence de la quantité de matière introduite dans la phase organique initiale, de la fraction massique en SA ou encore de la concentration du dextrane modifié sur les propriétés des nanoparticules élaborées a été étudiée.

L'AcOEt est partiellement miscible dans l'eau, à raison de 1 mL par 10 mL d'eau. Nous avons considéré que cette valeur de miscibilité n'est pas significativement modifiée dans les solutions de DexC<sub>6</sub>.

#### **5.3.4.1. Influence de la saturation/non saturation de la phase aqueuse en Acétate d'éthyle**

Dans le chapitre 3, nous avons montré que l'utilisation soit d'un rapport phase organique/phase aqueuse de V mL/10 mL de phase aqueuse saturée en AcOEt, soit de (V+1) mL/10 mL de phase aqueuse non saturée, à quantité de matière constante n'a aucun effet sur la taille et la distribution des tailles des particules de PLA obtenues. Ceci peut être attribué à la diffusion très rapide de l'AcOEt dans la phase aqueuse non saturée. Ceci fait que l'on a une composition des phases identique avant même l'étape d'émulsification avec l'une ou l'autre de ces conditions initiales.

Nous avons d'abord vérifié que l'on obtenait le même résultat en présence d'une SA, ici le GN. Les tailles des nanoparticules obtenues avec et sans saturation de la phase aqueuse en AcOEt sont similaires. La distribution de tailles obtenue avant lavage n'est pas modifiée après lavage de la suspension (Tableau 46).

**Tableau 46: Evolution des d(0,5), D[3,2], Span et taux de recouvrement en DexC<sub>6</sub>- $\tau$  des nanoparticules de PLA/GN élaborées avec une phase aqueuse saturée (+) ou non (-) en AcOEt (phase organique: quantité de matière totale (PLA+GN) = 50 mg,  $W_{GN\ initial}$  = 20%,  $V_{aq}$  = 10 mL, 10 mg DexC<sub>6</sub>/mL).**

Formulation	Saturation de la phase aqueuse en AcOEt <sup>a</sup>	Volume de la phase organique	Avant lavages			Après lavages			$\Gamma (\pm 0,5)^b$ (mgDexC <sub>6</sub> /m <sup>2</sup> PLA)
			d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	
1	-	6	102	94	1,19	105	96	1,14	2,54
2	+	5	108	102	1,04	113	105	1,03	2,46

a : (-) phase aqueuse non saturée en AcOEt, (+) phase aqueuse saturée en AcOEt

b : Taux de recouvrement des particules déterminé par RMN <sup>1</sup>H (Cf. chapitre 2 - paragraphe 2.2.5.1)

De la même façon, il apparaît que pour les deux procédures, les masses de GN encapsulées ne sont pas significativement différentes (Tableau 47).

**Tableau 47: Comparaison entre les caractéristiques des nanoparticules PLA/GN élaborées en utilisant une phase aqueuse DexC<sub>6</sub>- $\tau$  saturée (échantillon 2) ou non (échantillon 1) en AcOEt (phase organique: quantité de matière totale (PLA+GN) = 50 mg,  $W_{GN\ initial}$  = 20%, phase aqueuse :  $V_{aq}$  = 10 mL, 10 mg DexC<sub>6</sub>/mL).**

Formulation	Masse de GN encapsulée (mg/gPLA)	TE <sup>a</sup> (%)	$W_{GN}$ dans les NP <sup>b</sup> (%)
1	49,4	19,8	4,7
2	52,7	21,1	5

a : Taux d'encapsulation représentant la masse de SA par rapport à la masse de SA initialement introduite

b : Fraction massique du GN encapsulée dans le cœur des nanoparticules de PLA

A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que la saturation ou non de la phase aqueuse en AcOEt est sans effet sur les caractéristiques des nanoparticules obtenues, à quantité de matière équivalente.

### **5.3.4.2. Elaboration de nanoparticules avec différentes compositions initiales (SA/PLA) dans la phase organique**

Contrairement à la nanoprécipitation, des nanoparticules peuvent être obtenues par E-ES avec des concentrations en PLA beaucoup plus élevées. Nous avons en effet montré dans le chapitre 3 (paragraphe 3.3.2.1.1.1), que des nanoparticules de PLA peuvent être obtenues par E-ES avec des distributions de tailles relativement monomodales en utilisant des quantités de matière totale (masse du PLA) pouvant atteindre les 300 mg.

Nous avons élaboré et analysé différents lots de nanoparticules en variant la quantité de matière totale (PLA+SA) initialement introduite dans la phase organique, en conservant la même fraction massique en SA.

#### **5.3.4.2.1. Encapsulation du GO**

Dans tous les cas étudiés, des nanoparticules avec une distribution en taille monomodale sont obtenues après évaporation du solvant (avant lavages des nanoparticules) (Tableau 48). Cependant, après les étapes de lavages, les particules s'agrègent dès lors que la fraction massique de GO encapsulé devient supérieure à ~10% (Tableau 49), ce qui correspond à une valeur de la  $T_g$  du mélange GO/PLA inférieure à 40°C (Tableau 37).

**Tableau 48: Evolution des d(0,5), D[3,2], Span et taux de recouvrement en DexC<sub>6</sub>- $\tau$  des nanoparticules PLA /GO (phase organique :  $V_{org} = 3$  mL à l'exception du cas où la quantité de matière est égale à 50 mg :  $V_{org} = 6$  mL, phase aqueuse : DexC<sub>6</sub>-18 (10 g/L) non saturée en AcOEt,  $V_{aq}=10$  mL).**

$W_{GO}$ initiale <sup>a</sup> (%)	Masse totale (PLA+ GO) <sup>b</sup> (mg)	Avant lavages			Après lavages			$\Gamma (\pm 0,5)^c$ (mgDexC <sub>6</sub> /m <sup>2</sup> PLA)
		d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	d(0,5) (nm)	D[3,2] (nm)	Span	
3	200	134	116	1,27	146	126	1,20	2,0
20	50	107	101	1,07	99	91	1,10	2,4
	100	91	80	1,12	91	80	1,11	2,6
	200	108	96	1,36	113	99	1,24	2,0
	300	126	108	1,46	128	114	4,40	3,0
	400	202	167	9,9	149	135	8,30	2,8
30	100	96	86	1,23	120	116	158,00	2,5
	200	102	91	1,33	935	364	11,00	2,9
	300	109	95	1,40	196	205	36,00	5,3
40	100	99	90	1,25	121	110	52,00	2,5

a : Fraction massique en GO initialement introduite dans la phase organique

b: Quantité de matière totale dans la phase organique

c: Taux de recouvrement des particules déterminé par RMN <sup>1</sup>H (Cf. chapitre 2 - paragraphe 2.2.5.1)

**Tableau 49: Comparaison entre les caractéristiques des nanoparticules PLA/GO élaborées avec différentes  $W_{GO}$  initiale et quantités de matières totales dans la phase organique (phase organique :  $V_{org} = 3$  mL à l'exception du cas où la quantité de matière est égale à 50 mg :  $V_{org} = 6$  mL, phase aqueuse : DexC<sub>6-τ</sub> (10 g/L) non saturé en AcOEt,  $V_{aq}=10$  mL).**

$W_{GO}$ initiale <sup>a</sup> (%)	Masse totale (PLA+ GO) <sup>b</sup> (mg)	Masse de GO encapsulée (mg/gPLA)	TE <sup>c</sup> (%)	$W_{GO}$ dans les NP <sup>d</sup> (%)
3	200	22	69,8	2,1
20	50	43	18,0	4,1
	100	84	33,4	7,7
	200	101	38,7	9,2
	300	126	48,5	11,2
	400	131	51,6	11,6
30	100	132	29,1	11,7
	200	189	43,9	15,9
	300	265	61,7	21,0
40	100	132	20,4	11,6

a: Fraction massique en GO initialement introduite dans la phase organique

b: Quantité de matière totale dans la phase organique

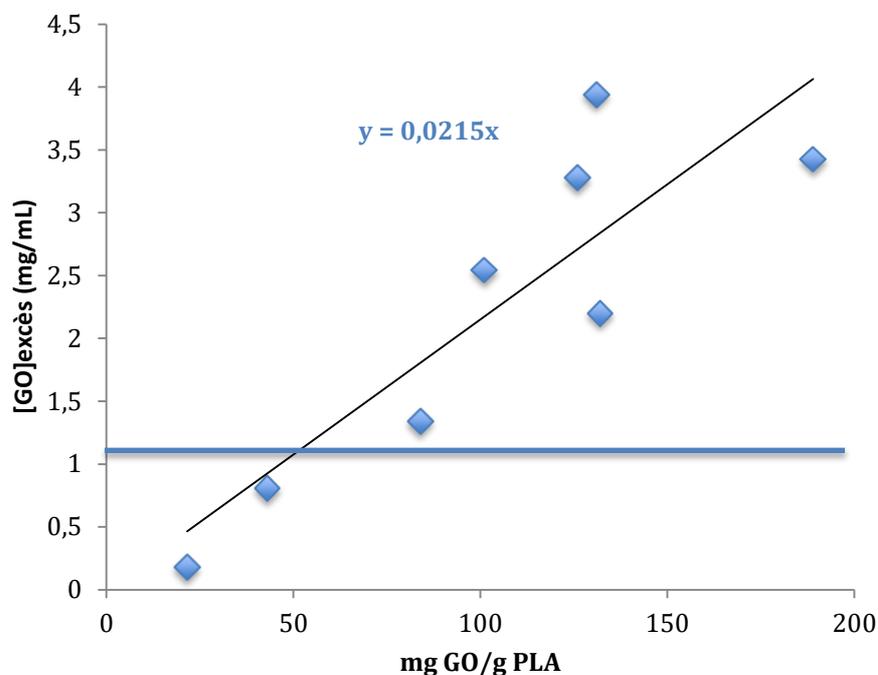
c: Taux d'encapsulation représentant la masse de SA par rapport à la masse de SA initialement introduite

d: Fraction massique du GO encapsulée dans le cœur des nanoparticules de PLA

Dans le cas de l'E-ES, la quantité de SA encapsulée par g de PLA lors de la formulation est aussi gouvernée par un coefficient de partage entre la phase aqueuse saturée en AcOEt et les gouttelettes d'AcOEt contenant le PLA, avant et pendant l'évaporation du solvant.

Au final, les valeurs de Kp sont déterminées comme précédemment décrit dans le cas de la nanoprécipitation (Eq.3).

La Figure 116 représente l'évolution de la concentration en GO en excès en fonction de la quantité de SA encapsulée par g PLA.



**Figure 116: Evolution de la concentration en GO en excès en fonction de la quantité de GO encapsulée par g PLA (♦) nanoparticules PLA/GO (conditions détaillées dans Tableau 48). La droite horizontale (—) représente la limite de solubilité du GO dans une solution de  $[DexC_6-\tau] = 10 \text{ g/L}$**

Ainsi que précédemment décrit, on peut remarquer que la concentration en GO en excès calculée dans la phase aqueuse est dans la plupart des cas, supérieure à la concentration de saturation dans la solution de DexC<sub>6</sub> 10g/L (1,15 g/L) (Figure 116). Ceci peut être attribué à une solubilité du GO plus grande dans la phase aqueuse saturée en AcOEt que dans la phase aqueuse après évaporation du solvant. La valeur de  $K_p$  obtenue est de l'ordre de 47 et donc comparable à celle obtenue lorsque les particules sont préparées par nanopréciipitation.

#### 5.3.4.2.2. Encapsulation du GN

De façon similaire au paragraphe précédent, nous avons étudié l'influence de différentes compositions initiales (GN/PLA) dans la phase organique sur les caractéristiques des particules obtenues. Dans les formulations étudiées, les fractions massiques en GN varient entre 3% à 20%, et les quantités de matières totales (PLA+GN) varient entre 50 et 300 mg (Tableau 50 et Tableau 51). Nous constatons que, comme avec le GO, les nanoparticules s'agrègent lors des lavages quand la teneur en GN est supérieure à 10 %, ce qui correspond à une valeur de  $T_g$  de l'ordre de 40 °C.

**Tableau 50: Evolution des d(0,5), D[3,2], Span et taux de recouvrement en DexC<sub>6</sub>- $\tau$  des nanoparticules PLA/GN (phase organique:  $V_{org} = 3$  mL à l'exception du cas où la quantité de matière est égale à 50 mg :  $V_{org} = 6$  mL, phase aqueuse : DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (10 g/L) non saturée en AcOEt,  $V_{aq} = 10$  mL).**

W <sub>GN initiale</sub> <sup>a</sup> (%)	Masse totale (PLA+GN) <sup>b</sup> (mg)	Avant lavages			Après lavages			$\Gamma (\pm 0,5)$ (mg DexC <sub>6</sub> /m <sup>2</sup> PLA)
		d(0,5)	D(3,2)	Span	d(0,5)	D(3,2)	Span	
3	200	126	122	0,92	117	109	1,17	2,5
20	50	102	94	1,19	105	96	1,14	2,0
	100	94	86	0,95	113	103	1,80	2,6
	200	101	89	1,23	193	196	6,80	4,2
	300	128	113	1,20	230	264	36,68	4,1

- a : Fraction massique en GN initialement introduite dans la phase organique  
 b : Quantité de matière totale dans la phase organique  
 c : Taux de recouvrement des particules déterminé par RMN <sup>1</sup>H (Cf. chapitre 2 - paragraphe 2.2.5.1)

**Tableau 51: Comparaison entre les caractéristiques des nanoparticules PLA/GN (phase organique :  $V_{org} = 3$  mL à l'exception du cas où la quantité de matière est égale à 50 mg :  $V_{org} = 6$  mL, phase aqueuse : DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (10g/L) non saturée en AcOEt,  $V_{aq} = 10$  mL).**

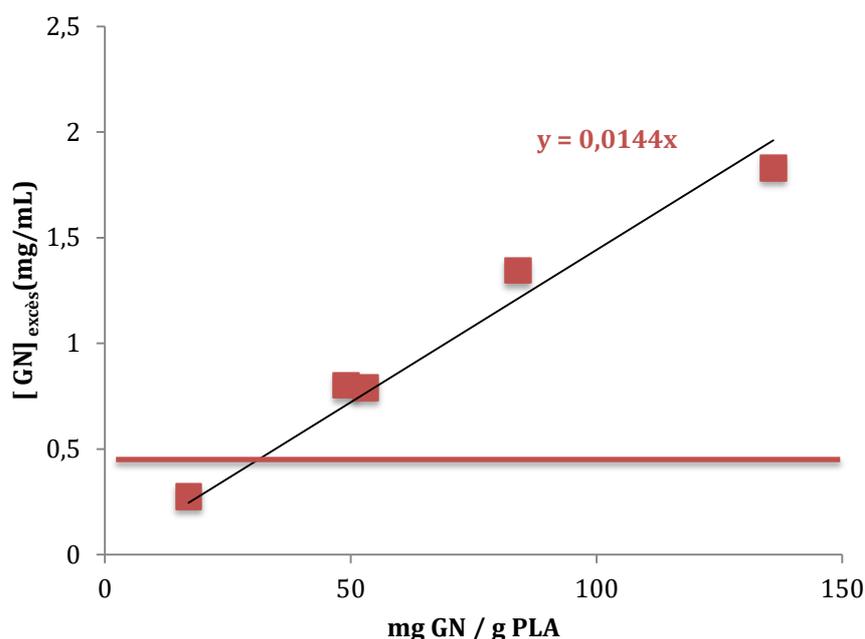
W <sub>GN initiale</sub> <sup>a</sup> (%)	Masse totale (PLA+GN) <sup>b</sup> (mg)	Masse de GN encapsulée (mg/gPLA)	TE <sup>c</sup> (%)	W <sub>GN dans les NP</sub> <sup>d</sup> (%)
3	200	17	54,3	1,7
20	50	49	20,0	4,7
	100	84	34,5	7,7
	200	136	54,3	12,0
	300	219	89,8	18,0

- a : Fraction massique en GN initialement introduite dans la phase organique  
 b : Quantité de matière totale dans la phase organique  
 c : Taux d'encapsulation représentant la masse de GN<sub>encapsulée</sub> par rapport à la masse de GN<sub>initialement introduite</sub>  
 d : Fraction massique du GN encapsulée dans le cœur des nanoparticules de PLA

La Figure 117 représente l'évolution de la concentration en GN en excès en fonction de la quantité de SA encapsulée par g PLA. Le K<sub>p</sub> calculé est égal à 70. Cette valeur est cette fois très

supérieure à celle déterminée à partir des nanoparticules PLA/GN obtenues par nanoprecipitation (égale à 30).

On peut supposer que, lors de l'émulsification, le GN plus hydrophobe que le GO a plus d'affinité pour le mélange PLA/AcOEt que pour la phase aqueuse saturée en AcOEt. Lors de l'évaporation du solvant, la phase aqueuse se sature en GN pendant que les particules de PLA se forment, en encapsulant une grande quantité de GN qui ne peut plus diffuser dans la phase aqueuse déjà saturée en GN.



**Figure 117:** Evolution de la concentration en GN en excès en fonction de la quantité de GN encapsulée par g PLA (♦) nanoparticules PLA/GN (conditions détaillées dans Tableau 50). La droite horizontale (—) représente la limite de solubilité du GN dans une solution de [DexC<sub>6</sub>-τ] = 10 g/L.

### 5.3.4.3. Elaboration de nanoparticules avec différentes compositions de phase aqueuse

Nous avons préparé des nanoparticules en utilisant une phase organique avec une fraction massique en GN égale à 20% et une quantité de matière totale (PLA+SA) égale à 50 mg dans 6 mL d'AcOEt. La phase aqueuse, quant à elle, est une solution de dextrane modifié à 5 ou 10 g/L, non saturée en AcOEt ayant un volume égal à 10 mL. Le Tableau 52 et le Tableau 53 résument les caractéristiques des nanoparticules obtenues.

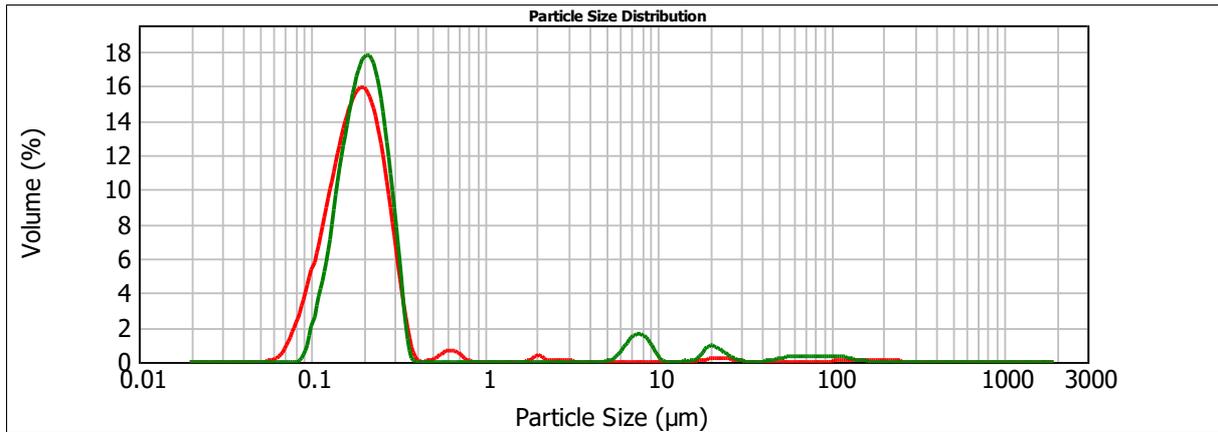
**Tableau 52: Evolution des d(0,5), D[3,2], Span et taux de recouvrement en DexC<sub>6-18</sub> des particules PLA/GN en fonction de la concentration initiale en Dextrane modifié dans la phase aqueuse** (phase aqueuse:  $V_{aq}=10$  mL non saturée en AcOEt, phase organique : quantité de matière (PLA+GN) égale à 50 mg avec  $W_{GN}=20\%$ ,  $V_{org}=6$  mL).

[DexC <sub>6-18</sub> ] <sup>a</sup> (g/L)	Avant lavages			Après lavages			$\Gamma (\pm 0,5)^b$ (mg DexC <sub>6-18</sub> /m <sup>2</sup> PLA)
	d(0,5) (nm)	D(3,2) (nm)	Span	d(0,5) (nm)	D(3,2) (nm)	Span	
5	184	171	0,96	205	208	2,6	2,9
10	97	85	1,11	97	86	1,13	2,5

a : concentration en DexC<sub>6-18</sub> dans 10 mL d'eau

b: Taux de recouvrement des particules déterminé par RMN <sup>1</sup>H (Cf. chapitre 2- paragraphe 2.2.5.1)

Les particules élaborées avec une concentration en DexC<sub>6-18</sub> égale à 5 g/L ont une taille bien supérieure (et se redispersent plus difficilement) à celles obtenues avec une concentration en DexC<sub>6-18</sub> égale à 10 g/L. Toutefois, les plus grandes particules, vraisemblablement constituées d'agrégats de nanoparticules, restent en faible proportion (Figure 118).



**Figure 118: Distribution granulométrique des particules obtenues avec une concentration en DexC<sub>6-18</sub> égale à 5 g/L (-) avant lavages, (-) après lavages** (phase aqueuse:  $V_{aq}=10$  mL non saturée en AcOEt, phase organique : quantité de matière (PLA+GN) égale à 50 mg avec  $W_{GN}=20\%$ ,  $V_{org}=6$  mL).

**Tableau 53: Evolution de la masse de GN encapsulée en fonction de la concentration en DexC<sub>6</sub>-18** (phase aqueuse:  $V_{aq}=10$  mL non saturée en AcOEt, phase organique : quantité de matière (PLA+GN) égale à 50 mg avec  $W_{GN}=20$  %,  $V_{org}=6$  mL).

[DexC <sub>6</sub> -18] <sup>a</sup> (g/L)	Masse de GN encapsulée (mg/gPLA)	TE <sup>b</sup> (%)	W <sub>GN</sub> dans les NP <sup>c</sup> (%)
5	60	24,1	5,9
10	49	19,8	4,7

- a : concentration en DexC<sub>6</sub>-18 dans 10 mL d'eau  
 b : Taux d'encapsulation représentant la masse de GN<sub>encapsulée</sub> par rapport à la masse de GN<sub>initialement introduite</sub>  
 c : Fraction massique du GN encapsulée dans le cœur des nanoparticules de PLA

Comme nous l'avons déjà montré, la solubilité du GN diminue avec la concentration du dextrane modifié dans l'eau. Ceci explique que les nanoparticules élaborées en utilisant un dextrane modifié ayant une concentration de 5 g/L renferment plus de GN que celles élaborées avec 10 g/L.

### 5.3.5. Comparaison entre les caractéristiques des nanoparticules élaborées par nanoprécipitation et par E-ES

D'après les différents résultats obtenus et présentés dans les paragraphes précédents, nous pouvons remarquer que les taux de charge maximaux obtenus lors de la préparation des nanoparticules, soit par nanoprécipitation soit par E-ES, sont comparables et dépendent de la SA encapsulée. Ainsi, pour le GO, les valeurs obtenues par nanoprécipitation et E-ES sont respectivement équivalentes à 134 et 100 mg/g PLA. Pour le GN, les valeurs obtenues par nanoprécipitation et E-ES sont équivalentes, soit environ 80 mg/g PLA.

Lorsque l'on tente de préparer des nanoparticules contenant des quantités encapsulées supérieures, les nanoparticules obtenues s'agrègent lors des étapes de lavages et de centrifugation. Ceci peut être lié à l'abaissement de la T<sub>g</sub> du mélange SA/PLA lorsque W<sub>SA</sub> dans les NP (%) devient supérieure à environ 10%. On observe en effet ce phénomène d'agrégation dès lors que la T<sub>g</sub> calculée des particules devient significativement inférieure à environ 40°C.

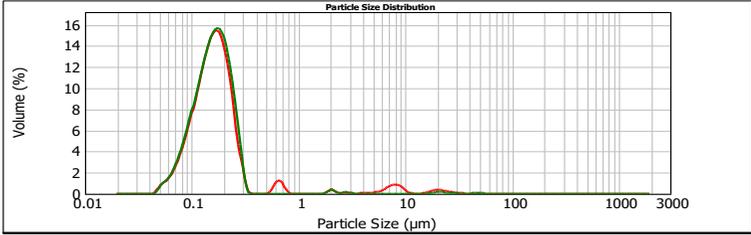
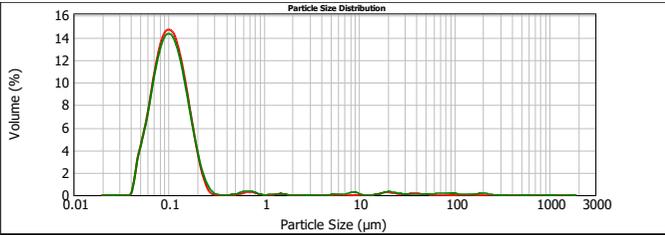
Dans le but d'isoler l'influence du procédé utilisé sur les caractéristiques des nanoparticules obtenues, nous avons préparé des lots de nanoparticules par nanopréciipitation et E-ES contenant du GN, dans des conditions de formulation identiques : même composition des phases organique et aqueuse initiales (sauf la nature du solvant car c'est un paramètre relatif au procédé lui même ; pour la nanopréciipitation l'acétone a été utilisé alors que l'AcOEt a été utilisé pour l'E-ES).

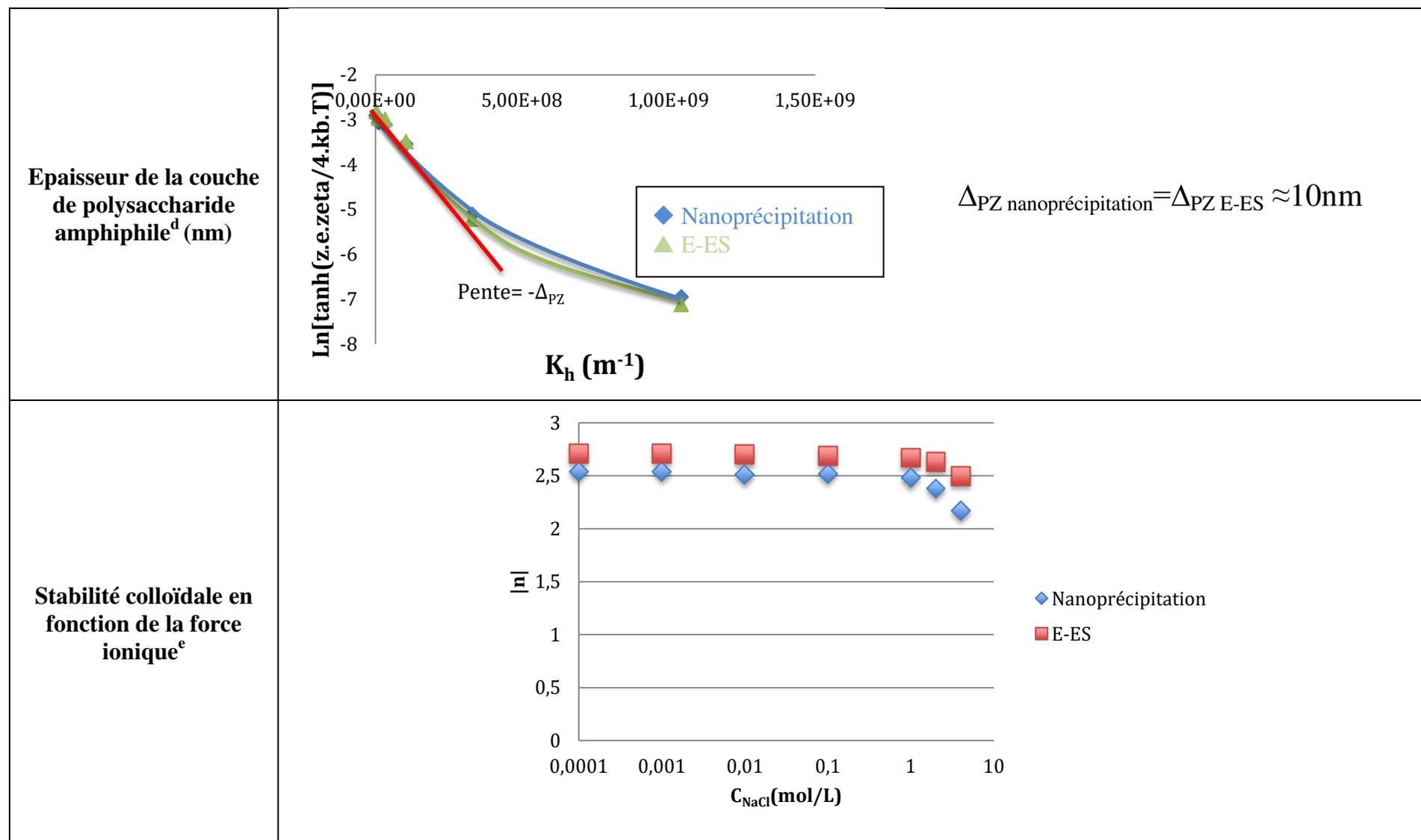
La comparaison des résultats (Tableau 54) confirme que la taille des particules obtenues par E-ES est plus petite que celle des particules obtenues par nanopréciipitation. Pour les nanoparticules élaborées par E-ES, la masse de GN encapsulée et le TE% (Tableau 54) présentent des valeurs plus élevées que celles obtenues par nanopréciipitation dans des conditions similaires. Cette différence est attribuée au coefficient de partage  $K_p$  du GN qui présente une valeur plus élevée dans le cas de l'encapsulation du GN par E-ES par rapport à la nanopréciipitation, favorisant ainsi son encapsulation par le procédé d'E-ES.

Avec ces deux lots de nanoparticules, nous effectués des mesures de potentiel zêta de façon à déterminer l'épaisseur de la couche superficielles de polysaccharide amphiphile (voir chapitre 2 pour la procédure expérimentale). Dans les deux cas les valeurs trouvées sont identiques et égales à 10 nm. Cette épaisseur de la couche hydrophile en surface des particules provient des boucles formées par les segments hydrophiles des chaînes de polysaccharide amphiphile et explique la stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules.

La Tg des nanoparticules a également été déterminée expérimentalement et comparée à la valeur calculée à l'aide de la relation de Fox en utilisant la composition déterminée par RMN  $^1\text{H}$ . Un bon accord entre valeurs expérimentales et valeurs calculées est retrouvé ici, comme dans plusieurs autres séries de résultats de ce chapitre. Ceci vient conforter l'hypothèse d'une répartition uniforme de la SA dans le cœur des particules. En effet, si une proportion non négligeable de la SA s'accumulait en périphérie des particules, les mesures de MDSC s'en trouveraient affectées. Ce point sera rediscuté dans le paragraphe consacré au suivi de la libération des SA.

**Tableau 54: Comparaison entre les caractéristiques des nanoparticules de PLA/GN élaborées par nanopréciipitation** (phase aqueuse :  $V_{aq} = 10$  mL de solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (10 g/L), phase organique : quantité de matière (PLA+GN) égale à 50 mg avec  $W_{GN\text{initiale}} = 20\%$ ,  $V_{org} = 5$  mL (acétone)) **et par E-ES** (phase aqueuse  $V_{aq} = 10$  mL de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (10 g/L) non saturée en AcOEt, phase organique : quantité de matière (PLA+GN) égale à 50 mg avec  $W_{GN\text{initiale}} = 20\%$ ,  $V_{org} = 6$  mL ).

Procédé	Nanopréciipitation	E-ES
Distribution des tailles de particules <sup>a</sup> (Avant et après lavages)		
D[3,2] après lavages (nm)	143	96
D(0,5) après lavages (nm)	159	104
Span <sup>b</sup>	0,96	1,15
$\Gamma^c$ (mg de DexC <sub>6</sub> /m <sup>2</sup> )	2	2,5



<b>Masse de GN encapsulée<sup>f</sup> (mg/gPLA)</b>	32,9	49,4
<b>TE<sup>g</sup> (%)</b>	13,2	19,8
<b>W<sub>GN</sub> dans le cœur des NP<sup>h</sup> (%)</b>	3,2	4,7
<b>Tg<sub>Expérimentale</sub> des NP<sup>i</sup> (°C)</b>	47,7	47,8
<b>Tg<sub>calculée</sub> des NP<sup>j</sup> (°C)</b>	48,3	46,7

a et b: Déterminés à partir d'analyse granulométriques par le Mastersizer

c et f: Calculés à partir des spectres RMN <sup>1</sup>H des nanoparticules analysées (chapitre 2 .paragraphes 2.2.5.1 et 2.2.4.4)

d : Déterminés à partir des mesures de potentiel zêta par le Zetasizer. La procédure est détaillée dans le chapitre matériels et méthodes

e : Suivi de la stabilité colloïdale effectué par UV. La procédure est détaillée dans le chapitre matériels et méthodes

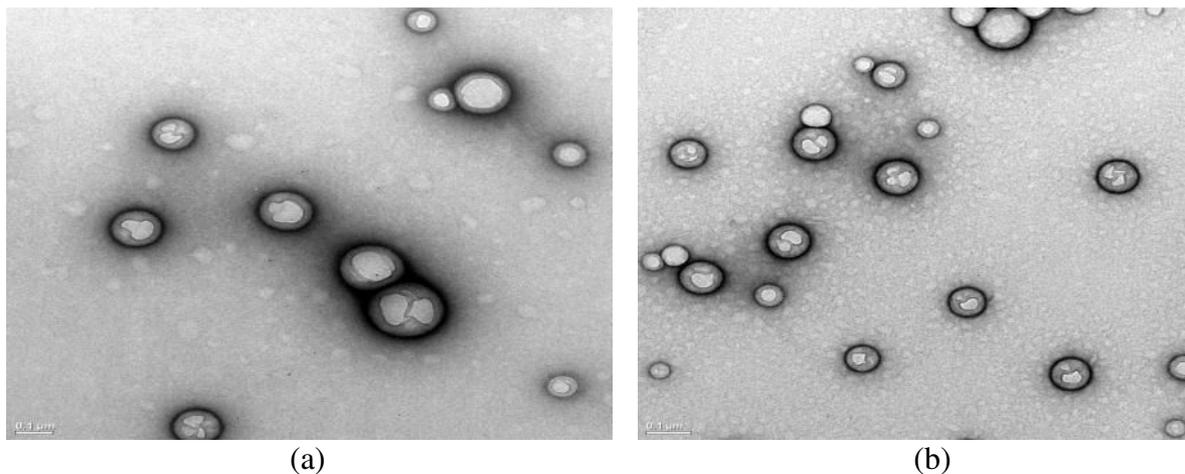
g : Taux d'encapsulation : calculé à partir du rapport entre la masse de GN encapsulée dans les nanoparticules et la masse introduite initialement dans la phase organique

h : Fraction massique du GN dans le cœur des nanoparticules élaborées

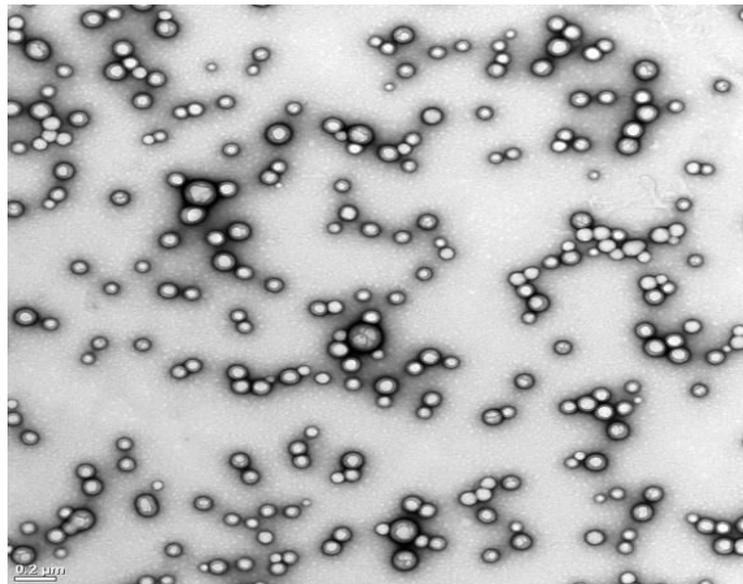
i : Tg des nanoparticules déterminée expérimentalement par MDSC

j : Tg des nanoparticules calculée avec l'équation de Fox.

La morphologie de ces particules a été étudiée par MET (Figure 119 et Figure 120). Les nanoparticules présentent des morphologies sphériques avec des dimensions comparables à celles déterminées par granulométrie laser.



**Figure 119: Micrographies MET des nanoparticules PLA/GN élaborées par nanoprécipitation avec une concentration en DexC<sub>6</sub>-18 en phase aqueuse égale à (a) 5g/L (b) 10g/L (Phase organique : 50 mg de (PLA+GN) avec  $W_{GN} = 20\%$ ,  $V_{org}=5$  mL d'acétone, phase aqueuse :  $V_{aq}= 10$  mL d'une solution de DexC<sub>6</sub>-18).**



**Figure 120: Micrographie MET des nanoparticules de PLA/GN élaborées par E-ES (phase aqueuse :  $V_{aq}= 10$  mL DexC<sub>6</sub> 10g/L non saturée en AcOEt, phase organique : quantité de matière (PLA+GN) égale à 50 mg avec  $W_{GN\text{ initiale}} = 20\%$ ,  $V_{org} = 6$  mL).**

## 5.4. Encapsulation des SA dans les microparticules

### 5.4.1. Microparticules élaborées par microfluidique (Emulsion-diffusion)

L'élaboration de microparticules PLA/SA par E-DS en utilisant la microfluidique dans l'étape d'émulsification a été mise en œuvre en se fondant sur les résultats obtenus dans le chapitre 4. Des microparticules de PLA/GO avec des tailles comprises entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  ont été élaborées en utilisant une phase aqueuse constituée d'une solution de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (5g/L) saturée en acétate d'éthyle et saturée ou non en GO. La phase organique utilisée est une solution dans l'acétate d'éthyle contenant un mélange PLA/GO avec des concentrations respectivement égales à 8 g/L et 2 g/L.

#### 5.4.1.1. Phase continue non saturée en GO

Dans cette partie nous avons utilisées les conditions opératoires définies dans le chapitre 4. Les débits des phases continue et dispersée ont été maintenus respectivement à 6 mL/h et 0,3 mL/h.

La phase aqueuse utilisée pour la diffusion de l'AcOEt et la solidification des gouttelettes est une solution saturée en GO, dans le cas où la phase dispersée contient le mélange GO/PLA. Nous avons opté pour l'utilisation d'une solution aqueuse saturée pour limiter la perte de GO par diffusion au cours de l'élaboration des microparticules.

**Tableau 55: Caractéristiques des microparticules de PLA et PLA/GO élaborées par microfluidique (E-DS) : D(3,2), TE(%) et masse de GO encapsulée par g de PLA (phase dispersée : Solvant = AcOEt,  $C_{\text{PLA}/\text{phase dispersée}} = 8 \text{ g/L}$ ,  $C_{\text{GO}/\text{phase dispersée}} = 2 \text{ g/L}$ ,  $Q_d = 0,3 \text{ mL/h}$ , phase continue : Solution de DexC<sub>6</sub> saturée en AcOEt,  $C_{\text{Dexc6}} = 5 \text{ g/L}$ ,  $Q_c = 6 \text{ mL/h}$ ).**

$W_{\text{GO}}^{\text{initiale}}$ (%)	$D[3,2]_{\text{Av.L}}^{\text{a}}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D[3,2]_{\text{Ap.L}}^{\text{a}}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D[3,2]_{\text{Ap.lyo}}^{\text{a}}$ ( $\mu\text{m}$ )	TE (%)	$m_{\text{GO}}$ encapsulée (mg/gPLA)	$W_{\text{GO}}$ dans le cœur des NP (%)
0	22,2	24,2	-	0	0	0
20	27,0	29,7	28,3	12,4	31,4	3

a : Diamètre moyen en surface mesuré = (Av.L) : avant lavages des particules, (Ap.L) : après lavages des particules, (Ap.lyo) : après lyophilisation

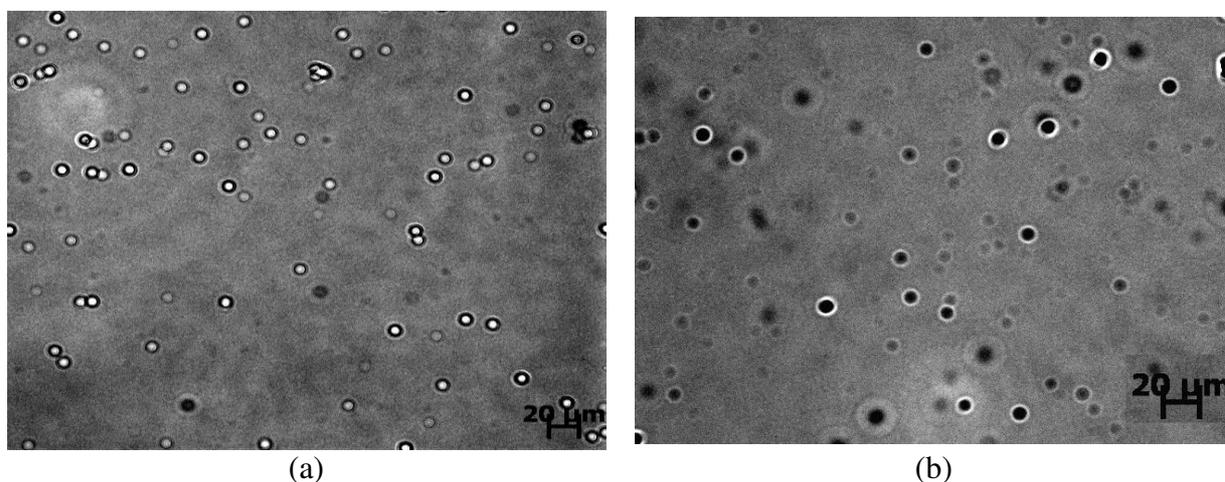
Les données du Tableau 55 permettent de comparer les caractéristiques des particules de PLA à celles des particules de PLA/GO. La présence du GO dans la phase dispersée ne perturbe pas la

formation des gouttelettes dans le microsysteme. Après diffusion du solvant, les microparticules de PLA/GO élaborées par microfluidique présentent des distributions de tailles comparables à celle des microparticules de PLA, avec un  $D[3,2]$  du même ordre de grandeur, que ce soit avant ou après lavages.

Le taux d'encapsulation est faible et peut s'expliquer comme précédemment par le partage du GO entre la phase organique et la phase aqueuse. Le rapport phase organique/phase aqueuse est très faible (0,05), d'où la dissolution d'une quantité importante de GO dans la phase aqueuse.

Contrairement aux nanoparticules, les microparticules se redispersent parfaitement après lyophilisation sans utilisation de cryoprotecteur.

La morphologie sphérique des microparticules obtenues a été confirmée par des observations au microscope optique des suspensions de microparticules de PLA/GO avant et après lavages (Figure 121). Les tailles des microparticules observées par microscope optique sont cohérentes avec celles obtenues par granulométrie laser.



**Figure 121: Observation des suspensions de microparticules de PLA/GO avec un microscope optique : (a) avant lavages (b) après lavages.**

#### **5.4.1.2. Phase continue saturée en GO**

Dans le but d'augmenter le taux de charge des microparticules en GO, nous avons renouvelé l'expérience précédente en saturant la phase continue en GO. Les conditions d'émulsifications (concentration de GO/PLA dans la phase dispersée, débit des phases continue et dispersée) sont identiques à celles précédemment utilisées.

En utilisant une phase continue contenant le DexC<sub>6-τ</sub> (5 g/L) et saturée en AcOEt et en GO, il a été impossible d'obtenir une émulsion dans le système microfluidique. Aucune formation de gouttelette n'a été observée (Figure 122).



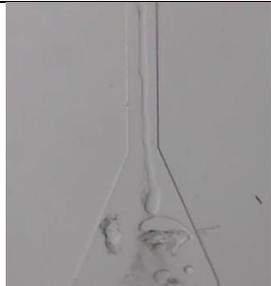
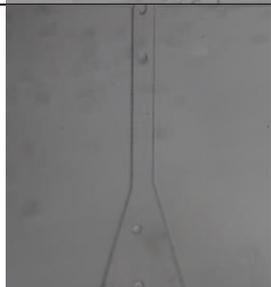
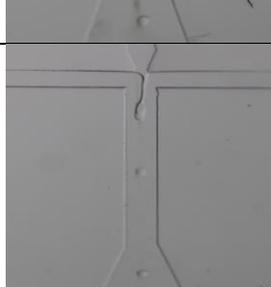
**Figure 122: Formation d'émulsion à l'intérieur du système microfluidique en utilisant une phase continue (a) non saturée en GO (b) saturée en GO** (phase dispersée : Solvant = AcOEt,  $C_{PLA/phase\ dispersée} = 8\text{ g/L}$ ,  $C_{GO/phase\ dispersée} = 2\text{ g/L}$ ,  $Q_d = 0,3\text{ mL/h}$ , phase continue :  $C_{Dexc6} = 5\text{ g/L}$ ,  $Q_c = 6\text{ mL/h}$ ).

La présence du GO dans la phase continue perturbe donc la formation de l'émulsion à l'intérieur du microsystème. Le fractionnement de la phase organique sous forme de gouttelettes ne semble plus possible dans les conditions utilisées (Figure 12-b). En conséquence, nous avons fait varier les conditions opératoires de façon à augmenter la contrainte de cisaillement à l'interface entre les deux phases.

Pour cela, nous avons augmenté le rapport  $R = Q_c/Q_d$ . Nous avons maintenu le débit de la phase continue égal à 6 mL/h et diminué le débit de la phase dispersée.

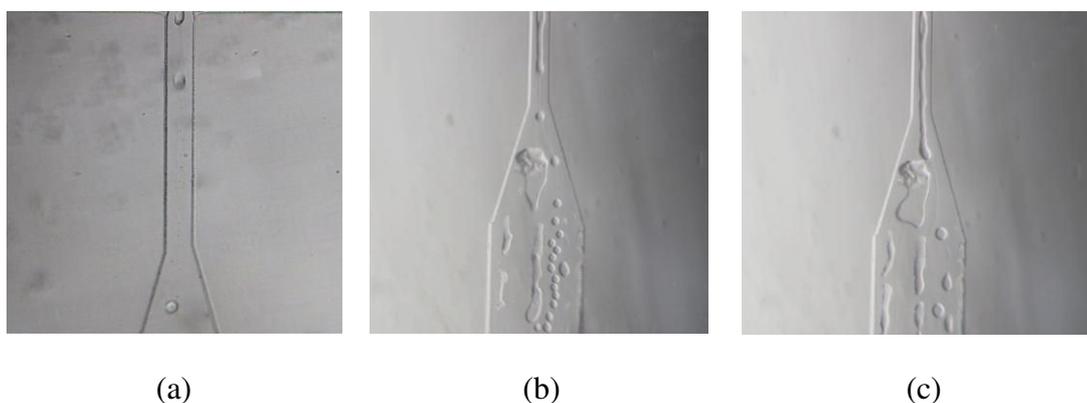
Les émulsions peuvent être formées à partir du rapport  $R = 60$  (Tableau 56). De plus, plus le rapport  $Q_c/Q_d$  ( $R$ ) est élevé, plus la taille des gouttelettes est faible. En augmentant  $R$  de 60 à 100, la taille des gouttelettes produites diminue de 102  $\mu\text{m}$  à 74  $\mu\text{m}$ . Ceci provient de l'augmentation de la contrainte de cisaillement à l'interface entre les deux phases liquides. A titre de comparaison, la taille des gouttelettes obtenues avec une phase continue non saturée en GO est de 86  $\mu\text{m}$  pour  $R = 20$  (chapitre 4 - paragraphe 4.6.2).

**Tableau 56: Influence de la variation de  $Q_d$  et  $R$  sur la formation des gouttelettes à l'intérieur du microsystème** (*phase dispersée : Solvant = AcOEt,  $C_{PLA/phase\ dispersée} = 8\text{ g/L}$ ,  $C_{GO/phase\ dispersée} = 2\text{ g/L}$ , phase continue :  $C_{Dexc6} = 5\text{ g/L}$ ,  $Q_c = 6\text{ mL/h}$* ).

$Q_d$ (mL/h)	$R = Q_c/Q_d$	Formation des gouttelettes dans le microsystème	Photo du microsystème lors de la formation des gouttelettes	Taille des gouttelettes ( $\mu\text{m}$ )
0,30	20	non		-
0,15	40	non		-
0,10	60	oui		102
0,08	75	oui		81
0,06	100	oui		74

Les conditions que nous avons retenues par la suite pour élaborer les microparticules de PLA/GO en utilisant une phase dispersée saturée en GO sont :  $Q_d = 0,1 \text{ mL/h}$ ,  $Q_c = 6 \text{ mL/h}$  soit  $R = 60$ . En effet, dans ces conditions, l'émulsification a parfaitement lieu à l'intérieur du microsystème et la quantité de particules élaborées par unité de temps reste élevée.

Cependant, nous avons observé qu'au bout de 3 à 4 heures, une déstabilisation de l'émulsion formée a lieu à l'intérieur du microsystème. Les gouttelettes coalescent entraînant la formation de trainées (Figure 123 (b) et (c)).



**Figure 123: Evolution de la formation des gouttelettes dans le microsystème lorsqu'une phase continue saturée en GO est utilisée (a) Formation des gouttelettes à l'intérieur du microsystème au début de la production (b) et (c) déstabilisation des gouttelettes (après 4 h de fonctionnement)** (*phase dispersée : Solvant = AcOEt,  $C_{PLA/phase\ dispersée} = 8 \text{ g/L}$ ,  $C_{GO/phase\ dispersée} = 2 \text{ g/L}$ ,  $Q_d = 0,1 \text{ mL/h}$ , phase continue :  $C_{Dexc6} = 5 \text{ g/L}$  dans une solution d'eau saturée en AcOEt et en GO,  $Q_c = 6 \text{ mL/h}$* ).

La présence du GO dans la phase continue a donc tendance à perturber le processus d'émulsification. L'augmentation de la contrainte de cisaillement à la jonction n'est pas suffisante pour assurer la formation de l'émulsion. Ce point mériterait certainement des approfondissements. Cependant, dans le cadre de ce travail de thèse, nous n'avons pas examiné plus loin l'utilisation d'une phase continue saturée en GO pour augmenter le taux de charge dans les microparticules.

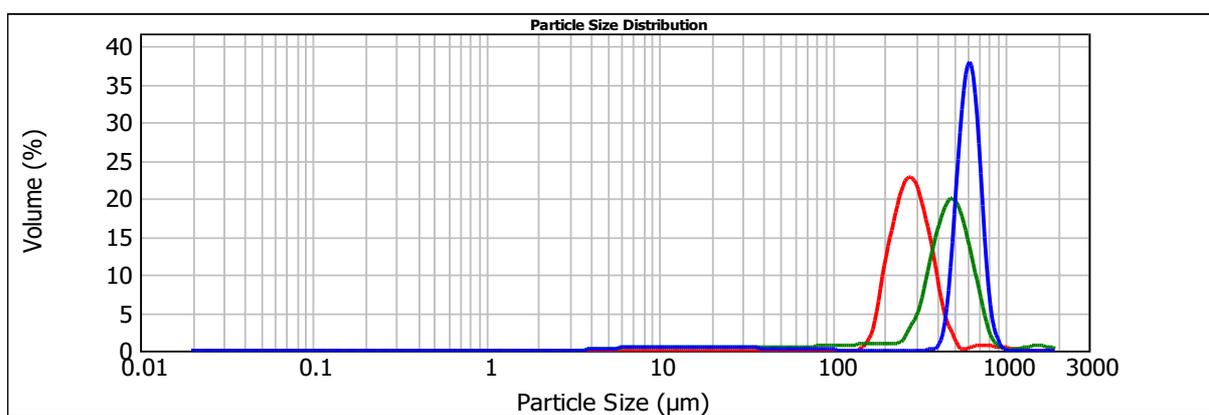
#### 5.4.2. Microparticules élaborées par Emulsion-Evaporation de solvant

Des microparticules de PLA de tailles égales à quelques centaines de micromètres (domaine  $n^{\circ}3$ ) ont été élaborées avec succès par E-ES avec une étape d'émulsification sous agitation magnétique (Cf. chapitre 3 - paragraphe 3.3.2.2.3). Dans cette partie, nous nous sommes

intéressés à l'encapsulation du GO et du GN dans ces microparticules à partir des conditions d'élaboration préalablement définies.

#### 5.4.2.1. Influence de la %W<sub>SA</sub> initiale dans la phase organique

Des microparticules de PLA/GO ont été préparées en utilisant des fractions massiques initiales en GO égales à 20% et 30%. La distribution en taille et les caractéristiques des microparticules obtenues sont présentées dans la Figure 124 et le Tableau 57.



**Figure 124: Distributions granulométriques des microparticules :** (-) %W<sub>GO</sub> = 0, (-) %W<sub>GO</sub> = 20, (-) %W<sub>GO</sub> = 30 (Vitesse d'agitation : 1000 rpm, temps d'agitation : 30 minutes, phase aqueuse : solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5 g/L) saturée en AcOEt de volume 4 mL, phase organique : PLA ou PLA/GO avec une quantité de matière totale = 200 mg dans 2 mL d'AcOEt).

Nous constatons que plus la %W<sub>GO</sub> initiale est élevée, plus la taille des microparticules obtenues augmente (Figure 124). En effet, le d(0,5) passe de 298 µm à 616,7 µm. Les taux d'encapsulation sont, dans tous les cas, très élevés (proches de 100%), comparativement à ceux obtenus avec les nanoparticules élaborées par E-ES (Tableau 57).

Ainsi que nous l'avons mentionné précédemment, la différence de taille et donc de surface spécifique des nano- et microparticules explique ce résultat. Dans le cas des microparticules, la quantité de SA encapsulée qui diffuse dans la phase aqueuse lors de l'élaboration des particules est proportionnellement beaucoup plus faible que dans le cas des nanoparticules, d'où une forte augmentation des taux d'encapsulation et des quantités de SA encapsulées.

**Tableau 57 : Influence de la fraction massique initiale en GO sur les caractéristiques des microparticules de PLA/GO** (Vitesse d'agitation : 1000 rpm, temps d'agitation : 30 minutes, phase aqueuse : solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5 g/L) saturée en AcOEt de volume 4 mL, phase organique : GO/PLA avec une quantité de matière totale = 200 mg dans 2 mL d'AcOEt).

$W_{GO}$ initiale (%)	$d(0,5)^a$ (µm)	$D[3,2]^a$ (µm)	Span <sup>a</sup>	Masse de SA encapsulée (mg/gPLA)	TE <sup>b</sup> (%)	$W_{GO}$ dans le cœur des particules <sup>c</sup> (%)	$T_g$ Experimentale des particules <sup>d</sup> (°C)	$T_g$ Théorique des particules <sup>e</sup> (°C)
0	298	280	1,29	0	0	0	52,0	52,9
20	469	149	1,09	237,5	95	19,2	32,4	33,3
30	616	185	0,40	380,0	91	27,5	24,1	24,6

- a : Déterminés après les étapes de lavages
- b : Taux d'encapsulation : calculé à partir du rapport entre la masse de GO encapsulée dans les particules et celle introduite initialement dans la phase organique
- c : Fraction massique du GO dans le cœur des particules élaborées
- d :  $T_g$  des particules déterminée expérimentalement par MDSC
- e :  $T_g$  des particules calculée avec l'équation de Fox (Tableau 37 et Eq. 29)

Les  $T_g$  des microparticules déterminées par MDSC sont en parfaite adéquation avec les valeurs calculées à partir de la relation de Fox. Les particules de PLA sont fortement plastifiées par le GO. Les quantités de SA qu'il est possible d'encapsuler dans les microparticules de PLA ne sont pas limitées par l'abaissement de la  $T_g$  du mélange SA/PLA, contrairement aux résultats que nous avons obtenus dans le cas des nanoparticules.

#### 5.4.2.2. Influence de la nature de la SA encapsulée

Nous avons ensuite comparé les résultats précédents à ceux obtenus en substituant le GO par le GN (Tableau 58). Tout comme les microparticules de PLA/GO, celles de PLA/GN présentent des Span après lavages qui sont proches de 1, témoignant ainsi de l'obtention d'une distribution de taille monomodale. Pour les deux SA, les TE (%) et les quantités encapsulées sont élevées et similaires.

La comparaison, entre les  $T_g$  des microparticules obtenues par MDSC et celles calculées, permet de montrer que le PLA est aussi bien plastifié par le GO que le GN. La relation de Fox permet d'estimer convenablement les  $T_g$  des particules dans les deux cas.

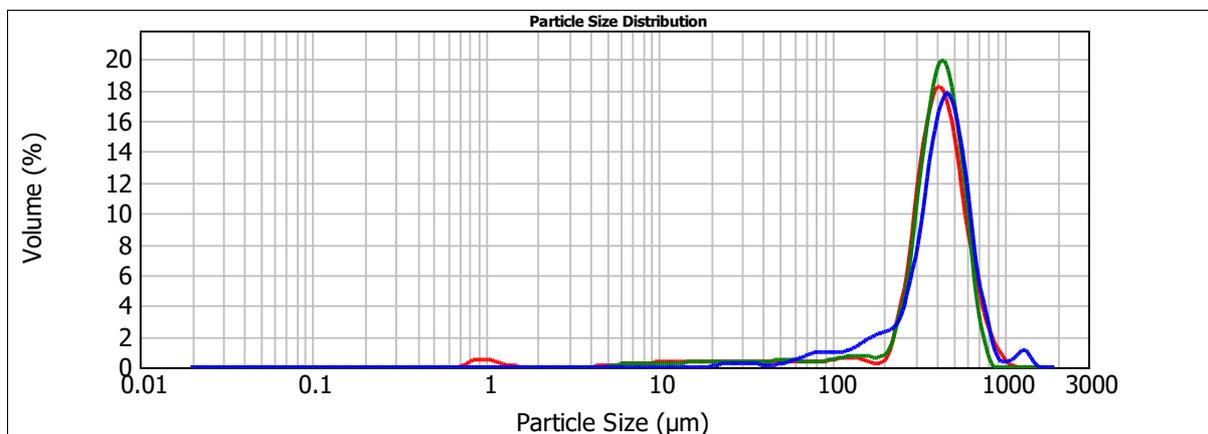
**Tableau 58: Influence de la nature de la SA sur les caractéristiques des microparticules de PLA/SA** (Vitesse d'agitation : 1000 rpm, temps d'agitation : 30 minutes, phase aqueuse : solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5 g/L) saturée en AcOEt de volume 4 mL, phase organique : PLA/SA avec une quantité de matière 200 mg,  $W_{SA} = 20\%$  dans 2 mL d'AcOEt)

SA	d(0,5) <sup>a</sup> (µm)	D[3,2] <sup>a</sup> (µm)	Span <sup>a</sup>	Masse de SA encapsulée (mg/gPLA)	TE <sup>b</sup> (%)	W <sub>SA</sub> dans le cœur des particules <sup>c</sup> (%)	T <sub>g</sub> Experimentale des particules <sup>d</sup> (°C)	T <sub>g</sub> Théorique des particules <sup>e</sup> (°C)
GO	469	149	1,09	237,5	95	19,2	32,4	33,3
GN	417	206	0,98	227,5	91	18,5	32,0	32,5

- a : Déterminés après les étapes de lavages  
 b : Taux d'encapsulation : calculée à partir du rapport entre la masse de la SA encapsulée dans les particules et celle introduite initialement dans la phase organique  
 c : Fraction massique de la SA dans le cœur des particules élaborées  
 d : T<sub>g</sub> des particules déterminée expérimentalement par MDSC  
 e : T<sub>g</sub> des particules calculée par l'équation de Fox

#### 5.4.2.3. Stabilité aux lavages et à la lyophilisation

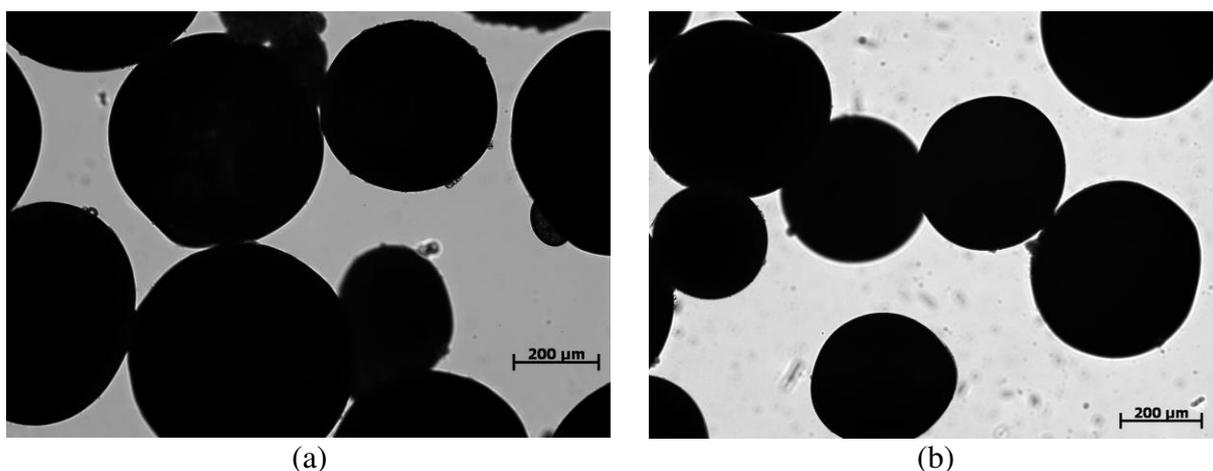
Les particules sont souvent conservées sous forme lyophilisée. Afin d'évaluer l'aptitude des particules à se redisperser après la lyophilisation, nous avons préparé un lot de microparticules PLA/GN avec  $\%W_{GN\text{ initiale}} = 20\%$ . Comme dans le cas des microparticules de PLA, nous avons comparé les distributions de tailles obtenues avant lavage des microparticules, après lavages ainsi qu'après lyophilisation sans ajout de cryoprotecteur (Figure 125). Comme dans le cas des microparticules de PLA, les microparticules de PLA/GN présentent une distribution monomodale même après lyophilisation. La présence de SA ne gêne donc pas la redispersion des particules, aussi bien après lavages qu'après lyophilisation.



**Figure 125: Distribution granulométrique des microparticules PLA/GN avec  $\% W_{GN\text{ initiale}} = 20\%$  : (–) avant lavages (–) après lavage (–) après lyophilisation** (vitesse d'agitation : 1000 rpm, temps d'agitation : 30 minutes, phase aqueuse : solution de DexC<sub>6</sub>-17 (5 g/L) saturée en AcOEt de volume 4 mL, phase organique : GN/PLA avec une quantité de matière 200 mg dans 2 mL d'AcOEt)

#### 5.4.2.4. Morphologie des microparticules

La caractérisation morphologique des microparticules de PLA/SA ( $\% W_{SA\text{ initiale}} = 20\%$ ) a été effectuée par microscopie optique (Figure 126 a et b). Les microparticules obtenues sont de morphologie sphérique. Les tailles des particules observées par microscope optique sont cohérentes avec les distributions de tailles obtenues par granulométrie laser.



**Figure 126 : Images de microscopie optique : (a) microparticules PLA/GO (b) microparticules PLA/GN avec un grossissement (x10)**

## **5.5. Libération du GO et du GN encapsulés**

### **5.5.1. Généralités**

Un système à libération contrôlée est défini comme une entité qui délivre une SA à une vitesse prédéterminée pendant un temps relativement long (au moins 12 heures). Il existe deux mécanismes fondamentaux de libération de SA à partir de vecteurs de types particules, la diffusion [11] de la SA à travers le matériau du vecteur ou bien la dégradation chimique du matériau du vecteur [12].

Pour des systèmes matriciels, la diffusion de la SA encapsulée implique sa libération vers le milieu extérieur. Cette libération peut être influencée non seulement par le mode d'immobilisation de la SA (soit dispersée de manière homogène dans la matrice, soit sous forme d'inclusions plus ou moins cristallines, soit adsorbée à la surface des particules) mais aussi par la porosité du matériau constituant le vecteur.

Les mécanismes impliquant une dégradation chimique correspondent le plus souvent à une hydrolyse par voie chimique ou enzymatique du polymère entraînant ainsi la libération de la SA encapsulée.

Il est à noter que de nombreux autres paramètres liés aux caractéristiques des particules peuvent influencer sur la cinétique de libération des SA encapsulées parmi lesquels nous pouvons citer la distribution de taille des particules, la nature du polymère, sa masse molaire, la solubilité de la SA dans la phase aqueuse...

### **5.5.2. Libération à partir des nanoparticules**

Les conditions de suivi de libération des SA seront présentées. Ensuite nous exposerons brièvement le modèle utilisé pour décrire la cinétique de libération. Enfin, nous examinerons les profils expérimentaux de libération des SA en fonction du procédé d'élaboration utilisé.

#### **5.5.2.1. Etude des mécanismes de libération**

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons étudié la libération du GO et GN à partir de particules utilisant le PLA comme matrice et stabilisées par du DexC<sub>6</sub>- $\tau$ .

Nous pouvons exclure l'hypothèse de l'encapsulation des SA par adsorption à la surface des particules. Nous avons montré que des particules de PLA stabilisées par du GO ne sont pas stables aux lavages. L'adsorption des SA ne permet pas d'assurer le maintien de la stabilité des particules de PLA formés car les molécules de SA sont éliminées au cours des lavages entraînant ainsi une agrégation irréversible des particules. Les particules de PLA/SA (avec  $3\% \leq W_{SA\text{ initiale}} \leq 30\%$ ) étudiées et qui sont stabilisées par du dextrane modifié se redispersent parfaitement après les lavages. Au cas où la SA était uniquement encapsulée par adsorption, elle serait nécessairement éliminée lors des lavages et les analyses RMN  $^1\text{H}$  de ces particules n'auraient pas montré des pics relatifs à la SA.

Pour suivre la libération dans les conditions les plus favorables, il faut opérer dans des conditions « sink », c'est-à-dire que la concentration de la SA dans le milieu de libération doit être inférieure au dixième de la limite de solubilité. En effet, le milieu dans lequel la libération a lieu, peut être un facteur limitant pour la libération de la SA. Cela peut se produire quand la SA y atteint sa concentration de saturation.

Nous faisons l'hypothèse que la libération de la SA hors des particules est cinétiquement limitée par la diffusion au sein du cœur des particules. Dans la littérature, plusieurs modèles sont utilisés pour décrire la libération de SA par diffusion dans différents systèmes particulaires. Dans notre cas, nous allons nous intéresser uniquement au modèle décrivant la diffusion de SA à travers une matrice polymère de morphologie sphérique. La loi de Fick est souvent utilisée pour décrire le mécanisme de transport et de diffusion d'un soluté (SA) à travers une matrice polymère.

Crank [13] a résolu les équations de diffusion dans différentes géométries de matrices notamment dans une matrice sphérique.

Pour une particule sphérique de rayon R, qui contient initialement l'espèce diffusante, la concentration C de celle-ci dans la sphère étant uniforme et la sphère étant placée dans un milieu qui ne contient pas cette espèce, la résolution de l'équation de Fick conduit à l'équation 4.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 6 \left( \frac{Dt}{R^2} \right)^{0,5} \left\{ \pi^{-0,5} + 2 \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \text{ierfc} \left( \frac{nR}{(Dt)^{0,5}} \right) \right\} - 3 \cdot \frac{Dt}{R^2} \quad \text{Eq. 32}$$

Avec

$M_t$  : la masse de SA libérée à un instant  $t$  (g)

$M_\infty$  : la masse de SA maximale libérable (g)

$D$  : Coefficient de diffusion ( $m^2/s$ )

$R$  : Rayon de la particule (m)

$t$  : temps (s)

Dans le cas où on se limite à une libération pendant laquelle la proportion de SA libérée ( $M_t/M_\infty$ ) est inférieure ou égale à 90%, l'équation précédente (Eq. 32) peut être simplifiée sous la forme de l'équation 5.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 6 \left( \frac{D.t}{\pi R^2} \right)^{0,5} - 3 \cdot \frac{D.t}{R^2} \quad \text{Eq. 33}$$

L'Eq. 33 permet d'obtenir la valeur des coefficients de diffusion. La solution générale peut également s'écrire sous la forme de l'équation 6 [13, 14].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left\{ - \frac{D.n^2.\pi^2.t}{R^2} \right\} \quad \text{Eq. 34}$$

Avec  $n$  : nombre entier naturel supérieur à 0 ;  $n=1,2,3\dots$ . Les autres symboles ont les mêmes significations que dans l'Eq. 4.

Les valeurs de  $M_t/M_\infty$  à différents temps sont accessibles expérimentalement. L'ajustement de ces données, avec les équations précédentes permet de vérifier la cohérence du modèle proposé avec les expériences et d'extraire la valeur du coefficient de diffusion de la SA dans le cœur des particules.

Cette démarche d'étude et d'analyse de la libération de SA à partir de systèmes matriciels est celle que l'on trouve dans beaucoup de travaux de la littérature et c'est celle que nous suivrons. Il faut cependant remarquer que ces équations supposent que le coefficient de diffusion est invariant. Compte tenu de l'effet plastifiant des SA, cette hypothèse pourrait ne pas être raisonnable car dans ces conditions le coefficient de diffusion peut varier de façon notable avec

la concentration en SA dans le cœur de la particule [15]. Ici, compte tenu que dans la quasi-totalité des expériences, la quantité initiale de SA n'excède pas 5 % en masse dans le cœur des nanoparticules, nous considérerons que cette approximation est acceptable et n'impacte pas de façon notable les résultats et les discussions.

Enfin, il faut noter que toutes ces équations incluent le « rayon des particules », ces dernières étant admises isométriques. En pratique et compte tenu de la polymétrie des suspensions de particules préparées, il est nécessaire de se fonder sur un diamètre moyen. Dans ce qui suit, nous avons utilisé le diamètre moyen en surface,  $D[3,2]$ .

### **5.5.2.2. Cinétiques de libération**

Les nanoparticules ont été obtenues soit par nanoprécipitation soit par E-ES. Dans cette partie, nous allons présenter les différentes cinétiques de libérations obtenues en fonction du procédé d'élaboration, pour les deux SA, le GO et le GN. Pour chaque procédé, nous avons étudié l'influence de la composition massique initiale en SA, la concentration initiale du dérivé amphiphile du dextrane et l'influence de la quantité de SA encapsulée. L'influence de la lyophilisation sur la cinétique de libération ainsi que la quantité de matière totale initialement introduite dans la phase organique ont été aussi évaluées. Les suivis de libération ont été réalisés par méthode indirecte en déterminant par RMN  $^1\text{H}$  la quantité de SA encore présente dans les nanoparticules après un temps donné. Les conditions expérimentales de suivi de libération sont décrites dans le paragraphe 2.2.6 du chapitre 2.

#### ***5.5.2.2.1. Nanoparticules élaborées par nanoprécipitation***

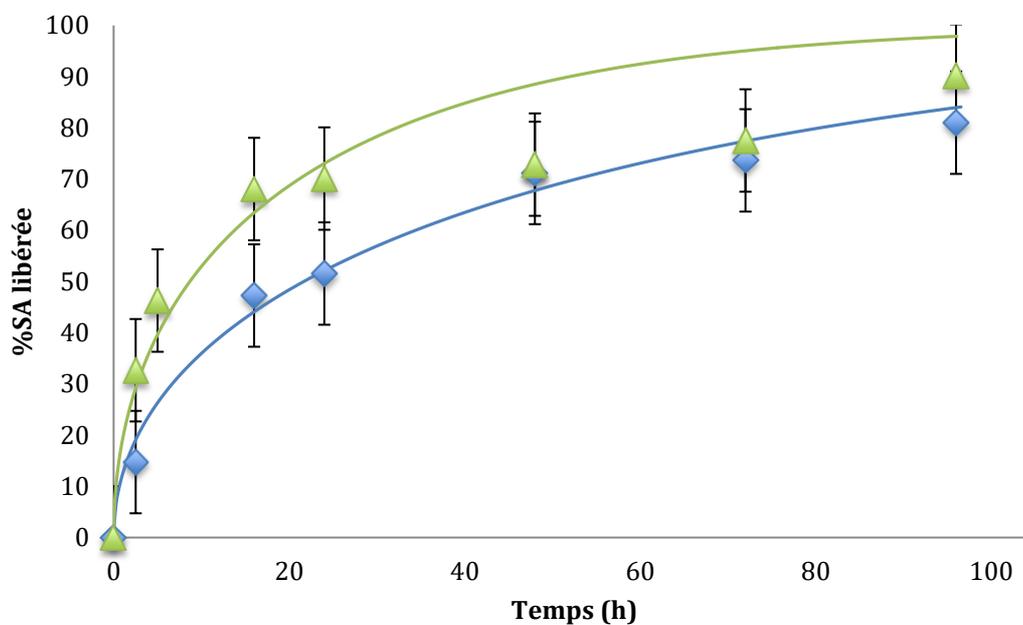
Nous avons en particulier étudié l'influence de la quantité de SA encapsulée ainsi que l'influence de la nature de la SA (Tableau 59, Figure 127 et Figure 128).

Les courbes expérimentales ne permettent pas de détecter un effet « burst ». Au contraire, dans tous les cas, la libération de la SA se fait de façon progressive. Cette observation est cohérente avec l'hypothèse d'une répartition uniforme de la SA au sein du cœur des particules et donc de l'absence d'une accumulation des SA en périphérie du cœur voire en surface des particules. Le fait que les mesures de Tg réalisées avec des nanoparticules ont toujours donné des résultats identiques à ceux des mélanges solides de même composition est un autre élément de confirmation de cette hypothèse.

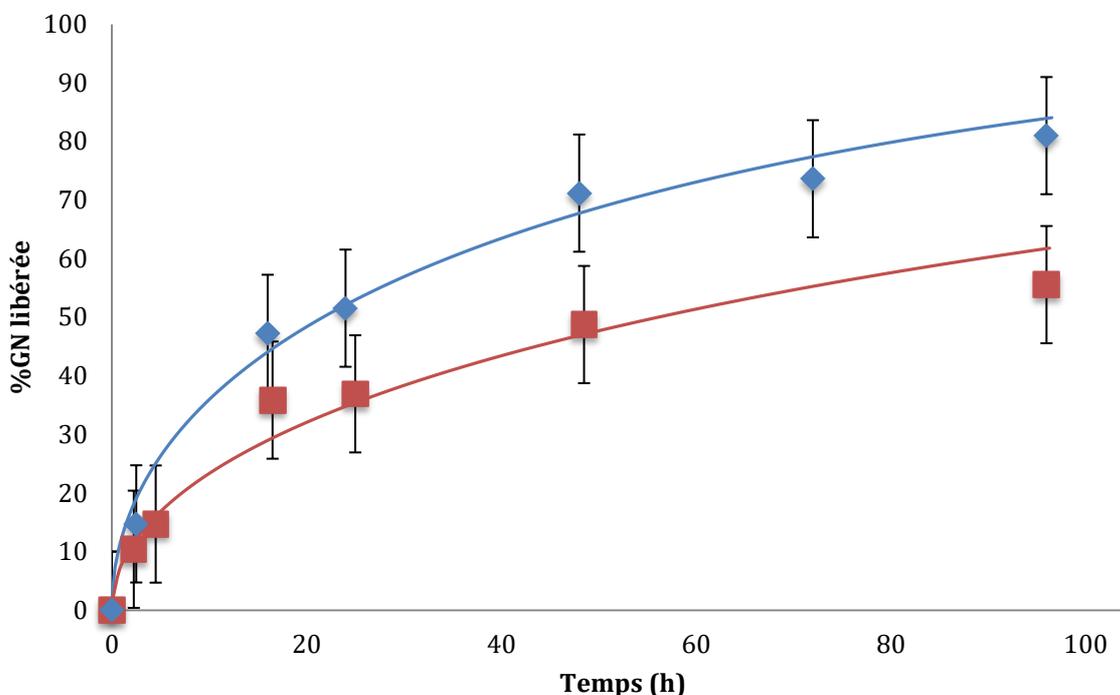
**Tableau 59: Caractéristiques des nanoparticules de PLA/SA élaborées par nanoprécipitation** (phase organique : 5 mL acétone, quantité de matière totale (PLA+SA) = 50 mg, phase aqueuse :  $V_{aq} = 10$  mL DexC<sub>6</sub>).

Formulation	SA	[DexC <sub>6</sub> - $\tau$ ] <sup>a</sup> (g/L)	W <sub>SA</sub> Initiale (%)	D[3,2] <sup>b</sup> (nm)	Masse de SA encapsulée (mg/gPLA)	W <sub>SA</sub> dans les particules (%)	D <sup>c</sup> (10 <sup>-21</sup> m <sup>2</sup> /s)
1 nano	GO	10	3	162	10,2	1,0	6,5
2 nano	GO	10	20	146	28,2	2,7	5,2
3 nano	GN	10	3	123	5,1	0,5	2,1
4 nano	GN	10	20	143	32,0	3,1	2
5 nano	GN	5	20	139	57,4	5,4	0,7

- a : Concentration en DexC<sub>6</sub>- $\tau$  dans 10 mL d'eau
- b : Diamètre moyen en surface mesuré après lavages des particules
- c : Coefficient de diffusion de la SA encapsulée à travers la matrice PLA déterminé à partir de l'Eq. 33



**Figure 127: Profils de libération de GO et GN encapsulés dans les nanoparticules de PLA, à taux de charge en SA équivalents (▲) Formulation 2 nano (GO) (◆) Formulation 4 nano (GN).**



**Figure 128: Profils de libération de GN encapsulé dans les nanoparticules de PLA à différents taux de charge en GN (◆) Formulation 4nano (■) Formulation 5nano.**

L'utilisation du modèle décrit précédemment permet de décrire correctement les points expérimentaux. Les valeurs trouvées pour les coefficients de diffusion sont toutes du même ordre de grandeur même si des variations peuvent être décelées (Tableau 59). D'une manière générale, on observe que les coefficients de diffusion trouvés pour le GO sont plus élevés que ceux trouvés pour le GN.

La littérature comporte peu d'exemples que l'on puisse comparer à nos résultats à la fois en termes de tailles de particules, de procédé de préparation et de conditions de libération. Chorny et al. [16] ont étudié l'encapsulation et la libération du Tyrphostin AG-1295 ( $M_{\text{Tyrphostin AG-1295}} = 234,3 \text{ g/mol}$ ) à partir de nanoparticules de poly(D,L-lactide) élaborées par nanopréciipitation et ayant des diamètres d'environ 170 nm. La libération de la SA est effectuée dans une solution aqueuse de Pluronic F68 (6 %). Le coefficient de diffusion déterminé est de l'ordre de  $2 \times 10^{-20} \text{ m}^2/\text{s}$ . Cette valeur est entre 3 et 10 fois supérieure aux valeurs que nous avons obtenues dans nos différents essais. Plusieurs raisons peuvent expliquer la différence observée : la distribution des tailles de particules (non indiquée), le milieu de libération (qui contient un tensioactif non ionique), la nature chimique de la SA.

**5.5.2.2. Nanoparticules élaborées par E-ES**

Comme précédemment, nous avons en particulier étudié l'influence de la quantité de SA encapsulée et de la nature de la SA sur les cinétiques de libération (Tableau 60).

**Tableau 60 : Caractéristiques des nanoparticules de PLA/SA formulées par E-ES**  
(Concentration de la phase aqueuse en DexC<sub>6</sub>- $\tau$ =10 g/L).

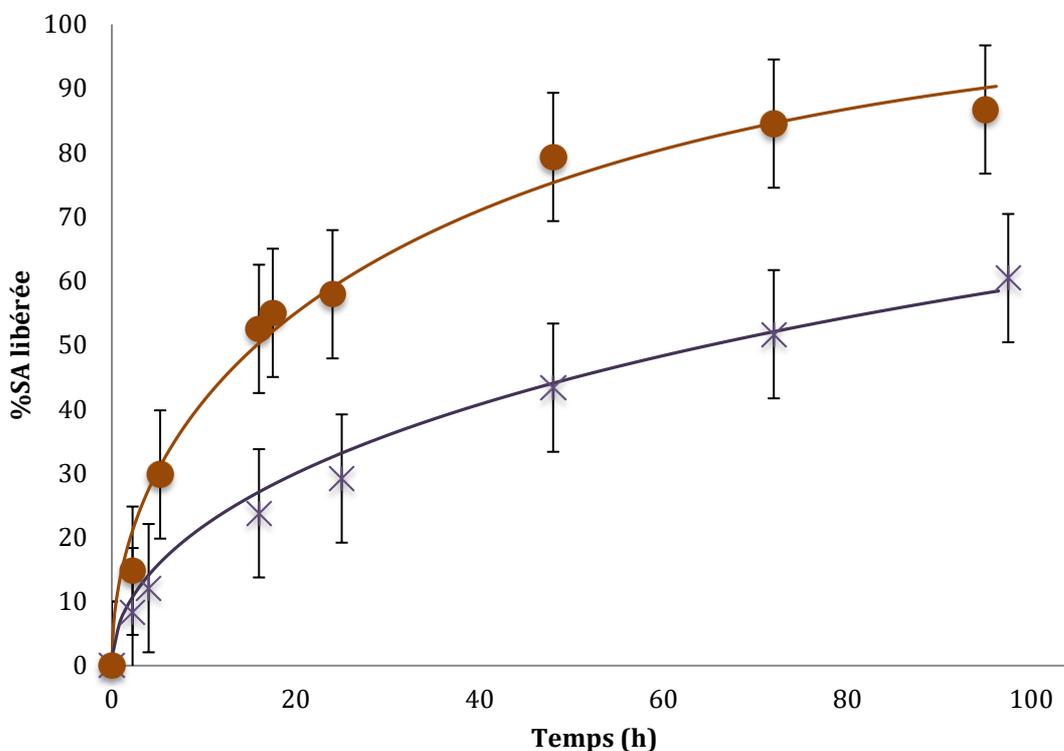
Formulation	SA	Quantité de matière totale <sup>a</sup> (mg)	W <sub>SA</sub> Initiale (%)	D[3,2] <sup>b</sup> (nm)	Masse SA encapsulée (mg/gPLA)	W <sub>SA</sub> dans les particules (%)	D <sup>c</sup> (10 <sup>-21</sup> m <sup>2</sup> /s)
1-EES	GO	200	3	116	21,6	2,1	1,6
2-EES	GO	200	20	119	99,0	9,0	2,5
3-EES	GO	50	20	91	43,0	4,1	1,1
4-EES	GN	200	3	109	16,9	1,7	0,1
5-EES	GN	50	20	96	52,3	4,9	0,3

a : Masse totale de PLA+SA dans la phase organique initiale

b : Diamètre moyen en surface mesuré après lavages des particules

c : Coefficient de diffusion de la SA encapsulée à travers la matrice PLA déterminé à partir de l'Eq. 33

Dans tous les cas, le modèle de diffusion présenté dans l'Eq.10 décrit bien les expériences de cinétiques de libération. Ces résultats confirment que la libération du GO et du GN encapsulés est convenablement décrite par un processus diffusionnel. Cette fois encore la diffusion du GO est plus rapide que celle du GN (Figure 129). De la même façon qu'avec les nanoparticules préparées par nanopréciipitation, aucun effet « burst » n'est détecté.



**Figure 129: Comparaison entre la cinétique de libération du GO et du GN à partir des nanoparticules élaborées par E-ES en fonction du temps : (●) Formulation 3-EES (GO) (\* ) Formulation 5-EES (GN).**

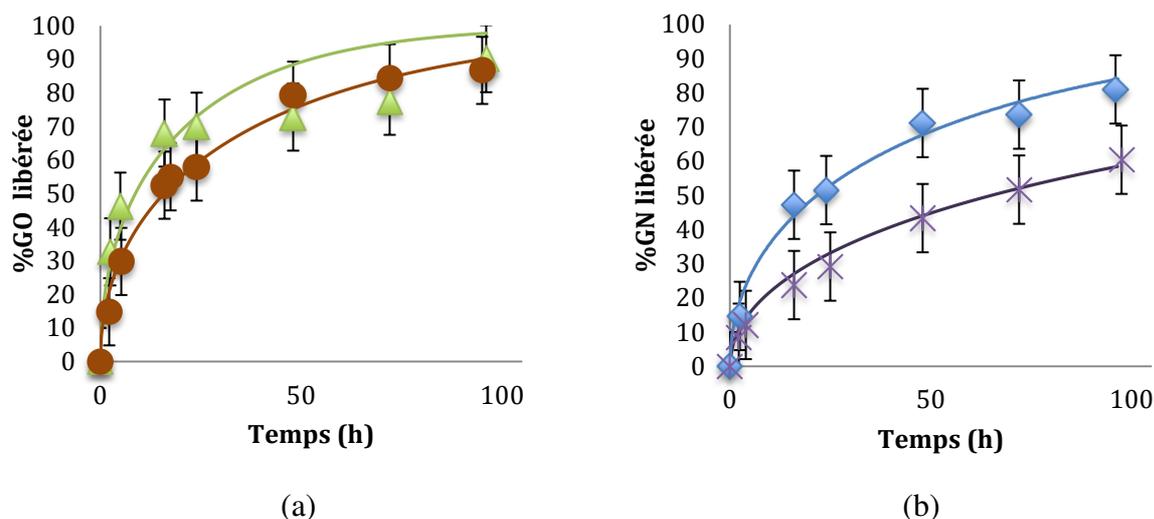
En comparant les coefficients de diffusion des SA encapsulées dans les nanoparticules préparées par nanopréciptation à ceux des SA encapsulées dans les nanoparticules préparées par E-ES, on observe que la libération de SA est plus rapide dans le premier cas que dans le second cas.

Le Tableau 61 présente une comparaison entre les différents coefficients de diffusion obtenus pour des nanoparticules préparées par nanopréciptation ou E-ES, à partir des mêmes compositions de phase aqueuse et organique.

**Tableau 61 : Comparaison des différents coefficients de diffusion obtenus pour le GO et le GN en fonction du procédé d'élaboration des nanoparticules.**

SA	Formulation	Procédé	D ( $10^{-21} \text{ m}^2/\text{s}$ )
GO	2-nano	Nanoprécipitation	5,2
	3-EES	E-ES	1,1
GN	4-nano	Nanoprécipitation	2
	5-EES	E-ES	0,3

Les profils de libération du GO et du GN correspondants sont présentés dans la Figure 130.



**Figure 130: (a) Comparaison entre les différentes cinétiques de libération du GO à partir des nanoparticules de PLA recouvertes de DexC<sub>6</sub>-τ élaborées par : (▲) Nanoprécipitation : Formulation 2-nano (●) E-ES : Formulation 3-EES (b) Comparaison entre les différentes cinétiques de libération du GN à partir des nanoparticules de PLA recouvertes de DexC<sub>6</sub>-τ élaborées par (◆) Nanoprécipitation Formulation 4-nano (\*) E-ES : Formulation 5-EES.**

Actuellement, sauf, omission de notre part, aucune comparaison entre les caractéristiques de suivi de cinétiques de libération de la même SA à partir de nanoparticules élaborées par nanoprécipitation et E-ES en utilisant la même matrice polymère (PLA) et le même stabilisant (polysaccharide modifié) n'est disponible dans la littérature. Cette différence peut être attribuée à une différence de porosité entre les particules obtenues par les deux procédés. En effet, une structure poreuse accélère la libération des SA encapsulées [11]. L'hypothèse qui peut être émise revient à supposer que les nanoparticules élaborées par nanoprécipitation sont plus poreuses que celle préparées par E-ES.

Au cours de ces travaux nous n'avons pas été en mesure d'évaluer la porosité des nanoparticules élaborées. Polkovic et al. [17] ont rapporté que des essais d'évaluation de la porosité des nanoparticules de Poly (D,L- lactide) (200-800 nm) élaborées par E-ES n'ont pas été concluantes. Aucun volume de nanopore n'a été détecté par sorption de l'azote liquide en utilisant la méthode BET. Dans notre cas, les nanoparticules élaborées par E-ES libèrent moins rapidement les SA encapsulées ceci peut donc être expliqué par une structure non poreuse de ces nanoparticules. Nous n'avons pas d'information nous permettant de prouver nos hypothèses sur

la porosité des nanoparticules préparées par nanoprécipitation. Il s'agit d'un point qui mérite davantage d'études expérimentales pour être clarifié.

Nous avons comparé nos résultats à ceux disponibles dans la littérature, dans le cas de nanoparticules de PLA/SA préparées par E-ES (Tableau 62).

**Tableau 62 : Comparaison des coefficients de diffusion du GN et du GO calculés avec des valeurs rapportées dans la littérature pour des cinétiques de libération à partir de nanoparticules PLA/SA préparées par E-ES.**

Polymère <sup>a</sup>	SA <sup>b</sup>	M <sub>SA</sub> (g/mol) <sup>c</sup>	Taille des particules (nm) <sup>d</sup>	D (m <sup>2</sup> /s) <sup>e</sup>	Réf.
PLA	Halopéridol	375	220	5,1.10 <sup>-23</sup>	[18]
PLA	GN	296,36	96	3,0.10 <sup>-22</sup>	Tableau 60
PLA	GO	282,33	116	1,6.10 <sup>-21</sup>	Tableau 60
PLA	Lidocaine	234,30	205	7,7.10 <sup>-20</sup>	[8]
PLA	Lidocaine	234,30	225	5,2.10 <sup>-20</sup>	[17]
PLA	4-nitroanisole	153,14	511	4,9.10 <sup>-19</sup>	[19]

<sup>a</sup> : Matrice polymère constituant le cœur des nanoparticules élaborées

<sup>b</sup> : SA encapsulée dans les nanoparticules élaborées par E-ES

<sup>c</sup> : Masse molaire de la SA encapsulée (g/mol)

<sup>d</sup> : Diamètre des nanoparticules étudiées

<sup>e</sup> : Coefficient de diffusion de la SA encapsulée à travers la matrice PLA

Nous pouvons constater que les valeurs trouvées dans ce travail sont globalement cohérentes avec les valeurs disponibles qui sont comprises entre 5,1.10<sup>-23</sup> et 4,9.10<sup>-19</sup> m<sup>2</sup>/s et sont relatives à des SA de structures chimiques assez distinctes (Tableau 62). Les différences de structure chimique des SA, les distributions de tailles de particules et le choix des rayons moyens utilisés dans les équations peuvent expliquer une partie des différences observées.

### 5.5.3. Libération des SA à partir des microparticules préparées par E-ES avec émulsification par agitation magnétique

En utilisant le coefficient de diffusion obtenu pour des nanoparticules de PLA/GN, et en faisant l'hypothèse que le PLA n'est pas dégradé sur la durée de la libération, on peut estimer le temps nécessaire à la libération de 50% du GN encapsulée dans des microparticules de 500 μm

de diamètre. Compte tenu de la faible surface spécifique de ces microparticules, la durée calculée est de  $10^{25}$  années.

Expérimentalement, nous avons essayé de détecter la libération du GN à partir de microparticules de PLA/GN dans de l'eau MilliQ pendant 20 jours. Il s'est avéré qu'aucune libération de SA n'a été observée pendant toute la durée du suivi. Donc, dans ces conditions (qui étaient celles utilisées pour le suivi de libération à partir des nanoparticules), aucune dégradation significative du PLA ne survient et la libération de la SA reste contrôlée par la diffusion. Comme la surface spécifique des microparticules préparées par E-ES avec émulsification par agitation magnétique est environ 2500 fois plus faible que celle des nanoparticules, la libération est infiniment lente. [18].

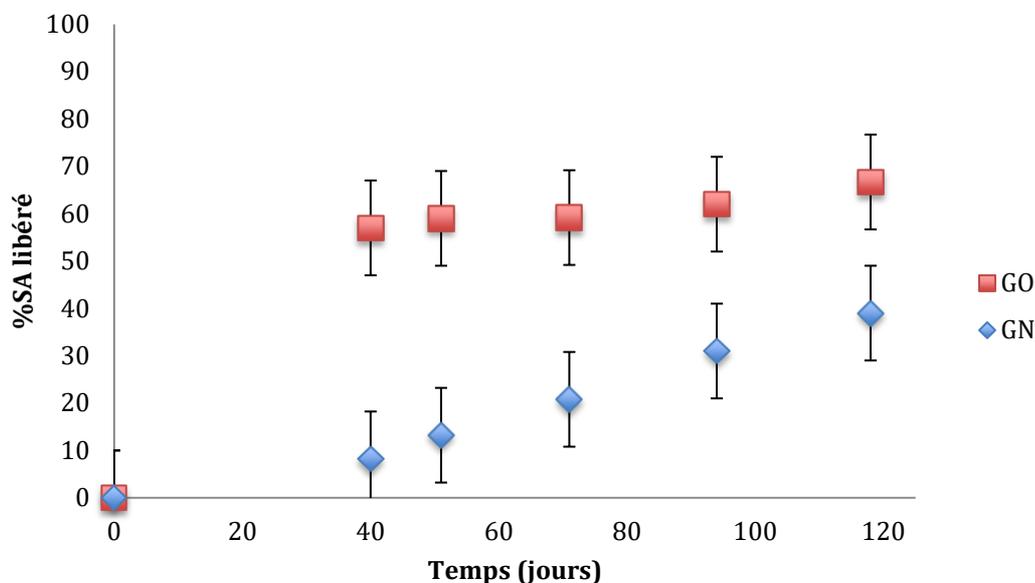
D'après la littérature [20-22], plusieurs facteurs peuvent modifier la vitesse de libération de SA encapsulées dans une matrice de PLA ou de PLGA. Parmi ces facteurs nous pouvons citer la température du milieu de libération [23], la cristallinité plus ou moins élevée du polymère [24, 25], la masse molaire du polymère [26, 27], ou encore le pH du milieu extérieur [28, 29]. La plupart de ces paramètres modifient les interactions entre la SA et la matrice polymère ou la cinétique de dégradation du polymère permettant ainsi d'accélérer ou de ralentir la libération.

Les particules élaborées et au cours de ce travail sont destinées à des applications pour le traitement des milieux aquatiques. Le pH des étangs est habituellement compris entre 8 et 9 [30].

Le suivi de la libération à partir de ces microparticules a été effectué dans un milieu tamponné (Tris/HCl, pH 8,6, 0,1 mol/L). La procédure de suivi de la cinétique de libération est décrite dans le chapitre 2 - paragraphe 2.2.6.2. La libération a été suivie pendant 4 mois.

La Figure 131 représente les cinétiques de libération obtenues pour le GO et le GN encapsulés dans des microparticules de PLA préparées par E-ES avec émulsification par agitation magnétique.

Les microparticules de PLA/GN ( $\%W_{GN\text{initiale}} = 20\%$ ) et PLA/GO ( $\%W_{GO\text{initiale}} = 20\%$ ) utilisées pour ces expériences de suivi de libération sont décrites dans le Tableau 60 du paragraphe 5.4.2.2.



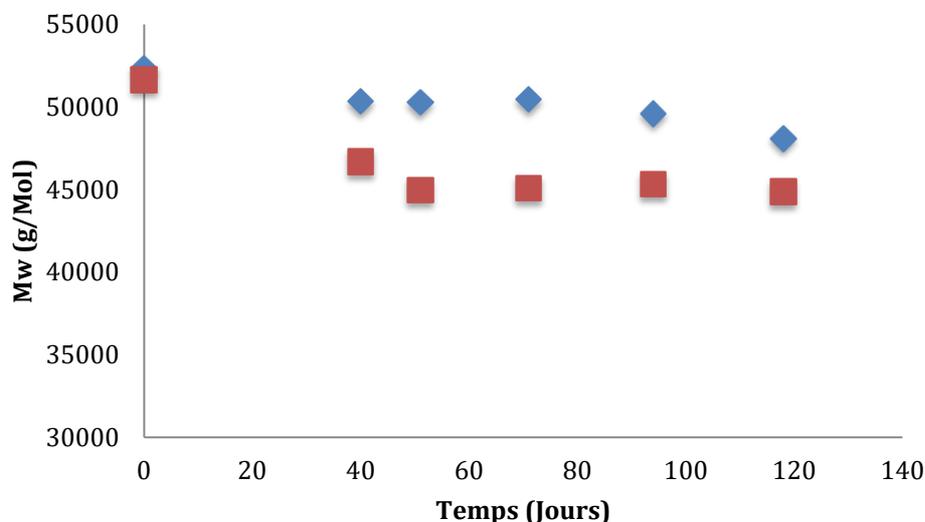
**Figure 131: Cinétiques de libération du GO (■) et du GN (◆) à partir des microparticules de PLA/SA élaborées par E-ES: Emulsification par agitation magnétique avec  $W_{SA}=20\%$  dans la phase organique (2 mL d'acétate d'éthyle avec une quantité de matière totale égale 100 mg), la phase aqueuse ( $V = 4$  mL) est une solution de DexC<sub>6-17</sub> saturée en acétate d'éthyle).**

Les deux SA se libèrent hors des microparticules sur des intervalles de temps infiniment plus courts que ceux calculés en ne tenant compte que du phénomène de diffusion (Figure 131). Comme dans le cas des nanoparticules obtenues par nanopréciipitation et par E-ES, le GO se libère plus rapidement que le GN.

Selon la littérature, deux raisons peuvent expliquer l'accélération de la libération des SA à pH = 8,6 en comparaison des expériences réalisées dans de l'eau milli-Q : la dégradation (hydrolyse) de la matrice PLA et/ou le gonflement du PLA. Pour tenter d'expliquer les résultats obtenus, nous avons tenté de mettre en évidence chacun de ces deux phénomènes.

### 5.5.3.1. Suivi de la dégradation du PLA

Le suivi de la dégradation du PLA a été effectué par SEC/MALLS. Les résultats obtenus montrent qu'une faible diminution de la masse molaire moyenne du PLA a lieu au cours des 4 mois de suivi (Figure 132). La dégradation du PLA est plus prononcée dans les particules PLA/GO que dans les particules PLA/GN. Ceci pourrait être attribué au caractère plus hydrophobe du GN qui le rend moins efficace pour faciliter la diffusion de l'eau dans la matrice PLA.



**Figure 132 : Variation de la  $\bar{M}_{wPLA}$  des microparticules (■) PLA/GO (◆) PLA/GN en fonction du temps. La  $\bar{M}_{wPLA}$  a été déterminée par SEC en analysant les différentes microparticules utilisées lors du suivi de la cinétique de libération (Cf.4.2).**

On observe que la masse molaire moyenne en masse ( $\bar{M}_w$ ) du PLA diminue au cours du temps, ce qui confirme l'hydrolyse du PLA. Toutefois, l'hydrolyse est relativement limitée car les masses molaires du PLA ne sont pas diminuées de façon très marquée (15 % au maximum).

Grandfils et al. [31] ont suivi pendant 30 jours la dégradation des microparticules de élaborées à partir de Poly(D,L-lactide) ayant une faible masse molaire R104 ( $\bar{M}_{nR104}=3500$  g/mol), une masse molaire élevée R206 ( $\bar{M}_{nR206}= 65000$  g/mol) ou à partir de différents mélanges massiques des deux polymères. La dégradation a été suivie pour des particules ayant des tailles entre 100 et 160  $\mu\text{m}$ . Le milieu utilisé pour le suivi de la dégradation des microparticules est une solution de tampon phosphate (0,2M à pH=7,4) contenant du Tween 80 (0,1% w/v) et du  $\text{NaN}_3$  (0,02%w/v) respectivement pour faciliter la diffusion de l'eau et pour éviter le développement bactérien. Le suivi de la dégradation a montré que les microparticules élaborées avec le PLA (R206) subissent une dégradation limitée : une diminution de 21% de la masse molaire moyenne en nombre du PLA des microparticules au bout de 30 jours, diminution que les auteurs considèrent comme non significative. La dégradation du PLA de plus faible masse molaire (R104) est plus rapide : une diminution d'environ 60% en masse molaire moyenne en nombre est observée au bout de 30 jours de suivi.

En se basant sur ces données, nous pouvons considérer la diminution de la masse molaire moyenne du PLA (13% et 7% respectivement pour le PLA constituant la matrice des microparticules PLA/GO et PLA/GN), suivie pendant 4 mois, comme peu significative. La

dégradation du PLA n'est certainement pas le seul phénomène responsable de la libération rapide des SA hors des microparticules.

### 5.5.3.2. Mise en évidence du gonflement des microparticules

Suite à ces résultats, nous nous sommes alors intéressés au phénomène de gonflement de la matrice PLA. Dans la littérature, le gonflement de la matrice PLA sous l'effet du pH a été mis en évidence [32, 33]. Ce gonflement est attribué à la dissociation des groupements acides carboxyliques terminaux du PLA dans ces milieux conduisant à la formation d'anions carboxylates. La formation de ces anions carboxylates provoque le gonflement des particules de PLA.

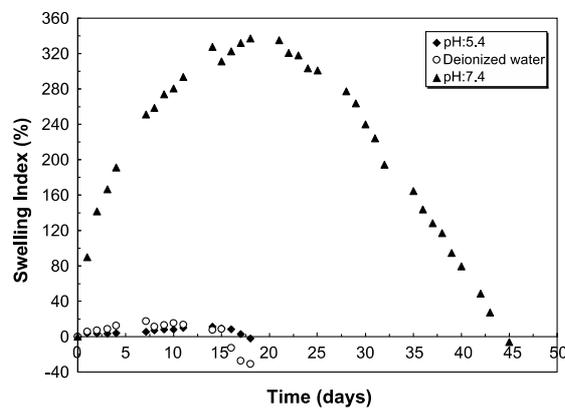
L'indice de gonflement (SI) peut être calculé à partir de l'Eq. 35.

$$SI = \left( \frac{m_e - m_0}{m_0} \right) \cdot 100 \quad \text{Eq. 35}$$

Avec  $m_e$  : Masse de l'échantillon étudié à l'instant  $t$

$m_0$  : Masse initiale de l'échantillon étudié

Cet indice de gonflement est facilement accessible à l'expérience lorsque l'échantillon suivi présente des dimensions assez grandes. Proikakis et al. [33] ont suivi l'indice de gonflement de tablettes cylindriques de poly(D,L-lactide) ayant un diamètre de 10 mm et une épaisseur de 3 mm. Ils ont montré que le pH a une grande influence sur l'indice de gonflement (Figure 133).



**Figure 133 : Evolution du SI(%) en fonction de temps pour des cylindres de poly(D,L-lactide) à 37°C dans un milieu tamponné à pH = 5,4 (◆), dans l'eau distillée (○) et dans un milieu tamponné à pH = 7,4 (▲) [32]**

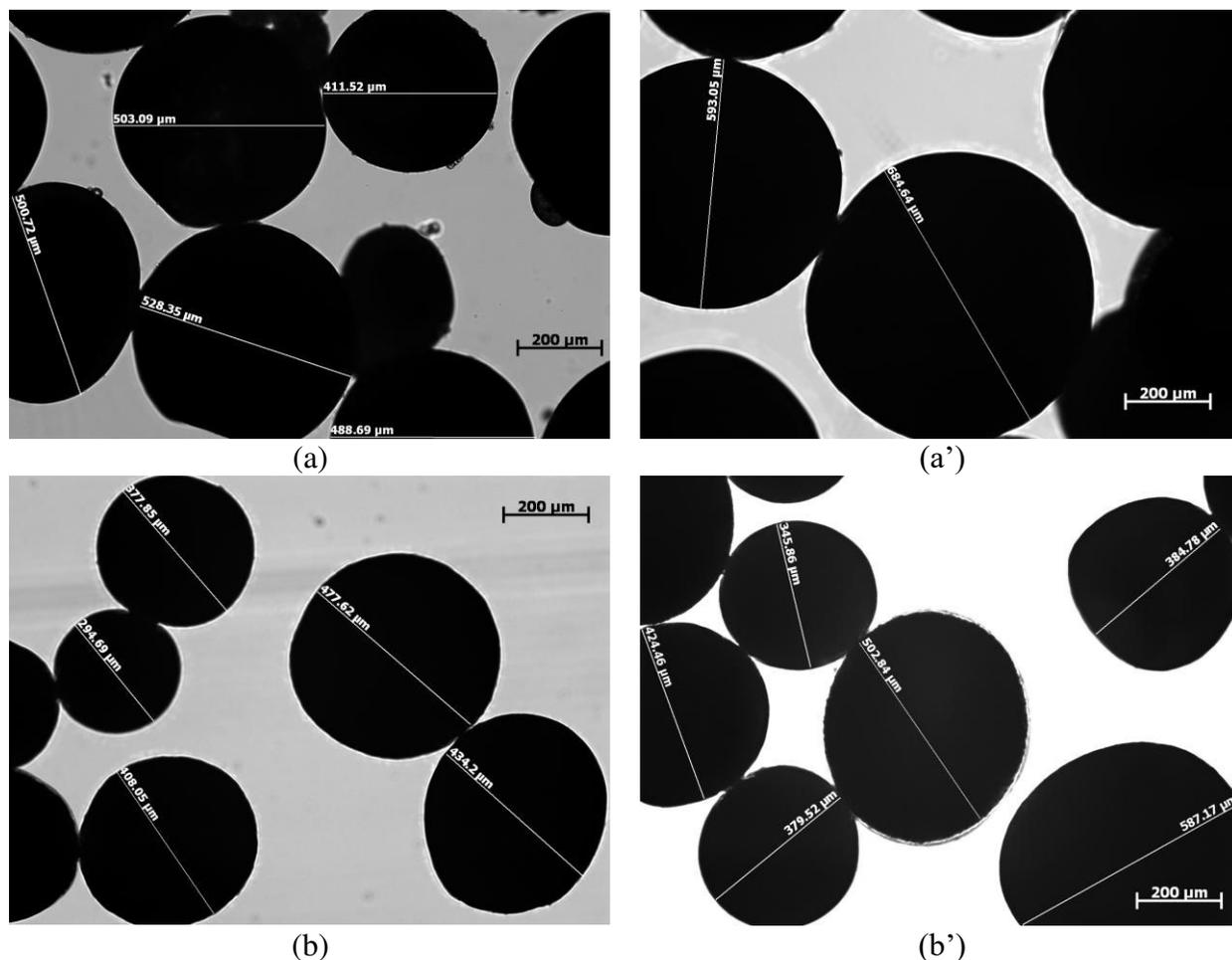
A 37°C et en augmentant le pH du milieu, le gonflement devient très prononcé. Le SI (%) atteint les 340% après 20 jours dans un milieu ayant un pH égal à 7,4 puis le gonflement commence à diminuer. Cette diminution provient d'une dégradation du PLA qui fait que la masse des cylindres diminue au cours du temps. Pour ces expériences, la  $\bar{M}_n$  du PLA utilisé est très faible et est égale à 2550 g/mol ( $\bar{D} = 1,87$ ).

Dans notre cas, la libération du GO et GN a été réalisée à pH 8,6, c'est à dire dans des conditions ou un phénomène de gonflement, même limité (du fait de la masse molaire du PLA utilisé), peut intervenir.

La détermination exacte du SI (%) est assez délicate. En effet, la masse des microparticules que nous avons utilisée pour le suivi de la libération est assez faible (20 mg par aliquot). Des pertes, lors des lavages des particules, peuvent ainsi avoir lieu et fausser les résultats. Nous avons alors eu recours à la microscopie optique pour comparer visuellement les tailles des particules (Figure 134).

En comparant les micrographies (a) et (a') des microparticules PLA/GO et (b) et (b') relatives aux microparticules, PLA/GN nous avons pu observer dans les deux cas une augmentation de la taille des particules après 3 mois.

Il est à noter que le gonflement est plus prononcé dans le cas des particules PLA/GO que dans le cas des particules PLA/GN. D'un coté, les tailles des microparticules de PLA/GO passent d'une taille moyenne estimée à 500  $\mu\text{m}$  (à partir des images prises par microscope en calculant la moyenne des diamètres d'une quinzaine de microparticules) à une taille moyenne, après 3 mois de suivi, égale à 650  $\mu\text{m}$ . D'un autre coté les tailles des microparticules de PLA/GN passent d'une taille moyenne estimée à 400  $\mu\text{m}$  à une taille moyenne égale à 480  $\mu\text{m}$ . Le caractère plus hydrophobe du GN pourrait justifier un gonflement plus faible. Ce gonflement plus faible est cohérent avec une dégradation moins importante des chaînes de PLA.



**Figure 134 : Images prises par le microscope optique pour différents lots de MP (a) MP PLA /GO ( $W_{GO\ Initial} = 20\%$ ) à  $t_0$  (a') MP PLA /GO ( $W_{GO\ Initial} = 20\%$ ) après 3 mois (b) MP PLA /GN ( $W_{GN\ Initial} = 20\%$ ) à  $t_0$  (a') MP PLA /GN ( $W_{GN\ Initial} = 20\%$ ) après 3 mois**

Ainsi, la cinétique de libération des SA hors des microparticules peut être expliquée par le gonflement des microparticules du PLA. En effet, ce gonflement permet une diffusion plus rapide des molécules de SA encapsulées (augmentation du degré de liberté), en raison de la moindre compacité du réseau de chaînes PLA.

## 5.6. Conclusion

Les tests de solubilités de l'acide gallique et de ses esters, dans l'eau et dans différents solvants organiques, nous ont permis de sélectionner trois SA susceptibles d'être encapsulées dans les nanoparticules de PLA : GO, GN et GL.

Afin d'évaluer la compatibilité entre les SA sélectionnées et le PLA, des tests de miscibilités ont été effectués par MDSC. Ces essais, nous ont permis de choisir les SA ayant plus le d'affinité avec le PLA et d'autre part de déterminer la fraction massique maximale en SA pour laquelle le

mélange PLA/SA reste monophasique. Les SA sélectionnées pour notre étude sont le GO et le GN.

Concernant les particules chargées en SA préparées par nanoprécipitation, les rendements d'encapsulation de GO et GN sont relativement faibles, de même que les quantités de SA encapsulées. Par E-ES, il est possible d'encapsuler les SA avec des rendements beaucoup plus élevés mais dans ce cas, les nanoparticules ne sont pas redispersables après centrifugation. En fait, les quantités de SA qu'il est possible d'encapsuler dans les nanoparticules de PLA semblent être limitées par l'abaissement de la  $T_g$  du mélange PLA/SA. Quel que soit le procédé utilisé et dans toutes les conditions étudiées, une augmentation trop importante de la quantité de SA encapsulée ( $W_{SA} \rightarrow 10\%$ ) conduit à une agrégation irréversible des nanoparticules formées, lors des lavages par centrifugation.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'élaboration des microparticules chargées en SA dans les domaines de taille n°2 (1  $\mu\text{m}$ -100  $\mu\text{m}$ ) et n°3 (100  $\mu\text{m}$ -1000  $\mu\text{m}$ ).

Dans le cas des particules préparées par E-DS avec émulsification dans un système microfluidique (domaine n°2), une mise au point adéquate a été effectuée pour pouvoir obtenir des particules chargées. Les rendements d'encapsulation et les taux de charges en GO obtenus sont faibles. Ceci s'explique par la grande dilution de la phase organique contenant le mélange PLA/GO dans la phase aqueuse (3 mg PLA/GO pour 6 mL de DexC6, 5g/L), condition qui favorise la solubilisation de la SA dans la phase aqueuse.

Dans le cas des particules préparées par E-ES avec émulsification par agitation magnétique (domaine n°3), les rendements d'encapsulation sont quasi-quantitatifs et les taux de charges en SA (GO ou GN) obtenus sont élevés. Les conditions d'émulsification sont en fait beaucoup plus favorables à l'encapsulation de la SA (200 mg SA/PLA pour 4 mL de DexC6, 5g/L), comparativement aux conditions d'émulsification utilisées dans le procédé par microfluidique.

Les cinétiques de libération du GO et GN à partir des particules de PLA ont été établies. Dans le cas des nanoparticules, nous avons évalué l'influence de la quantité de SA encapsulée ainsi que le procédé utilisé sur le profil de libération. Indépendamment du procédé utilisé pour l'élaboration des nanoparticules, la nature de la SA encapsulée a une influence sur la cinétique de sa libération. Les coefficients de diffusion du GO sont plus élevés que ceux obtenus pour le GN. Nous avons aussi montré que le procédé utilisé a une influence sur le coefficient de diffusion. Indépendamment de la SA encapsulée, les nanoparticules préparées par nanoprécipitation libèrent plus rapidement les SA encapsulées que les nanoparticules élaborées

par E-ES. Cette différence de cinétique de libération a été attribuée à une possible porosité de la matrice des particules préparées par nanoprécipitation.

La libération à partir des microparticules du domaine n°3 n'a été possible que dans un milieu à pH = 8,6. A ce pH, une faible dégradation du PLA associée à un phénomène de gonflement accélèrent la diffusion des SA à partir de la matrice PLA. Comme dans le cas des nanoparticules, le GO diffuse plus rapidement que le GN.

Le procédé de nanoprécipitation utilisé pour élaborer des nanoparticules de PLA/SA (GO ou GN) est un procédé peu énergétique dont la mise en œuvre est assez simple. L'extrapolation de ce procédé à l'échelle industrielle est a priori possible. Le passage de l'élaboration de lots d'une dizaine de mL à 1 L a été effectué avec succès et sera décrit dans le chapitre 6. Signalons néanmoins que le procédé basé sur l'émulsification par US est plus énergétique et ne peut pas être, tel quel, extrapolé à une échelle industrielle. Toutefois, il permet de travailler dans des conditions de concentration en PLA beaucoup plus élevée que dans le procédé de nanoprécipitation.

## 5.7. Références Bibliographiques

1. Wan, L.S.C. and C.L. Hwang, *Antioxidant solubility and efficiency*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1969. **58**(7): p. 889-891.
2. Sakai, T., K. Kamogawa, K. Nishiyama, H. Sakai, and M. Abe, *Molecular Diffusion of Oil/Water Emulsions in Surfactant-Free Conditions*. Langmuir, 2002. **18**(6): p. 1985-1990.
3. N., H., K. M., and W.C. J., *Membrane Modification: Technology and Applications*. Membrane Modification: Technology and Applications. 2012. 1-482.
4. Fox, T.G., *Influence of diluent and of copolymer composition on the glass temperature of a polymer system*. Bulletin of the American Phys Society, 1956. **1**: p. 123-132.
5. Harte, I., C. Birkinshaw, E. Jones, J. Kennedy, and E. DeBarra, *The effect of citrate ester plasticizers on the thermal and mechanical properties of poly(DL-lactide)*. Journal of Applied Polymer Science, 2013. **127**(3): p. 1997-2003.
6. Heins, A., V.M. Garamus, B. Steffen, H. Stöckmann, and K. Schwarz, *Impact of Phenolic Antioxidants on Structural Properties of Micellar Solutions*. Food Biophysics, 2006. **1**(4): p. 189-201.
7. Maldonado, O.S., R. Lucas, F. Comelles, M. Jesús González, J.L. Parra, I. Medina, and J.C. Morales, *Synthesis and characterization of phenolic antioxidants with surfactant properties: glucosyl- and glucuronosyl alkyl gallates*. Tetrahedron, 2011. **67**(38): p. 7268-7279.
8. Rouzes, C., M. Leonard, A. Durand, and E. Dellacherie, *Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2003. **32**(2): p. 125-135.
9. Diou, O., S. Greco, T. Beltran, D. Lairez, J.R. Authelin, and D. Bazile, *A method to Quantify the Affinity of Cabazitaxel for PLA-PEG Nanoparticles and Investigate the Influence of the Nano-Assembly Structure on the Drug/Particle Association*. Pharmaceutical Research, 2015. **32**(10): p. 3188-3200.
10. Rouzes, C., *Nanosphères à cœur de poly(acide lactique) et couronne de dextrane : élaboration, propriétés et applications biomédicales*. 2001, Thèse de doctorat de l'Institut Nationale Polytechnique de Lorraine, France.
11. Ehtezazi, T. and C. Washington, *Controlled release of macromolecules from PLA microspheres: using porous structure topology*. Journal of Controlled Release, 2000. **68**(3): p. 361-372.
12. Zhang, M.P., Z.C. Yang, L.L. Chow, and C.H. Wang, *Simulation of drug release from biodegradable polymeric microspheres with bulk and surface erosions*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **92**(10): p. 2040-2056.
13. Crank, J.J., *The mathematics of diffusion*. 1975, Oxford: Clarendon Press.
14. Nordstierna, L., A.A. Abdalla, M. Nordin, and M. Nyden, *Comparison of release behaviour from microcapsules and microspheres*. Progress in Organic Coatings, 2010. **69**(1): p. 49-51.
15. Prager, S. and F.A. Long, *Diffusion of Hydrocarbons in Polyisobutylene I*. Journal of the American Chemical Society, 1951. **73**(9): p. 4072-4075.

16. Chorny, M., I. Fishbein, H.D. Danenberg, and G. Golomb, *Study of the drug release mechanism from tyrphostin AG-1295-loaded nanospheres by in situ and external sink methods*. Journal of Controlled Release, 2002. **83**(3): p. 401-414.
17. Polakovic, M., T. Gorner, R. Gref, and E. Dellacherie, *Lidocaine loaded biodegradable nanospheres II. Modelling of drug release*. Journal of Controlled Release, 1999. **60**(2-3): p. 169-177.
18. Budhian, A., S.J. Siegel, and K.I. Winey, *Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **346**(1-2): p. 151-159.
19. Romero-Cano, M.S. and B. Vincent, *Controlled release of 4-nitroanisole from poly(lactic acid) nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2002. **82**(1): p. 127-135.
20. Alexis, F., *Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly (lactic acid)-co-(glycolic acid)*. Polymer International, 2005. **54**(1): p. 36-46.
21. Freiberg, S. and X.X. Zhu, *Polymer microspheres for controlled drug release*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **282**(1-2): p. 1-18.
22. Witt, C. and T. Kissel, *Morphological characterization of microspheres, films and implants prepared from poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: is the erosion controlled by degradation, swelling or diffusion?* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2001. **51**(3): p. 171-181.
23. Zolnik, B.S., P.E. Leary, and D.J. Burgess, *Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres*. Journal of Controlled Release, 2006. **112**(3): p. 293-300.
24. Tsuji, H. and Y. Ikada, *Properties and morphology of poly(L-lactide) 4. Effects of structural parameters on long-term hydrolysis of poly(L-lactide) in phosphate-buffered solution*. Polymer Degradation and Stability, 2000. **67**(1): p. 179-189.
25. Tsuji, H. and C.A. Del Carpio, *In Vitro Hydrolysis of Blends from Enantiomeric Poly(lactide)s. 3. Homocrystallized and Amorphous Blend Films*. Biomacromolecules, 2003. **4**(1): p. 7-11.
26. Liggins, R.T. and H.A. Burt, *Paclitaxel-loaded poly(L-lactic acid) microspheres 3: blending low and high molecular weight polymers to control morphology and drug release*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **282**(1-2): p. 61-71.
27. Liggins, R.T. and H.M. Burt, *Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **222**(1): p. 19-33.
28. Zolnik, B.S. and D.J. Burgess, *Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release*. Journal of Controlled Release, 2007. **122**(3): p. 338-344.
29. Makino, K., H. Ohshima, and T. Kondo, *Mechanism of hydrolytic degradation of poly(L-lactide) microcapsules: effects of pH, ionic strength and buffer concentration*. Journal of microencapsulation, 1986. **3**(3): p. 203-12.
30. Techer, D., P. Fontaine, A. Personne, S. Viot, and M. Thomas, *Allelopathic potential and ecotoxicity evaluation of gallic and nonanoic acids to prevent cyanobacterial growth in lentic systems: A preliminary mesocosm study*. Science of the Total Environment, 2016. **547**: p. 157-165.

31. Grandfils, C., P. Flandroy, and R. Jerome, *Control of the biodegradation rate of poly(DL-lactide) microparticles intended as chemoembolization materials*. *Journal of Controlled Release*, 1996. **38**(2-3): p. 109-122.
32. Proikakis, C.S., N.J. Mamouzelos, P.A. Tarantili, and A.G. Andreopoulos, *Swelling and hydrolytic degradation of poly(D,L-lactic acid) in aqueous solutions*. *Polymer Degradation and Stability*, 2006. **91**(3): p. 614-619.
33. Proikakis, C.S., P.A. Tarantili, and A.G. Andreopoulos, *The role of polymer/drug interactions on the sustained release from poly(DL-lactic acid) tablets*. *European Polymer Journal*, 2006. **42**(12): p. 3269-3276.





# Chapitre 6

*Transposition de l'élaboration des nanoparticules à l'échelle pilote (1L) et tests de leur efficacité sur le traitement des cyanobactéries*



## Table des matières

<b>6.1. Introduction</b> .....	315
<b>6.2. <u>Transposition du procédé de nanoprecipitation de l'échelle laboratoire (25 mL) à l'échelle pilote (1 L)</u></b> .....	315
<b>6.2.1. Etude bibliographique</b> .....	315
6.2.1.1. <u>Transposition de l'élaboration des nanoparticules</u> .....	316
6.2.1.2. <u>Transposition de l'étape d'élimination du solvant organique</u> .....	319
6.2.1.3. <u>Transposition de l'étape de séchage des nanoparticules</u> .....	322
<b>6.2.2. <u>Elaboration des nanoparticules par nanoprecipitation à plus grande échelle</u></b> ....	323
6.2.2.1. <u>Schéma de montage</u> .....	323
6.2.2.2. <u>Transposition de l'élaboration de nanoparticules par nanoprecipitation : de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote</u> .....	325
<b>6.3. <u>Efficacité du traitement sur les cyanobactéries</u></b> .....	335
<b>6.3.1. <u>Procédure expérimentale</u></b> .....	335
<b>6.3.2. <u>Evaluation de l'efficacité de l'utilisation des nanoparticules élaborées à l'échelle du laboratoire sur le traitement des invasions algales</u></b> .....	337
<b>6.3.3. <u>Evaluation de l'efficacité de l'utilisation des nanoparticules élaborées à l'échelle pilote sur le traitement des invasions algales</u></b> .....	339
<b>6.4. <u>Conclusion</u></b> .....	340
<b>6.5. <u>Références bibliographiques</u></b> .....	342



## **6.1. Introduction**

Dans le but d'utiliser les particules de SA/PLA pour le traitement des invasions algales dans les milieux aquatiques, il est nécessaire de transposer les procédés optimisés à l'échelle du laboratoire à une échelle plus grande, afin d'augmenter de manière significative les quantités de particules produites. D'autre part, il est évidemment indispensable de tester l'efficacité de ces particules PLA/SA comme traitement contre la prolifération des cyanobactéries.

La nanoprécipitation étant un procédé relativement peu énergétique et facile à mettre en œuvre, nous avons opté pour l'étude de la transposition de ce procédé, de l'échelle du laboratoire (une dizaine de millilitres pour chaque lot de particules préparé) à une échelle pilote plus grande (1 L par lot de particules).

Par la suite, les nanoparticules élaborées à petite et à grande échelle ont été testées dans des milieux de cultures contenant des blooms de cyanobactérie. Ces essais réalisés par la société FP.Environnement ont permis d'évaluer l'efficacité des nanoparticules GN/PLA sur le traitement des invasions de cyanobactéries dans les systèmes lenticules et de quantifier la masse de nanoparticules nécessaire à l'obtention d'un effet algistatique ou algicide sur les cyanobactéries, dans un volume donné de milieu de culture.

Dans ce chapitre, nous présenterons donc, dans une première partie, la procédure suivie pour la transposition du procédé de nanoprécipitation à l'échelle pilote ainsi que les caractéristiques des nanoparticules PLA/GN élaborées à cette échelle. Puis, dans la seconde partie, nous exposerons les résultats de l'étude de la cytotoxicité des nanoparticules chargées en GN sur les cyanobactéries.

## **6.2. Transposition du procédé de nanoprécipitation de l'échelle laboratoire (25 mL) à l'échelle pilote (1 L)**

### **6.2.1. Etude bibliographique**

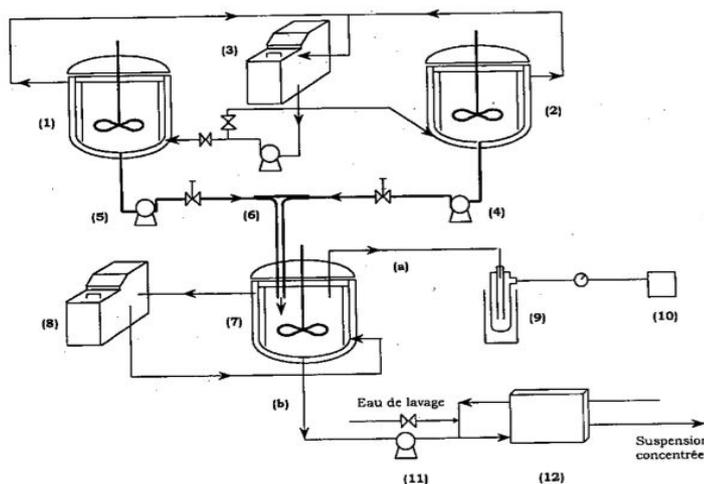
La nanoprécipitation fait partie des procédés les plus utilisés pour la préparation des nanoparticules à l'échelle laboratoire. Dans le but d'utiliser ce procédé à l'échelle industrielle, un changement d'échelle est nécessaire et implique de reconsidérer toute la procédure de fabrication. L'enjeu est d'obtenir des particules en quantité assez importante tout en conservant des caractéristiques voisines de celles obtenues à l'échelle du laboratoire [1-3]. Dans la

littérature, la méthodologie de changement d'échelle de la nanoprécipitation est peu rapportée. Nous donnerons dans ce qui suit les éléments disponibles dans la littérature pour l'ensemble des opérations unitaires du procédé de nanoprécipitation.

### 6.2.1.1. Transposition de l'élaboration des nanoparticules

Briançon et al. [4] sont les premiers à avoir étudié la transposition de la nanoprécipitation à l'échelle pilote. Un volume égal à 2,5 litres de suspension de nanoparticules d'Eudragit E100 et d'Eudragit RL100, a été obtenu en « batch ». La masse des nanoparticules produite est alors comprise entre 0,25 g et 7,5 g/ lot en fonction de la concentration de départ du polymère solubilisé dans la phase organique (Figure 135).

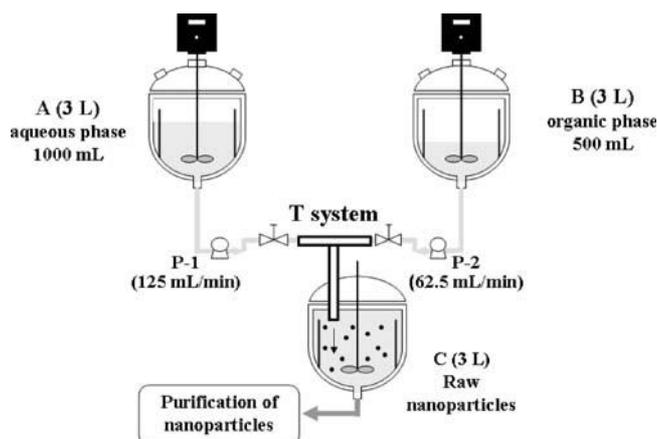
Les auteurs ont montré que comme à petite échelle, les deux paramètres qui ont le plus d'influence sur la taille des nanoparticules sont la nature du solvant organique utilisé et la concentration en polymère dans cette phase. La concentration maximale en polymère solubilisé initialement dans la phase organique, conduisant à des nanoparticules avec des distributions de tailles monomodales, est égale à 40 g/L. Au delà de cette concentration, le polymère précipite sous forme de films et des agrégats de particules sont alors obtenus.



**Figure 135: Dispositif expérimental d'élaboration des nanoparticules par nanoprécipitation à l'échelle pilote établi par Briançon et al [4].** (1) et (2) : réacteurs contenant respectivement la phase aqueuse et organique. (3), (8): bains thermostatés, (4), (5) et (11): pompes, (6): mélangeurs en T, (7): réacteur contenant la suspension formée. L'évaporation du solvant a lieu soit (a) sous pression réduite en utilisant un piège à solvant (9) soit (b) par ultrafiltration tangentielle grâce à une membrane (12).

Galindo-Rodriguez et al. [5] se sont basés sur l'étude de Briançon et al pour étudier la transposition de l'élaboration de nanoparticules d'Eudragit® L100-55, poly(acide méthacrylique-

co-méthacrylate de méthyle) renfermant de l'ibuprofène, de 60 mL à 1,5 L. Ces auteurs ont montré dans leurs travaux que l'extrapolation est réalisable pour l'élaboration de nanoparticules d'ibuprofène par nanoprécipitation (Figure 136).



**Figure 136: Extrapolation du procédé de la nanoprécipitation adapté par Vauthier et al [6] des travaux de Galindo-Rodriguez et al [5]. A, B et C : réacteurs de 3 L. Tous les réacteurs sont équipés de 4 chicanes qui empêchent la formation d'un vortex autour de l'axe du mobile d'agitation. Les réacteurs sont agités par un agitateur axial. P-1 et P-2 pompes péristaltiques. T mélangeur.**

Ils ont vérifié que l'obtention de nanoparticules par nanoprécipitation à plus grande échelle est répétable et qu'elle peut être réalisée en continu.

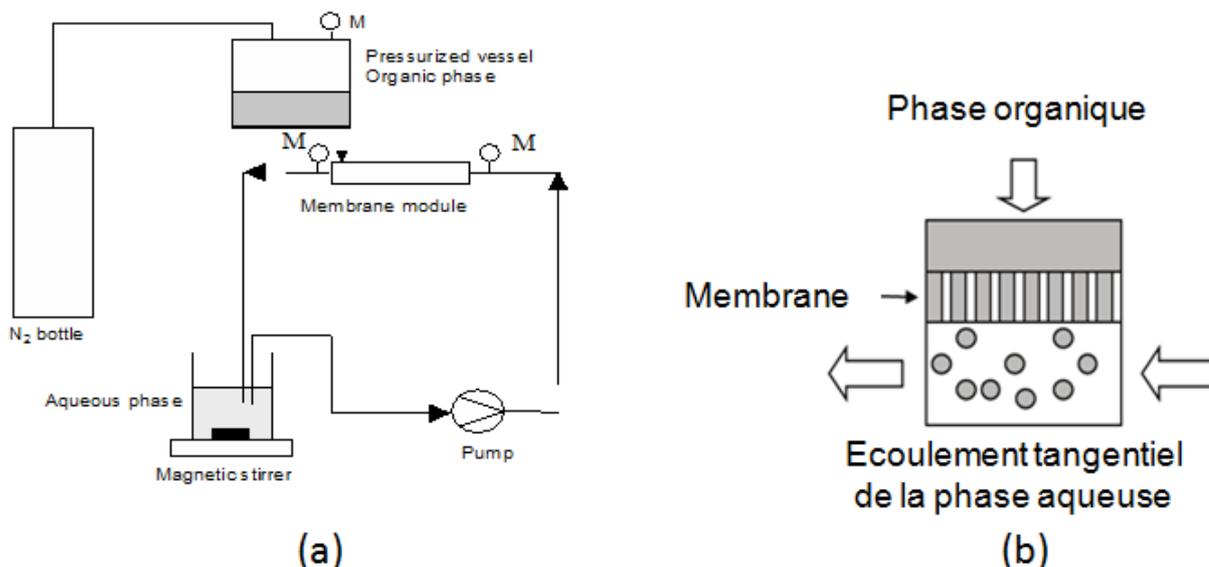
Une comparaison entre les caractéristiques des nanoparticules d'Eudragit® L100-55/Ibuprofène obtenues à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote a été présentée (Tableau 63).

**Tableau 63: Comparaison entre les caractéristiques des nanoparticules élaborées par nanoprécipitation à l'échelle du laboratoire et à l'échelle pilote [5].**

	Echelle du laboratoire	Echelle pilote
<b>Diamètre moyen (nm)</b>	141± 5	105± 8
<b>Indice de polymétrie</b>	0,082± 0,023	0,130± 0,049
<b>% Ibuprofène encapsulé</b>	4,5±0,3	3,2±0,4
<b>Taux d'encapsulation (%)</b>	50	39

Khayata et al. [7] ont étudié l'encapsulation de la vitamine E dans des nanocapsules de PCL élaborées par nanoprécipitation à petite et à grande échelle. Le passage de la petite échelle (75

mL par lot) à l'échelle pilote (600 mL) par lot a été réalisée en utilisant un contacteur à membrane (Figure 137).



**Figure 137: (a) Procédé d'élaboration de nanocapsules par contacteur à membrane (b) Principe de la formation des nano-objets par contacteur membranaire adapté de [7].**

La membrane utilisée est une membrane hydrophile à base de Shirasu (Shirasu Porous Glass) adaptée pour l'élaboration de nanocapsules. Elle est commercialisée par SPG Technology et présente les caractéristiques suivantes : 0,125 m de longueur,  $10^{-2}$  m de diamètre interne,  $10^{-3}$  m d'épaisseur et  $3,9 \cdot 10^{-3}$  m<sup>2</sup> de surface. Les résultats présentés dans le Tableau 64 (Echelle pilote) ont été obtenus avec une membrane dont le diamètre des pores est égal à 0,9  $\mu$ m. Les nanocapsules élaborées en utilisant les formulations optimales présentent des tailles et taux d'encapsulation comparables quelle que soit l'échelle (Tableau 64).

**Tableau 64 : Comparaison entre les caractéristiques des nanocapsules de PCL) chargées en vitamine E et élaborées par nanopréciipitation à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote [7].**

	Echelle du laboratoire	Echelle pilote
Diamètre moyen mesuré par Zétasizer (nm)	165 ± 16	172 ± 14
Diamètre moyen mesuré par MEB (nm)	125 ± 17	157 ± 42
Taux d'encapsulation (%)	98 ± 1,68	97,65 ± 2,06

Khayata et al. ont évalué l'influence sur la taille des nanocapsules de la pression exercée par la phase organique sur la membrane du contacteur. Lorsqu'une forte pression est utilisée, les gouttelettes se forment principalement à la surface de la membrane, ce qui provoque leur coalescence. La taille des nanocapsules obtenues augmente en fonction de la pression appliquée à la phase organique et une formation d'agrégats est aussi observée.

Ephrem et al. [8] se sont intéressés à l'encapsulation de l'huile de romarin dans des nanocapsules de PCL élaborées par nanopréciptation. Les formulations de ces nano-objets ont été optimisées à l'échelle du laboratoire puis transposées à l'échelle pilote. Cette transposition a permis d'augmenter d'un facteur 6 la quantité de particules produites : passage de 50 mL de suspension/lot (échelle laboratoire) à 300 mL de suspension /lot (échelle pilote). La transposition a encore été effectuée en utilisant un contacteur à membrane (Figure 137). Les nano-objets obtenus présentent les mêmes caractéristiques que celles de nanocapsules obtenues à petite échelle :  $220 \pm 10$  nm de diamètre, un potentiel zêta négatif ( $-19,9 \pm 4,6$  mV), un taux d'encapsulation très élevé ( $\sim 99\%$ ) et une stabilité colloïdale maintenue jusqu'à 2 mois.

#### **6.2.1.2. Transposition de l'étape d'élimination du solvant organique**

Après l'étape de nanopréciptation, l'élimination du solvant est nécessaire. A petite échelle, l'élimination du solvant organique est effectuée par évaporation en utilisant le Thermoshaker à température et durée contrôlée, ou dans un évaporateur rotatif (Rotavap) à température et à pression réduite données. L'élimination du solvant est souvent accompagnée de l'élimination d'un certain volume d'eau, ce qui présente l'avantage de concentrer la suspension de nanoparticules.

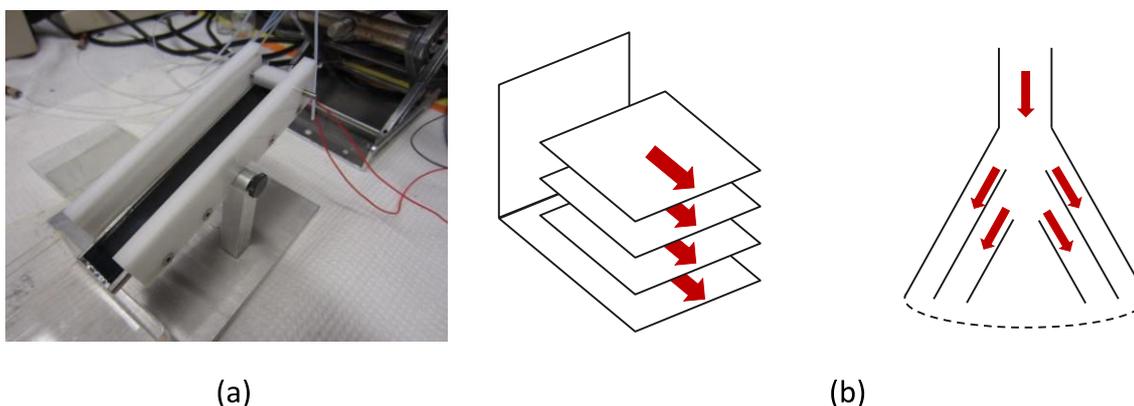
Plusieurs solutions peuvent être envisagées pour transposer l'étape d'évaporation de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle. Parmi ces solutions, nous pouvons citer :

- l'évaporation sur un plan incliné
- l'évaporation sous-vide à environ 70 mmHG et 37°C.
- la filtration tangentielle

Les deux premières méthodes citées sont détaillées ci dessous. La filtration tangentielle sera décrite ultérieurement dans la partie consacrée à l'étape de lavage des particules (Cf. paragraphe 6.2.1.2.3).

### 6.2.1.2.1. Évaporation sur un plan incliné

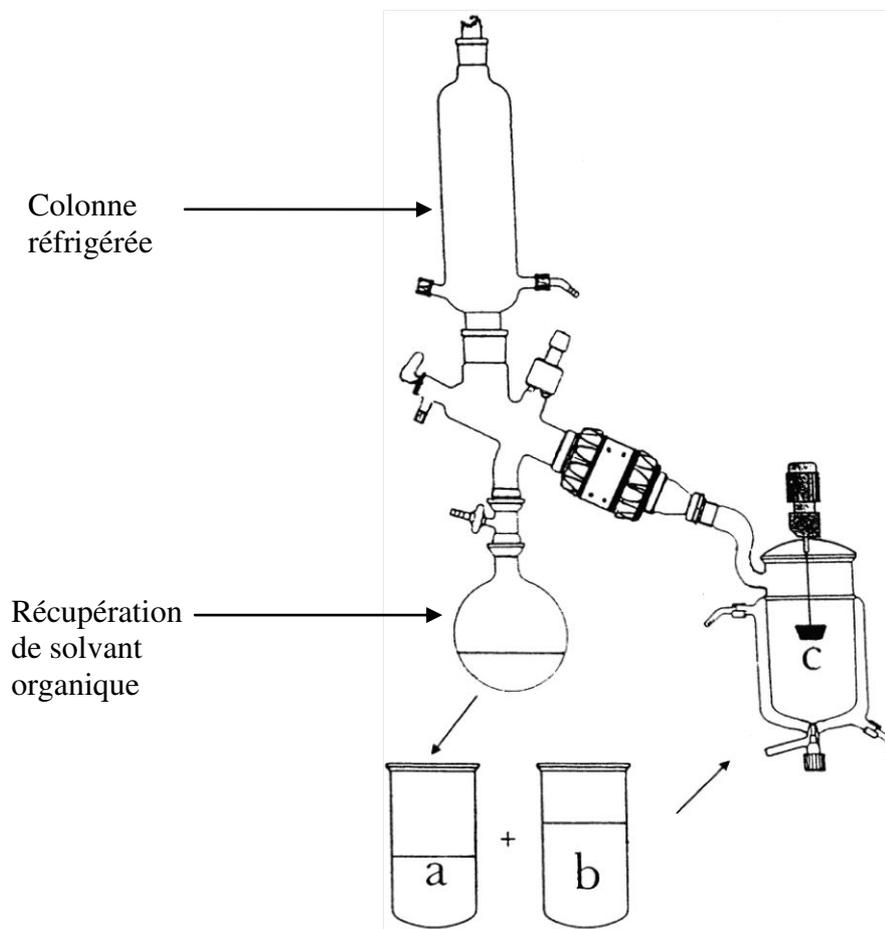
Il s'agit de concevoir ici, une évaporation rapide grâce à un plan incliné chauffé sur lequel la suspension va couler (Figure 138) [9]. Les paramètres clés sont l'angle d'inclinaison du plan, la température, la longueur et le matériau du plan de telle sorte que la suspension ait un temps de séjour sur la surface suffisant pour évaporer le solvant. Cette méthode permet d'évaporer un solvant en continu et à grande échelle (et même à échelle industrielle en ajoutant plusieurs plans inclinés en parallèle).



**Figure 138: (a) Plan incliné conçu pour évaporer les solvants organiques (b) Transposition de l'évaporation du solvant organique par mise en parallèle de plusieurs plans inclinés.**

### 6.2.1.2.2. Distillation sous vide

La distillation est une technique de séparation qui permet de séparer deux liquides selon leurs températures d'ébullition. Cette technique fonctionne dans notre cas puisque la température d'ébullition de l'eau est de 100 °C et celle de l'acétone est de 56 °C à pression atmosphérique. Comme nous ne souhaitons pas détériorer nos particules de PLA chargées en SA dont la température de transition vitreuse est relativement basse (< 50 °C), il serait préférable de travailler à une température ne dépassant pas 37 °C. A titre d'exemple des nanoparticules chargées en GN ( $W_{GN \text{ dans les nanoparticules}} = 10\%$ ) auront une  $T_g$  autour de 42°C (cf. chapitre 5 - paragraphe 5.2.3). La distillation sous vide est donc une alternative intéressante. Ce procédé présente l'avantage de permettre la récupération du solvant organique et sa réutilisation dans l'expérience suivante. C'est donc une façon de limiter les coûts liés aux rejets. Une figure représentative du procédé de distillation sous vide est représentée dans la Figure 139.



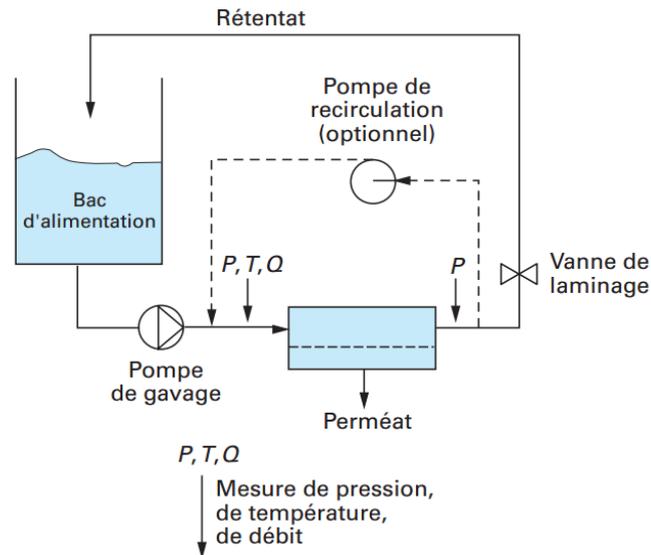
**Figure 139 : Procédé de distillation sous vide avec recyclage du solvant distillé: (a) solution organique contenant le polymère et la SA, (b) solution aqueuse de dextrane modifié, (c) émulsion formée à partir de (a) et (b) [10].**

### **6.2.1.2.3. Transposition de l'étape de lavage des nanoparticules**

Pour récupérer et laver les nanoparticules préparées, plusieurs méthodes peuvent être envisagées parmi lesquelles nous pouvons citer : la centrifugation, la dialyse et la filtration frontale ou tangentielle (nanofiltration, ultrafiltration...) [6]. La force motrice utilisée, pour que les espèces chimiques ou les ions puissent traverser la membrane semi-perméable, est à l'origine de la différence entre les procédés membranaires cités ci-dessus : un gradient de concentration pour la dialyse et un gradient de pression pour la filtration.

Au cours de ces travaux de thèse, les particules élaborées à petite échelle ont été lavées par centrifugation. La redispersion de ces nanoparticules peut être difficile après centrifugation et nécessite généralement l'utilisation des ultrasons, ce qui n'est pas envisageable à l'échelle industrielle.

La filtration tangentielle fait partie des procédés membranaires les plus utilisés pour un processus de lavage à l'échelle industrielle. Elle consiste à faire circuler la solution brute à filtrer parallèlement à la membrane poreuse (Figure 140). Sous l'action d'un gradient de pression, le liquide passe à travers la membrane et se clarifie. La filtration présente plusieurs avantages. Elle permet notamment de fonctionner en continu, ne fait pas appel à l'emploi d'adjuvant et fournit deux fluides généralement valorisables (rétentat et perméat).



**Figure 140 : Représentation schématique d'une installation de filtration tangentielle [11].**

Des essais de lavages de nanoparticules à l'échelle pilote ont été testés par microfiltration à flux tangentiels. Le procédé se fait en deux étapes : la suspension de nanoparticules est d'abord concentrée, puis une étape de diafiltration est réalisée [6]. Cette dernière consiste à ajouter en continu de l'eau dans le fluide traité.

### 6.2.1.3. Transposition de l'étape de séchage des nanoparticules

Parmi les techniques les plus utilisées pour obtenir des nanoparticules à l'état solide nous pouvons citer la lyophilisation et le séchage par pulvérisation (ou atomisation). Ces deux techniques sont en principe utilisables à l'échelle industrielle [6].

Tout comme à petite échelle, l'ajout de cryoprotecteur (tréhalose par exemple) est nécessaire pour limiter la formation d'agrégats de nanoparticules lors de la lyophilisation. Le séchage des nanoparticules par lyophilisation est très efficace mais demeure une alternative très coûteuse.

Le séchage par atomisation permet de produire une poudre à partir d'une suspension liquide. Il se déroule en trois étapes : atomisation, séchage puis séparation de la poudre sèche et de l'air humide au moyen d'un cyclone.

Ce procédé présente les avantages d'être moins onéreux et plus rapide que la lyophilisation.

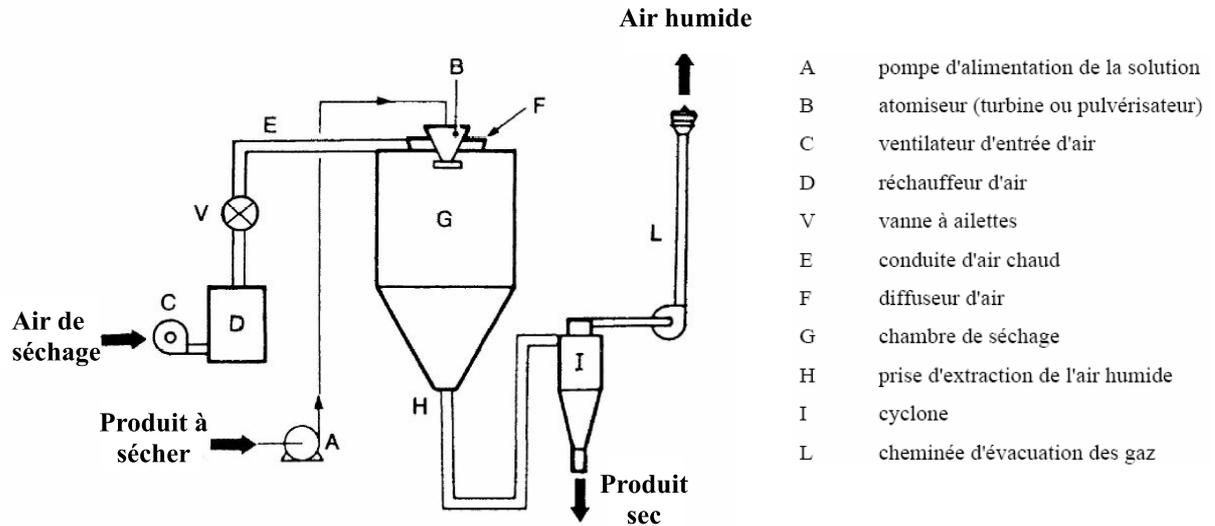


Figure 141: Procédé de séchage par pulvérisation [12].

## 6.2.2. Elaboration des nanoparticules par nanopréciipitation à plus grande échelle

### 6.2.2.1. Schéma de montage

Au regard de l'étude bibliographique présentée ci-dessus, les paramètres clés permettant l'extrapolation de la nanopréciipitation de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote ont été identifiés (Tableau 65).

**Tableau 65 : Paramètres clés de l'extrapolation du procédé de nanopréciipitation à l'échelle industrielle.**

Echelle du laboratoire	Echelle pilote
Phase organique ajoutée goutte à goutte dans le bécher via un pousse seringue	Pas de pousse seringue possible (durée trop longue) → Ajout de la solution en une fois
Utilisation d'un barreau magnétique pour l'agitation	Pas d'agitateur magnétique → pale d'agitation et moteur : système d'agitation mécanique
Evaporation avec le « thermoshaker » à 37°C et $P_{atm}$	Pas de « thermoshaker » (évaporation trop lente et système occupant trop de place) → Evaporation sous pression réduite à 40°C

Sur la base de ces recherches, un montage expérimental a été mis au point permettant l'élaboration de nanoparticules par nanopréciipitation dans des réacteurs de 250 mL et 1 L (Figure 142). Le dispositif comporte un réacteur ayant un volume de 250 mL ou de 1 L, pouvant être chauffé par un bain d'eau thermostaté. Il est intéressant d'introduire des chicanes dans ces réacteurs à fin d'éviter la formation de mousse dans le système. Le réacteur possède un couvercle étanche permettant le passage d'un arbre d'agitation composé d'une hélice à 3 pâles. L'arbre d'agitation est entraîné par un moteur pouvant aller de 20 à 2000 tr/min. Une sortie sur le couvercle est raccordée à un tube réfrigérant qui est lui-même relié à un ballon récupérateur de solvant puis à une pompe à vide. Ainsi, le solvant évaporé sous pression réduite et récupéré dans le ballon.

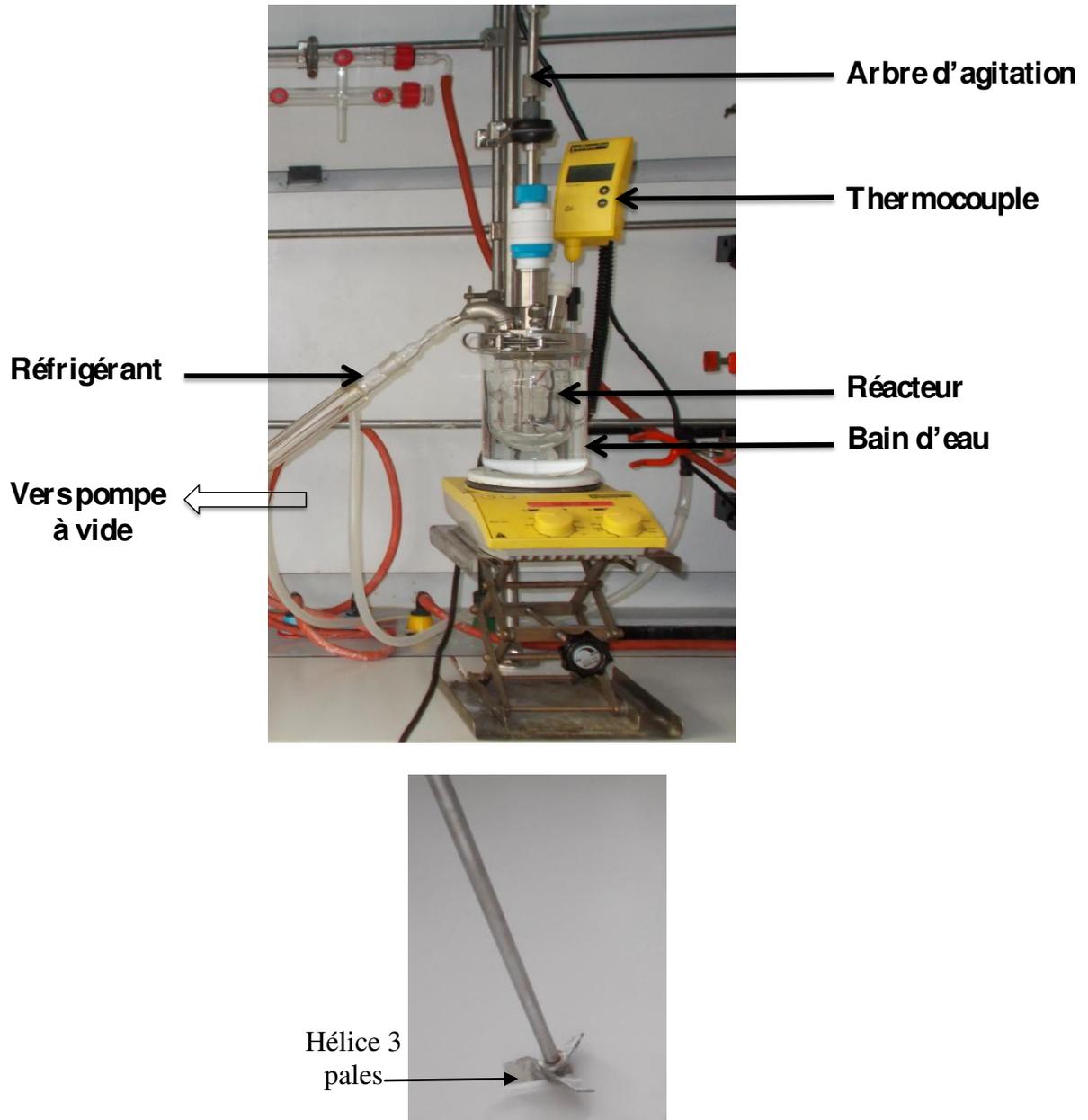


Figure 142: Montage pour le réacteur de 250 mL et de 1 L.

#### 6.2.2.2. Transposition de l'élaboration de nanoparticules par nanopréciipitation : de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote

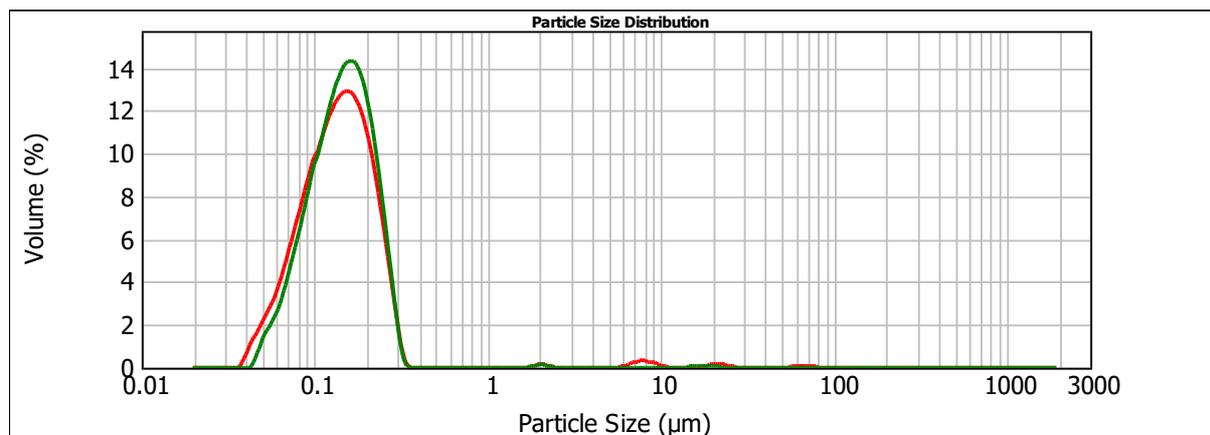
Les expériences d'extrapolation de l'élaboration des nanoparticules à l'échelle pilote ont été réalisées en collaboration avec Dr. Isabelle Martinuzzi, chercheur en CDD dans le cadre du projet BioCapTech.

### 6.2.2.2.1. Influence de la nature du PLA utilisé à petite échelle

Les essais de nanopréciipitation ont été réalisés avec les réacteurs de 250 mL et de 1 L. Pour ces essais, le PLA utilisé est un PLA commercialisé par Natureplast PLE005. Ce PLA a l'avantages d'être peu couteux (10 €/kg). Contrairement au PLA<sub>aldrich</sub> (utilisé pour les essais à petite échelle), il est semi-cristallin. Ceci est du à sa forte proportion en stéréoisomère L-lactide (95%). La comparaison entre les propriétés du PLA fournis par Sigma Aldrich (utilisé à l'échelle du laboratoire) et Natureplast (utilisé à l'échelle pilote) est présenté dans le chapitre matériels et méthodes (cf. chapitre 2 – paragraphe 2.1).

Nous avons, tout d'abord, préparé des nanoparticules à petite échelle en utilisant le PLA Natureplast. Le but de ces expériences était d'évaluer l'influence de la nature du PLA sur la taille des nanoparticules, la distribution de taille et le taux de recouvrement en dextrane modifié.

Les nanoparticules élaborées par nanopréciipitation avec du PLA<sub>Natureplast</sub> présentent les mêmes caractéristiques que celles élaborées en utilisant le PLA<sub>Aldrich</sub> (Figure 143 et le Tableau 66).



**Figure 143 : Comparaison entre les distributions de taille obtenues après lavages des nanoparticules de PLA élaborées par nanopréciipitation à petite échelle (-) PLA<sub>Aldrich</sub> (-) PLA<sub>Natureplast</sub> (phase organique : PLA (10 g/L dans 5 mL d'acétone), phase aqueuse : DexC<sub>6-τ</sub> (10 g/L), débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse, d, h, et vitesse d'agitation fixés respectivement à 0,3 mL/ min, 0,9 cm, -2 cm et 500 rpm).**

Après avoir vérifié que la nature du PLA utilisé n'avait pas d'influence sur la taille, la distribution de taille et le taux de recouvrement des nanoparticules, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'influence du changement d'échelle sur les caractéristiques des nanoparticules obtenues.

**Tableau 66 : Caractéristiques des nanoparticules de PLA élaborées par nanopréciipitation à petite échelle en fonction du PLA utilisé** (phase organique : PLA (10 g/L dans 5 mL d'acétone), phase aqueuse : DexC<sub>6</sub>- $\tau$  (10 g/L), débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse, *d*, *h*, et vitesse d'agitation fixés respectivement à 0,3 mL/min, 0,9 cm, 1,5 cm et 500 rpm).

Echantillon de PLA	d(0,5) <sup>a</sup> (nm)	D[3,2] <sup>a</sup> (nm)	Span <sup>a</sup>	$\Gamma(\pm 0,5)^b$ (mg DexC <sub>6</sub> /m <sup>2</sup> )
Aldrich <sup>®</sup> (Amorphe)	138	118	1,17	2,2
Natureplast <sup>®</sup> (Semi-cristallin)	146	129	1,05	2,3

a: Après lavages des particules

b: Taux de recouvrement des nanoparticules par le dextrane modifié calculé à partir de l'analyse RMN <sup>1</sup>H des nanoparticules (Cf.chapitre 2- paragraphe- 2.2.5.1)

#### 6.2.2.2. Influence du changement d'échelle sur les caractéristiques des nanoparticules élaborées

Seules les étapes de formulation et d'évaporation de solvant ont été transposées à l'échelle pilote. La méthode utilisée pour le lavage des nanoparticules reste la centrifugation suivie d'une redispersion dans un bain US. Cette méthode n'est utilisable qu'à l'échelle laboratoire mais n'a pas été transposée à l'échelle pilote dans le cadre de cette étude.

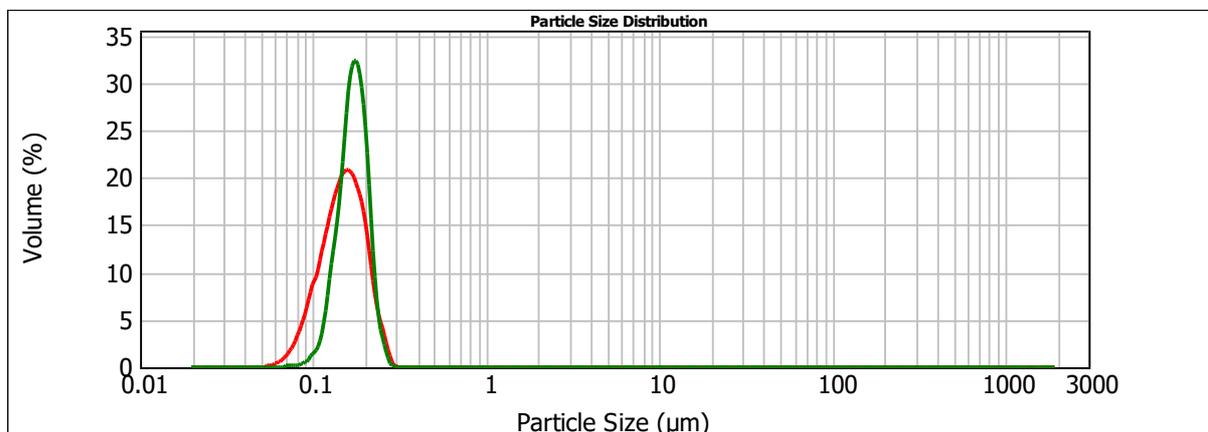
##### a) Nanoparticules de PLA

Les nanoparticules de PLA recouvertes de dextrane modifié ont été élaborées avec succès par nanopréciipitation dans un réacteur de 250 mL et dans un réacteur de 1 L (Tableau 67).

**Tableau 67: Conditions opératoires d'élaboration de nanoparticules de PLA par nanopréciipitation dans des réacteurs de 250 mL ou de 1 L.**

<b>Paramètres</b>	<b>Réacteur (250 mL)</b>	<b>Réacteur (1 L)</b>
Concentration en PLA (g/L)	10	10
Concentration en DexC <sub>6</sub> (g/L)	10	5
Volume de la phase organique (mL)	57	262
Volume de la phase aqueuse (mL)	113	523
Rapport volumique (phase organique/phase aqueuse)	1/2	1/2
Durée de l'ajout de la phase organique dans la phase aqueuse (s)	15	15
Position de l'hélice (distance entre les pales de l'hélice et le fond du réacteur) (cm)	2	3,5
Vitesse d'agitation (rpm)	600	430
Durée de l'agitation (min)	20	20
Évaporation de solvant (conditions)	sous vide, à T = 40°C, à 300 rpm, pendant 2h	sous vide, à T = 40°C, à 430 rpm, pendant 3h

Les nanoparticules élaborées dans ces réacteurs présentent des distributions de tailles monomodales bien définies (Figure 144, Tableau 68) et superposables avec les distributions des nanoparticules de PLA élaborées à petite échelle (Figure 143, Tableau 66).



**Figure 144 : Granulométrie des nanoparticules de PLA élaborées par nanopréciipitation dans un réacteur de 250 mL ( $C_{PLA} = 10$  g/L,  $C_{DexC6} = 10$  g/L,  $V_{aq} = 113$  g/L,  $V_{org} = 57$  g/L, vitesse d'agitation = 600 rpm, durée d'agitation = 20 min) et de 1 L ( $C_{PLA} = 10$  g/L,  $C_{DexC6} = 5$  g/L,  $V_{aq} = 523$  mL,  $V_{org} = 262$  mL, vitesse d'agitation = 430 rpm, durée d'agitation = 20 min)**

**Tableau 68 : Distribution de taille et taux de recouvrement en dextrane modifié des nanoparticules de PLA élaborées avec un réacteur de 250 mL ( $C_{PLA} = 10$  g/L,  $C_{DexC6} = 10$  g/L,  $V_{aq} = 113$  g/L,  $V_{org} = 57$  /L, vitesse d'agitation = 600 rpm, durée d'agitation = 20 min) et de 1 L ( $C_{PLA} = 10$  g/L,  $C_{DexC6} = 5$  g/L,  $V_{aq} = 523$  mL,  $V_{org} = 262$  mL, vitesse d'agitation = 430 rpm, durée d'agitation = 20 min)**

Volume du réacteur (mL)	d(0,5) <sup>a</sup> (nm)	D[3,2] <sup>a</sup> (nm)	Span <sup>a</sup>	$\Gamma (\pm 0,5)$ <sup>b</sup> (mg DexC <sub>6</sub> /m <sup>2</sup> )
250	151	142	0,72	2,3
1000	171	166	0,47	2,1

a: Après lavages des particules

b: Taux de recouvrement des nanoparticules en dextrane modifié calculé à partir de l'analyse RMN <sup>1</sup>H des nanoparticules (Cf.chapitre 2- paragraphe- 2.2.5.1)

Le montage mis au point permet d'évaporer le solvant et de concentrer la suspension en nanoparticules. En effet, dans ces conditions, une partie de l'eau est alors évaporée simultanément avec l'acétone permettant ainsi de récupérer une suspension de nanoparticules plus concentrée.

L'extrapolation de la nanopréciipitation a donc été réalisée avec succès et nous avons pu montrer que des nanoparticules de taille maîtrisée avec des distributions de taille monomodales ont été obtenues. Les résultats obtenus confirment que les nanoparticules élaborées à plus grande échelle présentent les mêmes caractéristiques que celles obtenues à petite échelle.

**b) Nanoparticules de PLA/GN**

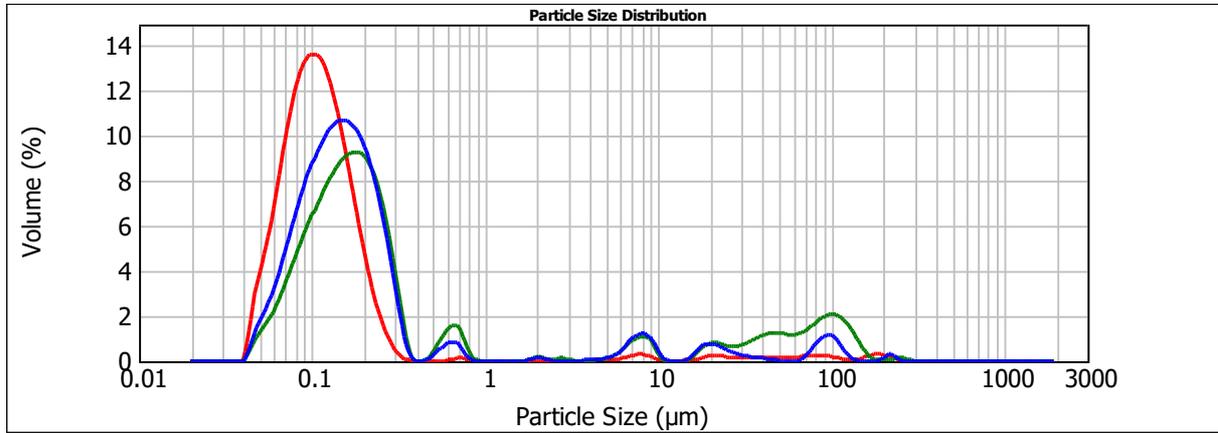
***i. Etude paramétrique de l'élaboration des nanoparticules***

Nous nous sommes intéressés à évaluer l'influence du changement d'échelle sur l'élaboration de particules de PLA chargées en GN. Dans le chapitre 5, nous avons montré que, pour une fraction massique initiale en GN introduite dans la phase organique ( $W_{GN \text{ initiale}} = 20 \%$ ), les nanoparticules se redispersent bien après lavages et présentent des distributions de tailles monomodales. Comme dans le cas des particules élaborées à l'échelle du laboratoire, différents essais ont été réalisés dans le but d'encapsuler la plus grande quantité de GN possible, en fondant notre démarche sur les conditions déjà définies à l'échelle laboratoire. La concentration en dextrane modifié et la  $W_{GN \text{ initiale}}$  ont été maintenues respectivement à 8 g/L et 20 % massique. Le rapport des phases organique/aqueuse a été augmenté de 0,5 à 1, dans le but d'augmenter la quantité produite pour chaque lot. Les conditions optimales testées sont présentées dans le Tableau 69.

**Tableau 69 : Conditions optimales utilisées pour l'élaboration de nanoparticules de PLA/GN ( $W_{GN\text{initiale}} = 20 \%$ ) à l'échelle pilote (1 L).**

Paramètres	Caractéristiques
Volume du réacteur (L)	1
Concentration en PLA (g/L)	8
Concentration en GN (g/L)	2
Concentration en DexC <sub>6</sub> (g/L)	8
Volume de la phase organique (mL)	393
Volume de la phase aqueuse (mL)	393
Rapport volumique (phase organique/phase aqueuse)	1/1
Durée de l'ajout de la phase organique dans la phase aqueuse (s)	20
Position de l'hélice (distance entre les pales de l'hélice et le fond du réacteur) (cm)	3,5
Vitesse d'agitation (rpm)	430
Durée de l'agitation (min)	20
Conditions d'évaporation du solvant	sous vide, à T = 40°C, à 300 rpm, pendant 2h30
Masse de tréhalose (ajoutée avant lyophilisation) (g/g de suspension)	4

Les nanoparticules élaborées sont lavées par centrifugation puis caractérisées en termes de taille, distribution de tailles et aptitude à la redispersion après lyophilisation (Figure 145, Tableau 70).



**Figure 145 : Distributions granulométriques des nanoparticules de PLA/GN élaborées par nanopréciptation à l'échelle de 1 L : (-) avant lavages (-) après lavages (-) après lyophilisation** ( $W_{GN\text{ initiale}} = 20\%$ ,  $C_{PLA} = 8\text{ g/L}$ ,  $C_{GN} = 2\text{ g/L}$ ,  $C_{DexC6} = 8\text{ g/L}$ ,  $V_{aq} = 393\text{ mL}$ ,  $V_{org} = 393\text{ mL}$ , vitesse d'agitation = 430 rpm, durée d'agitation = 20 min).

**Tableau 70 : Tailles des nanoparticules PLA/GN élaborées par nanopréciptation à l'échelle de 1 L mesurées : avant lavages, après lavages, après lyophilisation** ( $W_{GN\text{ initiale}} = 20\%$ ,  $C_{PLA} = 8\text{ g/L}$ ,  $C_{GN} = 2\text{ g/L}$ ,  $C_{DexC6} = 8\text{ g/L}$ ,  $V_{aq} = 393\text{ mL}$ ,  $V_{org} = 393\text{ mL}$ , vitesse d'agitation = 430 rpm, durée d'agitation = 20 min).

	Avant lavages	Après lavages	Après lyophilisation
<b>d(0,5) (nm)</b>	107	187	151
<b>D[3,2] (nm)</b>	99	169	136

Une augmentation de quelques dizaines de nanomètre a été observée après redispersion des particules lavées ou lyophilisées. Au cours de la centrifugation, certaines particules peuvent coalescer par collision des nanoparticules provoquant ainsi une augmentation irréversible de la taille. La présence d'agrégats, peut être attribuée à une durée de redispersion aux ultrasons insuffisante pour bien redisperser la totalité des nanoparticules. Par faute de temps cette hypothèse n'a pas été vérifiée expérimentalement.

L'analyse RMN  $^1\text{H}$  de ces nanoparticules nous a permis de déterminer le taux d'encapsulation, la quantité de GN encapsulée par gramme de PLA ainsi que la fraction massique en GN encapsulée dans les nanoparticules (Tableau 71).

**Tableau 71 : Masse de GN encapsulé, taux d'encapsulation et fraction massique du GN encapsulé dans les nanoparticules de PLA/GN élaborées par nanopréciipitation à l'échelle de 1 L ( $W_{GN\text{ initiale}} = 20\%$ ,  $C_{PLA} = 8\text{ g/L}$ ,  $C_{GN} = 2\text{ g/L}$ ,  $C_{DexC6} = 8\text{ g/L}$ ,  $V_{aq} = 393\text{ mL}$ ,  $V_{org} = 393\text{ mL}$ , vitesse d'agitation = 430 rpm, durée d'agitation = 20 min).**

$W_{GN\text{ initiale}}^a$ (%)	Masse de GN encapsulé (mg/gPLA)	TE <sup>b</sup> (%)	$W_{GN\text{ dans les NP}}^c$ (%)
20	136	60	12

a : Fraction massique du GN introduit initialement dans la phase organique

b : Taux d'encapsulation calculé à partir du rapport massique entre le GN encapsulé et la masse de GN initialement introduite dans la phase aqueuse

c : Fraction massique du GN encapsulé dans le cœur des nanoparticules de PLA

La masse optimale de GN encapsulée dans les nanoparticules de PLA est égale à 136 mg /g PLA. Cette quantité est beaucoup plus importante que la quantité maximale encapsulée dans des nanoparticules élaborées à l'échelle du laboratoire dans les conditions les plus favorables (80 mg / g PLA cf. chapitre 5 - paragraphe 5.3.5). Cette différence peut être attribuée aux conditions opératoires. L'utilisation d'un rapport équivalent entre la phase organique et la phase aqueuse peut limiter les pertes en SA. En effet, pour un tel rapport volumique (1/1), la quantité nécessaire pour saturer la phase aqueuse en GN est deux fois plus faible que celle nécessaire pour saturer une phase aqueuse de volume deux fois plus important (rapport volumique  $V_{org}/V_{aq}$  utilisé à l'échelle du laboratoire est 1/2).

Cette différence n'est probablement pas liée à la différence de cristallinité entre les deux polymères utilisés. En effet, des essais préliminaires ont été effectués à l'échelle du laboratoire en élaborant des nanoparticules de PLA/GN par nanopréciipitation et en ne variant que la nature du PLA utilisé (PLA<sub>Sigma aldrich</sub> et le PLA<sub>Natureplast</sub>). Ces essais conduisent à des résultats comparables (Tableau 72).

**Tableau 72 : Caractéristiques des nanoparticules de PLA/GN élaborées par nanoprécipitation à l'échelle du laboratoire en utilisant le PLA<sub>Aldrich</sub> et le PLA<sub>Natureplast</sub>**  
*(Phase organique :  $W_{GN\text{initiale}} = 20 \%$ , quantité de matière totale PLA+GN égale à 50 mg,  $V_{\text{acétone}} = 5 \text{ mL}$  d'acétone, phase aqueuse : 10 mL de solution aqueuse de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  10 g/L).*

PLA	d(0,5) <sup>a</sup> (nm)	D[3,2] <sup>a</sup> (nm)	Span <sup>a</sup>	Masse de GN encapsulée (mg/gPLA)	TE <sup>b</sup> (%)	W <sub>GN</sub> dans les NP <sup>c</sup> (%)
Aldrich <sup>®</sup>	134	118	1,17	32	13	3,1
Natureplast <sup>®</sup>	137	118	1,51	35	14	3,4

a : Après lavages des nanoparticules

b : Taux d'encapsulation représentant le rapport massique entre le GN encapsulé et la masse de GN initialement introduite dans la phase aqueuse

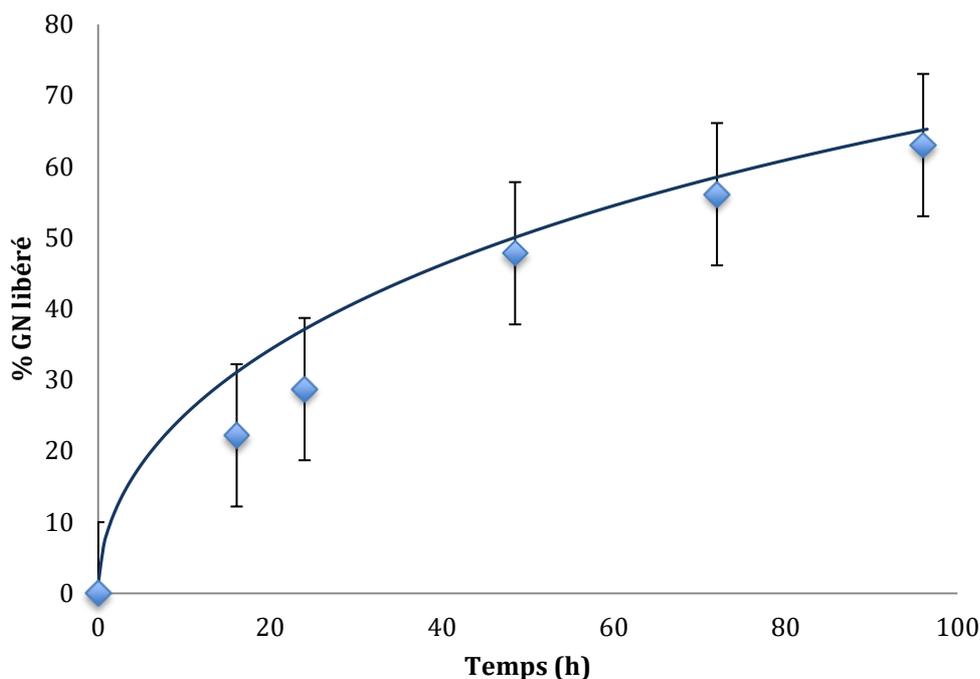
c : Fraction massique du GN encapsulé dans le cœur des nanoparticules de PLA

## ii. Suivi de la cinétique de libération

Nous avons suivi la cinétique de libération du GN à partir des nanoparticules PLA/GN élaborées à l'échelle pilote dans un réacteur de 1 L et dont les caractéristiques sont détaillées dans les Tableau 70 ainsi que le Tableau 71.

Comme dans le cas des nanoparticules élaborées à l'échelle du laboratoire, la cinétique de libération du GN a été suivie expérimentalement par la méthode indirecte (Cf. chapitre 2 - paragraphe 2.2.6.1) (Figure 146).

La courbe calculée à partir de l'équation décrivant la diffusion du GN dans la matrice de PLA décrit convenablement les points expérimentaux ce qui confirme comme dans le cas des nanoparticules élaborées à l'échelle du laboratoire que la diffusion de la SA à travers la matrice de PLA est l'étape qui limite la libération. Le coefficient de diffusion du GN dans ces nanoparticules est égal à  $1,3 \times 10^{-21} \text{ m}^2/\text{s}$ . Cette valeur est proche de celles obtenues avec des nanoparticules préparées à l'échelle du laboratoire avec un PLA amorphe (entre  $0,7$  et  $2 \times 10^{-21} \text{ m}^2/\text{s}$ ).



**Figure 146: Profil de libération du GN à partir des nanoparticules PLA/GN élaborées par nanopréciipitation à l'échelle de 1 L en fonction du temps : (◆) profil expérimental suivi par méthode indirecte, (—) courbe théorique calculée à partir de l'Eq.9 (Cf. Chapitre 5) avec un  $D = 1,25 \times 10^{-21} \text{ m}^2/\text{s}$  et un  $D [3,2] = 169 \text{ nm}$  ( $W_{GN\text{initiale}} = 20 \%$ ,  $C_{PLA} = 8 \text{ g/L}$ ,  $C_{GN} = 2 \text{ g/L}$ ,  $C_{DexC6} = 8 \text{ g/L}$ ,  $V_{aq} = 393 \text{ mL}$ ,  $V_{org} = 393 \text{ mL}$ , vitesse d'agitation = 430 rpm, durée d'agitation = 20 min).**

### 6.3. Efficacité du traitement sur les cyanobactéries

L'objectif de notre travail était d'élaborer les vecteurs de SA nano- et micrométriques qui permettent de maîtriser l'encapsulation et la libération de SA algicides. Une fois ces objectifs atteints, il était nécessaire de tester l'efficacité de ces particules sur des milieux de cultures contenant les algues à traiter.

#### 6.3.1. Procédure expérimentale

Les essais de toxicité du GN encapsulé dans les nanoparticules de PLA/GN (élaborées par nanopréciipitation à l'échelle laboratoire et pilote, en utilisant un  $W_{GN\text{initiale}}=20\%$ ) ont été effectués par la société FP.Environnement (société partenaire dans le projet BioCapTech). Les nanoparticules ont été fournies à FP.Environnement sous forme lyophilisée en présence de tréhalose. Dans le cas des échantillons élaborés à l'échelle laboratoire, 1 gramme d'échantillon

contient 6,4 mg de GN. Dans le cas des échantillons élaborés à l'échelle pilote, 1 g de particules contient 120 mg de GN.

La composition du milieu de culture utilisé est détaillée dans le Tableau 73. Le milieu de culture Z8 a été préparé le jour même et filtré sur un filtre d'acétate de cellulose (0,2 µm).

**Tableau 73 : Composition du milieu de culture Z8.**

Produits	Concentration (mg/L)	Masse en mg pour un volume de 5 L
<b>KNO<sub>3</sub></b>	202	1010
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	50,3	251,5
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	27,8	139
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	17,4	87
<b>MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O</b>	49,6	248
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	11,1	55,5
<b>FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O</b>	6	30
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	5,72	28,6
<b>MnCl<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O</b>	2,82	14,1
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	0,6	3
<b>(NH<sub>4</sub>)Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 4 H<sub>2</sub>O</b>	0,043	0,215
<b>CuCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O</b>	0,078	0,39
<b>CoCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O</b>	0,054	0,27

Les expériences sont réalisées dans un milieu de culture présentant une abondance en cyanobactéries (*Anabaena flos aquae*) entre 1835607 et 4301153 cellules par mL. La culture d'*Anabaena flos-aquae* a été développée à partir d'une souche du commerce.

En se basant sur des tests de toxicité aiguë sur l'*Anabaena flos-aquae* en présence de GN non encapsulé et sur les données de cinétique de libération du GN encapsulée dans les nanoparticules de PLA, une série d'expériences a été réalisée en variant la masse de particules initialement introduite dans le milieu de culture.

### 6.3.2. Evaluation de l'efficacité de l'utilisation des nanoparticules élaborées à l'échelle du laboratoire sur le traitement des invasions algales

Les expériences ont été réalisées dans 50 mL de milieu de culture. Une suspension mère de nanoparticules (1g d'échantillon (nanoparticules + tréhalose) contenant 6,4 mg de GN dilué dans 200 mL) est préparée. La suspension mère de particules est ensuite diluée (Tableau 74) et l'évolution du nombre de cellules d'*Anabaena* en fonction du temps d'exposition dans les solutions préparées est suivie au cours du temps.

**Tableau 74 : Composition des solutions utilisées pour l'étude de l'effet algicide.**

Lot	Volume solution tampon (mL)	Volume suspension mère (mL)	Masse GN Encapsulée (mg)	Concentration GN encapsulé (à $t_0$ ) ( $10^{-2}$ g/L)
Témoin	50,0	0,0	0,0	0,0
1	0,0	50,0	1,6	3,20
2	11,5	38,5	1,2	2,5
3	20,4	29,6	0,9	1,9
4	27,2	22,8	0,7	1,5
5	32,5	17,5	0,6	1,1
6	36,5	13,5	0,4	0,9
7	39,7	10,3	0,3	0,7

L'évolution de l'abondance en nombre de cellules d'*Anabaena* en fonction du temps d'exposition et de la concentration en GN sont présentés dans la Figure 147. La concentration en GN libérée dans le milieu de culture a été calculée à partir des coefficients de diffusion du GN présentés dans le chapitre 5. Il ne s'agit ici que des résultats préliminaires. Il sera nécessaire de déterminer expérimentalement les concentrations en SA libérée.

Par rapport au témoin (une culture d'*Anabaena* sans nanoparticules), pour lequel une augmentation continue du nombre de cellules est observée, tous les autres lots exposés aux nanoparticules présentent une évolution distincte du nombre de cellules. Considérons en premier le cas du lot 7, après une faible diminution au bout de 24 h puis une stagnation jusqu'à 48 h, une légère reprise de la multiplication cellulaire est observée entre 48 et 72 h sans revenir à l'effectif

noté à  $t_0$ ; il y a donc un effet algistatique. Cet effet algistatique commence à une concentration d'environ 5 mg/L de GN dans le milieu, atteinte après 48 h. Les observations réalisées avec les lots 4, 5 et 6 sont cohérentes avec cette valeur, puisque pour ces 3 lots une constance du nombre de cellules est observée entre 0 et 24 h, or la concentration du GN libérée dans ces 3 cas dépasse 5 mg/L dans ce même intervalle de temps. Pour tous les autres lots (n°1 à 3), le nombre de cellules a déjà fortement diminué au bout de 24 h (temps au bout duquel, pour ces trois lots la concentration en GN libéré est supérieure ou égale à 10 mg/L). Cette diminution se poursuit et après 48 h, le nombre de cellules devient nul dans les lots n°1 et 2, ce qui nous amène à estimer la concentration létale CL100 à 18 mg/L.

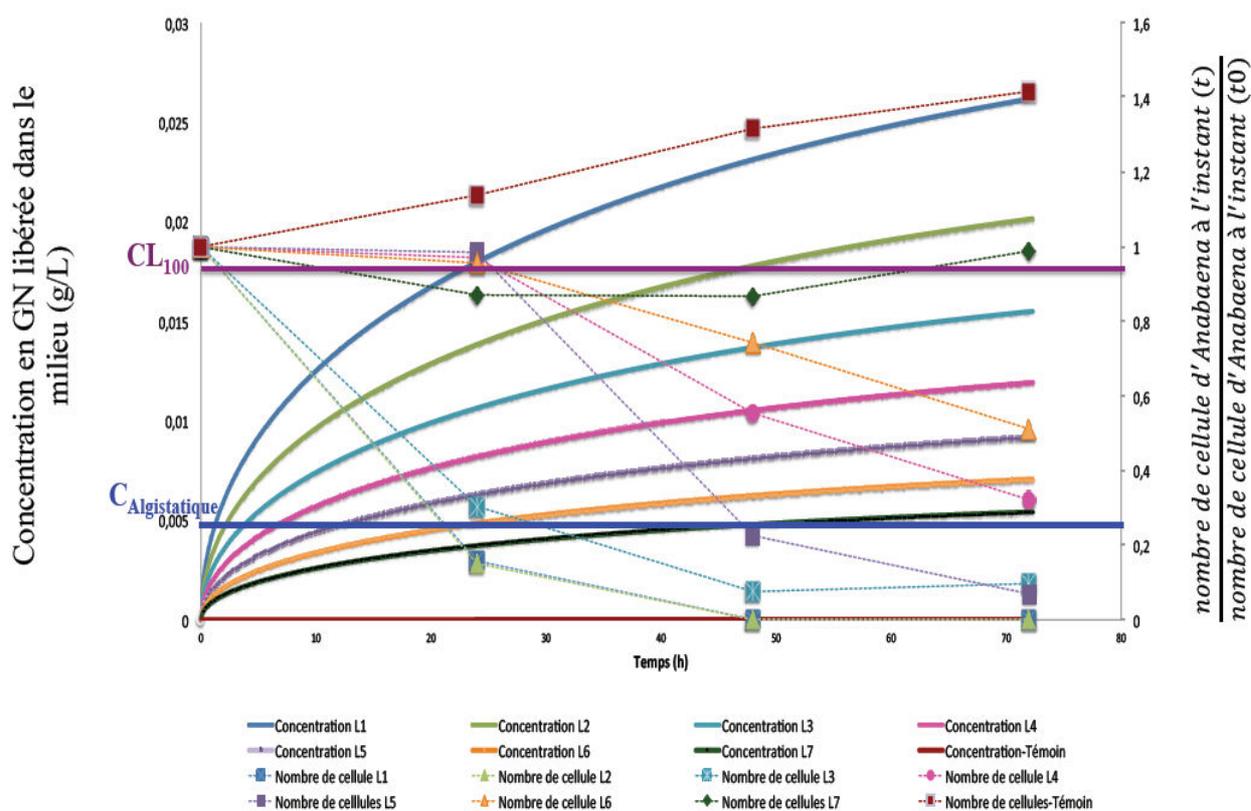


Figure 147 : Influence de la concentration en GN libérée dans le milieu de culture à partir des nanoparticules de PLA/GN (élaborées à l'échelle du laboratoire) sur le nombre de cellules d'Anabaena présentes dans le milieu- Lignes horizontales : Estimation des concentrations en GN pour lesquelles un effet algistatique (-) et un effet 100% létal (-) sont observés

D'après ces résultats, nous avons pu remonter à la quantité de nanoparticules nécessaire pour traiter 1 m<sup>3</sup> d'eau sachant que pour 1g d'échantillon de nanoparticules utilisé 6,4 mg de GN s'y trouve encapsulées:

- 260 g d'échantillon de nanoparticules sont nécessaires pour avoir un effet algistatique (5 mg/L de GN après 48 h).
- 960 g d'échantillon de nanoparticules sont nécessaires pour avoir un effet algicide 100 % létal au bout de 48h (18 mg/L de GN après 48 h).

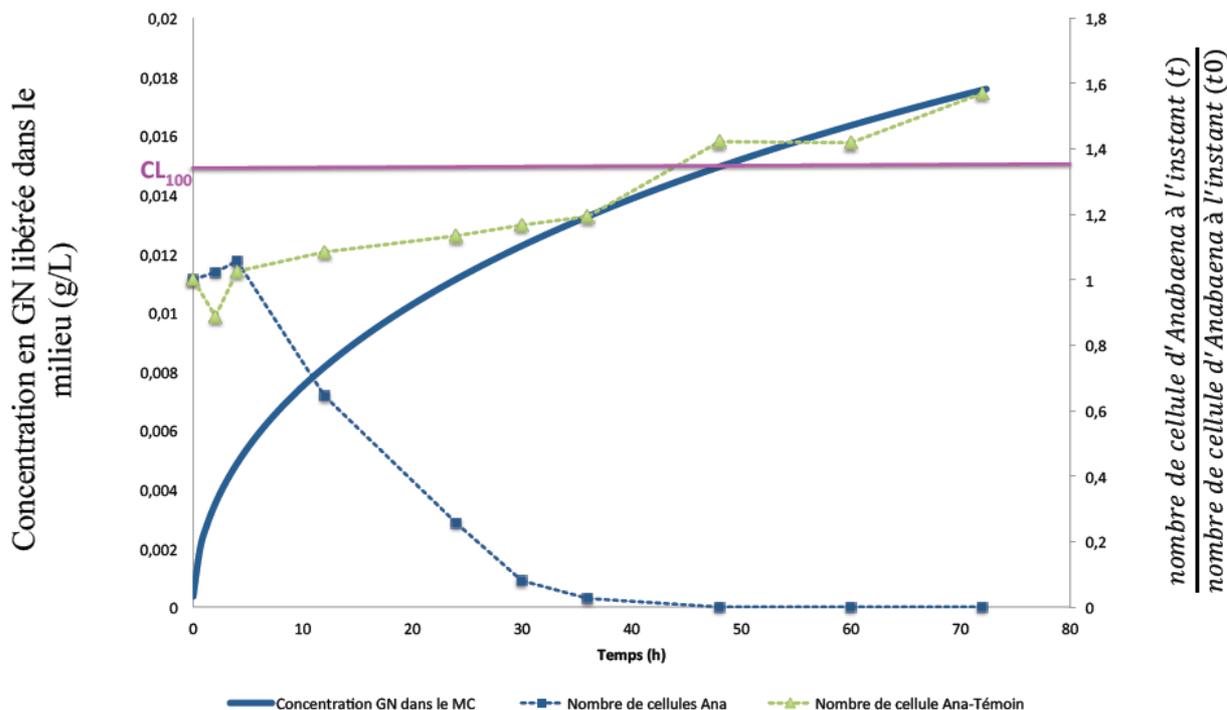
Ces estimations montrent qu'il faut des volumes réactionnels très importants pour traiter un volume d'eau assez faible. Ainsi, il faut encapsuler plus de GN dans les objets a fin de pouvoir envisager de les transposer à l'échelle industrielle.

### **6.3.3. Evaluation de l'efficacité de l'utilisation des nanoparticules élaborées à l'échelle pilote sur le traitement des invasions algales**

De la même manière, un lot de nanoparticules PLA/GN élaborées à l'échelle pilote a été fourni à FP. Environnement pour suivre sont activité sur des cultures d'*Anabaena flos aquae*.

Le suivi de libération a été réalisé pendant 72 h. Pour cela, 9 Erlen de 50 mL contenant une culture d'*Anabaena flos aquae* présentant une abondance cellulaire entre 2.093.591 et 2.610.880 cellules par mL. Les 50 mL de milieux de culture sont prélevés à partir d'une solution mère de milieu de volume 500 mL contenant 125 mg de nanoparticules chargées à 12% en GN.

L'évolution de l'abondance en nombre de cellules d'*Anabaena* en fonction du temps d'exposition et de la concentration en GN libérée dans le milieu de culture sont présentées dans la Figure 148. La concentration en GN libérée a été calculée à partir du coefficient de diffusion du GN présenté dans le paragraphe 6.2.2.2.b)- ii qui est égal à  $1,3 \times 10^{-21} \text{ m}^2/\text{s}$ .



**Figure 148 : Influence de la concentration en GN libérée dans le milieu de culture à partir des nanoparticules de GN/PLA (élaborées à l'échelle pilote) sur le nombre de cellules d'Anabaena présentes dans le milieu de culture. Ligne horizontale : Estimation de la concentration en GN pour laquelle un effet 100% létal (-) est observé.**

Le suivi de l'abondance cellulaire dans les milieux de culture montre qu'au bout de 12 h un effet algicide est observé. Un effet 100% létal est quand à lui obtenu à partir 48 h. La CL 100 obtenue lorsque des nanoparticules PLA/GN élaborées à l'échelle pilotes sont utilisées est de l'ordre de 15 mg/L. Cette valeur est comparable à celle observée lorsque des nanoparticules PLA/GN élaborées à l'échelle du laboratoire sont utilisées (18 mg/L).

Ces résultats confirment que les nanoparticules de PLA, chargées en GN et élaborées aussi bien à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle pilote, présentent sont toutes les deux efficaces contre la prolifération des cyanobactéries. En effet, ces résultats confirment que le changement d'échelle n'a pas d'influence sur la cinétique de libération (cf. paragraphe 6.2.2.2.(b)).

## 6.4. Conclusion

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'extrapolation du procédé d'élaboration de nanoparticules de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote ainsi qu'à l'évaluation de l'efficacité de l'utilisation des nanoparticules GN/PLA pour le traitement des milieux aqueux contenant des cyanobactéries.

L'élaboration de nanoparticules de PLA chargées ou non avec du GN ( $W_{GN\text{initiale}} = 20 \%$  massique), dans des réacteurs de 250 mL et de 1 L, a été mise au point. Les nanoparticules présentent des tailles, des distributions de tailles et des taux de recouvrement comparables à ceux obtenus à l'échelle du laboratoire. La seule différence observée concerne la quantité de SA encapsulée qui est plus importante dans le cas des nanoparticules élaborées à l'échelle pilote (136mg / gPLA) qu'à l'échelle laboratoire (80 mg / gPLA). Cette différence a été attribuée, non pas au changement d'échelle, ni à la nature du PLA utilisé (amorphe pour l'échantillon utilisé à l'échelle du laboratoire et semi-cristallin à l'échelle du pilote). La principale différence pouvant expliquer ce résultat est la modification du rapport des phases organique / phase aqueuse/ (0,5 dans le premier cas et 1 dans le second).

La libération du GN à partir des nanoparticules de GN/PLA élaborées à l'échelle pilote (1 L) a été suivie au cours du temps. Le profil calculé modélise bien le profil expérimental établi à partir du suivi de la libération du GN. Le coefficient de diffusion déterminé est égal à  $1,3 \times 10^{-21} \text{m}^2/\text{s}$ . Ce coefficient est du même ordre de grandeur que celui obtenu pour les nanoparticules élaborées à l'échelle du laboratoire.

Dans le but d'évaluer l'efficacité de l'utilisation de ces vecteurs de SA sur la prolifération algale, des essais *in vivo* ont été réalisés par la société FP.Environnement. Des lots de nanoparticules de PLA/GN élaborées à l'échelle du laboratoire et à l'échelle pilote ont été testés. Les quantités de nanoparticules nécessaires pour  $1 \text{ m}^3$  d'eau ont été estimées en se basant sur les profils de libération du GN encapsulé et par la suite sur les concentrations en GN libérées dans le milieu de culture permettant d'obtenir un effet algistatique ou algicide.

## 6.5. Références bibliographiques

1. Reis, C.P., R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, and F. Veiga, *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 2006. **2**(1): p. 8-21.
2. Desai, N., *Challenges in Development of Nanoparticle-Based Therapeutics*. Aaps Journal, 2012. **14**(2): p. 282-295.
3. Kaur, I.P., V. Kakkar, P.K. Deol, M. Yadav, M. Singh, and I. Sharma, *Issues and concerns in nanotech product development and its commercialization*. Journal of Controlled Release, 2014. **193**: p. 51-62.
4. Briançon, S., H. Fessi, F. Lecomte, and L. J., *Study of an original production process of nanoparticles by precipitation*. 1999.
5. Galindo-Rodriguez, S.A., F. Puel, S. Briancon, E. Allemann, E. Doelker, and H. Fessi, *Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **25**(4-5): p. 357-367.
6. Vauthier, C. and K. Bouchemal, *Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles*. Pharmaceutical Research, 2009. **26**(5): p. 1025-1058.
7. Khayata, N., W. Abdelwahed, M.F. Chehna, C. Charcosset, and H. Fessi, *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): p. 419-427.
8. Ephrem, E., H. Greige-Gerges, H. Fessi, and C. Charcosset, *Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process*. Journal of Microencapsulation, 2014. **31**(8): p. 746-753.
9. Chang, E.P., *Controlled emulsion droplet solvent evaporation for particle production*. 2013, Thèse de doctorat de Massachusetts Institute of Technology.
10. Quintanar-Guerrero, D., E. Allemann, H. Fessi, and E. Doelker, *Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **188**(2): p. 155-164.
11. Aimar, P., *Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Mise en oeuvre et performances*. s.l. : Technique de l'ingénieur, 2006, Référence w4110.
12. Charreau, A. and R. Cavaillé, *Séchage. Appareillage et choix d'un procédé*. 1991, Techniques de l'ingénieur, Référence J2482.





*Conclusion générale  
et perspectives*



La prolifération algale dans les systèmes lenticques est un phénomène néfaste qui menace l'équilibre des écosystèmes. Afin de limiter son impact sur l'environnement, plusieurs types de traitements sont actuellement utilisés (mécaniques ou chimiques, à base de molécules de synthèse ou naturelles ...). Sur la base des traitements naturels existants, nous nous sommes intéressés à la conception de solutions innovantes et éco-durables pour lutter contre les invasions algales.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons développé une famille de vecteurs particuliers chargés en substances actives (SA) algicides (certaines sont déjà utilisées comme additifs alimentaires et cosmétiques), et élaborés à partir de matériaux biocompatibles/biodégradables : poly(acide lactique) PLA et dextrane amphiphile (DexC<sub>6</sub>-τ). L'objectif visé dans ce travail consistait à élaborer des particules nano- et micrométriques, dans un large domaine de tailles (0,1 μm- 1000 μm), avec des propriétés bien maîtrisées. En effet, la variation de la taille des particules joue un rôle important aussi bien sur la quantité de SA encapsulée que sur son profil de libération. Ainsi, en fonction de leurs tailles, ces particules pourraient être utilisées, contre la prolifération algale à des fins curatives (libération d'une quantité importante de SA sur une courte période de temps) ou préventives (libération de SA en quantité moindre sur une période de temps beaucoup plus longue).

Nous avons, dans un premier temps, étudié de manière systématique l'obtention de nano- et microparticules de PLA recouvertes de DexC<sub>6</sub>-τ avec des tailles et des morphologies bien définies. L'élaboration de nanoparticules dans le domaine de taille 0,1 μm - 1 μm a été réalisée en utilisant aussi bien un procédé peu énergétique (nanoprécipitation) qu'un procédé plus énergétique l'émulsion-évaporation de solvant (E-ES). Des nanoparticules de diamètres compris entre environ 100 et 200 nm ont été aisément obtenues par ces deux procédés. La lyophilisation des suspensions de nanoparticules est ensuite nécessaire pour permettre leur conservation lors du stockage. L'ajout d'un cryoprotecteur (le tréhalose à raison de 10 mg / mL de suspension) est indispensable pour assurer une bonne redispersion de ces nanoparticules après la lyophilisation. La stabilité colloïdale dans des solutions salines a été démontrée jusqu'à une concentration en NaCl égale à 1 M à condition que le polysaccharide amphiphile utilisé ait un taux de modification inférieur à 20 %.

Il ne nous a pas été possible d'obtenir des particules ayant des distributions de tailles étroites dans le domaine 1 μm – 100 μm avec des procédés discontinus comportant une étape d'émulsification par agitation mécanique. Par contre, des particules de tailles comprises entre 100 et 1000 μm ont pu être élaborées avec succès par E-ES, avec émulsification par agitation

magnétique. Les microparticules obtenues sont stables lors des étapes de lavages et se redispersent facilement après lyophilisation, sans nécessité d'ajouter un cryoprotecteur.

Pour remédier au problème d'élaboration de particules dans le domaine de taille 1  $\mu\text{m}$  - 100  $\mu\text{m}$ , nous avons mis au point un procédé d'émulsion-diffusion de solvant (E-SD) avec l'utilisation en continu d'un système microfluidique dans lequel l'émulsion est formée. Ce procédé a été utilisé pour la première fois pour les systèmes PLA / DexC<sub>6</sub>- $\tau$ . Brièvement, le procédé comporte trois étapes : la préparation du système microfluidique en PDMS par un traitement de surface adéquat pour rendre hydrophile la surface des canaux, l'émulsification dans le microsystème et la formation des particules lors d'une étape de diffusion dans un volume d'eau adapté.

Nous avons montré que la mise en contact préalable du microsystème avec la solution de polysaccharide amphiphile pendant une durée suffisante (24 h) permettait d'obtenir un état de surface du PDMS convenable pour la réalisation de l'étape d'émulsification. Nous avons également montré que l'usage d'un traitement chimique (associant mélange piranha et solution de KOH) conduisait beaucoup plus vite à un état de surface convenable. Cependant, la présence du polysaccharide amphiphile permet de maintenir cette hydrophilie beaucoup plus longtemps qu'avec le seul traitement chimique. Des microparticules avec des diamètres voisins de 20  $\mu\text{m}$  et des distributions de tailles étroites ont été obtenues avec ce procédé. Ces microparticules sont stables durant les étapes de lavages et les suspensions peuvent être lyophilisées et reconstituées sans addition de cryoprotecteur.

L'acide gallique ainsi que certains de ses esters (des gallates de n-alkyle) ont été choisis comme molécules modèles à encapsuler dans les particules de PLA recouvertes de dextrane modifié. Finalement, après examen des solubilités dans l'eau et de la compatibilité avec le PLA, les SA retenues pour notre étude sont le gallate d'octyle (GO) et le gallate de nonyle (GN).

Des nanoparticules chargées ont été élaborées aussi bien par nanopréciipitation que par E-ES. Il s'est avéré qu'il était possible d'encapsuler aussi bien le GO que le GN. Les quantités de GO maximales encapsulées sont plus élevées par E-ES que par nanopréciipitation. Alors que, dans le cas du GN, les quantités maximales encapsulées sont équivalentes et sont indépendante du procédé utilisé.

Cependant, quel que soit le procédé utilisé et dans toutes les conditions étudiées, une augmentation trop importante de la quantité de SA encapsulée ( $W_{SA} \geq 10 \%$ ) conduit à une

agrégation irréversible des nanoparticules formées lors des lavages par centrifugation. Le problème de redispersion a été attribué à l'abaissement de la  $T_g$  du mélange SA/PLA.

Les cinétiques de libération du GO et GN à partir de ces nanoparticules de PLA ont été établies. Selon les cas, entre 60 et 80 % de la SA est libérée au bout de 4 jours. La vitesse de libération est limitée par l'étape de diffusion dans le cœur des nanoparticules. Dans tous les cas, la libération du GN est plus lente que celle du GO. Par ailleurs, la libération des SA à partir de nanoparticules préparées par nanoprécipitation est toujours un peu plus rapide que celle des SA encapsulées dans des nanoparticules préparées par E-ES.

Dans les microparticules chargées en SA préparées par E-DS avec émulsification dans un système microfluidique, les quantités de SA encapsulées et les taux de charges en SA obtenus sont faibles. Ceci s'explique par la grande dilution de la phase organique contenant le mélange PLA/SA dans la phase aqueuse, condition qui favorise la solubilisation de la SA dans la phase aqueuse. Le suivi de la libération de SA à partir des microparticules élaborées par ce procédé n'a pas pu être effectué.

Dans le cas des particules préparées par le procédé d'E-ES avec émulsification par agitation magnétique (diamètre d'environ 500  $\mu\text{m}$ ), les rendements d'encapsulation sont quasi-quantitatifs et les taux de charges en SA (GO ou GN) sont assez élevés. Les conditions d'émulsification sont en fait beaucoup plus favorables à l'encapsulation de la SA (200 mg SA/PLA pour 4 mL de DexC<sub>6</sub>, 5g/L), par rapport aux conditions d'émulsification utilisées dans le procédé par microfluidique. Ceci s'explique, par la taille élevée des particules et donc par une diffusion moins importante de la SA encapsulée vers le milieu environnant durant la formulation. Les microparticules chargées en GO ou GN se redispersent parfaitement après lavages et lyophilisation. La libération à partir de ces microparticules n'a pu être obtenue que dans un milieu à pH contrôlé (8,6). En effet, à ce pH et sur une durée de temps relativement longue (4 mois) une très faible dégradation du PLA et, surtout, un phénomène de gonflement des particules permettent d'augmenter la porosité de la matrice de PLA et donc d'accélérer la diffusion des SA. Comme dans le cas des nanoparticules, le GO diffuse plus rapidement que le GN.

Pour pouvoir commercialiser des produits à base des particules élaborées et caractérisées au cours de cette thèse, le passage de l'échelle laboratoire à une production à l'échelle industrielle est nécessaire. Pour cela, des études préliminaires de transposition de l'élaboration des nanoparticules de PLA à l'échelle pilote ont été menées. L'élaboration de nanoparticules de PLA chargées avec du GN ( $W_{\text{GN}}^{\text{initiale}} = 20\%$  massique) a été réalisée dans des réacteurs de 250 mL et de 1 L. Les nanoparticules préparées dans ces conditions présentent des tailles, des distributions de tailles et des taux de recouvrement comparables à ceux obtenus à petite échelle (25 mL). La

seule différence observée concerne la quantité de SA encapsulée qui est plus importante dans le cas des nanoparticules élaborées à l'échelle pilote (136 mg/ gPLA) qu'à l'échelle laboratoire (80 mg/ gPLA). Cette différence a été attribuée, ni au changement d'échelle, ni à la nature du PLA utilisé (amorphe à l'échelle du laboratoire et semi-cristallin à l'échelle du pilote), mais plutôt à la modification du rapport des phases organique / phase aqueuse (0,5 dans le premier cas et 1 dans le second) seule différence entre les procédés. La libération du GN à partir des nanoparticules de GN/PLA élaborées à l'échelle pilote (1L) a été suivie au cours du temps. Le profil théorique proposé modélise bien le profil expérimental. Le coefficient de diffusion déterminé ( $1,3 \cdot 10^{-21} \text{ m}^2/\text{s}$ ) est du même ordre de grandeur que celui obtenu pour les nanoparticules élaborées à l'échelle du laboratoire.

Afin d'évaluer l'efficacité de l'utilisation de ces vecteurs de SA sur la prolifération des cyanobactéries, des essais de cytotoxicité ont été réalisés par la société FP. Environnement sur des cellules d'*Anabaena flos aquae*. Des lots de nanoparticules de GN/PLA élaborées aussi bien à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle pilote ont été testés. L'efficacité de ces particules a été vérifiée et les quantités de nanoparticules nécessaires pour traiter  $1 \text{ m}^3$  d'eau ont pu être estimées. En considérant que pour 1 g d'échantillon (particules lyophilisées en présence de tréhalose), 6,4 mg de GN sont encapsulés, 260 g d'échantillon de nanoparticules sont alors nécessaires pour avoir un effet algistatique (ce qui correspond à 5 mg/L de GN libéré après 48 h) et 960 g d'échantillon de nanoparticules sont nécessaires pour avoir un effet algicide 100 % létal au bout de 48h (18 mg/L de GN libéré après 48 h) dans  $1 \text{ m}^3$  d'eau.

D'autre part, nous pouvons proposer quelques pistes pour des développements à venir. La production de particules dans le domaine  $1 \mu\text{m} - 100 \mu\text{m}$  par E-DS avec émulsification dans un système microfluidique demanderait plus d'études car il n'a pas été possible, dans le cadre de ce travail de thèse, d'approfondir la mise au point de ce procédé et de progresser dans la compréhension de certains phénomènes. De plus, le suivi de la libération de SA à partir de ces particules n'a pas pu être mené. Or ce domaine de taille pourrait représenter un bon compromis entre la vitesse de libération et la facilité de manipulation. Les microparticules du domaine  $100 \mu\text{m} - 1000 \mu\text{m}$  sont certainement les plus faciles à fabriquer et celles qui conduisent aux rendements d'encapsulation les plus élevés. Elles semblent les plus prometteuses pour conduire aux coûts de traitement les plus bas. Toutefois, il est nécessaire d'étudier davantage la cinétique de libération des SA à partir de ces particules.

Enfin, il est possible d'envisager l'utilisation d'un mélange constitué de 3 types particules de PLA recouvertes de DexC<sub>6</sub>- $\tau$  avec des tailles dans les domaines 1, 2 et 3. La variation des

fractions massiques des particules de chaque domaine de taille par mélange, serait un moyen d'adapter les cinétiques de libération de façon à avoir un effet régulé sur des durées de plusieurs mois. En fonction de l'état du milieu aquatique, des traitements spécifiques pourraient être proposés à des fins curatives, préventives ou encore à la fois curatives et préventives.

Finalement, le fait de disposer de vecteurs particuliers, obtenus à partir des mêmes matériaux, aux caractéristiques bien maîtrisées et couvrant une large gamme de tailles pourrait conduire à d'autres applications dans divers domaines comme par exemple la cosmétique ou l'agroalimentaire.



## Elaboration de nano- et microparticules pour l'encapsulation et la libération de molécules polyphénoliques ayant des applications dans le traitement de milieux aquatiques

---

### Résumé

Des particules constituées d'un cœur polymère polylactide (PLA), recouvertes d'une couche de polysaccharide adsorbé physiquement (dextrane hydrophobisé par des chaînes alkyle en C<sub>6</sub>, DexC<sub>6</sub>) et contenant des substances actives (SA) de type polyphénolique ont été élaborées par différents procédés physico-chimiques discontinus (nanoprécipitation et émulsion-évaporation de solvant) ou continus (procédé microfluidique d'émulsion-diffusion de solvant). L'extrapolation du procédé de nanoprécipitation de l'échelle laboratoire (25 mL) à l'échelle pilote (1 L) a été examinée.

Ces particules étaient destinées au traitement des milieux aquatiques, pour la lutte contre le développement des cyanobactéries et des algues.

Dans le but de maîtriser les caractéristiques des particules élaborées (distribution de taille, stabilité colloïdale, rendement d'encapsulation en SA ...), l'influence de paramètres physico-chimiques a été étudiée (concentration du PLA dans la phase organique, concentration du DexC<sub>6</sub> dans la phase aqueuse, rapport volumique des deux phases, fraction massique SA/PLA ...). Les procédés mis au point ont permis d'obtenir des particules dont les diamètres moyens allaient de 0,1 µm à 1 mm, avec des distributions granulométriques bien maîtrisées.

Ces objets ont été caractérisés en termes de taux de recouvrement en dextrane, de quantité de SA encapsulée et de morphologie. La stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules a été examinée dans des milieux de force ionique variable. Par ailleurs, nous avons vérifié la possibilité de redisperser les suspensions de particules après lyophilisation. Pour les nanoparticules, l'addition d'un cryoprotecteur s'est avérée indispensable.

Les cinétiques de libération des substances actives à partir des particules nano- et micrométriques ont également été suivies et les phénomènes limitant leur libération ont été identifiés.

Enfin, des essais sur des milieux de culture contenant des cyanobactéries ont été réalisés. Ils ont montré que la libération des SA conduisait à des effets algistatiques ou algicides selon les quantités utilisées.

**Mots clés :** nanoparticules, microparticules, polyester, polyphénols, encapsulation, cinétique de libération, microfluidique, nanoprécipitation, émulsion-évaporation de solvant

### Preparation of nano- and microparticles for encapsulation and release of polyphenolic molecules with applications in the treatment of aquatic media

---

#### Abstract

Polysaccharide-covered polyester particles were prepared. The core of particles was made of polylactic acid (PLA) while their surface was covered by dextran chains via the use of water-soluble randomly hydrophobized dextran (DexC<sub>6</sub>) as a polymeric stabilizer. Polyphenolic active substances were encapsulated inside those particles. Polyphenol loaded PLA particles were designed for preventing cyanobacterias and algae proliferation in aquatic media.

Conventional batch processes (nanoprecipitation or emulsion-solvent evaporation) and continuous processes (emulsion-solvent diffusion in microfluidics) were used to elaborate particles with average diameters ranging between 0.1 µm and 1 mm. The scale up of nanoprecipitation from lab scale (25 mL) to pilot scale (1 L) was also studied. The formulation parameters (PLA concentration in the organic phase, DexC<sub>6</sub> concentration in the aqueous phase, aqueous phase to organic phase volume ratio, active substance weight fraction...) were optimized in order to obtain particles with well controlled characteristics (average diameter and size distribution, colloidal stability, encapsulation efficiency ...).

Loaded particles elaborated by different processes were characterized with regards to DexC<sub>6</sub> surface coverage, colloidal stability at various ionic strengths, morphology and encapsulation efficiency. We also investigated the re-dispersion ability of particle suspensions after freeze drying and we showed that the use of a cryoprotectant was required in case of nanoparticles.

The release of polyphenolic molecules from the elaborated polymeric nano- and microparticles was studied and limiting steps were identified.

Finally, the cytotoxicity of nanoparticles toward cyanobacterias was evaluated. It was demonstrated that anti-algal effects were observed depending on the added quantities.

**Keywords:** Nanoparticles, microparticles, polyester, polyphenols, nanoprecipitation, emulsion-solvent evaporation, microfluidics encapsulation, release kinetics