



HAL
open science

Synthèse de nanoparticules à propriétés de surface contrôlées par polymérisation en miniémulsion pour la vectorisation de molécules actives

Man Wu

► **To cite this version:**

Man Wu. Synthèse de nanoparticules à propriétés de surface contrôlées par polymérisation en miniémulsion pour la vectorisation de molécules actives. Génie des procédés. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2007. Français. NNT : 2007INPL101N . tel-01752832

HAL Id: tel-01752832

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752832>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement

Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire UMR CNRS-INPL 7568

THESE

Présentée publiquement pour obtenir le grade de

DOCTEUR
DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des procédés et des produits

Par

Man WU

**« Synthèse de nanoparticules à propriétés de surface
contrôlées par polymérisation en miniémulsion pour
la vectorisation de molécules actives »**

Soutenue publiquement le 13 décembre 2007
devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY

Présidente :	Marie-Laure VIRIOT, DR. CNRS, Nancy
Rapporteurs :	François GANACHAUD, CR. CNRS, Montpellier Christine VAUTHIER, DR. CNRS, Chatenay-Malabry
Examineurs :	Abdelhamid ELAISSARI, DR. CNRS, Lyon
Invitée :	Christine GERARDIN, Pr. UHP, Nancy
Directrice de thèse :	Edith DELLACHERIE, Pr. Emérite ENSIC, Nancy
Co-directrice de thèse :	Emmanuelle MARIE, CR. CNRS, Nancy

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au sein du groupe « Polymères et Matériaux de spécialité » du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM, UMR CNRS-INPL 7568, Nancy-université).

Je remercie en premier lieu Madame Edith Dellacherie, Professeure émérite à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC), de m'y avoir accueillie. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour avoir suivi ce travail durant ces trois années, mais également pour la confiance et les conseils scientifiques qu'elle m'a apporté.

Je tiens tout particulièrement à remercier Madame Emmanuelle Marie, Chargée de recherche CNRS au LCPM, pour m'avoir encadré et avoir rendu ce travail si passionnant. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a donné au cours de ces trois années, sa patience immuable, sa disponibilité de chaque instant, et la qualité scientifique de ses nombreux conseils qui m'ont permis d'aboutir à la réalisation de ce travail.

Je voudrais remercier Madame Marie-Laure Viriot, Directrice de Recherche au CNRS au Département de Chimie-Physique des Réactions (DCPR, UMR CNRS-INPL 7630, Nancy-université), pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'être la présidente de jury, et également pour les encouragements et les conseils sur la présentation de la thèse qu'elle m'a apporté.

Que Madame Christine VAUTHIER, Directrice de Recherche au CNRS au Laboratoire de Physico-Chimie, Pharmacotechnie, Biopharmacie (LBCPB, UMR CNRS-Université Paris-sud XI 8612), et que Monsieur François GANACHAUD, Chargée de recherche CNRS au Laboratoire de Chimie Macromoléculaire (LCM, UMR CNRS-ENSCM 5076), trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail et d'en être rapporteur.

J'adresse aussi mes remerciements à Monsieur Abdelhamid ELAISSARI, Directeur de Recherche au CNRS au Laboratoire de Laboratoire d'Automatique et de Génie d'Es Procédés (LAGEP, UMR CNRS-CPE 5007) et à Madame Christine GERARDIN, Professeure à l'Université Henri Poincaré pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes plus grands remerciements vont également à Céline Frochot, Chargée de recherche au CNRS au Département de Chimie-Physique des Réactions (DCPR, UMR CNRS-INPL 7630, Groupe ENSIC, Nancy-université), pour son encadrement et ses précieux conseils durant toute l'étude par spectroscopie de fluorescence.

Je tiens à remercier sincèrement Alain Durand, Professeur à l'ENSIC, pour son aide, ses conseils scientifiques et l'énergie qu'il apporte. Mes remerciements s'adressent aussi à Jean-Luc Six, Maître de conférences à l'Ecole Européenne d'Ingénieurs du Génie des Matériaux (EEIGM), pour le soutien qu'il a donné envers ses monitrices. Merci également à Cécile Nouvel, Maître de Conférences à l'ENSIC et Michèle Léonard Chargée de Recherche au CNRS.

J'adresse mes remerciements à Madame Marie-Christine Grassiot pour son aide et son appui technique tout au long de ces années. Je tiens également à remercier Monsieur Olivier Fabre pour les études en RMN. Je remercie Mesdames Jeanine Fourier et Dominique Stork pour leur aide administrative et leur habituelle gentillesse.

Je voudrais également remercier Wei pour sa contribution à ces travaux au cours de son stage au laboratoire.

Un grand merci à tous mes collègues passés et présents avec qui j'ai passé de très bons moments : Anne-Sophie, Charbel, Emelyne, Fatiha, Magali, Michel et Sébastien, et qui ont su mettre une bonne ambiance dans le bureau : Ahmed, Cécile, Charlotte, Elise, Fred, Hervé, Julie, Ludovic, Poup et Rudy. Merci à mes chers compatriotes : Mian, Yuan, Ying et Hongyu. Je ne saurais également oublier tous les membres du laboratoire qui ont, de près ou de loin, contribué à l'accomplissement de ces travaux.

Enfin, un grand merci du fond du cœur à mes proches, et plus particulièrement à mes parents et à Xiaofeng qui m'ont toujours aidé et soutenu tout au long de ces années.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I : Généralités sur la vectorisation de médicaments.....	6
1. INTRODUCTION.....	7
2. INTRODUCTION A LA VECTORISATION DE MEDICAMENTS	8
2.1. Définition de la vectorisation	8
2.2. Générations de vecteurs de médicaments.....	9
2.2.1. Vecteurs de 1 ^{ère} génération : les vecteurs hépato-spléniques.....	9
2.2.2. Vecteurs de 2 ^{ème} génération : les vecteurs «furtifs».....	11
2.2.3. Vecteurs de 3 ^{ème} génération : les vecteurs à reconnaissance moléculaire.....	14
2.3. Avantages de la vectorisation de médicaments.....	15
3. PRINCIPAUX POLYMERES UTILISES POUR LA VECTORISATION DE MEDICAMENTS	17
3.1. Polymères naturels	17
3.1.1. Chitosane.....	18
3.1.2. Alginate.....	19
3.1.3. Dextrane	20
3.2. Polymères synthétiques	20
3.2.1. Polyesters aliphatiques	21
3.2.2. Dérivés du type méthacrylate.....	22
3.2.3. Poly(alkyl cyanoacrylate).....	23
3.2.4. Poly(oxyde d'éthylène)	23
4. METHODES DE PREPARATION DES NANOPARTICULES.....	24
4.1. Préparation de nanoparticules par polymérisation de monomères.....	24
4.2. Préparation de nanoparticules à partir de polymères préformés	25
4.2.1. Emulsion/évaporation de solvant	25
4.2.2. Fluide supercritique.....	26
4.2.3. « Salting out »	27
4.2.4. Nanoprécipitation.....	28
4.3. Procédés d'hydrophilisation de surface.....	28
4.3.1. Adsorption physique de polymères amphiphiles	29
4.3.2. Fixation chimique du polymère hydrophile	29
5 NANOPARTICULES DE POLY(ALKYL CYANOACRYLATE).....	30
5.1. Préparation de poly(alkyl cyanoacrylate)s	31
5.2. Préparation de nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate).....	31
5.2.1. Préparation des nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate) à partir des monomères	32
5.2.2. Préparation des nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate)s à partir du polymère préformé	35
5.3. Dégradation et toxicité des nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate).....	36
5.4. Applications thérapeutique de nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate).....	38
6 CONCLUSIONS.....	38

7 REFERENCES	40
---------------------------	-----------

Chapitre II : Synthèse et/ou caractérisation des polymères amphiphiles..... 50

1. INTRODUCTION	51
------------------------------	-----------

2. SYNTHESE DU DEXTRANE PHENOXY	52
--	-----------

2.1. Généralités sur le dextrane	52
2.2. Modification chimique du dextrane	54
2.2.1. Synthèse du dextrane phénoxy	56
2.2.2. Détermination du taux de substitution des dextrans phénoxy	57

3. STABILITE DES POLYMERES AMPHIPHILES EN MILIEU ACIDE	60
---	-----------

3.1. Cas des dextrans phénoxy	60
3.1.1. Matériel et méthodes	60
3.1.2. Résultats	63
3.2. Dérivés du poly(oxyde d'éthylène)	64

4. ADSORPTION DES POLYMERES AMPHIPHILES AUX INTERFACES LIDUIDE/LIQUIDE	66
---	-----------

4.1. Rappels théoriques	66
4.1.1. Thermodynamique de Gibbs ^[49]	66
4.1.2. Cinétique d'adsorption des polymères à l'interface	70
4.2. Méthodes et matériels.....	72
4.3. Résultats des mesures de la tension interfaciale eau/dodécane.....	74
4.3.1. Détermination des coefficients de diffusion.....	76
4.3.2. Détermination des isothermes de Gibbs.....	77
4.3.3. Détermination du t^*	80

5. CONCLUSIONS	82
-----------------------------	-----------

6. REFERENCES	84
----------------------------	-----------

Chapitre III : Préparation et caractérisation de nanoparticules de poly(*n*-butyl cyanoacrylate)..... 88

1. INTRODUCTION	89
------------------------------	-----------

2. POLYMERISATION EN MINIEMULSION	90
--	-----------

3. METHODES DE CARACTERISATION DES NANOPARTICULES	92
--	-----------

3.1. Mesure de la taille des particules	92
3.1.1. Granulométrie.....	92
3.1.2. Microscopie électronique à balayage	94
3.2. Détermination de l'épaisseur de la couche hydrophile	94
3.2.1. Principe des mesures du potentiel zêta.....	94
3.2.2. Calcul de l'épaisseur de la couche hydrophile.....	97
3.3. Détermination du taux de recouvrement	98

3.3.1. Détermination de la quantité de polymère amphiphile adsorbé à la surface de particules	99
3.3.2. Aire des particules	100
3.3.3. Calcul du taux de recouvrement	101
3.4. Stabilité de la couche hydrophile	101
3.4.1. Désorption au lavage	101
3.4.2. Désorption en présence de dodécyl sulfate de sodium	101
4. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EMULSIFICATION.....	102
4.1. Influence du temps d'homogénéisation.....	102
4.2. Influence de la durée de sonication	104
5. RESULTATS DE CARACTERISATION DES NANOPARTICULES.....	105
5.1. Nanoparticules recouvertes par les dextrans phénoxy.....	105
5.2. Nanoparticules recouvertes par des dérivés du POE.....	111
6. CONCLUSIONS.....	117
7. REFERENCES.....	120

Chapitre IV : Cinétique de polymérisation du *n*-butyl cyanoacrylate en émulsion et en miniémulsion 122

1. INTRODUCTION.....	123
2. GENERALITES SUR LA CINETIQUE DE POLYMERISATION EN EMULSION ET EN MINIEMULSION.....	124
2.1. Cinétique de polymérisation en émulsion	124
2.1.1. Nucléation	124
2.1.2. Période stationnaire	125
2.1.3. Terminaison.....	126
2.2. Cinétique de polymérisation en miniémulsion directe	126
2.2.1. Influence de la taille des particules	127
2.2.2. Influence de l'hydrophobe	127
2.2.3. Influence de l'amorceur	128
3. CINETIQUE DE LA POLYMERISATION DU <i>N</i>-BUTYL CYANOACRYLATE EN EMULSION ET EN MINIEMULSION.....	128
3.1. Optimisation du protocole de suivi de la polymérisation.....	130
3.1.1. Choix du polymère amphiphile	130
3.1.2. Utilisation de l'isocyanate de trichloroacétyle	131
3.1.3. Protocole expérimental.....	131
3.2. Méthodes de caractérisation	133
3.2.1. Taux de conversion du monomère	133
3.2.2. Evolution de la masse molaire du PBCA	134
3.3. Suivi de la polymérisation du BCA en miniémulsion	136
3.3.1. Taux de conversion du monomère	137
3.3.2. Evolution de la masse molaire	138

4. ENCAPSULATION ET LIBERATION D'UN PRINCIPE ACTIF MODELE.....	143
4.1. Généralité	143
4.2. Encapsulation du pyrène	146
4.3. Cinétique de libération du pyrène	147
4.3.1. Matériel et méthode.....	147
4.3.2. Résultats de la cinétique de la libération du pyrène	149
5. CONCLUSIONS.....	150
6. REFERENCES.....	154
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	157

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

Polymères

PACA	poly(alkyl cyanoacrylate)
PBCA	poly(<i>n</i> -butyl cyanoacrylate)
Dex T40 et T70	dextrane dont la masse molaire moyenne en masse est égale à 40 000 et 70 000 g/mol
DexP _τ	dextrane phénoxy (τ taux de substitution)
PLA	poly(acide lactique)
PCL	poly(ε-caprolactone)
POE	poly(oxyde d'éthylène)
PGA	poly(acide glycolique)
PLGA	poly(acide lactique – <i>co</i> – glycolique)
PMMA	poly(méthyl méthacrylate)
PVA	poly(alcool vinylique)
PPO	poly(oxyde propylène)
MePOECA	monométhoxypoly(oxyde d'éthylène)

Réactifs, produits et solvants utilisés

AC	alcool cétylique
ACA	alkylcyanoacrylate
AIBN	azobisisobutyronitrile
AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	sulfate dodécahydrate d'aluminium et de potassium
BCA	<i>n</i> -butyl cyanoacrylate
BSA	albumine de sérum bovin
CH ₂ Cl ₂	dichlorométhane
CH ₃ SO ₃ H	acide méthane sulfonique
DBSA	acide dodécyl benzène sulfonique (C ₁₂ H ₂₅ C ₆ H ₄ SO ₃ H)
DTAB	bromure de dodécyl-triméthylammonium
HD	hexadécane
HDCA	hexadécyl cyanoacrylate
I ₂ /KI	iodo-iodurée
K ₂ S ₂ O ₈	persulfate de potassium
MMA	méthyl méthacrylate

TAIC	isocyanate de trichloroacétyle
TBAOH	hydroxyde de tétrabutylammonium
THF	tétrahydrofurane
SDS	dodécyl sulfate de sodium

Appareils et techniques utilisés

GPC	gel permeation chromatography
HPPS	high performance particule sizer
FSC	fluide supercritique
MEB	microscopie électronique à balayage
RESOLV	rapid expansion of a supercritical solvent into a liquid solution
RESS	rapid expansion of supercritical solvent
RMN ¹ H	résonance magnétique nucléaire du proton
SEC	chromatographie d'exclusion stérique
SEC-MALLS	chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser

Caractérisations des polymères

\overline{M}_n	masse molaire moyenne en nombre (g/mol)
\overline{M}_w	masse molaire moyenne en masse (g/mol)
DA	degré d'acétylation
$\frac{dn}{dc}$	incrément d'indice de réfraction pour un polymère dans un solvant (cm ³ /g)
τ	taux de substitution du dextrane (%)
p	nombre de motifs glucose porteurs d'un motif hydrophobe
m	nombre de motifs glucose porteurs non modifié
A_1	aire d'intégration des pics attribués au proton anomérique et aux groupements hydroxyle
A_2	aire d'intégration des pics attribués au groupement aromatique
HLB	balance lipophile/hydrophile
CMC	concentration micellaire critique (mol/l)
γ	tension interfaciale (mN/m)

Γ_{\max}	taux de recouvrement maximal des chaînes latérales (mol/m ²)
R	constante des gaz parfaits (8,3145 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)
Π_{CC}	effectivité de tension interfaciale (mN/m)
D	coefficient de diffusion (m ² /s)
γ_0	tension interfaciale à t=0 (mN/m)
γ_e	tension interfaciale quand l'équilibre est atteint (t→∞) (mN/m)
t*	temps caractéristique d'après l'équation de Filippov (s)
A	aire d'adsorption par chaîne hydrophobe ou molécule de stabilisant (nm ²)
N_A	nombre d'Avogadro (6,022x10 ²³ mol ⁻¹)
CC	concentration critique (mol/l)

Caractérisation des nanoparticules

PDI	polydispersité de la taille des particules
$P_{Laplace}$	pression de Laplace
Π_{osm}	pression osmotique
d_H	diamètre hydrodynamique de la particule (nm)
ζ	potentiel mesuré au niveau du plan de cisaillement des particules colloïdales (mV)
μ_E	mobilité électrophorétique des particules (cm·V ⁻¹ ·s ⁻¹)
Δ	épaisseur de la couche interfaciale de polymère calculée à partir des mesures de potentiel zêta à différentes forces ioniques (nm)
Γ	taux de recouvrement en polymère amphiphile (g/m ²)
DO	densité optique- absorbance mesurée par spectroscopie UV/visible
N_{part}	nombre de nanoparticules
ψ_0	potentiel de surface de la particule (mV)
ψ	potentiel de Stern des particules colloïdales (mV)
\bar{n}	nombre moyen de radicaux par particule
k_H	paramètre de Debye-Hückel
f	fonction de Henry
η	taux d'encapsulation (%)

I_1 et I_3 intensité des pics à 372 nm et 383 nm mesurée par spectroscopie de fluorescence

Divers

BHE barrière hémato-encéphalique

SPM système des phagocytes mononuclées

DCPR Département Chimie Physique des Réactions

LCPM Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire

INTRODUCTION GENERALE

Lorsqu'une molécule active est injectée par voie intraveineuse dans le corps humain, elle va se répartir dans tout l'organisme en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques (hydrophobie, poids moléculaire, etc.). Certains de ces principes actifs vont être arrêtés par les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action. D'autres seront dégradés plus ou moins rapidement par voie chimique ou par les différentes enzymes présentes dans l'organisme. Ainsi, seule une petite fraction de la quantité injectée atteindra les cellules ou les tissus visés. Une concentration efficace sur le plan thérapeutique ne pourra donc être atteinte au niveau de la cible qu'au prix d'injections massives et/ou répétées dans l'organisme. Or, certaines des molécules actives utilisées, notamment dans les traitements anti-cancéreux, sont relativement toxiques, ce qui occasionne des effets indésirables importants. Un des objectifs de la vectorisation est donc d'améliorer la biodisponibilité du principe actif en le protégeant du milieu vivant et en contrôlant sa distribution spatiale mais aussi dans le temps.

Dès le début du XX^e siècle, le savant Paul Ehrlich rêvait d'une "Magic Bullet" capable d'acheminer un médicament de manière spécifique vers son site d'action mais il a fallu attendre les années 1970 pour que le concept de vectorisation soit réellement mis en application avec les liposomes. Depuis, le champ des vecteurs de médicaments s'est étendu à des systèmes colloïdaux à base de polymères synthétiques ou naturels. La mise au point de ces formes galéniques présente de nombreux avantages tels que la réduction de la dégradation de principes actifs instables ou encore la réduction des effets toxiques de certains médicaments hautement actifs notamment grâce à une libération contrôlée dans le temps.

L'utilisation de systèmes particuliers polymères pour la vectorisation de principes actifs nécessite de travailler avec des polymères non hydrosolubles (donc présentant une certaine hydrophobie), biocompatibles, et biodégradables et/ou bioéliminables pour éviter une accumulation dans l'organisme. De nombreux polymères, comme par exemple les polyesters type poly(acide lactique) ou poly(acide glycolique), répondent à ce cahier des charges. Le poly(*n*-butyl cyanoacrylate) a également été expérimenté pour l'élaboration de particules destinées au « drug release ». Ce polymère, utilisé depuis les années 60 comme adhésif, aussi bien par les consommateurs (colle super glue) que pour des applications chirurgicales, n'a été exploité qu'à partir des années 80 pour des applications en vectorisation. Ce n'est en effet qu'en 1979 que l'équipe de P. Couvreur a réussi à synthétiser des nanoparticules par polymérisation anionique en émulsion. En effet, ce monomère est extrêmement réactif ce qui

rend le contrôle de la synthèse des nanoparticules particulièrement complexe. Depuis ces premiers travaux, l'intérêt pour des particules de poly(alkyl cyanoacrylate) ne s'est toutefois pas démenti et quelques-unes font d'ores et déjà l'objet d'études cliniques, notamment pour le traitement de certains cancers.

La caractéristique commune des vecteurs polymères destinés à une administration par voie intraveineuse est de présenter un diamètre suffisamment faible pour éviter tout risque d'embolisation. Toutefois, leur devenir *in vivo* va dépendre en grande partie de leurs propriétés de surface puisque selon sa composition, elle pourra améliorer le franchissement de certaines barrières biologiques, favoriser la pénétration dans des cellules spécifiques ou au contraire l'empêcher dans le cas des cellules du système immunitaire. Ainsi, le caractère hydrophobe de la surface de particules de poly(*n*-butyl cyanoacrylate) favorise leur capture par le Système des Phagocytes Mononucléés ce qui a pour conséquence de limiter fortement leur persistance intravasculaire et donc la biodisponibilité du principe actif encapsulé. C'est pourquoi, un effort particulier a été porté ces 10 dernières années sur l'hydrophilisation de la surface des nanoparticules. Deux grandes classes de polymères ont été utilisées à cet effet. Dans un premier temps, des études ont montré le rôle positif joué par une brosse de poly(oxyde d'éthylène) à la surface des nanoparticules sur la diminution de la capture par les macrophages. Depuis, les efforts se sont portés sur l'utilisation de polysaccharides. En effet, ces composés fortement hydrophiles sont biocompatibles et parfois biodégradables. Selon leur structure chimique, ils ont des propriétés biofonctionnelles très différentes, et peuvent être par exemple mucoadhésifs ou interagir avec des cellules spécifiques.

Le Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire a développé depuis une quinzaine d'années la synthèse de dérivés amphiphiles du dextrane. Ces composés sont obtenus par greffage de motifs hydrophobes sur la chaîne polysaccharidique. Les différents modes opératoires mis au point permettent de contrôler parfaitement la nature (linéaire, aromatique, neutre ou chargé) et le nombre de greffons introduits. Les caractéristiques physico-chimiques des polymères en peigne ainsi obtenus ont été étudiées de manière approfondie. De tels polymères sont capables de s'adsorber aux interfaces liquide/liquide ou liquide/solide et de recouvrir des particules sphériques à base de polymères hydrophobes. Les nanoparticules obtenues, par adsorption du polysaccharide ou par la technique d'émulsion évaporation de solvant, ont une écorce hydrophile et un cœur hydrophobe dans lequel il est possible d'encapsuler un principe actif. Plus récemment, ces dérivés amphiphiles du dextrane

ont été utilisés avec succès pour stabiliser la polymérisation en miniémulsion du styrène. Des nanoparticules de type cœur-écorce avec un coeur hydrophobe en poly(styrène) et une écorce hydrophile en dextrane ont ainsi été obtenues et caractérisées.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette stratégie d'exploitation des possibilités offertes par la miniémulsion pour synthétiser des particules à couronne polysaccharidique en une seule étape. Récemment, F. Ganachaud a montré qu'il était possible de réaliser la polymérisation anionique du butyl cyanoacrylate en miniémulsion.

Nous avons donc envisagé d'utiliser des dérivés amphiphiles du dextrane pour stabiliser la miniémulsion et réaliser ainsi en une étape la synthèse des nanoparticules à cœur de poly(*n*-butyl cyanoacrylate) et le contrôle de leurs propriétés de surface. L'objectif de cette étude était de maîtriser les différentes caractéristiques physico-chimiques des nanosphères (taille, taux de recouvrement de la couche hydrophile, masse molaire des chaînes polymères constituant le cœur...) afin d'étudier de manière systématique leur influence sur l'encapsulation et la cinétique de libération d'un principe actif.

Dans la première partie de ce mémoire, nous nous attacherons à définir le concept de vectorisation et à présenter les différentes générations de vecteurs colloïdaux qui ont été développés ces dernières années. Afin de ne pas surcharger cette présentation, nous nous limiterons au cas des vecteurs utilisables pour une administration par voie intraveineuse. Après un inventaire des différents polymères utilisés, les méthodes de préparation des vecteurs colloïdaux seront abordées. L'accent sera porté sur les nanoparticules et en particulier sur les nanoparticules dont le cœur est constitué de poly(alkyl cyanoacrylate). Les différentes méthodes d'hydrophilisation des surfaces de nanoparticules seront également présentées.

Le chapitre II aborde la synthèse et la caractérisation des composés amphiphiles qui seront utilisés pour stabiliser la polymérisation en miniémulsion du *n*-butyl cyanoacrylate. Deux familles de polymères ont été choisies pour cette étude. La première est composée de dérivés amphiphiles du dextrane synthétisés au laboratoire. La deuxième est constituée de dérivés commerciaux du poly(oxyde d'éthylène). La synthèse des nanoparticules par polymérisation en miniémulsion des alkyl cyanoacrylates se faisant dans des conditions sévères de pH, la stabilité chimique des différents polymères amphiphiles dans ces conditions a été contrôlée par spectroscopie RMN ¹H et Chromatographie d'Exclusion Stérique. Enfin,

les propriétés tensioactives des deux familles de composés ont été évaluées par tensiométrie dynamique.

Le chapitre III est consacré à la synthèse par polymérisation en miniémulsion de nanoparticules de poly(*n*-butyl cyanoacrylate). Ce monomère polymérisant en présence de traces d'eau, il a été nécessaire d'optimiser les conditions de préparation des miniémulsions de manière à minimiser simultanément la taille des particules et la quantité de monomère polymérisant pendant l'étape d'émulsification. Les nanoparticules obtenues ont ensuite été caractérisées en termes de taille, de taux de recouvrement en polymère hydrophile, d'épaisseur de couche hydrophile en fonction de la nature et de la concentration du polymère amphiphile dans la phase aqueuse. Enfin, la stabilité de la couche en présence notamment d'agent détergent a été étudiée.

Le travail présenté dans le chapitre IV concerne l'étude de la cinétique de polymérisation en miniémulsion du *n*-butyl cyanoacrylate. Ce monomère peut en effet polymériser selon deux mécanismes : radicalaire et anionique. Selon le mode de polymérisation, les masses molaires obtenues mais aussi les vitesses de dégradation de la macromolécule sont différentes. L'objectif de cette étude était de parvenir à une meilleure compréhension du mécanisme de polymérisation afin de mieux contrôler la masse molaire du cœur de la nanoparticule, et d'étudier son influence sur la cinétique de libération d'un principe actif. Enfin, la dernière partie décrit les résultats préliminaires obtenus en matière d'encapsulation et de libération d'une molécule modèle. Nous avons choisi de travailler avec le pyrène. En effet, cette molécule hydrophobe est facile à doser même à l'état de traces, par spectroscopie de fluorescence. De plus, elle est totalement inerte et ne peut pas intervenir lors des réactions de polymérisation. Sa libération sera donc uniquement influencée par les propriétés physico-chimiques des particules. Un effort particulier a été porté sur l'étude de l'influence du cœur de la nanoparticule.

Chapitre I

Généralités sur la vectorisation de médicaments

1. INTRODUCTION

Les traitements médicaux utilisent souvent des molécules bioactives dont l'instabilité, l'insolubilité ou la toxicité peuvent limiter l'efficacité thérapeutique. Leur encapsulation dans des nanoparticules dites « vecteurs » peut permettre de surmonter ces difficultés en protégeant la molécule bioactive et en contrôlant sa libération. De plus, l'utilisation de ces vecteurs peut offrir la possibilité d'un ciblage au niveau cellulaire.

Les nanoparticules servant à la vectorisation sont constituées de polymères hydrophobes, (bio)dégradables et/ou bioéliminables, tels que le poly(acide lactique) (PLA), la poly(ϵ -caprolactone) (PCL), les poly(alkyl cyanoacrylate)s (PACA)s, pour éviter leur stockage dans l'organisme. Aujourd'hui, les nanoparticules de PACA sont de plus en plus étudiées pour la vectorisation de médicament en raison de leur faible toxicité et de leur rapide dégradation. Cependant, ces nanoparticules hydrophobes peuvent être capturées et éliminées facilement par les organes du Système des Phagocytes Mononucléés (SPM). C'est pourquoi il est nécessaire de réaliser une hydrophilisation de la surface des nanoparticules. Ceci se fait par un recouvrement des particules par une couche hydrophile et neutre. Cette couche, constituée de polymères amphiphiles par exemple à base de dextrane ou de polymères hydrophiles comme le poly(oxyde d'éthylène) (POE), permet de rendre la surface des vecteurs hydrophile, et donc de diminuer leur capture par le SPM.

Par ailleurs, les voies d'administration du médicament sont nombreuses (voie oculaire, voie cutanée, voie digestive, voie intraveineuse, etc.). Selon leur site d'administration, les médicaments n'agissent pas de la même façon. Dans cette étude, nous nous restreindrons aux vecteurs colloïdaux pour l'administration par voie intraveineuse. La taille de ces vecteurs doit donc être largement inférieure au micron, pour permettre leur circulation dans les capillaires sanguins en évitant leur obturation.

Dans ce chapitre, nous commencerons par une brève introduction sur la vectorisation de médicaments en en donnant la définition, en précisant les différentes générations de vecteurs et leurs avantages. Ensuite, nous mentionnerons les polymères les plus fréquemment utilisés pour constituer les vecteurs colloïdaux, ainsi que les différentes techniques de formulation employées. Enfin, les nanoparticules de PACA seront présentées en détail

(synthèse et propriétés du polymère, préparation de nanoparticules, exemples d'applications thérapeutiques).

2. INTRODUCTION A LA VECTORISATION DE MEDICAMENTS

De tout temps, le rapport entre la quantité de principe actif administré et celle de principe actif réellement utilisé au niveau de la zone à soigner (ce que l'on peut appeler biodisponibilité), a été une des préoccupations majeures pour les médecins, les pharmaciens, et les industriels des entreprises pharmaceutiques. Depuis les années 70, une partie des recherches menées pour améliorer la biodisponibilité, a concerné l'utilisation de vecteurs pour les molécules bioactives. Ces derniers permettant de mieux diriger le principe actif vers la zone à traiter, nous pouvons espérer :

- une réduction du nombre des administrations
- une limitation des éventuels effets secondaires et donc de la toxicité
- une amélioration du confort du patient
- une réduction des coûts de santé, etc....

Nous reviendrons plus en détail sur ces avantages dans le paragraphe 2.3 de ce chapitre.

2.1. Définition de la vectorisation

La vectorisation consiste à transporter un principe actif en quantité suffisante vers la cible à atteindre au moyen d'un vecteur, soluble ou insoluble dans l'eau, lequel est inactif du point de vue thérapeutique. Cette vectorisation permet d'une part d'éviter l'administration directe du médicament dans le corps humain et d'autre part d'améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques du principe actif vectorisé. Ce sont alors les propriétés du vecteur et non celles du principe actif qui détermineront le sort du système *in vivo*.

Les objectifs de la pharmacie galénique moderne sont donc de développer des systèmes d'administration permettant d'améliorer la biodisponibilité de molécules bioactives en prolongeant par exemple leur durée de vie dans l'organisme, en favorisant une mise à disposition progressive, et dans certains cas, en améliorant le passage des différentes barrières

naturelles dans l'organisme tout en protégeant le principe actif, notamment face aux nombreuses enzymes de dégradation du vivant.

En effet, aucun médicament n'est capable d'exercer une activité thérapeutique si le principe actif qu'il renferme n'est pas capable de passer les différentes barrières biologiques qui séparent le site d'administration de son site d'action.

Pour assurer la vectorisation, de nombreuses voies de recherche ont été expérimentées, parmi lesquelles celle utilisant les particules occupe une place importante depuis plusieurs décennies. C'est cette voie que nous allons détailler ci-après.

2.2. Générations de vecteurs de médicaments

Il y a vingt ans déjà, Benoît et al. ^[1] ont proposé une classification permettant de distinguer trois générations de vecteur selon leur taille et l'application envisagée. Au cours de ces dernières années, le développement des vecteurs de médicaments a connu un essor considérable, et un nouveau concept de classification a été mis au point ^[2]. Il concerne les systèmes colloïdaux de taille submicronique. Les vecteurs sont toujours classés en trois générations, mais, en fonction de leur biodistribution *in vivo*.

2.2.1. Vecteurs de 1^{ère} génération : les vecteurs hépato-spléniques

Les vecteurs synthétiques de la première génération sont des systèmes colloïdaux développés spécialement en vue de leur utilisation thérapeutique. Parmi ces vecteurs, selon la nature des éléments qui les constituent et leur structure, nous pouvons distinguer les liposomes, les nanosphères, et les nanocapsules.

- Les **liposomes** (Figure I.1) sont de petites vésicules sphériques dont la paroi est constituée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques délimitant une cavité centrale contenant une phase aqueuse. Ils sont apparus il y a quarante ans ^[3] et ont été les premiers à être utilisés comme vecteur de médicaments. Leur diamètre se situe dans un intervalle allant de 20 nm à 1 µm. Ils peuvent véhiculer des principes actifs de nature hydrophile, sous forme dissoute dans la phase aqueuse centrale, ou de nature

hydrophobe par insertion dans la bicouche. Les liposomes possèdent une bonne biocompatibilité en raison des matières premières qui les composent (phospholipides naturels, stérols, glycérolipides) et peuvent se comporter comme des formes médicamenteuses à libération contrôlée. Cependant, ces structures vésiculaires sont instables chimiquement (oxydation et hydrolyse des phospholipides) et physiquement (agrégation, fusion et perte du contenu).

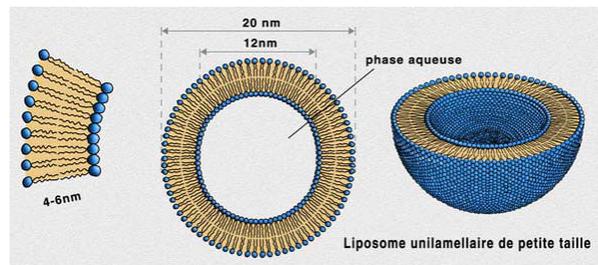


Figure I.1 : Structure d'un liposome.

- Les **nanosphères** (Figure I.2 A.) sont des structures matricielles, de forme sphérique, constituées de polymères de préférence (bio)dégradables. Les premières nanosphères ont été développées en 1976 par Birrenbach et Speiser [4] en utilisant le polyacrylamide réticulé, un polymère non biodégradable. Par la suite, les systèmes (bio)dégradables, à base de PACA, ont été développés par Couvreur et al. dès 1979 [5]. Dans le cas de nanosphères, le principe actif est soit incorporé à l'intérieur du réseau polymère durant la formation des nanosphères, soit adsorbé à leur surface par l'intermédiaire de liaisons de type hydrophobe, électrostatique ou covalente. Il est libéré par simple diffusion ou à la suite de la (bio)dégradation du polymère dans l'organisme.

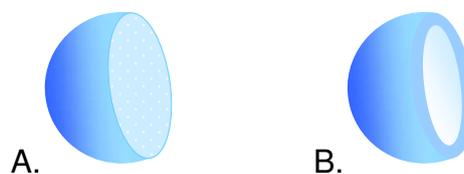


Figure I.2 : Structures de nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate)s.

A. Nanosphère ; B. Nanocapsule

- Les **nanocapsules** (Figure I.2 B.) [6] sont des structures réservoirs et sphériques. Elles sont constituées d'un cœur généralement huileux entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur n'excède pas quelques nanomètres. Le principe actif est généralement dissous dans le cœur huileux, mais, peut aussi être adsorbé à la surface des nanocapsules.

Les vecteurs particuliers à base de polymère hydrophobe comme, par exemple, les polyesters aliphatiques, présentent généralement en surface une hydrophobie plus ou moins marquée et une charge de surface négative. Après administration intraveineuse, les opsonines, des protéines cationiques plasmatiques, s'adsorbent rapidement à la surface des vecteurs ce qui favorise leur capture par les organes du SPM comme le foie, la rate, le rein et la moelle osseuse [7, 8]. Les vecteurs sont ensuite internalisés par *endocytose* pour aboutir dans des lysosomes où ils pourront éventuellement être dégradés par les enzymes lysosomiales. Le médicament est donc libéré essentiellement dans les cellules du foie, de la rate et du rein. Cette accumulation, principalement hépatique, peut constituer un avantage pour améliorer le traitement de certaines infections du SPM [9, 10].

Endocytose : mécanisme de transport permettant à des grosses molécules ou à des petites particules de pénétrer dans la cellule grâce à la formation d'une vésicule par invagination de la membrane cytoplasmique.

2.2.2. Vecteurs de 2^{ème} génération : les vecteurs « furtifs »

Les nanoparticules présentées dans le paragraphe précédent présentent des propriétés de surface hydrophobes. Suite à l'adsorption de protéines plasmatiques à leur surface, une forte proportion de ces nanoparticules est rapidement capturée par le SPM après administration intraveineuse et se retrouve concentrée dans le foie, la rate ou le rein. Cette adsorption de protéines sur les particules est donc un des facteurs capitaux influençant le destin des vecteurs *in vivo* [11-13].

➤ Adsorption des protéines

Les protéines sont des macromolécules d'origine biologique caractérisées par différents éléments parmi lesquels on peut citer la masse molaire, le point isoélectrique, la distribution des charges à leur surface, la présence de site actif, leur forme, leur rigidité et leur solubilité dans divers milieux aqueux. Elles sont constituées de séquences d'acides aminés liés par liaisons peptidiques, et présentent en surface un nombre plus ou moins important de zones hydrophobes lorsqu'elles sont en solution aqueuse. De ce fait, les protéines peuvent être considérées comme des macromolécules amphiphiles [14]. Elles s'adsorbent plus ou moins facilement sur la plupart des surfaces solides hydrophobes.

L'adsorption des protéines sur des surfaces hydrophobes est un phénomène complexe. L'hydrophobie et la charge des particules sont les principaux paramètres contrôlant l'adsorption des protéines [15-17].

- Le degré d'hydrophobie des particules influence la quantité et la composition des protéines plasmatiques s'adsorbant sur la surface de particules [18, 19]. De nombreuses études ont montré que plus la surface des particules est hydrophobe, plus la quantité de protéines plasmatiques adsorbée est importante [20-25]. Il semble que les forces attractives dominantes mises en jeu lors de l'adsorption non spécifique d'une protéine soient de type interactions hydrophobes.
- Les charges des particules influencent l'interaction électrostatique entre leur surface et la protéine [15, 26]. Elle peut être attractive ou répulsive. En effet, dans certains cas, les charges à la surface des particules peuvent accélérer l'adsorption des protéines par interaction électrostatique lorsque la densité de charges est supérieure à une certaine limite [24, 27]. Toutefois, les protéines peuvent s'adsorber sur des surfaces hydrophobes, y compris en présence d'interactions électrostatiques défavorables.

La modification de la surface hydrophobe des particules est une étape relativement importante pour diminuer leur accumulation dans la sphère hépatique et prolonger leur temps de circulation dans le sang.

➤ Hydrophilisation des surfaces et répulsion stérique des protéines

Une manière efficace, pour minimiser à la fois les interactions hydrophobes et électrostatiques entre les protéines et les particules, consiste à déposer à la surface des particules une couche hydrophile et neutre [27, 28] par adsorption physique de polymères amphiphiles [29, 30] ou par fixation chimique de polymères hydrophiles [27, 31]. Cette couche hydrophile peut jouer le rôle d'une barrière stérique qui masque l'hydrophobie et les charges de surface [25], et rend les particules hydrophobes « invisibles » au SPM (« stealth » effet) [32].

De nombreuses études du mécanisme de répulsion stérique des protéines ont été menées dans le cas de particules recouvertes de POE greffé de façon chimique [25, 33-35]. Il

apparaît que les conditions qui conduisent à la répulsion des protéines sont remplies quand la somme des énergies attractives (Van der Waals, électrostatiques, hydrophobes et liaisons hydrogène avec la surface) est plus petite que la somme des énergies répulsives (entropie des chaînes et énergie libre d'hydratation) dues au mouvement des chaînes de polymère et des molécules de solvant (Figure I.3) [25].

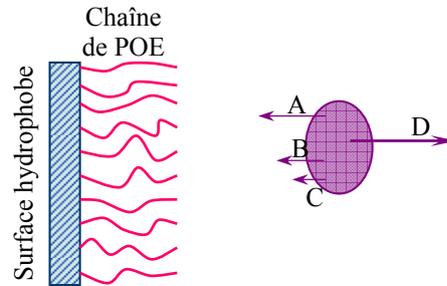


Figure I.3 : Modèle théorique traduisant les interactions entre une protéine et un substrat hydrophobe (par exemple surface de nanoparticules) recouvert de chaînes de POE [25]. A. Attraction hydrophobe entre la protéine et le substrat hydrophobe ; B. Attraction de Van Der Waals entre la protéine et la surface hydrophobe ; C. Attraction de Van Der Waals entre la protéine et les chaînes de POE ; D. Répulsion stérique résultant de la densité, de l'épaisseur et de la flexibilité des chaînes de POE présentes à la surface du substrat.

Pour optimiser la stabilité stérique des particules hydrophobes, le recouvrement par la couche hydrophile doit satisfaire les conditions suivantes [29] :

- Une densité de points d'ancrage à la surface suffisamment élevée
- Un recouvrement hydrophile des particules suffisant
- Une épaisseur de la couche hydrophile assez grande

Le recouvrement par une couche hydrophile constituée de polymères non-ioniques (neutre) et flexibles peut conférer aux vecteurs un caractère « furtif ». Ces vecteurs deviennent en effet pratiquement indétectables par les macrophages, ce qui permet de prolonger leur temps de circulation dans le sang [27, 31]. Certaines avancées permettent même d'envisager la translocation de ces vecteurs «furtifs» au niveau des sanctuaires biologiques comme le cerveau [36] ou le tissu oculaire. Par exemple, des nanoparticules préparées à l'aide d'un copolymère « PEGylé », poly(méthoxy poly(oxyde d'éthylène) cyanoacrylate-*co*-hexadécyl cyanoacrylate) [37, 38], sont capables de pénétrer dans le tissu cérébral d'un animal de laboratoire, atteint d'une encéphalomyélite allergique expérimentale [37] ou présentant une tumeur cérébrale [39], maladies qui s'accompagnent d'une perméabilisation de la *barrière hémato-encéphalique* (BHE).

Barrière hémato-encéphalique (BHE) : barrière physiologique plus qu'anatomique entre le sang et le cerveau entravant le passage et la diffusion dans le système nerveux central, qui se trouve ainsi protégé de toute substance circulant dans le sang et en particulier d'un médicament injecté par voie intraveineuse. En chimiothérapie anticancéreuse, cette barrière réduit la concentration en médicament qui agiront donc moins bien sur des tumeurs situées dans le cerveau (tumeurs primitives comme les gliomes ou métastases cérébrales) que sur des tumeurs de même nature situées ailleurs.

Sur le plan pratique, la technique d'hydrophilisation de surface des nanoparticules par adsorption physique présente une grande facilité de mise en œuvre puisqu'il s'agit simplement de mettre en contact une surface hydrophobe avec un polymère amphiphile en solution (poloxamer, poloxamine, etc.) [17, 29]. Cette adsorption physique se fait par interactions hydrophobes, liaisons hydrogène ou interactions ioniques. La fixation chimique de polymères hydrophiles consiste en un greffage de chaînes hydrophiles (POE [31], dextrane [40, 41], etc.) par liaisons covalentes à la surface des particules. Cette technique permet d'obtenir une couche hydrophile plus stable par rapport à celle obtenue par adsorption physique. Cependant, elle nécessite une fonctionnalisation de la surface des particules hydrophobes. Les techniques d'hydrophilisation des surfaces vont être détaillées dans le paragraphe 4.3 de ce chapitre.

2.2.3. Vecteurs de 3^{ème} génération : les vecteurs à reconnaissance moléculaire

Dans certains cas, en particulier pour le traitement du cancer, il est nécessaire d'utiliser des médicaments relativement toxiques et donc de contrôler les quantités administrées. Avec les vecteurs de la 2^{ème} génération, nous pouvons prolonger le temps de circulation de médicaments dans le sang, et contrôler leur libération. Cependant, le ciblage spécifique de médicaments reste difficile à réaliser.

La notion de ciblage est importante à définir. Nous pouvons parler de vecteur de ciblage tissulaire ou cellulaire quand celui-ci permet, de façon chimique ou physique, d'augmenter de façon très significative le rapport de la quantité de principe actif ciblée à celle non ciblée, ceci en comparaison avec l'injection normale du principe actif. C'est selon ce concept que la 3^{ème} génération de vecteurs a été développée. Ils possèdent une structure supramoléculaire : des ligands (anticorps, peptides, sucres, acide folique) sont fixés à la surface des vecteurs « furtifs » [2]. Ces ligands sont capables de reconnaître de manière

sélective des marqueurs spécifiques (antigènes ou récepteurs) qui sont hyperexprimés à la surface de cellules cibles (cellules cancéreuses, cellules infectées, etc.) (Figure I.4).

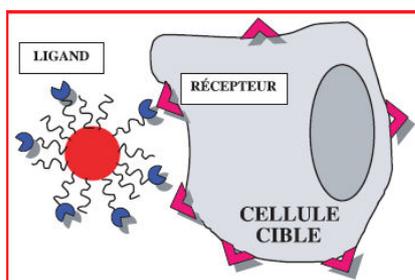


Figure I.4 : Représentation schématique de l'adressage moléculaire d'un vecteur à une cellule cible grâce à un ligand de reconnaissance (vecteurs de 3^{ème} génération) [2].

Les interactions spécifiques entre les ligands et leurs récepteurs permettent au vecteur de délivrer son principe actif au plus près de la cellule cible, voire de favoriser l'internalisation de celui-ci par des phénomènes d'endocytose propres à chaque tissu.

Cette démarche nécessite une connaissance accrue des mécanismes d'interaction entre les récepteurs ou les antigènes membranaires de la cellule cible et la « molécule clef » fixée de façon covalente au vecteur thérapeutique. Ce type de ciblage correspond à un nouveau concept concernant le mode d'action du « médicament moderne ». En effet, il sépare la phase de reconnaissance dédiée au vecteur thérapeutique, de la phase d'activité thérapeutique propre à la molécule bioactive. Ceci ouvre la voie à de nombreux développements dans le « design » des molécules de reconnaissance envers une cellule cible afin d'être de plus en plus spécifique dans le ciblage, mais aussi à une grande liberté dans le choix de la molécule bioactive pour rendre le traitement le plus efficace possible.

Toutefois, il faut noter que le couplage d'un ligand à la surface d'un vecteur particulière peut parfois altérer les capacités de reconnaissance moléculaire du ligand avec le récepteur en raison de l'encombrement stérique dû à la particule. Dans d'autres cas, certains groupements chimiques indispensables à l'adressage du ligand peuvent être masqués ou impliqués dans la fixation au vecteur.

2.3. Avantages de la vectorisation de médicaments

Comme nous l'avons déjà rapidement évoqué précédemment, la vectorisation de médicaments présente de nombreux avantages [2, 19, 42]. Les principaux points à retenir sont les suivants :

- **Protection du principe actif.** Certaines molécules biologiquement actives sont physico-chimiquement et/ou biochimiquement instables dans l'environnement biologique (pH, enzymes, protéines). Leur encapsulation dans des nanoparticules permet une protection contre l'inactivation chimique, enzymatique ou immunologique. Ainsi, les caractéristiques pharmacocinétiques du médicament sont optimisées. Ceci est particulièrement intéressant pour les principes actifs à faible durée de vie *in vivo*.
- **Réduction des effets toxiques potentiels du médicament.** De nombreuses thérapies par voie intraveineuse, en particulier le traitement du cancer, utilisent des molécules toxiques. Pour assurer l'efficacité thérapeutique d'un principe actif, il est néanmoins nécessaire d'injecter une quantité importante de médicament et/ou de répéter l'injection pour obtenir l'efficacité souhaitée, ce qui peut provoquer des effets indésirables liés à la toxicité de la molécule. La libération progressive permet une diminution du nombre d'injections et améliore le confort du patient.
- **Obtention de profils pharmacocinétiques plus favorables.** Les fluctuations de concentration en principe actif dans le sang peuvent être réduites en contrôlant la libération de celui-ci, ce qui permet de la maintenir dans la zone d'efficacité thérapeutique (Figure I.5).

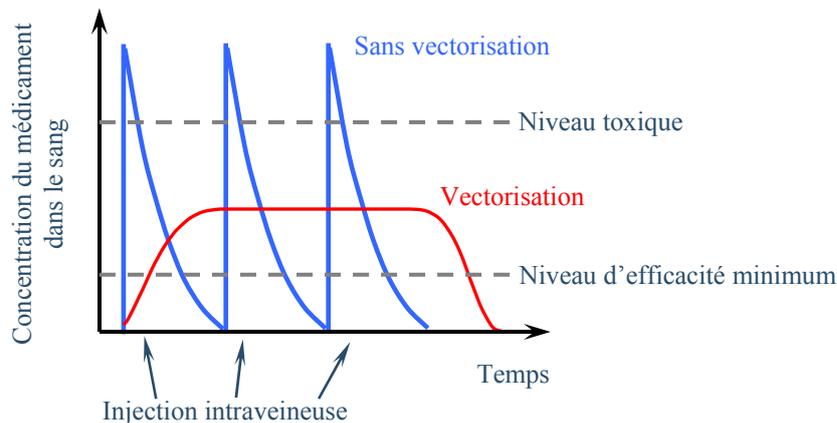


Figure I.5 : Evolution de la concentration plasmatique du principe actif en fonction du temps avec ou sans vectorisation.

En effet, la concentration en médicament doit dépasser le niveau minimum d'efficacité, tout en restant inférieure au niveau toxique. Le contrôle de la vitesse de libération du principe actif encapsulé dans un vecteur particulière peut alors permettre d'assurer une concentration quasi constante, comprise entre ces deux niveaux, pendant une durée

bien supérieure à celle obtenue avec une administration classique. Le principe actif encapsulé dans un vecteur pourra être libéré progressivement par dégradation de la particule sous l'effet de certains facteurs précis (pH, température, présence de certaines enzymes, magnétisme) ou par diffusion du principe actif. Ceci permet de maintenir la concentration en principe actif dans la fourchette souhaitée.

- **Sélectivité de la libération.** Dans certaines conditions, la vectorisation peut apporter un ciblage du médicament grâce à des ligands à la surface des vecteurs qui sont capables d'interagir avec des cellules cibles [28]. Ceci permet à la fois de limiter la biodistribution de médicament au sein de l'organisme et de réduire les effets secondaires indésirables au niveau des organes sains. Ainsi, la sélectivité et la spécificité de ces particules vis-à-vis de la cible peuvent permettre d'améliorer l'efficacité du principe actif.

3. PRINCIPAUX POLYMERES UTILISES POUR LA VECTORISATION DE MEDICAMENTS

Les polymères utilisés pour les vecteurs colloïdaux peuvent être soit d'origine naturelle ou bien synthétisés selon les méthodes de la chimie de polymérisation. Dans tous les cas, ils doivent être biocompatibles, non toxiques (absence de réactivité avec le tissu), non immunogènes, non cancérogènes. Ils doivent également pouvoir être (bio)dégradés dans l'organisme et leurs produits de dégradation bien tolérés. S'ils ne sont pas (bio)dégradables, ils doivent pouvoir être éliminés par les voies naturelles après solubilisation dans les fluides biologiques. Ceci suppose que leur masse moléculaire soit suffisamment faible pour passer au travers du filtre rénal. Compte tenu de la très grande variété des polymères utilisables, nous ne mentionnerons ici que les principaux.

3.1. Polymères naturels

Les polymères naturels utilisés dans des applications médicales sont principalement de deux catégories : les protéines [43] telles que l'*albumine* [44] et la *gélatine* [45, 46], et les polysaccharides comme le dextrane [47, 48], l'alginate [49, 50], le chitosane [51], ou encore certains dérivés de la cellulose [52].

Albumine : Principale protéine se trouvant dans le plasma. Elle joue un rôle important dans le maintien de la pression oncotique du sang et elle transporte diverses substances, telles que les acides gras, la bilirubine et divers médicaments, dans la circulation sanguine.

Gélatine : Forme dénaturée du collagène qui est la protéine animale extraite des os. Le collagène contient un total de 18 acides aminés en différentes concentrations. La liaison de ces acides forme des chaînes polypeptidiques, chaque chaîne contenant environ mille acides aminés. La forme globale du collagène est une baguette (protofibrille) se composant de structures en triple hélice.

L'utilisation des vecteurs constitués de polymères naturels, en particulier pour les polysaccharides, est limitée par la faible reproductibilité d'un échantillon à un autre que ce soient en termes de masses molaires ou de structures, voire de composition chimique. De plus, les particules obtenues sont généralement de taille supérieure au micron, ce qui limite leur utilisation en particulier pour l'administration du principe actif par voie intraveineuse.

Dans le cas des vecteurs « furtifs », les polysaccharides sont couramment utilisés pour constituer la couche hydrophile de particules. Ils présentent, pour la plupart, une biocompatibilité satisfaisante, et ils sont parfois biodégradables. Ils sont extrêmement hydrophiles, et de nombreux polysaccharides peuvent entrer dans des cycles de dégradation par la cellule et/ou le tissu, ce qui est un avantage prépondérant dans l'interface vivant/matériaux. De plus, comme ils sont constitués de sous-unités saccharidiques (type galactose, glucose ou dérivé acide ou N-acétylé...), leurs produits de dégradation sont facilement éliminés, voire assimilés par l'organisme. Par ailleurs, ce sont des polymères dont l'origine est bien connue et depuis longtemps, ce qui a permis de mettre en œuvre de nombreux procédés d'extraction avec un fort taux de rendement (exemple, l'alginate des algues brunes ou le hyaluronate du cartilage de requins...). Les principaux polysaccharides utilisés pour constituer la couche hydrophile des vecteurs « furtifs » sont les suivants :

3.1.1. Chitosane

Le chitosane (Figure I.6) est un copolymère linéaire constitué d'unités de glucosamine et de N-acétyl glucosamine. Il est obtenu par désacétylation de la chitine, polysaccharide très abondant sur terre, et qui se trouve principalement dans les carapaces des crustacées et dans certains champignons ^[53].

Les propriétés du chitosane dépendent de son degré d'acétylation (DA). Il n'est soluble qu'à pH compris entre 2 et 6 lorsque le DA est inférieur à 25% ; quand le DA est

proche de 50%, il devient soluble quel que soit le pH ; par contre si le DA devient supérieur à 60%, il est complètement insoluble dans l'eau pour des pH > 6 à cause de la formation de liaisons hydrogène [54]. La masse molaire est un autre paramètre influençant la solubilité du chitosane en milieu aqueux : la solubilité augmente lorsque la masse molaire diminue. Ceci est également dû à la formation de liaisons hydrogène avec l'eau [55]. Le chitosane est un polymère cationique qui est plus ou moins chargé positivement selon le pH de l'environnement. Il est donc capable de s'adsorber à la surface de muqueuses (structure anionique) par interaction ionique [56]. Ceci permet d'augmenter le temps de résidence du principe actif dans l'organe concerné [57]. Les micro/nanoparticules de chitosane ont été proposées comme vecteur de médicament pour les traitements anti-inflammatoires du colon [58].

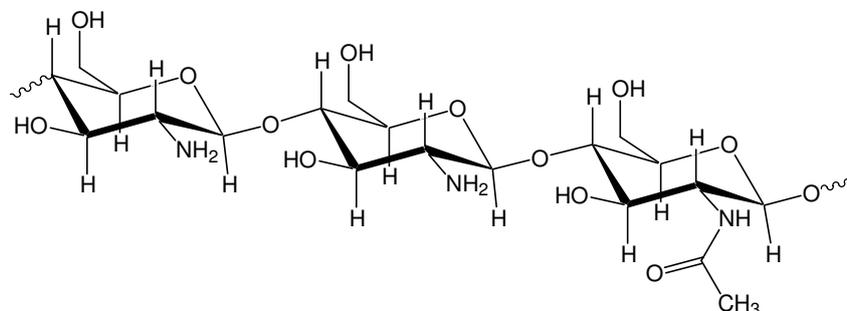


Figure I.6 : Structure chimique du chitosane.

3.1.2. Alginate

Les alginates (Figure I.7), extraits de plantes marines (algues), sont des polysaccharides linéaires anioniques, constitués des sels de deux acides uroniques dérivant du mannose : acide β -D-mannuronique (M) et son épimère l'acide α -L-gulonique (G).

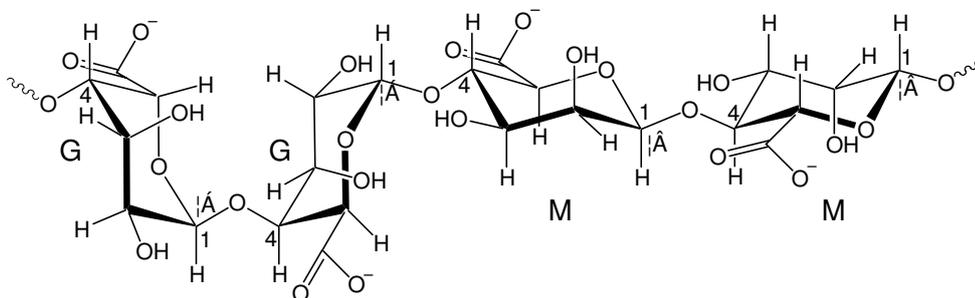


Figure I.7 : Structure chimique de l'alginate.

Les alginates sont capables de former des liaisons ioniques accompagnées de changements conformationnels en présence d'ions bivalents tels que le Ca^{2+} [59, 60]. Les

conditions de gélification des alginates étant très douces, c'est-à-dire ne nécessitant pas d'avoir recours à des solvants ou à des hautes températures ^[61], cela permet d'utiliser les gels alginate pour encapsuler tous types d'antigènes sans risquer de dénaturer les épitopes. Il en est de même pour les principes actifs fragiles (enzymes ^[62] ou des cellules ^[63]). Le principe actif est libéré soit par la diffusion, soit par l'érosion de la couche d'alginate ^[64].

3.1.3. Dextrane

Le dextrane (Figure I.8) est un polysaccharide neutre et hydrophile, constitué d'un enchaînement α -1,6 d'unités glucopyranose avec des chaînes latérales en α -1,2, α -1,3 ou α -1,4 ^[65]. Il contient un grand nombre de groupements hydroxyle qui interagissent facilement avec des médicaments ou des protéines par liaison ou interaction chimique. Encapsuler des médicaments, des protéines ou des agents d'empreinte dans des particules de dextrane peut prolonger leur temps de circulation dans le sang ^[66]. Les propriétés du dextrane seront détaillées dans le chapitre II.

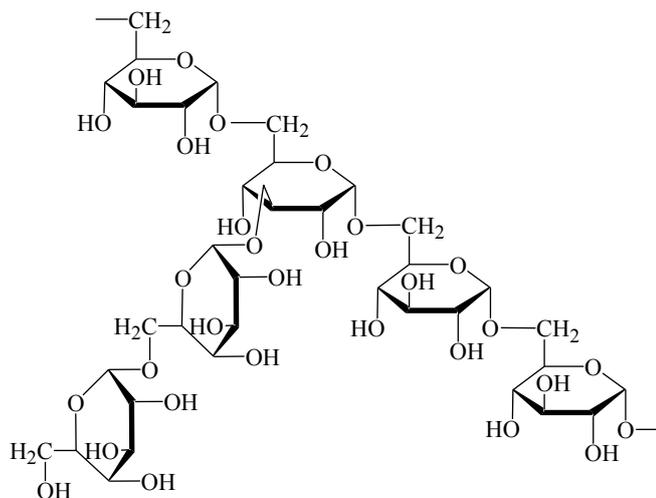


Figure I.8 : Structure chimique du dextrane constitué d'enchaînement d'unités α -D-glucopyranose avec des chaînes latérales en α -1,3.

3.2. Polymères synthétiques

Par rapport aux polymères naturels, les polymères synthétiques présentent certains avantages mentionnés ci-après :

- Grâce à la très grande variété des monomères, la composition chimique des polymères et copolymères est largement modulable.

- En utilisant les méthodes de synthèse macromoléculaires appropriées, on peut obtenir le contrôle complet de la taille et de la distribution des masses molaires. On peut également élaborer des architectures définies.
- Par le biais de la chimie des polymères, les propriétés mécaniques, viscoélastiques ou tensioactives peuvent être relativement contrôlées.

Parmi les polymères synthétiques, les polyesters aliphatiques ont été très largement étudiés pour leur biocompatibilité et leur capacité à être (bio)dégradés *in vivo*.

3.2.1. Polyesters aliphatiques

Le poly(acide glycolique) (PGA), le poly(acide lactique) (PLA), les copolymères poly(acide lactique –co– glycolique) (PLGA) sont des polyesters aliphatiques (Figure I.9) fréquemment utilisés pour la vectorisation de principe actif [67].

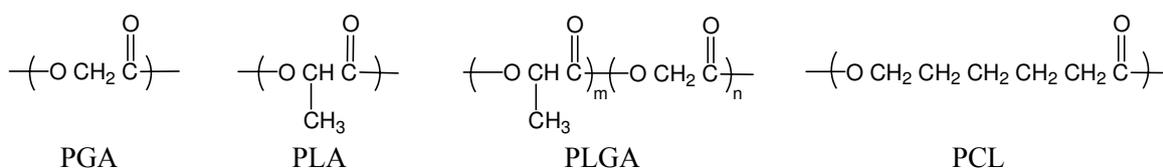


Figure I.9 : Structure chimique des polyesters aliphatiques.

Ils sont largement étudiés du fait de leur biocompatibilité, leur (bio)dégradabilité contrôlée [68], de la faible toxicité des sous-produits de dégradation et de leur aptitude à libérer de façon contrôlée des macromolécules biologiques, telle que les protéines [69]. Leur dégradation se fait par hydrolyse dans un délai allant de quelques heures à quelques mois selon la masse molaire, la morphologie et le rapport surface sur volume du polymère. La dégradation produit de l'acide lactique et l'acide glycolique qui sont des métabolites naturels de l'organisme. *In fine* ces métabolites sont transformés en CO₂ et eau. Par ailleurs, la cinétique de dégradation des PLGA peut être contrôlée par leur composition, c'est-à-dire par le taux de lactide par rapport à celui de glycolide [70]. Dans le cas de microsphères de PLGA, la vitesse de dégradation augmente avec la proportion d'unités glycolique [71, 72]. Ces polymères ont été notamment utilisés pour encapsuler des anticorps [72, 73] et des agents anticancéreux [74-76].

La poly (ε-caprolactone) (PCL) (Figure I.9) est également un polyester aliphatique. Elle est obtenue par polymérisation par ouverture de cycle de l'ε-caprolactone. La PCL est

plus hydrophobe que les polymères précédents et subit une dégradation lente *in vivo* (1 à 2 ans) [77] en présence de lipase. Les microcapsules de PCL peuvent être utilisées comme vecteurs de vaccins [78] dans la mesure où la dégradation ne produit pas d'environnement acide pouvant compromettre leur antigénicité.

3.2.2. Dérivés du type méthacrylate

Le poly(méthyl méthacrylate) (PMMA) est synthétisé à partir du méthacrylate de méthyle (MMA) par polymérisation radicalaire (Figure I.10) amorcée par irradiation UV [79] ou par amorçage chimique (peroxodisulfate de potassium ou d'ammonium) [80].

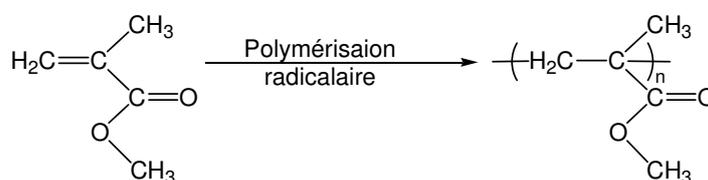


Figure I.10 : Mécanisme de la polymérisation radicalaire du MMA.

Il permet d'encapsuler des principes actifs hydrophobes (daunorubicine, doxorubicine, bromure d'éthidium) mais aussi hydrophiles comme des antigènes [81]. Dans ce cas, ces derniers sont adsorbés à la surface des nanoparticules. Cependant, le PMMA est un polymère non (bio)dégradable, ce qui peut aboutir à une toxicité par accumulation au niveau de certains compartiments *in vivo*. C'est pour pallier ce problème que les nanoparticules de PACA ont été développées [5].

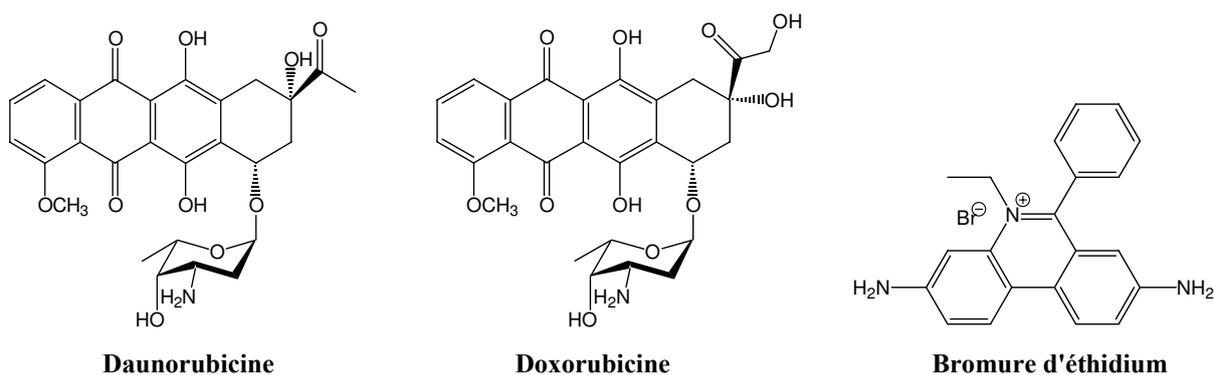


Figure I.11 : Structure des principes actifs hydrophobes.

Daunorubicine : Anthracycline (antibiotique cytotoxique) utilisée pour certains traitements du cancer, particulièrement pour la leucémie (un ensemble de cancers affectant le sang).

Doxorubicine : Médicament anticancéreux, se fixant rapidement sur les structures nucléaires de la cellule, et bloquant la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Elle est utilisée pour traiter le cancer du sein, du poumon, de l'endomètre, de l'utérus et les lymphomes.

Bromure d'éthidium : Agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique en laboratoire de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN.

3.2.3. Poly(alkyl cyanoacrylate)

Les poly(alkyl cyanoacrylate)s (PACA)s sont des polymères non toxiques, non immunogènes et bioéliminables. Ils sont généralement synthétisés à partir des alkylcyanoacrylates (ACA)s par polymérisation anionique en milieu acide. Les nanoparticules à base de PACA recouvertes par une couche hydrophile sont souvent utilisées pour encapsuler des principes actifs en chimiothérapie du cancer [82]. Les PACAs se dégradent principalement par hydrolyse de la liaison ester de la chaîne alkyle. La dégradation produit un alcool et le poly(acide cyanoacrylique) [83]. Ces composés sont solubles dans l'eau, et éliminés *in vivo* par le rein à condition que leur masse molaire ne soit pas trop élevée. Les PACAs se dépolymérisent probablement *in vivo*, ce qui conduit à la formation d'un polymère de masse molaire plus faible que la masse molaire initiale [84, 85]. Couvreur et al. [86] montrent que la dégradation de nanoparticules de PACA ne produit pas de taux significatifs de monomères toxiques et les produits de la dégradation sont facilement éliminés par l'organisme. Les nanoparticules de PACA seront présentées plus en détail dans le paragraphe 5 de ce chapitre.

3.2.4. Poly(oxyde d'éthylène)

Le poly(oxyde d'éthylène) (POE), est un polymère synthétique linéaire obtenu par polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène. Il est largement utilisé pour la modification de surface de particules en raison de certaines de ces propriétés telles que l'hydrosolubilité, la flexibilité, la biocompatibilité, et l'absence de toxicité [87]. Le POE est disponible sur le marché dans une gamme de masse molaire allant de 300 à 5 000 000 g/mol. Cependant, il ne peut être bioéliminé lorsque sa masse molaire est supérieure à 20 000 g/mol [87]. Donc, seuls les POE de masse molaire peu élevée (< 20 000 g/mol) peuvent être utilisés pour les applications biomédicales.

Le greffage de chaînes de POE à la surface de particules est une méthode fréquemment utilisée pour la modification des surfaces hydrophobes. De nombreuses études ont été développées pour des vecteurs « furtifs » dont le cœur est constitué de différents

polymères tels que les chitosanes [88-90], les polyesters aliphatiques [91, 92], les PACAs [2, 93, 94], ou bien de molécules bioactives comme le 3,4-dihydroxyphénylalanine [95] (pour le traitement de la maladie de Parkinson). Les POE ont montré une bonne efficacité pour réduire l'adsorption des protéines sur les particules [96-98]. Ce fait est lié à la flexibilité des chaînes du POE [99]. Lorsque le taux de recouvrement est suffisant, les chaînes de POE forment une brosse à la surface des particules. Cette couche compacte est comprimée lors de l'approche d'une protéine ce qui induit une répulsion stérique.

4. METHODES DE PREPARATION DES NANOPARTICULES

Les techniques utilisées pour préparer des nanoparticules sont nombreuses. Elles sont généralement classées en deux groupes. Dans le premier groupe, les nanoparticules sont formées par polymérisation de monomères en émulsion. Les nanoparticules chargées de médicament peuvent être obtenues par incorporation des principes actifs pendant ou après la préparation de la dispersion de polymère. Dans l'autre groupe, les nanoparticules sont préparées à partir de polymères préformés. Ces polymères peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau, et ils peuvent être synthétiques, semi-synthétiques, ou d'origine naturelle.

Le choix de la méthode de préparation des particules et du polymère les constituant dépend des propriétés physicochimiques du principe actif, des caractéristiques désirées pour la libération du médicament, du but de la thérapie, et de la voie de l'administration [100]. La méthode choisie doit permettre une bonne encapsulation avec un excellent rendement et doit être potentiellement applicable d'un point de vue industriel.

4.1. Préparation de nanoparticules par polymérisation de monomères

La polymérisation en émulsion a été développée pour limiter l'utilisation des solvants organiques toxiques qui sont utilisés pendant la production du polymère par voie radicalaire. C'est dans les années 20 que cette technique a été utilisée pour la première fois pour produire du polyisoprène. Ensuite, elle s'est développée industriellement pendant la deuxième guerre

mondiale pour synthétiser le caoutchouc et les plastiques. La polymérisation en émulsion consiste à disperser le(s) monomère(s) (le solvant est facultatif) dans un milieu aqueux contenant un tensioactif à l'aide d'un fort cisaillement, et à former des gouttelettes de monomère stabilisé par le tensioactif. L'amorceur utilisé est souvent hydrophile. Le mécanisme de la polymérisation en émulsion sera présenté dans le chapitre III.

En 1976, cette méthode a été utilisée par Birrenbach et Speiser ^[4] pour préparer des nanoparticules de polyacrylamide réticulé à partir de l'acrylamide et de N, N'-méthylène bis acrylamide. Puis, Kreuter et Speiser ^[101] ont fabriqué des particules de PMMA en se basant sur le protocole développé par Birrenbach et Speiser. Ce procédé permet de réaliser la polymérisation du monomère et la formation des nanoparticules en une seule étape. L'emploi des nanoparticules citées précédemment est limité pour des applications en tant que vecteur, car les polymères employés ne sont pas (bio)dégradables. Par conséquent, ils vont s'accumuler dans l'organisme. Pour pallier à ce problème, des nanoparticules bioéliminables à base de PACA ont été développées par Couvreur et al. dès 1979 ^[5]. La synthèse de ces nanoparticules sera décrite plus en détail dans le paragraphe 6 de ce chapitre.

4.2. Préparation de nanoparticules à partir de polymères préformés

L'utilisation de polymères préformés comporte certains avantages par rapport à la méthode utilisant la polymérisation de monomères. En effet, les polymères préformés possèdent des propriétés physicochimiques bien définies, et le processus ne nécessite pas une étape d'élimination des monomères résiduels et des réactifs (amorceur, catalyseur, etc.). De plus, il ne peut pas y avoir de réaction avec le principe actif pendant la préparation des nanoparticules. Les principales méthodes utilisant des polymères préformés sont les suivantes :

4.2.1. Emulsion/évaporation de solvant

Pour la première fois en 1981, Gurny et al. ^[102] ont préparé des nanosphères de PLA par la technique d'émulsion/évaporation de solvant. Cette technique consiste à préparer une émulsion (simple ou double) puis à éliminer le solvant organique par évaporation. Lors de cette élimination, le polymère précipite, ce qui conduit à la formation de sphères.

Dans un premier temps, le polymère choisi pour constituer les nanoparticules est dissous dans un solvant organique non miscible à l'eau (dichlorométhane, chloroforme, ou acétate d'éthyle) ^[19]. Ce mélange est ensuite émulsifié dans une phase aqueuse contenant un stabilisant (cholate de sodium, poly(alcool vinylique) (PVA)) ^[100, 103] par fort cisaillement ou par sonication pour former une émulsion H/E stable. Le solvant organique est alors évaporé par élévation de la température ou sous pression réduite, ou simplement par agitation à température ambiante. Cette méthode permet l'encapsulation de principe actif hydrophobe par simple ajout du composé dans la solution de polymère. Après évaporation du solvant organique, le médicament encapsulé se trouve au sein de la matrice polymère ^[42].

Dans le cas d'un principe actif hydrophile, celui-ci doit au préalable être dispersé sous forme de solution aqueuse dans la phase organique contenant le polymère. Cette émulsion est elle-même dispersée dans une phase aqueuse externe pour constituer une émulsion double E/H/E ^[103]. Après évaporation du solvant organique, il se forme des nanosphères contenant le principe actif hydrosoluble. Cette technique a été utilisée pour encapsuler de l'albumine de sérum bovin (BSA) ^[103] ou de l'érythroïétine ^[104].

Pour cette technique, il est nécessaire d'employer des tensioactifs pour faciliter la formation et améliorer la stabilité des émulsions ^[42]. De plus, des énergies importantes sont indispensables pour former une émulsion homogène. Enfin, les nanoparticules doivent être purifiées pour éliminer le solvant résiduel, potentiellement toxique. Toutes ces raisons limitent l'application de cette technique à la production industrielle.

4.2.2. Fluide supercritique

Pour résoudre les problèmes posés par l'émulsion/évaporation de solvant, la technique, dite Rapid Expansion of Supercritical Solvent (RESS), a été développée. Elle consiste à dissoudre le polymère et le principe actif à encapsuler dans un fluide supercritique (FSC). Ensuite, une réduction rapide de pression due à l'expansion du FSC dans l'air provoque la saturation et la précipitation du soluté, ce qui permet d'obtenir des particules. Les produits finaux ont une bonne pureté ^[105]. Le FSC utilisé est souvent le CO₂, puisqu'il est non toxique, non inflammable, relativement inerte et recyclable ^[106]. Cette technique est limitée par la faible solubilité des polymères et des principes actifs dans le FSC, et la taille de particules

obtenue par cette méthode est souvent supérieure à $1\ \mu\text{m}$ ^[107]. De plus, elle nécessite une très haute pression, généralement supérieure à 200 bar ^[106].

Parfois, l'utilisation d'une faible quantité de solvant organique (acétone, éthanol) ^[108] permet d'améliorer la solubilité du polymère dans le FSC, et d'optimiser les conditions d'opération. On peut alors normalement travailler à une pression inférieure à 100 bar lorsque la température est légèrement supérieure à la température critique du CO_2 (304,1 K) ^[106].

Pour limiter la formation d'agrégats et obtenir des particules submicroniques, le RESS a été modifié par la mise en place d'une solution contenant un tensioactif après l'expansion rapide du FSC, dit Rapid Expansion of a supercritical solution into a liquid SOLVENT (RESOLV) ^[109]. En utilisant cette technique, Meziani et al. ^[110] ont préparé des nanoparticules de PLA et de PMMA en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et de PVA comme tensioactif, et d'éthanol comme solvant.

4.2.3. « Salting out »

Le procédé de « salting out » consiste à ajouter, sous agitation, une solution aqueuse saturée en sel et contenant un stabilisant (par exemple : le PVA) à une solution acétonique de polymère. Dans ce cas, la miscibilité des deux phases est empêchée par la saturation en sel de la phase aqueuse, ce qui conduit à la formation d'une émulsion de type huile/eau. De l'eau pure est ensuite ajoutée au système, ce qui permet la diffusion complète de l'acétone dans la phase aqueuse. Ceci provoque la précipitation du polymère et la formation des particules. Cette technique permet l'encapsulation de principes actifs hydrophobes, solubles dans des solvants polaires ^[111].

La méthode d'émulsification/diffusion de solvant peut être considérée comme une modification du procédé de « salting out ». Dans ce cas, le solvant organique utilisé n'est que partiellement soluble dans l'eau. Le solvant, dans lequel est dissous le polymère, est initialement saturé en eau pour assurer l'équilibre thermodynamique des deux phases. Puis, il est émulsifié dans une phase aqueuse contenant un tensioactif. L'addition d'eau, après avoir obtenu l'émulsion, provoque la diffusion du solvant dans la phase aqueuse et entraîne la précipitation du polymère.

4.2.4. Nanoprécipitation

Le processus de nanoprécipitation a été décrit pour la première fois par Fessi et al. [112] en 1986. Celui-ci requiert l'utilisation d'une phase organique polaire contenant le polymère et le principe actif organosoluble. Cette phase organique doit être un solvant miscible à l'eau tel que l'acétone [113]. Cette solution de polymère est émulsifiée dans une phase aqueuse (le tensioactif est facultatif) pour former des gouttelettes. La diffusion spontanée du solvant dans la phase aqueuse entraîne une précipitation du polymère, et la formation de nanoparticules solides.

Ce procédé permet l'incorporation d'une grande quantité de médicament avec un excellent rendement. Ainsi, ni l'évaporation, ni l'extraction de solvant ne sont nécessaires à la précipitation du polymère. Cependant, ce mode de fabrication est limité aux principes actifs hydrophobes, qui sont solubles dans un solvant polaire mais insolubles dans l'eau, par exemple, l'isradipine (agent contre l'hypertension) [113].

4.3. Procédés d'hydrophilisation de surface

Selon leur structure et leur mode d'adsorption, les polymères amphiphiles peuvent adopter des conformations très différentes à la surface des particules (Figure I.12). Dans le cas d'un polymère uniquement substitué en extrémité de chaîne par un segment interagissant avec la particule, l'adsorption du polymère à la surface des particules, de type « end-on », s'effectue par un seul site. Le polymère adopte alors une conformation en brosse. Par contre, si le polymère est porteur de plusieurs motifs « réactifs » le long de la chaîne macromoléculaire, l'adsorption du polymère, de type « side-on », s'effectue par de nombreux sites de fixation. Le polymère adopte alors une conformation en boucle-trains et queues à la surface.

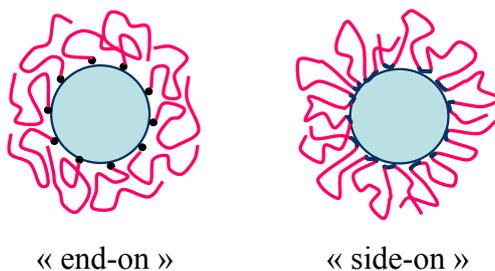


Figure I.12 : Conformations du polymère amphiphile en fonction du mode d'adsorption.

D'une manière générale, les procédés d'hydrophilisation les plus employés reposent soit sur l'adsorption physique de polymères amphiphiles lors de la préparation des nanoparticules, soit sur le greffage chimique de polymères hydrophiles à la surface de particules.

4.3.1. Adsorption physique de polymères amphiphiles

Une des méthodes couramment utilisée consiste à adsorber physiquement des polymères à l'interface solide-liquide. Cette adsorption physique est régie par des interactions électrostatiques ou hydrophobes. Dans le cas des particules chargées, des polyélectrolytes tels que le chitosane [114] et l'acide hyaluronique [115] s'adsorbent sur la surface de charge opposée par interaction électrostatique. Dans le cas de particules hydrophobes et neutres, la surface est souvent modifiée par des dérivés amphiphiles des polysaccharides [116, 117] ou du POE [118, 119]. Ces dérivés possédant des propriétés tensioactives, ils sont capables de s'adsorber sur une surface hydrophobe pour y former une couche hydrophile. Cette adsorption ne nécessite pas la présence d'extrémités ou de segments « réactifs » à la surface des nanoparticules.

Cette technique présente une grande facilité de mise en œuvre puisqu'il s'agit simplement de mettre en contact des nanoparticules préformées à surface hydrophobe et/ou chargée, avec un polymère hydrosoluble en solution aqueuse. Cependant, ce type de recouvrement n'offre pas de garantie quant à la stabilité de la couche adsorbée, laquelle peut être déplacée par exemple par les protéines plasmatiques [120].

Dans le cas de la polymérisation en émulsion du monomère présentée dans le paragraphe 4.1, l'hydrophilisation de la surface de particules est réalisée au cours de la polymérisation et de la formation de particules. Avant la polymérisation du monomère, le polymère amphiphile s'adsorbe à la surface des gouttes de monomère (interface liquide/liquide); après la réaction, le polymère amphiphile s'adsorbe à la surface des particules solides [121]. Le recouvrement de la couche hydrophile est également dû à une adsorption physique.

4.3.2. Fixation chimique du polymère hydrophile

L'hydrophilisation de surfaces par fixation chimique consiste à former des liaisons covalentes entre les chaînes hydrophiles et la surface à modifier. Cette technique permet

d'avoir une bonne stabilité de la couche hydrophile par rapport à celle obtenue par adsorption physique. Le greffage covalent de chaînes en surface peut être réalisé par couplage d'un polymère hydrophile préformé sur la surface de particules. Dans ce cas, la surface hydrophobe et les chaînes hydrophiles doivent être fonctionnalisées.

Une autre méthode permettant que des chaînes hydrophiles soient fixées chimiquement au cœur de la particule, consiste à utiliser des copolymères amphiphiles organosolubles préformés, dans des méthodes d'émulsion/évaporation de solvant [37, 122] ou de nanoprécipitation [123]. Au cours du procédé d'élaboration des particules, les segments hydrophobes des copolymères sont dissous dans la phase organique alors que les segments hydrophiles s'exposent à la phase aqueuse. Après élimination du solvant organique, les particules possèdent un cœur riche en chaînes hydrophobes et une couronne constituée de chaînes hydrophiles. L'utilisation de tels copolymères amphiphiles permet un bon contrôle de la structure particulaire car leur composition peut être bien définie [124]. Des exemples de cette méthode ont été décrits en particulier avec des copolymères dibloc tels que le poly(méthoxy poly(oxyde d'éthylène) cyanoacrylate-co-hexadécyl cyanoacrylate) [37, 38] et le poly(lactide)-b-poly(oxyde d'éthylène) organosoluble [125], ou avec un tribloc comme le POE-PPO-POE [27].

5 NANOPARTICULES DE POLY(ALKYL CYANOACRYLATE)

Les PACAs n'ont pas attiré l'attention des chercheurs avant le début des années 80. Pourtant leurs monomères, les alkylcyanoacrylates (ACA)s, sont utilisés depuis les années 60 en raison de leur excellente propriété adhésive : ils sont capables de former des liaisons de haute résistance avec la plupart des substances polaires, notamment, les tissus vivants et la peau [126]. Ces monomères sont largement utilisés comme colle chirurgicale pour des applications telles que la fermeture de tissus ou le matériel embolique pour la chirurgie endovasculaire [127, 128]. Depuis 1979, les PACAs occupent une place de choix dans le domaine des vecteurs de médicament, en particulier pour des médicaments anticancéreux. Aujourd'hui, les nanoparticules de PACA sont considérées comme les vecteurs les plus prometteurs, et certaines sont déjà au stade du développement clinique pour la thérapie des cancers [85].

5.1. Préparation de poly(alkyl cyanoacrylate)s

Les ACAs sont des liquides transparents de faible viscosité. Leur polymérisation peut se faire selon trois mécanismes : polymérisation radicalaire, anionique et zwitterionique (Figure I.13).

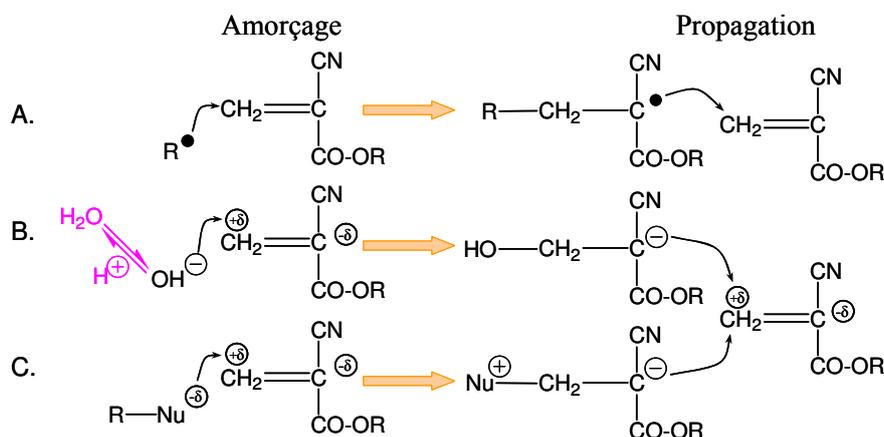


Figure I.13 : Différents mécanismes de la polymérisation des ACAs.

A. Polymérisation radicalaire ; B. Polymérisation anionique ; C. Polymérisation zwitterionique.

Les polymérisations anionique et zwitterionique sont largement étudiées dans la littérature. La polymérisation anionique est amorcée, à température ambiante, par des anions (OH^- , I^- , CH_3COO^- , etc.), des bases faibles telles que les alcools, l'eau, ou des acides aminés de tissus vivants [126]. La polymérisation zwitterionique peut être amorcée par des bases tertiaires comme la phosphine ou les dérivés de pyridine [129, 130]. Dans les deux cas, les chaînes en croissance sont des carbanions. Il faut noter que les ACAs sont très sensibles aux traces de base ou d'eau. Il est donc difficile d'obtenir des monomères purs. Il est nécessaire de les stabiliser par l'ajout d'un inhibiteur, par exemple, des acides gras, des acides minéraux, etc.

La polymérisation radicalaire est quant à elle amorcée par des radicaux. Elle requiert une énergie d'activation plus élevée par rapport aux deux autres mécanismes [85].

5.2. Préparation de nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate)

Les nanoparticules de PACA ont été développées en vue de créer un système biodégradable pour vectoriser un médicament vers des cellules ou des compartiments subcellulaires. Dans la littérature, les nanoparticules de PACA ont une structure de type

nanosphère ou nanocapsule recouverte par une couche hydrophile. Elles peuvent être préparées à partir des ACAs par polymérisation en (mini/micro)émulsion ou à partir de PACAs préformés, par émulsion/évaporation ou nanopréciipitation.

5.2.1. Préparation des nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate) à partir des monomères

➤ Polymérisation anionique en (mini)émulsion

La polymérisation en émulsion est largement utilisée pour préparer des vecteurs colloïdaux. En 1979, Couvreur et al. [131] ont utilisé cette technique pour synthétiser des nanoparticules de PACA destinées à des applications biomédicales. Le processus consiste à disperser le monomère dans un milieu acide contenant un stabilisant utilisé pour stabiliser l'émulsion à température ambiante sous agitation magnétique. Les particules obtenues ont une structure de type nanosphère dont la taille est comprise entre 50 et 300 nm. Dans ce système, la polymérisation est amorcée par les ions OH^- de l'eau, et la propagation de la chaîne se fait par polymérisation anionique. Il semble que la masse molaire des PACAs obtenus soit relativement faible [85]. Les stabilisants utilisés dans le cas des nanoparticules de PACA sont principalement des polymères tels que les polysaccharides (dextrane [132-134], chitosane [135]) ou des dérivés du POE (Tween80 [134], copolymère [119, 134, 136]). Leur utilisation permet la stabilisation de l'émulsion et l'hydrophilisation de la surface des particules par adsorption physique ou greffage covalent.

Dans le paragraphe 5.1 de ce chapitre, nous avons montré que les ACAs sont sensibles aux traces d'eau. Il est donc difficile de contrôler la polymérisation des ACAs en milieu aqueux. Le principal paramètre contrôlant la cinétique de la réaction est le pH du milieu continu. Il est généralement acidifié par de l'acide chlorhydrique [119, 133, 135] ou de l'acide nitrique [137, 138]. Pour un pH supérieur à 3, des agrégats ont été observés en raison d'une cinétique rapide de polymérisation anionique [139]. En revanche, travailler à un pH inférieur à 3 permet de mieux contrôler cette réaction. Cependant, à un pH très faible (<1), certains stabilisants tels que le dextrane [85] et des dérivés du POE [140] peuvent également amorcer la polymérisation anionique.

L'utilisation de la polymérisation anionique en émulsion pour préparer des nanoparticules de PACAs est caractérisée par un faible taux de solide d'environ 1% (w/w) et nécessite un rapport élevé entre quantité de stabilisant utilisé et quantité de monomère (1:1(w/w)) [119, 134, 141-143]. Weiss et al. [144] ont proposé de synthétiser les nanoparticules de PACA par polymérisation anionique en miniémulsion en présence d'un tensioactif ionique, le SDS. Après formation de l'émulsion, elle est homogénéisée par sonification. La polymérisation est amorcée par ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium. La taille des particules obtenues est d'environ 300 nm avec un taux de solide de 10% bien que le rapport massique tensioactif sur monomère soit de 1%. De plus, la taille de particules diminue jusqu'à environ 100 nm lorsque la quantité du tensioactif augmente. Limouzin et al. [145] et Huang et al. [146] ont également réussi à préparer les nanoparticules de PACA en miniémulsion, avec un taux de solide plus élevé et une concentration en tensioactif plus faible par rapport à ceux utilisés en émulsion, en utilisant un tensioactif anionique (acide dodécyl benzène sulfonique) [145] ou un copolymère triblock (POE-PPO-POE) [146].

➤ Polymérisation anionique interfaciale en (micro)émulsion

La polymérisation interfaciale en émulsion consiste en une polymérisation localisée entre les phases organique et aqueuse. Les nanoparticules de PACA préparées par cette méthode ont une structure de type nanocapsule possédant un cœur huileux ou aqueux.

Dans le cas des nanocapsules à cœur huileux, les nanocapsules sont préparées en émulsion directe (huile dans l'eau) [136]. Le monomère, l'huile (Miglyol) et un solvant miscible à l'eau (éthanol) sont mélangés, puis dispersés dans une phase aqueuse contenant le copolymère POE-PPO-POE sous forte agitation magnétique. La migration du solvant vers la phase aqueuse entraîne un déplacement du monomère vers l'interface huile/eau. La polymérisation est amorcée lorsque le monomère rencontre les ions hydroxyde de l'eau, et une couche du polymère se forme à l'interface. Les nanocapsules de PACA synthétisés par cette technique peuvent contenir plus de 90% d'huile par rapport à la masse totale de nanocapsules [147]. Elles permettent d'encapsuler des principes actifs hydrophobes.

Les principes actifs tels que l'insuline [148] et les oligonucléotides [149] ont été encapsulés dans des nanocapsules possédant un cœur aqueux. Elles sont préparées par

polymérisation interfaciale en microémulsion inverse (eau dans huile) [148, 149]. Une solution de tensioactif contenant le principe actif hydrophile est dispersée dans une phase organique sous agitation magnétique. Après l'obtention de la microémulsion, le monomère est ajouté dans le système, et la réaction se déroule par voie anionique. Une membrane de polymère se forme à la surface des micelles, et le principe actif hydrophile est enfermé dans le cœur des nanocapsules. Ces dernières ont été principalement développées pour une administration par voie orale en raison de leur surface hydrophobe. Pour une administration par intraveineuse, une étape d'hydrophilisation de surface est nécessaire [149].

➤ Polymérisation redox en émulsion

La troisième méthode permettant de préparer les nanoparticules à partir des monomères est la polymérisation redox en émulsion (Figure I.14) [137]. Elle consiste à disperser une solution du nitrate d'ammonium et de cérium (IV), $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$, dans l'émulsion en présence du dextrane utilisé comme stabilisant. La phase continue doit être acidifiée. L'ion Ce^{4+} est capable de couper le cycle d'un motif glucopyranose du dextrane par une réaction redox ce qui produit un radical macromoléculaire. Le monomère polymérise alors par polymérisation radicalaire à partir de ce macroamorceur.

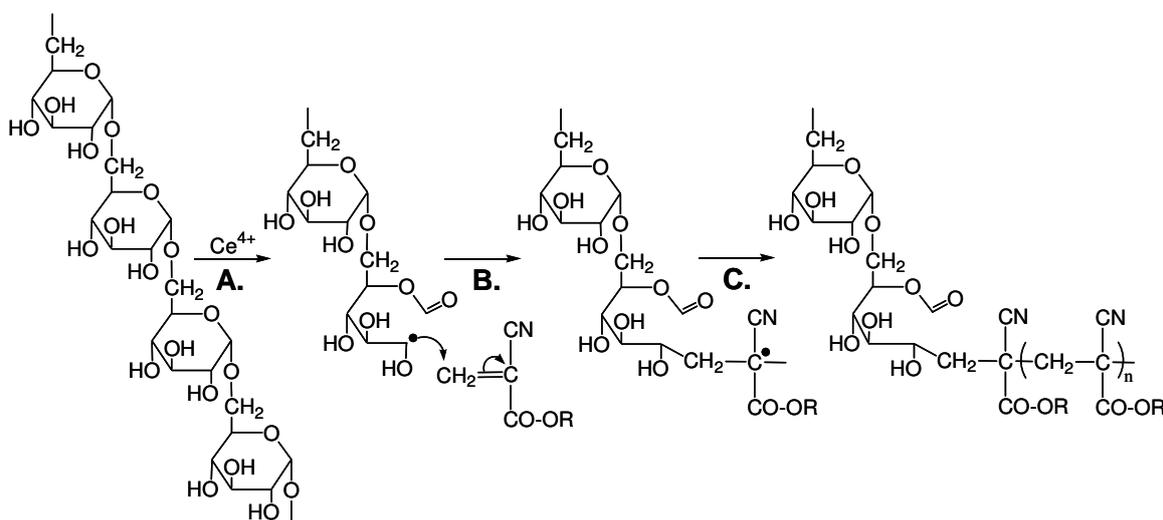


Figure I.14 : Mécanisme de la polymérisation redox des alkylcyanoacrylates [137]. A. Formation du radical macromoléculaire ; B. Amorçage de la polymérisation des ACAs par le radical macromoléculaire ; C. Propagation de la chaîne et formation d'un copolymère dextrane-co-PACA.

Les nanoparticules obtenues par cette méthode sont constituées par un copolymère linéaire dextrane-co-PACA. La couche hydrophile est fixée par des liaisons covalentes à la

surface des particules. Ceci permet d'obtenir une bonne stabilité de la couche hydrophile. Cette technique a été également utilisée pour préparer des nanoparticules de PACA recouvertes par le chitosane ^[150, 151].

Selon le mécanisme de polymérisation (anionique ou redox), les conformations du dextrane en surface des particules sont différentes ^[82, 138]. Dans le cas de la polymérisation anionique, des chaînes latérales du PACA sont greffées sur le dextrane (Figure I.15 A.). Dans le cas de la polymérisation redox, la couche de dextrane est sous forme de brosse (Figure I.15 B.). Cette dernière permet une réduction efficace de l'adsorption des protéines par répulsion stérique grâce à ses longues chaînes hydrophiles ^[138].

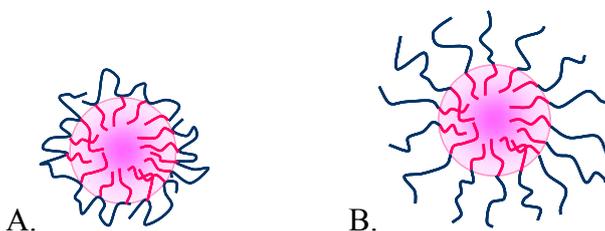


Figure I.15 : Conformation des chaînes de dextrane greffées à la surface de nanoparticules en fonction du mécanisme de la polymérisation. A. Polymérisation anionique, B. Polymérisation radicalaire.

5.2.2. Préparation des nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate)s à partir du polymère préformé

Le polymère utilisé pour la préparation des nanoparticules est un copolymère amphiphile contenant des segments de PACAs. Il possède une structure en peigne avec une chaîne principale en polycyanoacrylate et des greffons en POE. La synthèse du copolymère, poly(méthoxy poly(oxyde d'éthylène) cyanoacrylate -*co*- hexadécyl cyanoacrylate), noté poly (MePOECA-*co*-HDCA)) a été proposée par Peracchia et al. ^[38]. Elle consiste en une polycondensation de l'hexadécyl cyanoacétate et du POE-cyanoacétate. Ces derniers sont obtenus par estérification du méthoxy POE et de l'acide cyanoacétate (Figure I.16) ^[38]. Après la synthèse du copolymère, les nanoparticules sont préparées par les techniques d'émulsion/évaporation ou de nanoprécipitation.

L'avantage de cette méthode vient du contrôle du processus de la polymérisation du copolymère. De plus, les propriétés physico-chimiques des nanoparticules sont indépendantes des conditions de leur formulation. En effet, ces propriétés dépendent de la composition du copolymère obtenu. Cette dernière peut être modifiée en faisant varier la proportion des

réactifs lors de l'étape de polycondensation. De plus, les greffons du POE peuvent stabiliser les nanoparticules lors de leur formulation, et former une couche hydrophile à la surface des particules. Cette couche hydrophile étant fixée par des liaisons covalentes, elle est très stable.

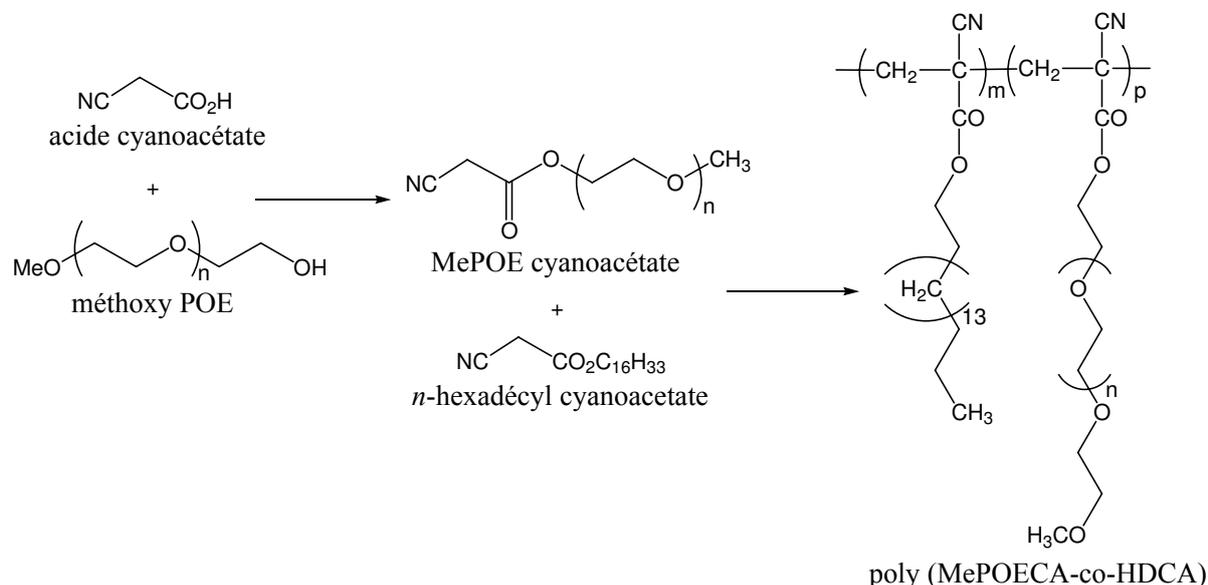


Figure I.16 : Schéma général de la synthèse du poly(méthoxy poly(oxyde d'éthylène) cyanoacétate -co- hexadécyl cyanoacrylate)), noté poly (MePOECA-co-HDCA) par estérification puis polycondensation. Le MePOECA a une masse molaire moyenne en masse de 2 000 g/mol, et le copolymère présente un rapport MePOECA/HDCA de ¼.

5.3. Dégradation et toxicité des nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate)

La dégradation des nanoparticules de PACA a été largement étudiée dans la littérature, en particulier dans le cadre de la vectorisation de médicaments. Les nanoparticules se dégradent de deux manières différentes en fonction de leur environnement (Figure I.17).

Le mécanisme prédominant est une hydrolyse de la liaison ester des chaînes latérales (Figure I.17 A.). Cette dégradation produit des alcools et le poly(acide cyanoacrylique). Ce mécanisme peut être catalysé *in vivo* par des estérases du sérum, les lysosomes et les sécrétions pancréatiques [152]. La vitesse de cette dégradation dépend de la longueur de la chaîne alkyle : plus la chaîne est longue, plus la vitesse de dégradation est faible [153]. Dans le cas des nanoparticules de poly(*n*-butyl cyanoacrylate), 80% de nanoparticules ont été éliminées un jour après l'injection intraveineuse [7].

L'autre mécanisme est la dépolymérisation et la repolymérisation de la chaîne principale du polymère (Figure I.17 B). En présence d'ions hydroxyde, la chaîne principale se dépolymérise et produit un nouveau polymère qui pourra repolymériser avec le monomère libéré. Cependant, la masse molaire du polymère « repolymérisé » est généralement plus faible que celle du polymère initial [152]. Les PACAs ne sont donc pas des polymères biodégradables, mais ils sont bioéliminables après leur dégradation.

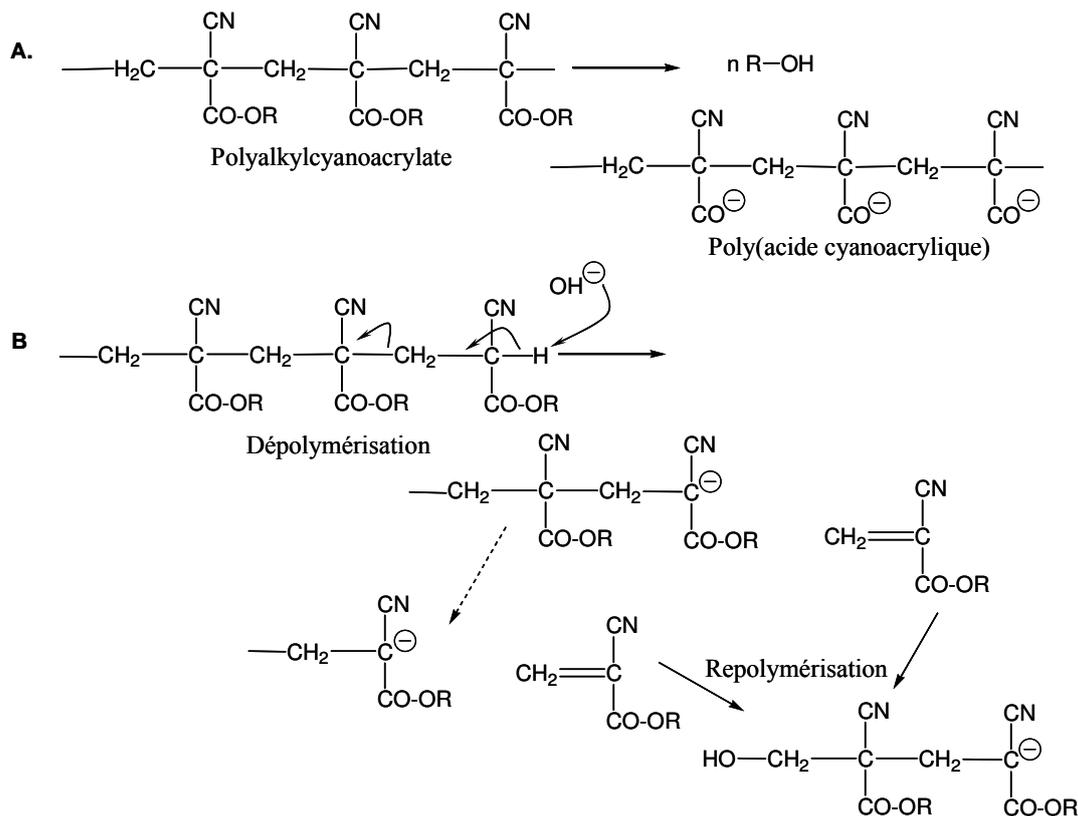


Figure I.17 : Mécanismes de dégradation des nanoparticules de PACAs.

A. Hydrolyse de la liaison d'ester ; B. Dépolymérisation et repolymérisation des PACAs.

La toxicité des PACAs est toujours un sujet de discussion. Toutefois, des études ont montré que ce polymère ne pose pas de problèmes pour les applications biomédicales [85, 154]. En effet, les produits de dégradation sont principalement des alcools et le poly(acide cyanoacrylique). Ils sont solubles dans les fluides biologiques, et éliminés *in vivo* par filtration rénale. Dans le cas de la dépolymérisation et de la repolymérisation, Couvreur et al. [137] ont montré que la dégradation des nanoparticules de PACA ne produit pas de taux significatifs de monomères toxiques et les produits de la dégradation sont facilement éliminés par l'organisme.

5.4. Applications thérapeutique de nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate)

Du fait de leur faible toxicité et de leur dégradation rapide, les nanoparticules de PACA sont préconisées pour des traitements thérapeutiques par administration intraveineuse, en particulier dans le traitement du cancer. Les principes actifs peuvent être soit encapsulés dans le cœur des particules (doxorubicine [134] et fluorouracil [143]), soit adsorbés à leur surface (amoxicilline [119] et méthotrexate [155]). Dans le cas des nanoparticules de PACA recouvertes par une couche hydrophile, le temps de circulation du médicament dans le sang est amélioré notamment en raison de la réduction de l'adsorption des opsonines par répulsion stérique [37, 134, 146, 155]. Un temps de circulation plus long permet un meilleur contrôle de la biodistribution du médicament *in vivo*. Dans certaines études, une accumulation du médicament dans des tumeurs est même observée [85]. En effet, les capillaires des tissus normaux sont moins perméables aux particules que ceux des tissus tumoraux. Enfin, les nanoparticules de PACA sont également utilisées pour encapsuler des anticorps, des antigènes, des protéines pour administration par voie intraveineuse ou orale [156].

6 CONCLUSIONS

Au cours de ces dernières décennies, des progrès importants ont été réalisés dans le développement de vecteurs de principes actifs. Le principal objectif de ces recherches vise à assurer la protection de la molécule encapsulée, son transport près du site actif et une libération contrôlée dans le temps en fonction du traitement préconisé.

Dans ce chapitre, nous avons introduit le concept de la vectorisation, et répertorié les différents types de vecteurs, les polymères les plus utilisés pour les préparer et les principaux procédés permettant de préparer les vecteurs colloïdaux destinés à l'administration par voie intraveineuse.

Nous avons montré que les PACAs sont des polymères parfaitement adaptés à la vectorisation de principes actifs. Bien que non biodégradables, ils sont rapidement éliminés du corps par les voies naturelles. De nombreuses méthodes permettent d'obtenir des nanoparticules de PACA à surface hydrophile. Toutefois, le taux de solide reste faible et les

quantités de tensioactif élevées. L'objectif de cette étude était d'exploiter les possibilités offertes par la technique de polymérisation en miniémulsion (qui sera décrite en détail au chapitre III) pour optimiser les paramètres de synthèse et obtenir un meilleur contrôle des propriétés finales des particules. La parution en 2007 de publications sur ce même sujet prouve son intérêt ^[32]. La préparation au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM) de dextrans amphiphiles tensioactifs ^[117, 121] nous a incités à entreprendre la synthèse de nanoparticules de PACA, par miniémulsion, en utilisant ces stabilisants macromoléculaires, dont les propriétés semblaient adaptées à cette technique ^[157-159].

7 REFERENCES

1. J.P. Benoit, P. Couvreur, J.P. Devissaguet, H. Fessi, F. Puisieux, and L. Roblot-Treupel. «"Carrier" or "modulated distribution" forms, new systems for drug administration». *Journal de Pharmacie de Belgique*, **1986**, 41(5): p.319-329.
2. K. Andrieux, D. Desmaele, J. D'Angelo, and P. Couvreur. «Nanotechnologies and new drugs». *Actualité Chimique*, **2003**: p.135-139.
3. A.D. Bangham, M.M. Standish, and J.C. Watkins. «Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids». *Journal of Molecular Biology*, **1965**, 13(1): p.238-252.
4. G. Birrenbach and P. Speider. «Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1976**, 65(12): p.1763-1766.
5. P. Couvreur, M. Roland, and P. Speiser. «Submicroscopic biodegradable particles containing a biologically-active substance». **1979**, BE 869107.
6. P. Couvreur, P. Tulkens, M. Roland, A. Trouet, and P. Speiser. «Nanocapsules: a new type of lysosomotropic carrier». *FEBS Letters*, **1977**, 84(2): p.323-326.
7. L. Grislain, P. Couvreur, V. Lenaerts, M. Roland, D. Deprez-Decampeneere, and P. Speiser. «Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier». *International Journal of Pharmaceutics*, **1983**, 15(3): p.335-345.
8. C. Verdun, F. Brasseur, H. Vranckx, P. Couvreur, and M. Roland. «Tissue distribution of doxorubicin associated with polyisohexylecyanoacrylate nanoparticles». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **1990**, 26(1): p.13-18.
9. N. Chiannikulchai, N. Ammoury, B. Caillou, J.P. Devissaguet, and P. Couvreur. «Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcome M 5076 metastasis-bearing mice». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **1990**, 26(2): p.122-126.
10. O. Balland, H. Pinto-Alphandary, A. Viron, E. Puvion, A. Andremont, and P. Couvreur. «Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium* and treated with (3H)ampicillin-loaded nanoparticles». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **1996**, 37(1): p.105-115.
11. T. Blunk, D.F. Hochstrasser, J.C. Sanchez, B.W. Mueller, and R.H. Mueller. «Colloidal carriers for intravenous drug targeting: plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis». *Electrophoresis*, **1993**, 14(12): p.1382-1387.
12. M.E. Price, R.M. Cornelius, and J.L. Brash. «Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma». *Biochimica et Biophysica Acta*, **2001**, 1512(2): p.191-205.
13. L. Thiele, J.E. Diederichs, R. Reszka, H.P. Merkle, and E. Walter. «Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells». *Biomaterials*, **2003**, 24(8): p.1409-1418.
14. V. Hlady and J. Buijs. «Protein adsorption on solid surfaces». *Current Opinion in Biotechnology*, **1996**, 7(1): p.72-77.
15. H. Kawaguchi, D. Duracher, and A. Elaissari. «Interaction of proteins with thermally sensitive particles». *Sustactant Science Series*, ed. T. Sato and R. Ruch. Marcel Dekker. **1980**, Vol.9 (Stabilization of colloidal dispersions sensitive particles). p.189-210.
16. C.A. Haynes and W. Norde. «Globular proteins at solid/liquid interfaces». *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **1994**, 2(6): p.517-566.

17. M.G. Torsten and H.M. Rainer. «Protein adsorption patterns on poloxamer- and poloxamine-stabilized solid lipid nanoparticles (SLN)». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2005**, 60(3): p.361-372.
18. E. Brynda, N.A. Cepalova, and M. Stol. «Equilibrium adsorption of human serum albumin and human fibrinogen on hydrophobic and hydrophilic surfaces». *Journal of Biomedical Materials Research*, **1984**, 18(6): p.685-693.
19. K.S. Soppimath, 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.
20. F. Macritchie. «Adsorption of proteins at the solid/liquid interface». *Journal of Colloid and Interface Science*, **1972**, 38(2): p.484-488.
21. C.G. Golander and W.G. Pitt. «Characterization of hydrophobicity gradients prepared by means of radiofrequency plasma discharge». *Biomaterials*, **1990**, 11(1): p.32-35.
22. T. Arai and W. Norde. «The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces. 2. Sequential and competitive adsorption». *Colloids and Surfaces*, **1990**, 51: p.17-28.
23. F.X. Lacasse, M.C. Filion, N.C. Phillips, E. Escher, J.N. McMullen, and P. Hildgen. «Influence of surface properties at biodegradable microsphere surfaces: effects on plasma protein adsorption and phagocytosis». *Pharmaceutical Research*, **1998**, 15(2): p.312-317.
24. A. Gessner, R. Waicz, A. Lieske, B. Paulke, K. Mader, and R.H. Muller. «Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption». *International Journal of Pharmaceutics*, **2000**, 196(2): p.245-249.
25. S.I. Jeon, J.H. Lee, J.D. Andrade, and P.G. De Gennes. «Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory». *Journal of Colloid and Interface Science*, **1991**, 142(1): p.149-158.
26. W. Norde. «Driving forces for protein adsorption at solid surfaces». *Surfactant Sciences Series*, ed. M. Malmsten. Marcel Dekker. **1998**, Vol.74 (Biopolymers at interfaces). p.21-44.
27. S. Stolnik, L. Illum, and S.S. Davis. «Long circulating microparticulate drug carriers». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1995**, 16(2,3): p.195-214.
28. I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur. «Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2002**, 54(5): p.631-651.
29. G. Storm, S.O. Belliot, T. Daemen, and D.D. Lasic. «Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1995**, 17(1): p.31-48.
30. V.P. Torchilin and V.S. Trubetskoy. «Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating?». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1995**, 16(2,3): p.141-155.
31. R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, and R. Langer. «Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres». *Science*, **1994**, 263(5153): p.1600-1603.
32. C.K. Weiss, M.R. Lorenz, K. Landfester, and V. Mailaender. «Cellular uptake behavior of unfunctionalized and functionalized poly(n-butylcyanoacrylate) particles prepared in a miniemulsion». *Macromolecular Bioscience*, **2007**, 7(7): p.883-896.
33. I. Szleifer. «Protein adsorption on surfaces with grafted polymers: a theoretical approach». *Biophysical Journal*, **1997**, 72(2 Pt 1): p.595-612.
34. A. Halperin. «Polymer Brushes that Resist Adsorption of Model Proteins: Design Parameters». *Langmuir*, **1999**, 15(7): p.2525-2533.

35. M.A. Carignano and I. Szleifer. «Prevention of protein adsorption by flexible and rigid chain molecules». *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **2000**, 18(3,4): p.169-182.
36. J. Kreuter, R.N. Alyautdin, D.A. Kharkevich, and A.A. Ivanov. «Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles)». *Brain Research*, **1995**, 674(1): p.171-174.
37. P. Calvo, B. Gouritin, H. Chacun, D. Desmaele, J. D'Angelo, J.P. Noel, D. Georjgin, E. Fattal, J.P. Andreux, and P. Couvreur. «Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery». *Pharmaceutical Research*, **2001**, 18(8): p.1157-1166.
38. M.T. Peracchia, D. Desmaele, P. Couvreur, and J. d'Angelo. «Synthesis of a Novel Poly(MePEG cyanoacrylate-co-alkyl cyanoacrylate) Amphiphilic Copolymer for Nanoparticle Technology». *Macromolecules*, **1997**, 30(4): p.846-851.
39. I. Brigger, J. Morizet, G. Aubert, H. Chacun, M.J. Terrier-Lacombe, P. Couvreur, and G. Vassal. «Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2002**, 303(3): p.928-936.
40. D. Labarre, C. Vauthier, C. Chauvierre, B. Petri, R. Muller, and M. Chehimi Mohamed. «Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush». *Biomaterials*, **2005**, 26(24): p.5075-5084.
41. C. Chauvierre, L. Leclerc, D. Labarre, M. Appel, M.C. Marden, P. Couvreur, and C. Vauthier. «Enhancing the tolerance of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles with a modular surface design». *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 338(1-2): p.327-332.
42. E. Dellacherie, G. Ruxandra, and Q. Patricia. «Les nanosphères "furtives" comme nouvelles formes galéniques injectables: espoirs et réalités». *Medecin/Science*, **2001**, 17: p.619-626.
43. C. Weber, C. Coester, J. Kreuter, and K. Langer. «Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles». *International Journal of Pharmaceutics*, **2000**, 194: p.91-102.
44. S. Dreis, F. Rothweiler, M. Michaelis, J. Cinatl, J. Kreuter, and K. Langer. «Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles». *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 341(1-2): p.207-214.
45. M. Konishi, Y. Tabata, M. Kariya, A. Suzuki, M. Mandai, K. Nanbu, K. Takakura, and S. Fujii. «In vivo anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel». *Journal of Controlled Release*, **2003**, 92(3): p.301-313.
46. S. Young, M. Wong, Y. Tabata, and A.G. Mikos. «Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules». *Journal of Controlled Release*, **2005**, 109(1-3): p.256-274.
47. L. Hovgaard and H. Brondsted. «Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery». *Journal of Controlled Release*, **1995**, 36(1-2): p.159-166.
48. S. Mitra, U. Gaur, P.C. Ghosh, and A.N. Maitra. «Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier». *Journal of Controlled Release*, **2001**, 74(1-3): p.317-323.
49. M. George and T.E. Abraham. «Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review». *Journal of Controlled Release*, **2006**, 114(1): p.1-14.
50. M. George and T.E. Abraham. «pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs». *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 335(1-2): p.123-129.
51. K.A. Janes, M.P. Fresneau, A. Marazuela, A. Fabra, and M.J. Alonso. «Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin». *Journal of Controlled Release*, **2001**, 73(2-3): p.255-267.

52. O. Chambin, D. Champion, C. Debray, M.H. Rochat-Gonthier, M. Le Meste, and Y. Pourcelot. «Effects of different cellulose derivatives on drug release mechanism studied at a preformulation stage». *Journal of Controlled Release*, **2004**, 95(1): p.101-108.
53. M. Thanou and H.E. Junginger. «Pharmaceutical applications of chitosan and derivatives». *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, ed. S. Dumitriu. Marcel Dekker. **2004**. p.661-678.
54. A. Domard and M. Domard. «Chitosan: structure-properties relationship and biomedical applications». *Polymeric biomaterials*, ed. S. Dumitriu. Marcel Dekker. **2001**. p.187-212.
55. M.W. Anthonsen, K.M. Varum, and O. Smidsrod. «Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation». *Carbohydrate Polymers*, **1993**, 22(3): p.193-201.
56. V. Grabovac, D. Guggi, and A. Bernkop-Schnürch. «Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57(11): p.1713-1723.
57. M. Thanou, J.C. Verhoef, P. Marbach, and H.E. Junginger. «Intestinal absorption of octreotide: N-trimethyl chitosan chloride (TMC) ameliorates the permeability and absorption properties of the somatostatin analogue in vitro and in vivo». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2000**, 89(7): p.951-957.
58. B.S. Andreas and S. Hans. «Drug delivery system for the release of α -lipoic acid in the colon containing chitosan». **2004**, US 2004108779.
59. B. Kloareg. «Isolation and analysis of cell walls of the brown marine algae *Pelvetia canaliculata* and *Ascophyllum nodosum*». *Physiologie Vegetale*, **1984**, 22(1): p.47-56.
60. K.I. Draget, K. Steinsvag, E. Onsoyen, and O. Smidsrod. «Monovalent alginate counterions; effects on Ca^{2+} -mediated gelation». *Annual Transactions of the Nordic Rheology Society*, **1997**, 5: p.26-30.
61. T.L. Bowersock and H. Hogenesch. «Oral immunization using microparticles». *Controlled Drug Delivery*, **1997**: p.269-288.
62. H. Keshaw, Forbes A, Day R M. «Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass». *Biomaterials*, **2005**, 26(19): p.4171-4179.
63. T A Read, V. Stensvaag, H. Vindenes, E. Ulvestad, R. Bjerkvig, and F. Thorsen. «Cells encapsulated in alginate: a potential system for delivery of recombinant proteins to malignant brain tumors». *International Journal of Developmental Neuroscience*, **1999**, 17(5-6): p.653-663.
64. C.V. Liew, L.W. Chan, A.L. Ching, and P.W.S. Heng. «Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets». *International Journal of Pharmaceutics*, **2006**, 309: p.25-37.
65. E. Khalikova, P. Susi, and T. Korpela. «Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: Fundamentals and applications». *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2005**, 69(2): p.306-325.
66. R. Mehvar. «Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents». *Journal of Controlled Release*, **2000**, 69(1): p.1-25.
67. S. Li and M. Vert. «Biodegradable polymers : polyesters». *Encyclopedia of controlled drug delivery*, ed. E. Mathiowitz. John Wiley & Sons. **1999**, Vol.1-2. p.71-93.
68. L.K. Fung and W.M. Saltzman. «Polymeric implants for cancer chemotherapy». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1997**, 26(2,3): p.209-230.
69. N. Wang, Wu X S. «A novel approach to stabilization of protein drugs in poly(lactic-co-glycolide acid) microspheres using agarose hydrogel». *International Journal of Pharmaceutics*, **1998**, 166: p.1-14.

70. S.Y. Lin, K.S. Chen, H.H.Teng, and M.L. Li. «In vitro degradation and sissomution behavious of microspheres prepared by three low molecular weight polyesters». *Journal of Microencapsulation*, **2000**, 17(5): p.577-586.
71. M.D. Blanco, R.L. Sastre, C. Teijon, R. Olmo, and J.M. Teijon. «Degradation behaviour of microspheres prepared by spray-drying poly(L,-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers». *International Journal of Pharmaceutics*, **2006**, 326(1-2): p.139-147.
72. P. Kocbek, N. Obermajer, M. Cegnar, J. Kos, and J. Kristl. «Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody». *Journal of Controlled Release*, **2007**, 120(1-2): p.18-26.
73. A. Cirstoiu-Hapca, L. Bossy-Nobs, F. Buchegger, R. Gurny, and F. Delie. «Differential tumor cell targeting of anti-HER2 (Herceptin) and anti-CD20 (Mabthera) coupled nanoparticles». *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 331(2): p.190-196.
74. M. Cegnar, A. Premzl, V. Zavasnik-Bergant, J. Kristl, and J. Kos. «Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as a carrier system for delivering cysteine protease inhibitor cystatin into tumor cells». *Experimental Cell Research*, **2004**, 301(2): p.223-231.
75. R. Lin, L.S. Ng, and C.-H. Wang. «In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles». *Biomaterials*, **2005**, 26(21): p.4476-4485.
76. H. Zhang and S. Gao. «Temozolomide/PLGA microparticles and antitumor activity against Glioma C6 cancer cells in vitro». *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 329(1-2): p.122-128.
77. R. Chandra and R. Rustgi. «Biodegradable polymers». *Progress in Polymer Science*, **1998**, 23(7): p.1273-1335.
78. S.R. Jamees, N. Suma, and A. Jayakrishana. «Protein release from poly (epsilon-caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques : a comparative study». *Journal of Biomedical Materials Research*, **1997**, 8(6): p.457-466.
79. J. Kreuter and H.J. Zehnder. «The use of cobalt-60-g-irradiation for the production of vaccines». *Radiation Effects*, **1978**, 35(3): p.161-166.
80. U.E. Berg, J. Kreuter, P.P. Speiser, and M. Soliva. «Preparation and in vitro investigation of polymeric adjuvants for vaccines». *Pharmazeutische Industrie*, **1986**, 48(1): p.75-79.
81. J. Kreuter and E. Liehl. «Long-term studies of microencapsulated and adsorbed influenza vaccine nanoparticles». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1981**, 70(4): p.367-371.
82. C. Chauvierre, C. Vauthier, D. Labarre, and H. Hommel. «Evaluation of the surface properties of dextran-coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles by spin-labelling coupled with electron resonance spectroscopy». *Colloid and Polymer Science*, **2004**, 282(9): p.1016-1025.
83. V. Lenaerts, P. Couvreur, D. Christiaens-Leyh, E. Joiris, M. Roland, B. Rollman, and P. Speiser. «Degradation of poly(isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles». *Biomaterials*, **1984**, 5(2): p.65-68.
84. D.R. Robello, T.D. Eldridge, and M.T. Swanson. «Degradation and stabilization of polycyanoacrylates». *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **1999**, 37(24): p.4570-4581.
85. C. Vautier, P. Couvreur, and C. Bubernet. «Poly(alkylcyanoacrylate)». *Surfactant Science Series*, ed. A. Elaissari. Marcel Dekker. **2003**, Vol.116 (Colloidal biomolecules, biomaterials, and biomedical applications). p.349-370.
86. P. Couvreur, B. Kante, L. Grislain, M. Roland, and P. Speiser. «Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1982**, 71(7): p.790-792.

87. J.H. Lee, H.B. Lee, and J.D. Andrade. «Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces». *Progress in Polymer Science*, **1995**, 20(6): p.1043-1079.
88. A. Vila, A. Sanchez, M. Tobio, P. Calvo, and M.J. Alonso. «Design of biodegradable particles for protein delivery». *Journal of Controlled Release*, **2002**, 78(1-3): p.15-24.
89. C. Prego, D. Torres, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, E. Quinoa, and M.J. Alonso. «Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery». *Journal of Controlled Release*, **2006**, 111(3): p.299-308.
90. P. Chan, M. Kurisawa, J.E. Chung, and Y.-Y. Yang. «Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery». *Biomaterials*, **2007**, 28(3): p.540-549.
91. R. Gref, M. Luck, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, and R.H. Muller. «'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption». *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **2000**, 18(3,4): p.301-313.
92. F. Esmaeili, M.H. Ghahremani, B. Esmaeili, M.R. Khoshayand, F. Atyabi, and R. Dinarvand. «PLGA nanoparticles of different surface properties: Preparation and evaluation of their body distribution». *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, Article in Press.
93. M.T. Peracchia, E. Fattal, D. Desmaele, M. Besnard, J.P. Noel, J.M. Gomis, M. Appel, J. d'Angelo, and P. Couvreur. «Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting». *Journal of Controlled Release*, **1999**, 60(1): p.121-128.
94. H.M. Kelly, P.B. Deasy, E. Ziaka, and N. Claffey. «Formulation and preliminary in vivo dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis». *International Journal of Pharmaceutics*, **2004**, 274(1-2): p.167-183.
95. J.L. Dalsin, B.-H. Hu, B.P. Lee, and P.B. Messersmith. «Mussel Adhesive Protein Mimetic Polymers for the Preparation of Nonfouling Surfaces». *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125(14): p.4253-4258.
96. M. Amiji and K. Park. «Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers». *Biomaterials*, **1992**, 13(10): p.682-692.
97. M.M. Amiji. «Synthesis of anionic poly(ethylene glycol) derivative for chitosan surface modification in blood-contacting applications». *Carbohydrate Polymers*, **1997**, 32(3/4): p.193-199.
98. D.E. Owens and N.A. Peppas. «Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles». *International Journal of Pharmaceutics*, **2006**, 307(1): p.93-102.
99. P. Vermette and L. Meagher. «Interactions of phospholipid- and poly(ethylene glycol)-modified surfaces with biological systems: relation to physico-chemical properties and mechanisms». *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **2003**, 28(2-3): p.153-198.
100. R. Bodmeier and P. Maincent. «Polymeric dispersions as drug carriers». *Pharmaceutical dosage forms* ed. H.A. Lieberman, M.M. Rieger, and G.S. Banker. Marcel Dekker. **1998**, Vol.3 (Disperse systems). p.87-128.
101. J. Kreuter and P. Speiser. «In vitro studies of poly(methylmethacrylate) adjuvants». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1976**, 65(1624 -1627).
102. R. Gurny, N.A. Peppas, D.D. Harrington, and G.S. Banker. «Development of biodegradable and injectable latexes for controlled release of potent drugs». *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **1981**, 7(1): p.1-25.

103. M.F. Zambaux, 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.
104. K.F. Pistel, B. Bittner, H. Koll, G. Winter, and T. Kissela. «Biodegradable recombinant human erythropoietin loaded microspheres prepared from linear and star-branched block copolymers: Influence of encapsulation technique and polymer composition on particle characteristics». *Journal of Controlled Release*, **1999**, 59: p.309-325.
105. J.W. Tom and P.G. Debenedetti. «Particle formation with supercritical fluids - a review». *Journal of Aerosol Science*, **1991**, 22(5): p.555-584.
106. Y. Wang, R.N. Dave, and R. Pfeffer. «Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process». *Journal of Supercritical Fluids*, **2004**, 28(1): p.85-99.
107. M. Perrut, J. Jung, and F. Leboeuf. «Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes». *International Journal of Pharmaceutics*, **2005**, 288(1): p.3-10.
108. N. Foster, R. Mammucari, F. Dehghani, A. Barrett, K. Bezanehtak, E. Coen, G. Combes, L. Meure, A. Ng, H.L. Regtop, and A. Tandy. «Processing Pharmaceutical Compounds Using Dense Gas Technology». *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2003**, 42(25): p.6476-6493.
109. P. Pathak, M.J. Meziani, T. Desai, and Y.-P. Sun. «Nanosizing Drug Particles in Supercritical Fluid Processing». *Journal of the American Chemical Society*, **2004**, 126(35): p.10842-10843.
110. M.J. Meziani, P. Pathak, T. Desai, and Y.-P. Sun. «Supercritical Fluid Processing of Nanoscale Particles from Biodegradable and Biocompatible Polymers». *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2006**, 45(10): p.3420-3424.
111. E. Allemann, 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.
112. H. Fessi, J.P. Dexvissaguet, F. Puisieux, and C. Thies. «Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules.». **1986**, FR 8618446.
113. M. Leroueil-Le Verger, 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.
114. P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, and M.J. Alonso. «Development of positively charged colloidal drug carriers. Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions». *Colloid and Polymer Science*, **1997**, 275(1): p.46-53.
115. S. Barbault-Foucher, R. Gref, P. Russo, J. Guechot, and A. Bochot. «Design of poly- ϵ -caprolactone nanospheres coated with bioadhesive hyaluronic acid for ocular delivery». *Journal of Controlled Release*, **2002**, 83(3): p.365-375.
116. C. Rouzes, R. Gref, M. Leonard, A. De Sousa 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.
117. C. Rouzes, A. Durand, M. Leonard, and E. Dellacherie. «Surface activity and emulsification properties of hydrophobically modified dextrans». *Journal of Colloid and Interface Science*, **2002**, 253(1): p.217-223.

118. H.M. Redhead, S.S. Davis, and L. Illum. «Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation». *Journal of Controlled Release*, **2001**, 70(3): p.353-363.
119. G. Fontana, M. Licciardi, S. Mansueto, D. Schillaci, and G. Giammona. «Amoxicillin-loaded polyethyl cyanoacrylate nanoparticles: Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake». *Biomaterials*, **2001**, 22(21): p.2857-2865.
120. P. Couvreur, M. Roland, and P. Speiser. «Submicroscopic particles and pharmaceutical compositions containing them». **1982**, US 4329332.
121. A. Durand, 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.
122. C. Lemarchand, R. Gref, S. Lesieur, H. Hommel, B. Vacher, A. Besheer, K. Maeder, and P. Couvreur. «Physico-chemical characterization of polysaccharide-coated nanoparticles». *Journal of Controlled Release*, **2005**, 108(1): p.97-111.
123. I. Brigger, Morizet J, Aubert G, Chacun H, Terrier-Lacombe M J, Couvreur P, Vassal G. «Poly(ethylene glycol)-coated hexadecyl cyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2002**, 303(3): p.928-936.
124. D. Chognot, J.L. Six, M. Leonard, F. Bonneaux, C. Vigneron, and E. Dellacherie. «Physicochemical evaluation of PLA nanoparticles stabilized by water-soluble MPEO-PLA block copolymers». *Journal of Colloid and Interface Science*, **2003**, 268(2): p.441-447.
125. C. Lemarchand, R. Gref, and P. Couvreur. «Polysaccharide-decorated nanoparticles». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2004**, 58(2): p.327-341.
126. F. Leonard, R.K. Kulkarni, G. Brandes, J. Nelson, and J.T. Cameron. «Synthesis and degradation of poly(alkyl a-cyanoacrylates)». *Journal of Applied Polymer Science*, **1966**, 10(2): p.259-272.
127. M.E. King and A.Y. Kinney. «Tissue adhesives: a new method of wound repair». *The Nurse Practitioner*, **1999**, 24(10): p.66, 69-70, 73-64.
128. H. Oowaki, S. Matsuda, N. Sakai, T. Ohta, H. Iwata, A. Sadato, W. Taki, N. Hashimoto, and Y. Ikada. «Non-adhesive cyanoacrylate as an embolic material for endovascular neurosurgery». *Biomaterials*, **2000**, 21(10): p.1039-1046.
129. E. Fattal and C. Vauthier. «Drug Delivery: Nanoparticles». *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, ed. J. Swarbrick. Marcel Dekker. **2002**. p.1874-1892.
130. P. Couvreur, G. Barratt, E. Fattal, P. Legrand, and C. Vauthier. «Nanocapsule technology: a review». *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **2002**, 19(2): p.99-134.
131. P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Guiot, P. Bauduin, and P. Speiser. «Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties». *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **1979**, 31(5): p.331-332.
132. N. Behan, C. Birkinshaw, and N. Clarke. «Poly *n*-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerization and particle formation». *Biomaterials*, **2001**, 22(11): p.1335-1344.
133. N. Behan, C. O'Sullivan, and C. Birkinshaw. «Synthesis and in-vitro drug release of insulin-loaded poly(*n*-butyl cyanoacrylate) nanoparticles». *Macromolecular Bioscience*, **2002**, 2(7): p.336-340.
134. A. Ambruosi, S. Gelperina, A. Khalansky, S. Tanski, A. Theisen, and J. Kreuter. «Influence of surfactants, polymer and doxorubicin loading on the anti-tumour effect of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in a rat glioma model». *Journal of Microencapsulation*, **2006**, 23(5): p.582-592.

135. S.C. Yang, H.X. Ge, Y. Hu, X.Q. Jiang, and C.Z. Yang. «Formation of positively charged poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilized with chitosan». *Colloid and Polymer Science*, **2000**, 278(4): p.285-292.
136. M. Gallardo, G. Couarraze, B. Denizot, L. Treupel, P. Couvreur, and F. Puisieux. «Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of poly(isobutyl 2-cyanoacrylate)». *International Journal of Pharmaceutics*, **1993**, 100(1-3): p.55-64.
137. C. Cedric, L. Denis, C. Patrick, and V. Christine. «Novel polysaccharide-decorated poly(isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles». *Pharmaceutical Research*, **2003**, 20(11): p.1786-1793.
138. D. Labarre, C. Vauthier, C. Chauvierre, B. Petri, R. Mueller, and M.M. Chehimi. «Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush». *Biomaterials*, **2005**, 26(24): p.5075-5084.
139. S.J. Douglas, L. Illum, and S.S. Davis. «Particle size and size distribution of poly(butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. II. Influence of stabilizers». *Journal of Colloid and Interface Science*, **1985**, 103(1): p.154-163.
140. M.T. Peracchia, C. Vauthier, F. Puisieux, and P. Couvreur. «Development of sterically stabilized poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly(ethylene glycol)». *Journal of Biomedical Materials Research*, **1997**, 34(3): p.317-326.
141. Y. Nakada, E. Fattal, M. Foulquier, and P. Couvreur. «Pharmacokinetics and biodistribution of oligonucleotide adsorbed onto poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration in mice». *Pharmaceutical Research*, **1996**, 13(1): p.38-43.
142. R.N. Alyaudtin, A. Reichel, R. Lobenberg, P. Ramge, J. Kreuter, and D.J. Begley. «Interaction of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles with the blood-brain barrier in vivo and in vitro». *Journal of Drug Targeting*, **2001**, 9(3): p.209-221.
143. J.L. Arias, V. Gallardo, M.A. Ruiz, and A.V. Delgado. «Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(butylcyanoacrylate) nanospheres». *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 337(1-2): p.282-290.
144. C.K. Weiss, U. Ziener, and K. Landfester. «A route to nonfunctionalized and functionalized poly(*n*-butylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation in miniemulsion». *Macromolecules*, **2007**, 40(4): p.928-938.
145. C. Limouzin, A. Caviggia, F. Ganachaud, and P. Hemery. «Anionic polymerization of *n*-butyl cyanoacrylate in emulsion and miniemulsion». *Macromolecules*, **2003**, 36(3): p.667-674.
146. C.-Y. Huang, C.-M. Chen, and Y.-D. Lee. «Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly(*n*-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion». *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 338(1-2): p.267-275.
147. M. Wohlgemuth, W. Machtle, and C. Mayer. «Improved preparation and physical studies of polybutylcyanoacrylate nanocapsules». *Journal of Microencapsulation*, **2000**, 17(4): p.437-448.
148. S. Watnasirichaikul, N.M. Davies, T. Rades, and I.G. Tucker. «Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions». *Pharmaceutical Research*, **2000**, 17(6): p.684-689.
149. G. Lambert, E. Fattal, H. Pinto-Alphandary, A. Gulik, and P. Couvreur. «Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides». *Pharmaceutical Research*, **2000**, 17(6): p.707-714.
150. I. Bertholon, G. Ponchel, D. Labarre, P. Couvreur, and C. Vauthier. «Bioadhesive properties of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysaccharide». *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2006**, 6(9/10): p.3102-3109.

151. I. Bravo-Osuna, C. Vauthier, A. Farabollini, G.F. Palmieri, and G. Ponchel. «Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles». *Biomaterials*, **2007**, 28(13): p.2233-2243.
152. C. Vauthier, C. Dubernet, E. Fattal, H. Pinto-Alphandary, and P. Couvreur. «Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2003**, 55(4): p.519-548.
153. W.R. Vezin and A.T. Florence. «In vitro heterogeneous degradation of poly(*n*-alkyl α -cyanoacrylates)». *Journal of Biomedical Materials Research*, **1980**, 14(2): p.93-106.
154. B. Kante, P. Couvreur, G. Dubois-Krack, C. De Meester, P. Guiot, M. Roland, M. Mercier, and P. Speiser. «Toxicity of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. I: Free nanoparticles». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1982**, 71(7): p.786-790.
155. L.H. Reddy and R.R. Murthy. «Influence of polymerization technique and experimental variables on the particle properties and release kinetics of methotrexate from poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles». *Acta Pharmaceutica*, **2004**, 54(2): p.103-118.
156. C. Vauthier, C. Dubernet, E. Fattal, H. Pinto-Alphandary, and P. Couvreur. «Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2003**, 55(4): p.519-548.
157. E. Rotureau, E. Marie, M. Leonard, E. Dellacherie, T.A. Camesano, and A. Durand. «From polymeric surfactants to colloidal systems (2): Preparation of colloidal dispersions». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2006**, 288(1-3): p.62-70.
158. E. Rotureau, 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.
159. E. Marie, E. Rotureau, E. Dellacherie, and A. Durand. «From polymeric surfactants to colloidal systems: 4. Neutral and anionic amphiphilic polysaccharides for miniemulsion stabilization and polymerization». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2007**, 308(1-3): p.25-32.

Chapitre II

Synthèse et/ou caractérisation des polymères amphiphiles

1. INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la présence d'une couche polymère hydrophile à la surface de nanoparticules peut permettre de prolonger leur temps de circulation dans le sang. Ce phénomène est la conséquence d'un effet de répulsion stérique vis-à-vis de certaines protéines plasmatiques, les opsonines, responsables de la capture des particules par les macrophages. L'efficacité de cette couche hydrophile est influencée par la conformation à la surface du polymère qui la constitue. Pour réaliser cette couche, on a souvent recours à des polymères amphiphiles qui sont, soit utilisés pendant la préparation des particules par des procédés d'émulsion/évaporation ou de nanoprecipitation, soit adsorbés sur des particules préformées. Notre objectif étant de préparer des nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate) (PACA) à surface hydrophile par miniémulsion, nous avons envisagé, pour constituer la couronne hydrophile, de stabiliser la miniémulsion par deux familles de polymères amphiphiles : la première est constituée de dérivés hydrophobes du dextrane et la seconde de dérivés du poly(oxyde d'éthylène) (POE). Le but était de favoriser dans le premier cas (polymères greffés en peigne) une adsorption « side-on » et dans le second cas une adsorption « end-on » (polymères à blocs).

Ce chapitre concerne la synthèse et/ou la caractérisation de ces deux familles de polymères amphiphiles. Les dérivés du POE choisis sont des produits commerciaux : Brij[®]78, Brij[®]700, et Tween[®]80. Dans le cas du dextrane, la modification a été réalisée par fixation covalente de groupes hydrophobes, en particulier de type phénoxy, sur le squelette hydrophile du dextrane. Ces synthèses, mises au point au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), permettent d'obtenir des polysaccharides amphiphiles, neutres ou chargés ^[1-3], dont les propriétés physico-chimiques ont été étudiées en détail. Par exemple, il a été montré que les propriétés tensioactives des dextrans amphiphiles alkyles synthétisés peuvent être améliorées en augmentant le taux de modification en chaîne alkyle. Cependant, un excès de groupements hydrophobes conduit à la formation d'espèces insolubles dans l'eau ^[4].

Par ailleurs, les nanoparticules de PACA étudiées ont été synthétisées par polymérisation en miniémulsion à pH acide en présence des polymères amphiphiles. Il était donc indispensable d'étudier leur stabilité dans ces conditions. Pour ce faire, dans le cas du

dextrane, différentes techniques ont été utilisées : l'évolution du taux de modification du polysaccharide amphiphile a été suivie par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H), tandis que la chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser (SEC-MALLS) nous a permis de suivre la variation de la masse molaire du polymère. Dans le cas des dérivés du POE, la stabilité du Brij78[®] en milieu acide a été suivie par RMN ^1H . Enfin, les propriétés tensioactives des deux types de polymères amphiphiles, notamment la tension interfaciale eau/dodécane, a été étudiée. La cinétique de l'abaissement de la tension interfaciale a été suivie en fonction du temps et de la concentration en polymère amphiphile.

2. SYNTHÈSE DU DEXTRANE PHENOXY

2.1. Généralités sur le dextrane

Le dextrane fait partie d'une famille de polysaccharides constitués d'un enchaînement d'unités glucopyranose liées par des liaisons en α -1,6 (un minimum de 50% ^[5]) avec des chaînes latérales en α -1,2, α -1,3 ou α -1,4 ^[6-8]. Il est obtenu par fermentation de sucroses catalysée par une enzyme, la dextransase-sucrase.

La bactérie *Leuconostoc mesenteroides* (souche B 512-F) est la plus souvent utilisée pour la production commerciale du dextrane, notamment pour les secteurs pharmaceutiques et biochimiques ^[5, 6, 9]. Le dextrane dit « natif », obtenu directement après la synthèse enzymatique, possède une forte masse molaire (quelques millions g/mol) avec une large distribution de masses molaires ^[10, 11]. Il ne peut pas être directement utilisé pour des applications pharmaceutiques. En effet, la fraction de dextrane de très faibles masses molaires va être trop rapidement éliminée de la circulation sanguine, alors que celle de fortes masses molaires peut entraîner une coagulation avec le sang ^[10]. C'est pourquoi le dextrane « natif » subit une hydrolyse partielle après production ^[6], le plus souvent réalisée par de l'acide chlorhydrique, pour conduire à des polymères plus courts. Les dextranses sont ensuite séparés par fractionnement en utilisant un mélange eau/éthanol ^[11]. Les dextranses ainsi obtenus possèdent des masses molaires adaptées aux applications visées (par exemple, le dextrane T40 a une masse molaire moyenne en masse de 40 000 g/mol, le T70 de 70 000 g/mol) avec une distribution étroite ^[10-12]. Leur taux de ramification (en α -1,3) est en général voisin de 5%, la

longueur des branches étant généralement de 1 à 2 unités glucose [12, 13]. Sa structure chimique est représentée sur la figure II.1.

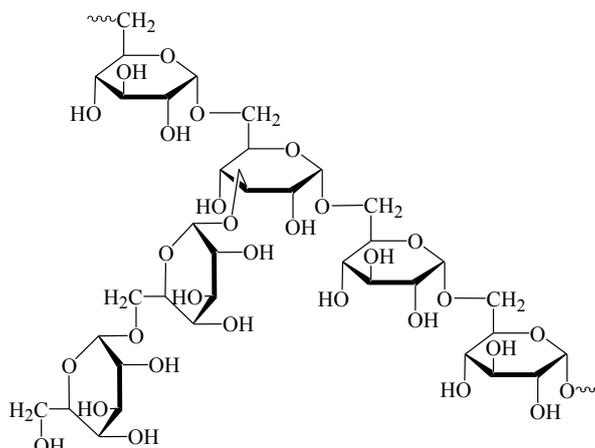


Figure II.1 : Représentation schématique de la structure générale du dextrane synthétisé à l'aide de la bactérie *Leuconostoc mesenteroides*.

Les dextranses de faibles masses molaires sont éliminés directement de l'organisme par le système de filtration rénale [14, 15]. Par ailleurs, quelle que soit sa masse molaire, le dextrane est dégradé en glucose par la dextranase (α -1 glucosidase), enzyme présente dans les organes du système des phagocytes mononucléés composé du foie, de la rate et du rein [15-17]. Le glucose est lui-même totalement hydrolysé en CO_2 et en H_2O . Le dextrane est donc totalement biodégradable et biorésorbable, par conséquent bioéliminable, qualité indispensable pour une application *in vivo*. De plus, ses produits de dégradation sont des éléments constitutifs du système vivant et ne sont donc pas toxiques pour l'organisme.

Les applications du dextrane sont nombreuses. Il peut être couplé à un principe actif grâce aux nombreux groupements hydroxyle présents le long de leur chaîne [15]. Le dextrane prolonge ainsi le temps de circulation du principe actif dans le sang, limite sa dispersion hors des vaisseaux sanguins, et le protège contre les dégradations chimiques ou biologiques [15]. La libération du principe actif est obtenue après hydrolyse de la liaison dextrane - principe actif. Un des premiers principes actifs étudiés fut l'insuline [18, 19]. Depuis, d'autres types d'agents thérapeutiques (antibiotiques, peptides, enzymes, vitamines...) [15] ont été fixés au dextrane.

D'autres exemples d'applications du dextrane concernent la modification de surfaces solides (oxyde de fer [15, 20, 21], silice [20], PLA [22, 23], polystyrène [24], PACA [25-28]). Les matériaux obtenus peuvent alors être utilisés, par exemple, comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique nucléaire ou pour la préparation de tests de diagnostic.

Par exemple, des dérivés du dextrane ont été employés pour l'élaboration de phases stationnaires composites. Dans ce cas, l'immobilisation (physique ou chimique) de polysaccharide à la surface de particules de silice, de polystyrène ou de PACA, permet de réduire significativement les interactions non-spécifiques avec les protéines.

Le dextrane est également préconisé pour la préparation d'hydrogels destinés à l'encapsulation et la libération contrôlée de peptides [15] ou de protéines [29, 30]. Le plus souvent, ces hydrogels sont obtenus par polymérisation radicalaire de méthacrylate de dextrane [29-31]. Le contrôle du taux de réticulation permet de moduler les vitesses de dégradation de l'hydrogel et de libération de la protéine [29, 30]. Les hydrogels à base de dextrane sont également utilisés dans le domaine de la chromatographie. Citons l'exemple des gels d'exclusion stérique Sephadex® [6] à base de dextrane plus ou moins réticulé selon le domaine de fractionnement souhaité.

2.2. Modification chimique du dextrane

Depuis une vingtaine d'années, les polysaccharides ont été l'objet de nombreuses modifications chimiques en vue d'obtenir des polymères aux applications les plus diverses notamment dans le domaine biomédical. Les travaux précurseurs sur la modification chimique d'un polysaccharide par fixation de groupements hydrophobes ont été réalisés par Landoll [32, 33]. La synthèse de ces polymères amphiphiles est basée sur la modification chimique de l'hydroxyéthylcellulose par différents époxydes en milieu basique. Ces travaux originaux ont permis de synthétiser de nouveaux polymères tensioactifs. Dès lors, les études physico-chimiques de nouvelles familles de polymères amphiphiles synthétisés dans des conditions définies ont pu démarrer. De nombreux travaux ont porté sur des polysaccharides amphiphiles préparés à partir de polymères obtenus par production bactérienne [34].

Dans le paragraphe suivant, nous nous intéresserons plus particulièrement aux modifications chimiques effectuées sur le dextrane.

Dans le cadre des travaux de Sanchez-Chaves et Arranz [35], le dextrane a été modifié par estérification des groupements hydroxyle par l'anhydride butyrique (en utilisant des amines tertiaires comme catalyseur) et par des *n*-alkyl chloroformates [36]. Pour ces derniers

polymères modifiés par des groupements éthyle ou butyle, il est intéressant de noter qu'ils deviennent insolubles en milieu aqueux respectivement à partir de taux de substitution de l'ordre de 81% et 69% (nombre d'unités glucose modifiées pour 100 unités). De façon similaire, des dérivés du dextrane ont été synthétisés à l'aide de l'acide laurique [37], ou de l'acide biliaire [38] en présence de N, N'-dicyclohexylcarbodiimide comme agent de couplage.

A titre indicatif, une autre voie de synthèse tout à fait originale a été développée par Kobayashi et Sumitomo [39]. Ils ont synthétisé un dextrane linéaire, sélectivement méthylé sur la position C-3, par polymérisation par ouverture de cycle du monomère 1,6-anhydro-2,4-di-O-benzyl-3-O-méthyl-glucopyranose. Cette polymérisation, dont le rendement est de l'ordre de 85%, est suivie d'une débenzylation. La masse molaire \overline{M}_w obtenue est comprise entre 13 000 et 23 000 g/mol avec un indice de polymolécularité de l'ordre de 3.

Le LCPM s'est quant à lui spécialisé depuis quelques années dans la modification du dextrane par des groupements hydrophobes de diverse nature, par réaction des fonctions hydroxyle avec un époxyde en milieu aqueux basique [37]. Ainsi des groupes phénoxy ou alkyle peuvent être greffés le long de la chaîne du polysaccharide [40-43]. Cette méthode permet un bon contrôle de la synthèse et du taux de modification. Cependant, ce dernier reste limité dans le cas des chaînes alkyle longues. En effet, la solubilité dans l'eau de l'époxyde correspondant est très faible, ce qui limite sa réactivité. Par ailleurs, le dextrane devient rapidement insoluble dans le système réactif lorsque le taux de modification dépasse un certain pourcentage. Pour obtenir un taux de substitution plus élevé, la modification du dextrane a été réalisée en milieu organique basique (hydroxyde de tétrabutylammonium, TBAOH). Cette méthode a permis d'augmenter significativement le taux de modification du dextrane. Plus récemment, une synthèse en milieu aqueux utilisant un tensioactif cationique, le bromure de dodécyl-triméthylammonium (DTAB) a été développée [41]. Elle permet de disperser finement les époxydes dans le milieu aqueux pour favoriser leur réaction avec le dextrane. Une augmentation du taux de modification avec la quantité du tensioactif a été observée. Enfin, le dextrane a également été substitué par des groupements hydrophiles tels que le monométhoxypoly(oxyde d'éthylène) (MPOE) [44]. Le greffage se produit entre un carbonate de dextrane et un MPOE aminé par l'intermédiaire d'une liaison uréthane.

Dans ce paragraphe, nous allons décrire la modification du dextrane par des groupes phénoxy.

2.2.1. Synthèse du dextrane phénoxy

La modification chimique du dextrane T40 (Pharmacia Biotech, masse molaire moyenne en masse $\overline{M}_w \approx 40\,000$ g/mol) est réalisée par fixation de groupements hydrophobes sur les fonctions hydroxyle du dextrane par l'intermédiaire d'une liaison éther. Cette réaction se fait aisément avec le 1,2-époxy-3-phénoxypropane (99%, Aldrich) en milieu basique, à température ambiante, en une seule étape. Le schéma de la synthèse est reporté sur la [figure II.2](#).

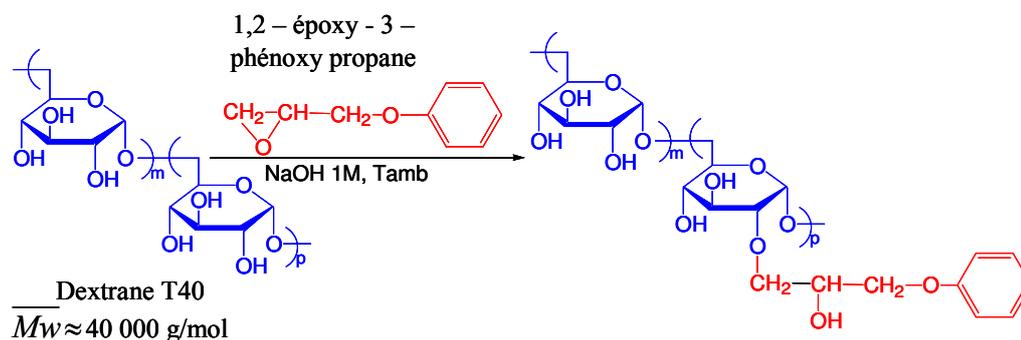


Figure II.2 : Schéma de synthèse des dextrane phénoxy.

Pour obtenir le taux de substitution requis, le 1,2-époxy-3-phénoxypropane est toujours en excès en raison de sa grande hydrophobie. Une étude expérimentale menée par C. Rouzes ^[4] a permis de définir les quantités de 1,2-époxy-phénoxypropane nécessaires pour obtenir le taux de modification visé. Les résultats sont présentés dans la [figure II.3](#). Les dérivés du dextrane T40 obtenus par cette méthode sont nommés DexP $_{\tau}$ où τ est le taux de modification du dextrane (voir le paragraphe 2.2.2). Signalons que les DexP $_{\tau}$ deviennent totalement insolubles dans l'eau lorsque le taux de substitution en groupe phénoxy dépasse 30%.

Protocole expérimental

10 g de dextrane T40 sont dissous dans 100 ml d'une solution de soude (1 M) pendant une heure. Le réactif 1,2-époxy-3-phénoxypropane est ensuite ajouté à cette solution, et le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 48 heures. Après réaction, la solution, devenue laiteuse, est précipitée dans 2 litres d'éthanol sous agitation vigoureuse (ultraturax). Le polymère obtenu est filtré sur un fritté de porosité 4 (SCHOTT DURAN[®]), relavé trois fois dans 500 ml d'éthanol afin d'éliminer le réactif en excès, puis séché sous vide à 40°C. Le produit obtenu est ensuite redissous dans 200 ml d'eau osmosée, dialysé (membrane Spectra/Por MWCO : 6000-8000) pendant 24 heures contre de l'eau osmosée pour éliminer les sels résiduels, et finalement lyophilisé.

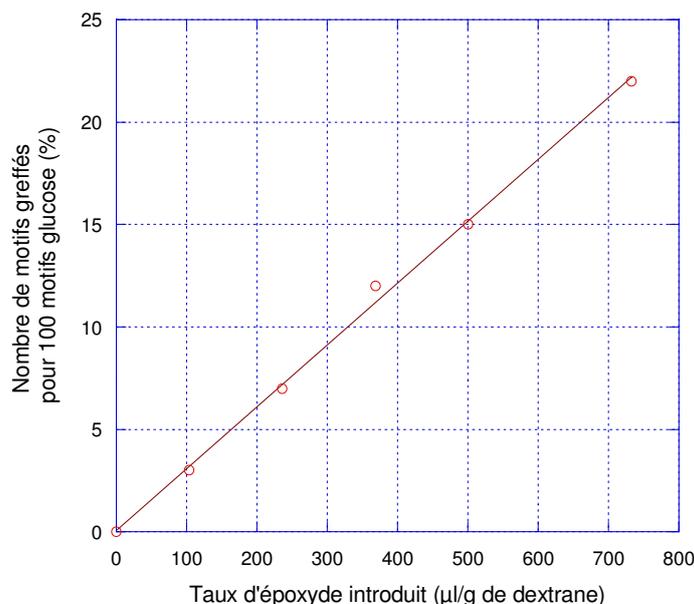


Figure II.3 : Influence de la quantité d'époxyde introduit sur le taux de substitution [4].

2.2.2. Détermination du taux de substitution des dextrans phénoxy

Après modification du dextrane T40, le taux de substitution en groupements phénoxy est déterminé par RMN ^1H (300,13 MHz, spectromètre Brüker Avance 300). Les échantillons analysés sont en solution dans du DMSO- d_6 , à une concentration d'environ 30 g/l. Le taux de substitution τ est exprimé en nombre de motifs glucose modifiés pour 100 motifs glucose (Equation II.1). Les polymères obtenus sont appelés: DexP τ .

$$\tau = \frac{p \times 100}{m + p} \quad \text{II. 1}$$

où p est le nombre de motifs glucose porteurs d'un motif hydrophobe ; m est le nombre de motifs glucose non modifiés.

Le spectre du dextrane T40 précurseur est présenté sur la figure II.4.

Le signal du proton anomérique est situé aux alentours de 4,7 ppm. Les trois signaux à 4,5, 4,8 et 4,9 ppm sont attribués aux protons des trois groupements hydroxyle. Les six protons non échangeables portés par les motifs glucose apparaissent sous forme d'un large massif entre 3,2 et 3,8 ppm [14]. Enfin, le signal du DMSO- d_6 se situe à 2,50 ppm, et l'eau dans le solvant à 3,33 ppm.

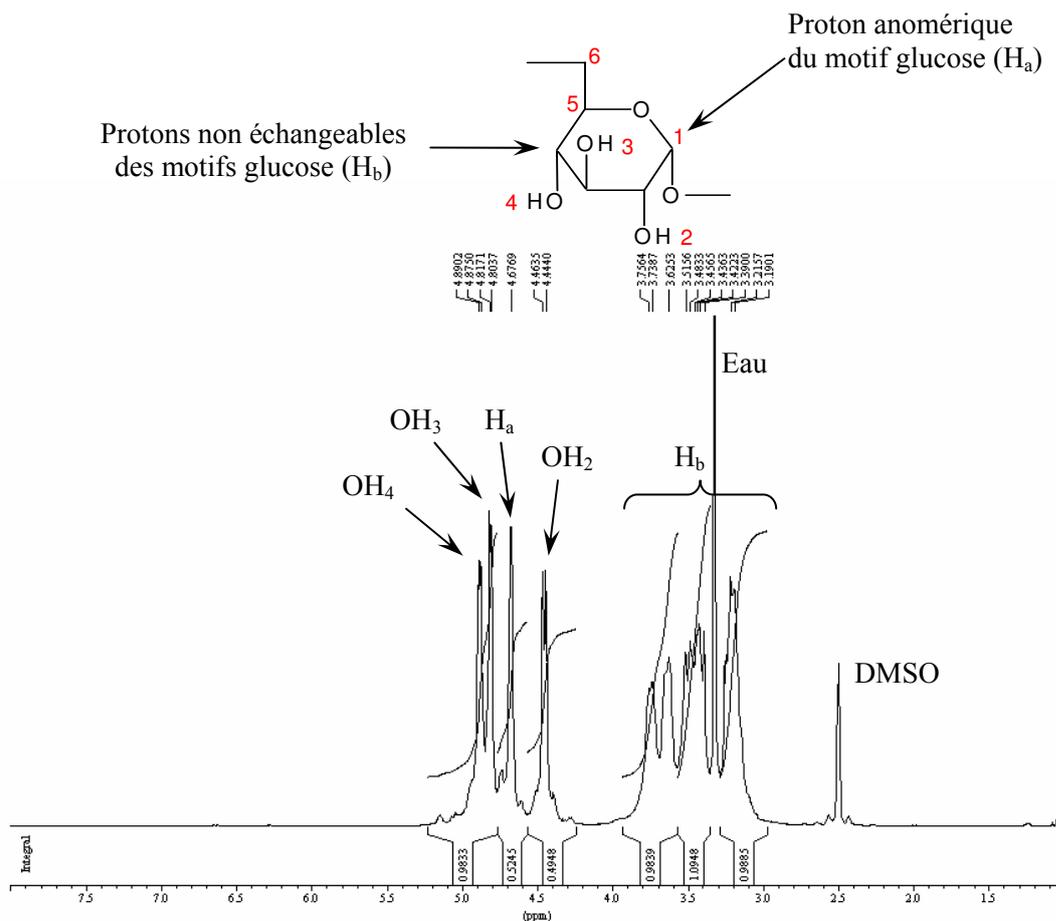


Figure II.4 : Spectre RMN ¹H du dextrane T40 précurseur dans le DMSO-*d*₆.

Après réaction du 1,2-époxy-3-phénoxypropane sur le dextrane (spectre donné sur la [figure II.5](#)), les signaux du proton anomérique et des protons des groupements hydroxyle non substitués demeurent inchangés.

Les signaux des 5 protons du bras espaceur entre la chaîne de dextrane et le noyau aromatique (groupe propanol) se superposent aux signaux des 6 protons non échangeables portés par les motifs glucose. Enfin, les protons aromatiques du groupement phénoxy se détachent des autres protons par un déplacement chimique important, avec des signaux caractéristiques situés entre 6,8 et 7,5 ppm.

Le calcul du taux de substitution (τ) est basé sur la comparaison des intégrations du signal correspondant aux protons aromatiques et du signal correspondant aux protons portés par le dextrane. L'équation peut alors se mettre sous la forme suivante ^[4] :

$$\tau = \frac{4 + A_2/5}{A_2/5 + A_1} \times 100$$

II. 2

où A_1 est l'aire des pics attribués au proton anomérique et aux groupements hydroxyle ;
 A_2 est l'aire des pics attribués au groupement aromatique.

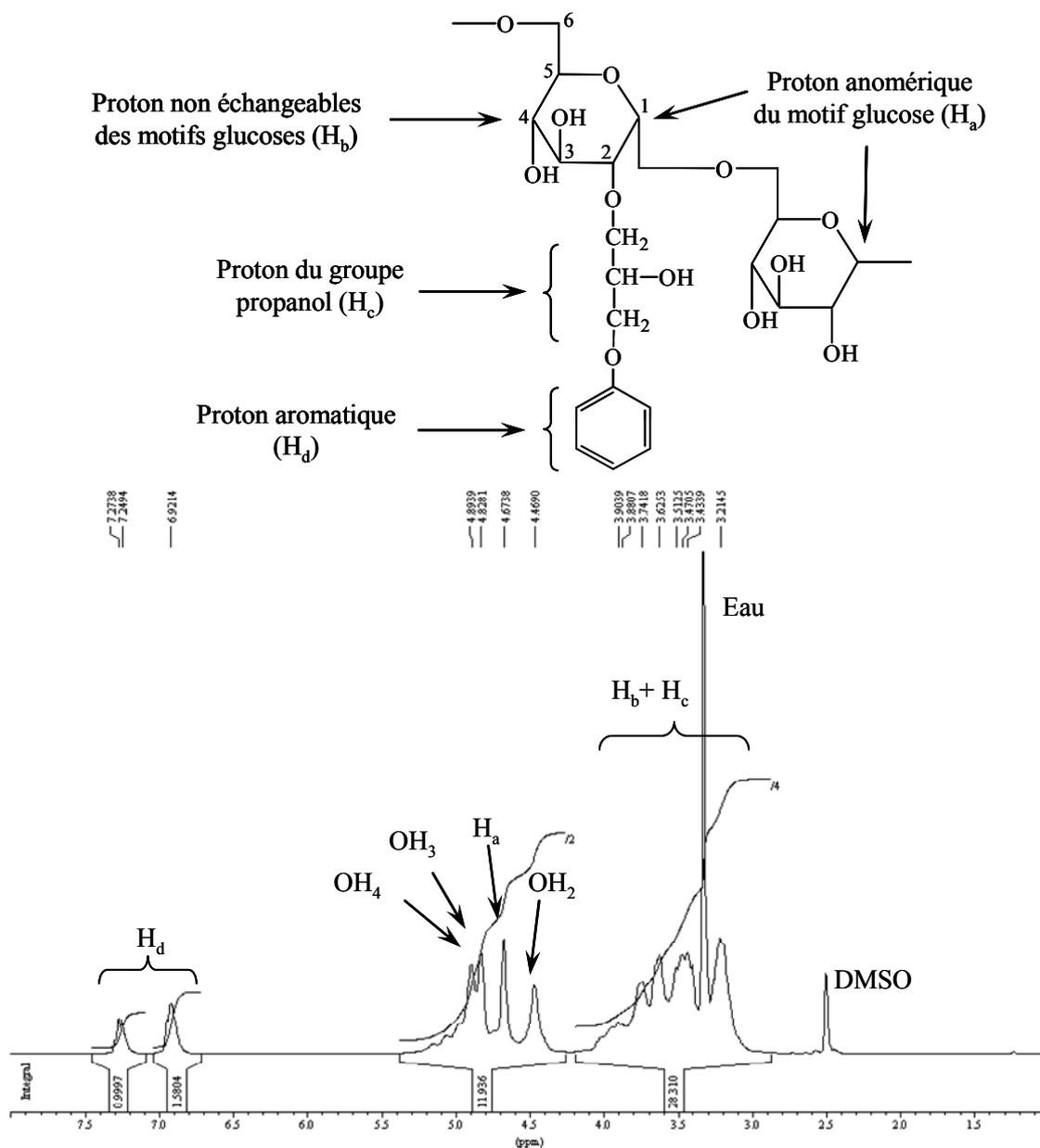


Figure II.5 : Spectre RMN ¹H d'un dérivé de type DexP_τ dans le DMSO-*d*₆ (τ=16).

Au cours de cette étude, trois dérivés du dextrane ont été synthétisés : DexP₁₁, DexP₁₆ et DexP₂₂.

3. STABILITE DES POLYMERES AMPHIPHILES EN MILIEU ACIDE

Pour contrôler la cinétique de polymérisation anionique de l'alkylcyanoacrylate (ACA) en miniémulsion, il est nécessaire de réaliser la synthèse des nanoparticules en milieu acide (voir chapitre I). La stabilité des polymères amphiphiles en milieu acide est donc un facteur important à étudier.

3.1. Cas des dextrans phénoxy

3.1.1. Matériel et méthodes

Les conditions choisies pour cette étude sont présentées dans le [tableau II.1](#). Elles correspondent aux conditions qui ont été utilisées par la suite pour la synthèse des nanoparticules de PACA. Dans ce paragraphe, les tests ont été effectués avec le DexP₂₂.

Tableau II.1 : Conditions utilisées pour l'étude de la stabilité du DexP₂₂ en milieu acide.

N°	pH	Premières 24 heures *	Après 24 heures
1	3	Température ambiante	Température ambiante
2		75°C	
3	2	Température ambiante	
4		75°C	
5	1	Température ambiante	
6		75°C	

* Conditions correspondant aux conditions de polymérisation utilisées dans la synthèse des nanoparticules.

Protocole expérimental :

250 mg de DexP₂₂ sont dissous dans 50 ml de solution d'acide chlorhydrique de pH connu. Ces solutions sont ensuite placées à température ambiante ou à 75°C pendant 24 heures. Au bout de 24 heures, toutes les solutions sont conservées à température ambiante. Des prélèvements de 10 ml sont réalisés 1, 3, 6, 9 et 16 jour(s) après la mise en solution du DexP₂₂.

Les échantillons prélevés sont neutralisés par ajout d'une solution de NaOH, puis dialysés (membrane Spectra/Por MWCO : 6000-8000) contre de l'eau osmosée pendant 48 heures pour éliminer le sel et les produits de faibles masses molaires engendrés par la dégradation du dextrane. Les solutions sont enfin lyophilisées.

En milieu acide, deux réactions de dégradation des DexP_τ peuvent se produire (Figure II.6) :

- L'hydrolyse de la liaison éther entre la chaîne du dextrane et le motif hydrophobe.
- La dégradation de la chaîne macromoléculaire elle-même.

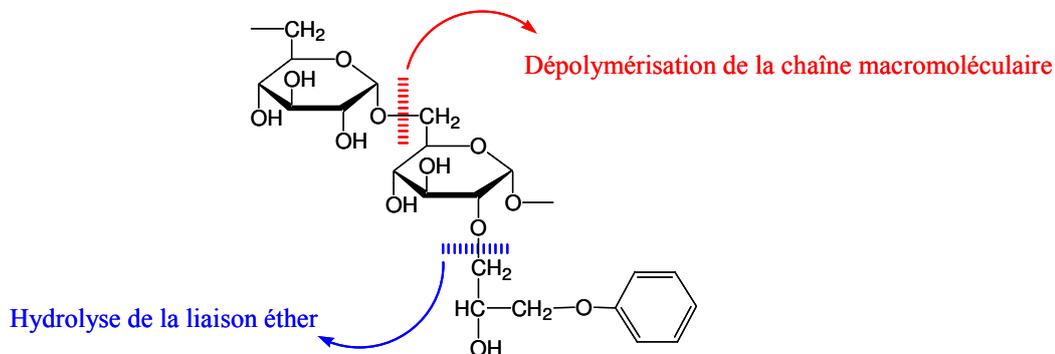


Figure II.6 : Mécanismes possibles de dégradation du DexP_τ.

L'hydrolyse de la liaison éther entre la chaîne du dextrane et le motif hydrophobe entraîne une diminution du taux de substitution. Ce dernier a été suivi par RMN ¹H dans le DMSO-*d*₆. La méthode de détermination du taux de substitution des dérivés DexP_τ par RMN ¹H dans le DMSO-*d*₆ a été présentée en détail au paragraphe 2.2.2 de ce chapitre. La dégradation de la chaîne macromoléculaire elle-même entraîne une diminution de la masse molaire du polysaccharide. La variation de la masse molaire a été mesurée par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière (SEC-MALLS) dans le DMSO.

- **Rappels théoriques sur la chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière**

La chromatographie d'exclusion stérique (size-exclusion chromatography, SEC), aussi appelée chromatographie à perméation de gel (gel permeation chromatography, GPC), est une technique analytique fondée sur la rétention sélective des macromolécules en solution en fonction de leur taille. Cette technique permet d'estimer la masse molaire moyenne et la polydispersité des polymères par comparaison avec des polymères étalons. Le couplage avec la diffusion de la lumière permet d'évaluer précisément la masse molaire du polymère. La théorie fondamentale de diffusion de la lumière par des solutions de polymères découle des travaux de Debye et Zimm. L'équation générale reliant l'intensité de la lumière diffusée à un

angle θ par une solution diluée de polymère de masse molaire moyenne en masse \overline{M}_w est la suivante :

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

$$\text{avec } K = \frac{4\pi^2 n^2}{\lambda N_A} \frac{dn}{dC} \quad \text{II. 4}$$

où C est la concentration massique du polymère en solution ; A_2 le second coefficient de Viriel ; λ la longueur d'onde incidente ; R_g le rayon de giration moyen de la pelote macromoléculaire ; θ l'angle de mesure par rapport au rayon incident ; N_A le nombre d'Avogadro ; n l'indice de réfraction du solvant ; ΔR_θ le rapport de Rayleigh.

$$\text{avec } \Delta R_\theta = \frac{I_\theta}{I_0} \frac{r^2}{V} \quad \text{II. 5}$$

où I_θ est 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.

Equipements

- une pompe Merck L-6200A ;
- un dégazeur ;
- une boucle d'injection de 100 μ l ;
- une série de colonnes Polymer Laboratories :

Pré-colonne: PLgel 5 μ l Guard, 50x7,5 mm, Part. No. 1110-1520 ;

Colonnes : PLgel 5 μ m 100 Å , 300x7,5mm, P/N 1110-6520, S/N 5M-2-200-60 ;

PLgel 5 μ m 10E3 Å , 300x7,5mm, P/N 1110-6530, S/N 5M-3-097-32.

A la sortie des colonnes, un photodiffusiomètre de modèle MiniDawn (Wyatt Technology Corporation) est en place. La longueur d'onde du laser est fixée à 690 nm par le constructeur, et trois photodiodes mesurent l'intensité diffusée à 47,6°, 90,0° et 132,4°. Une double détection est effectuée à l'aide d'un réfractomètre différentiel de type Waters 410 installé en série. Les mesures sont pilotées avec le logiciel Astra en place.

Conditions expérimentales utilisées

L'éluant utilisé est du DMSO (CHROMASOLV[®] for high-performance liquid chromatography, Sigma-Aldrich). Le débit de la pompe est fixé à 0,7 ml/min, et 24 heures sont nécessaires pour que le système soit équilibré. Les solutions de polymère sont préparées la veille dans l'éluant utilisé, à des concentrations d'environ 20 g/l. Les solutions sont injectées deux fois et les courbes sont traitées selon la méthode de Zimm. La valeur de dn/dC est fixée à 0,07 pour les DexP $_\tau$ analysés dans le DMSO [45, 46].

3.1.2. Résultats

➤ Variation du taux de substitution

Les variations du taux de substitution des DexP₂₂ en milieu acide sont présentées sur la [figure II.7](#). Dans tous les cas, nous n'observons qu'une très légère variation du taux de substitution. On sait que la liaison éther est une fonction assez inerte, et que son clivage peut se produire en présence d'acide fort tel que HCl, HBr, HI. L'oxygène des liaisons éther peut être protonné de manière à fournir des ions alkyloxonium. La réactivité subséquente de ces ions dépend de la nature des substituants alkyle. De plus, la vitesse d'hydrolyse des liaisons éther augmente avec la concentration en acide fort ^[47] et la température ^[48]. Les conditions choisies pour cette étude ne sont probablement pas assez sévères pour entraîner la coupure de la liaison éther. Dans un cas (pH 1 et 75°C), nous observons une légère augmentation du taux de substitution. Ceci peut être lié à une perte d'espèces moins modifiées lors de la dialyse (voir paragraphe suivant).

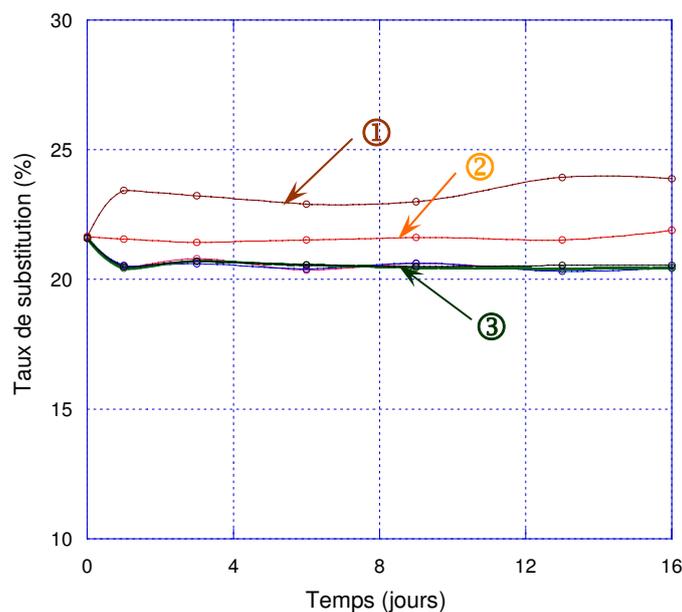


Figure II.7 : Evolution du taux de substitution du DexP₂₂ en milieu acide.

τ a été déterminé par RMN ¹H dans le DMSO-*d*₆. ① pH 1, 75°C ; ② pH 1, Tamb ; ③ pH 2 et 3, 75°C et Tamb.

➤ Variation du taux de substitution

Les résultats obtenus par SEC-MALLS sont présentés sur la [figure II.8](#). La masse molaire moyenne \overline{M}_w du DexP₂₂ est de 47 230 g/mol au départ. Elle reste parfaitement stable

dans la majorité des conditions étudiées. Seules les conditions extrêmes (pH1, 75°C pendant 24 heures) affectent \overline{M}_w qui passe à 18 500 g/mol. Dans ce cas, le rendement de dialyse, c'est-à-dire la quantité de polymère récupérée après dialyse, chute. Des chaînes de faibles masses molaires, capables de diffuser au travers des pores de la membrane, ont probablement été produites pendant le traitement acide. La perte de ces espèces de faibles masses molaires peut avoir comme conséquence un enrichissement en chaînes plus fortement substituées en moyenne que l'échantillon de départ, et expliquer l'augmentation du taux de substitution observée dans le paragraphe précédent.

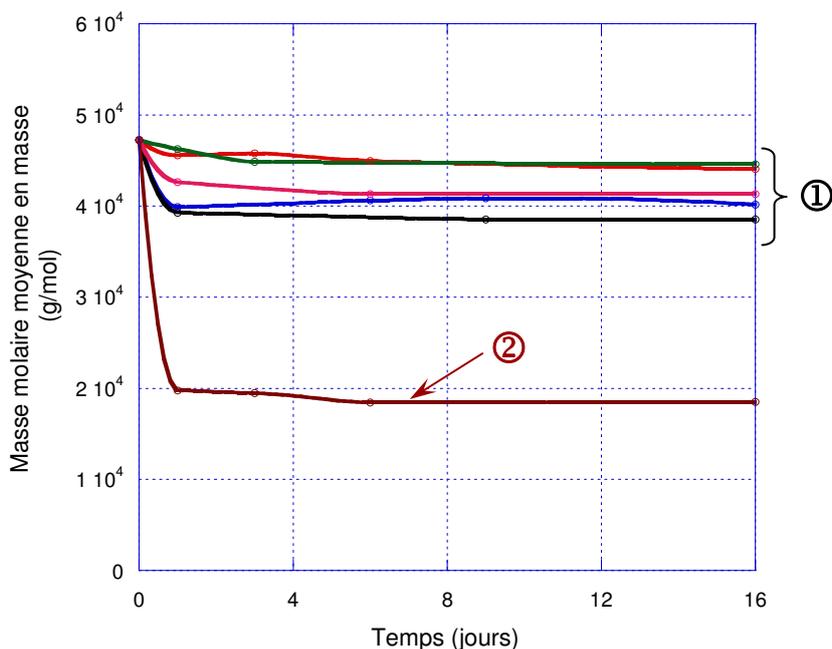


Figure II.8 : Evolution de la masse molaire DexP₂₂ en milieu acide suivie par SEC-MALLS dans le DMSO.

① pH 1 et T_{amb}, pH 2 et 75°C et T_{amb}, pH3 et 75°C et T_{amb} ; ② pH 1, 75°C.

D'après tous les résultats obtenus, nous constatons que le DexP₂₂ est bien stable dans les conditions étudiées.

3.2. Dérivés du poly(oxyde d'éthylène)

Le Brij[®]78, le Brij[®]700, et le Tween[®]80 sont des dérivés du POE. Leur structure et la valeur de HLB (balance lipophile/hydrophile) sont présentées dans le [tableau II.2](#). Le Brij[®]78 et le Brij[®]700 sont tous les deux linéaires, et leurs parties hydrophobes sont identiques. Ils se distinguent par la longueur de la chaîne hydrophile (20 unités oxyde d'éthylène pour le

Brij[®]78, et 100 pour le Brij[®]700). Le Tween[®]80 est composé de trois branches hydrophiles, le nombre total d'unités oxyde d'éthylène étant égal à celui du Brij[®]78.

Tableau II.2 : Structure et HLB des dérivés du POE.

	HLB ^a	Structure	
Brij [®] 78	15	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_7\text{OH}$	Y=20
Brij [®] 700	18		Y=100
Tween [®] 80	15	<p> $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_w$ $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$ $\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{OH}$ $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{z-1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ </p> <p>$w+x+y+z = 20$</p>	

Dans le paragraphe 3.1 de ce chapitre, nous avons montré que le DexP_τ est stable, le clivage des liaisons éther se produisant à un faible pH et haute température. Nous avons réalisé une étude de la stabilité du Brij[®]78 à pH 1 et 75°C.

Protocole expérimental :

50 mg de Brij[®]78 sont dissous dans 12,5 ml d'une solution d'HCl à pH 1. La solution est portée à 75°C pendant 20 heures. La formation d'une émulsion est observée. Après lyophilisation, un produit visqueux est obtenu, puis analysé par RMN ¹H dans le CDCl₃.

En comparant le spectre RMN ¹H du Brij[®]78 initial à celui du Brij[®]78 traité (Figure II.9), nous observons la disparition du pic de la fonction alcool situé initialement à 2,5 ppm. Un pic apparaît à 4,1 ppm après le traitement. Par ailleurs, les intégrales des différents signaux sont inchangées. Il semble que la chaîne du Brij[®]78 se soit coupée en deux parties, probablement entre la partie hydrophile et la partie hydrophobe. Cette rupture donnant naissance à des chaînes hydrophobes, ceci pourrait expliquer que nous observons la formation d'une émulsion après 20 heures de traitement. Par ailleurs, des expériences très préliminaires de polymérisation en miniémulsion en présence de Brij[®]78 à pH 1 et 75°C, avaient montré que le système se stabilisait extrêmement difficilement, ce qui laisse à penser que dans les conditions utilisées, le Brij[®]78 perd tout pouvoir tensioactif et ne peut donc pas être utilisé efficacement pour stabiliser la miniémulsion.

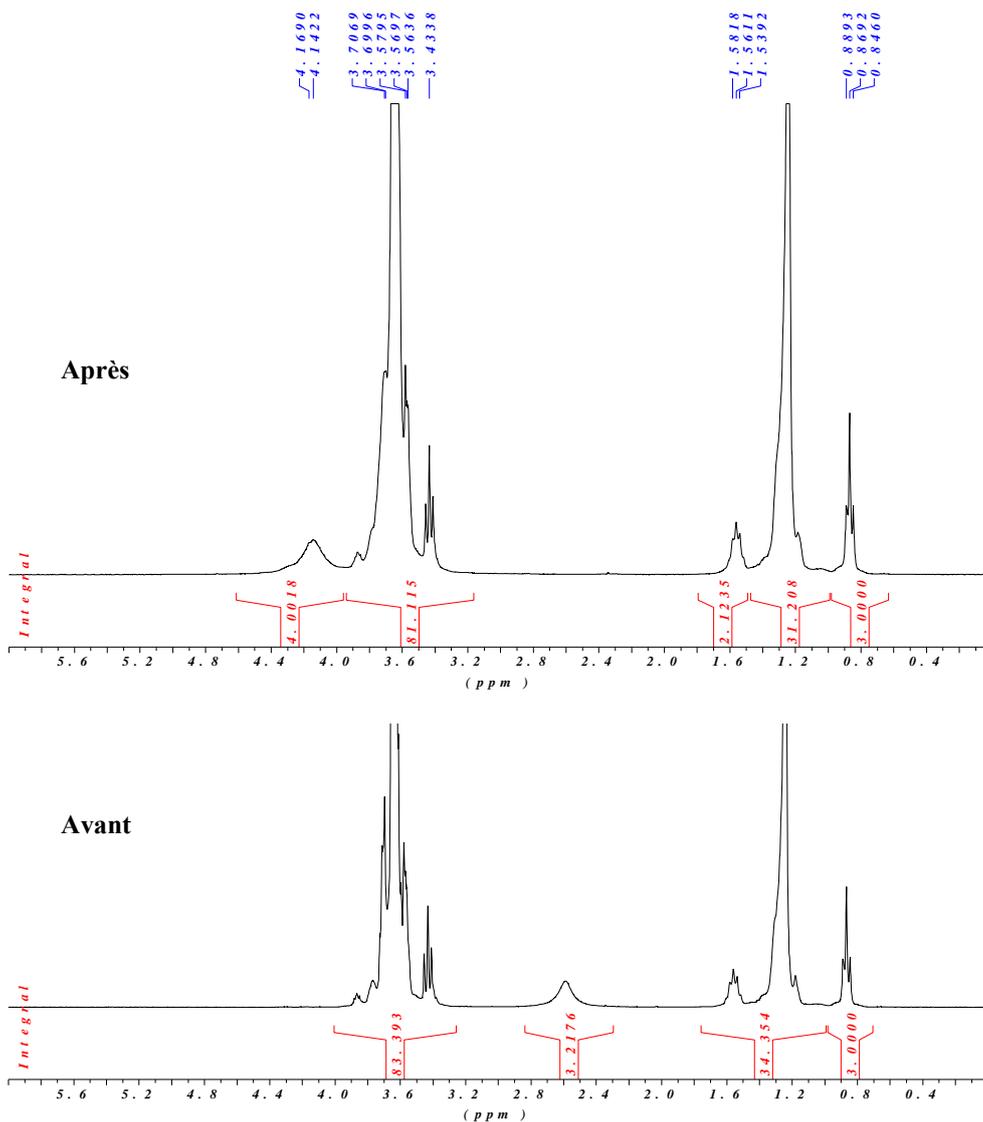


Figure II.9 : Spectres RMN H¹ du Brij[®]78 avant et après traitement à pH 1 et 75°C.

4. ADSORPTION DES POLYMERES AMPHIPHILES AUX INTERFACES LIDUIDE/LIQUIDE

4.1. Rappels théoriques

4.1.1. Thermodynamique de Gibbs ^[49]

Soit une interface S entre deux phases liquides (1 et 2) partiellement immiscibles entre elles et dont l'une contient des tensioactifs. La description thermodynamique de l'état

interfacial d'un tel système permet de dégager des relations entre le taux d'adsorption à l'interface liquide/liquide, la tension de surface et la concentration en tensioactif dans une des solutions. La tension interfaciale est un paramètre intrinsèque qui décrit la forme d'une interface courbée ou bien les différents phénomènes de capillarité.

L'énergie libre de Gibbs G^S d'une surface S est donnée par la relation :

$$G^S = H^S - TS^S = F^S - \gamma A \quad \text{II. 6}$$

où H^S, S^S, F^S sont respectivement l'enthalpie, l'entropie et l'énergie libre (Helmholtz) ; T la température (K) ; γ la tension interfaciale et A l'aire interfaciale.

Le potentiel chimique de chaque composant i à la surface est donné alors par les relations suivantes :

$$\mu_i^S = \left(\frac{\partial F^S}{\partial n_i^S} \right)_{T, A, n_j^S} = \left(\frac{\partial G_i^S}{\partial n_i^S} \right)_{T, P, \gamma, n_j^S} \quad \text{II. 7}$$

L'équilibre d'un composant i dans le système entier existe si $\mu_i^S = \mu_i^1 = \mu_i^2$. L'énergie libre de la surface est donnée alors par la relation :

$$G^S = \sum n_i^S \mu_i^S \quad \text{II. 8}$$

La tension de surface γ s'écrit alors :

$$\gamma = \left(\frac{\delta G^S}{\delta A} \right)_{T, P, n_j^S} = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T, P, n_j^S, n_j^2} \quad \text{II. 9}$$

où δG^S représente la variation d'énergie libre de la région interfaciale et δA la variation d'aire. La tension de surface γ représente le travail réversible à fournir au système pour augmenter sa surface d'une unité (N/m).

Le lien entre la tension de surface, le potentiel chimique et l'énergie de Gibbs de surface est donné par la relation suivante :

$$\gamma A = F^S - \sum n_i^S \mu_i^S = F^S - G^S \quad \text{II. 10}$$

Pour une unité de surface on a donc :

$$\gamma = f^S - \sum \Gamma_i \mu_i^S \quad \text{II. 11}$$

On peut écrire :

$$dG_i^S = \mu_i^S d\Gamma_i + \Gamma_i d\mu_i^S \quad \text{II. 12}$$

Pour une adsorption à l'équilibre, on a :

$$d\Gamma_i = 0 \quad \text{et} \quad d\mu_i^S = d\mu_i^{1,2} \quad \text{II. 13}$$

D'après les principes fondamentaux de la thermodynamique on a :

$$d\mu_i^S = RT d \ln a_i^{1,2} \quad \text{II. 14}$$

et

$$\Gamma_i = -\frac{1}{RT} \frac{d\gamma}{d \ln a_i} \quad \text{II. 15}$$

où a_i est l'activité du composé i dans la phase continue et R la constante des gaz parfaits ($8,3145 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$). Pour un système contenant seulement un composé tensioactif, la relation de l'isotherme d'adsorption de Gibbs devient alors :

$$\Gamma_{\max} = -\frac{1}{2,303 RT} \frac{d\gamma}{d \log C} \quad \text{II. 16}$$

avec Γ_{\max} le taux de recouvrement maximal des chaînes latérales (mol/m^2) et C la concentration du tensioactif en volume (mol/m^3).

Quelques points sont à souligner lorsque la théorie de Gibbs, établie initialement pour des tensioactifs moléculaires, est appliquée aux polymères amphiphiles :

- La théorie de Gibbs est basée sur un équilibre entre adsorption et désorption des tensioactifs moléculaires à l'interface. Cependant, dans le cas des polymères, bien que le phénomène d'adsorption soit probablement réversible pour chaque point d'ancrage, la désorption de la macromolécule est limitée à cause des contraintes entropiques liées à la chaîne.
- La polydispersité du polymère en termes de masses molaires et de taux de modification fait que le taux d'adsorption Γ_{\max} , obtenu par la relation ci-dessus, est une valeur moyenne.

- De même, la valeur de Γ_{\max} exprimée en mol de groupements hydrophobes /m², correspond uniquement au nombre de motifs adsorbés à l'interface.

La tension de surface ou d'interface peut être tracée en fonction de la concentration en tensioactif dans la solution, ce qui donne l'isotherme de Gibbs (Figure II.10). Généralement, l'isotherme, qui correspond à un tensioactif moléculaire ou à un polymère amphiphile, présente trois zones distinctes :

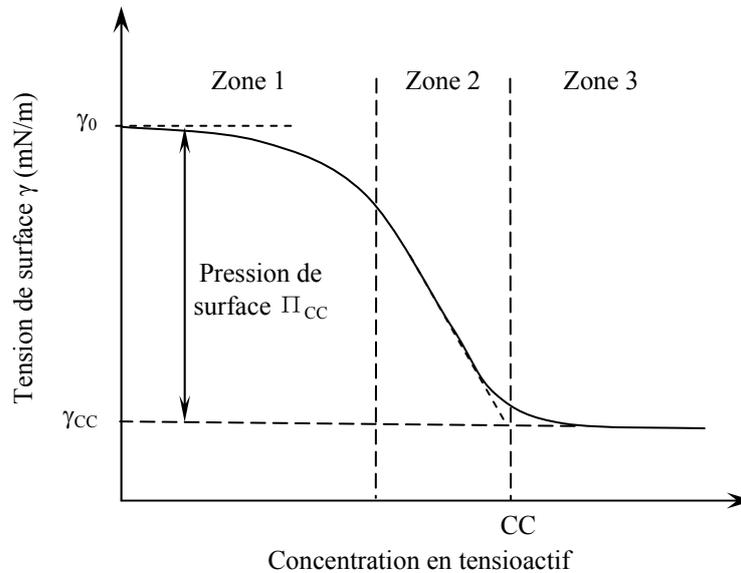


Figure II.10 : Courbe théorique de tension de surface en fonction de la concentration en tensioactif.

- Aux faibles concentrations en tensioactif (zone 1), le nombre de molécules en solution n'est pas suffisant pour saturer complètement l'interface air/liquide ou liquide/liquide et la tension de surface ne diminue que très peu.
- A une concentration plus élevée (zone 2), la quantité de tensioactif en solution est suffisante pour stabiliser l'interface. La tension de surface varie alors de façon linéaire avec le logarithme de la concentration. Ces variations sont décrites par la relation de l'isotherme d'adsorption de Gibbs (Equation II.16).
- Au-delà d'une certaine concentration en tensioactif, la tension de surface reste constante même pour des concentrations plus élevées (zone 3). Des agrégats de tensioactif, dits micelles, se forment en solution. La concentration micellaire critique (CMC) est atteinte, c'est-à-dire que la concentration en tensioactif libre ne varie plus.

L'aptitude des tensioactifs à s'adsorber à l'interface est caractérisée par leur pression de surface Π_{cc} (N/m). Elle représente la réduction de la tension de surface à la concentration critique par rapport à celle de l'eau γ_0 ($\Pi_{cc} = \gamma_0 - \gamma_{cc}$).

4.1.2. Cinétique d'adsorption des polymères à l'interface

Il existe plusieurs théories décrivant l'adsorption des polymères et des protéines sur une interface. De Gennes ^[50] a ainsi énoncé une théorie générale sur la structure et la dynamique de l'adsorption d'un polymère modèle, linéaire, flexible, neutre et en bon solvant. Les lois d'échelle permettent de concevoir la structure des couches de polymère adsorbé. Cependant, l'établissement d'une théorie universelle pour décrire le comportement des polymères semble impossible ; les macromolécules impliquées sont généralement des copolymères ce qui rend l'analyse théorique complexe. En effet, les molécules n'adoptent pas les mêmes conformations à l'interface, certaines peuvent se déplier, d'autres se réarranger ou bien se compacter. De plus, les relations établies par De Gennes peuvent être utilisées comme base pour la description théorique du processus dynamique interfacial. Avant de développer les équations que nous allons utiliser, nous allons effectuer un rappel sur le mécanisme probable d'adsorption des macromolécules à une interface.

La diminution de la tension interfaciale pour une solution de macromolécules peut être décrite en plusieurs étapes consécutives ou simultanées ^[51]. Il est à noter que la réduction de la tension de surface est liée au nombre de segments de polymère amphiphile en contact avec l'interface, et pas directement au nombre de macromolécules adsorbées.

Les étapes sont les suivantes (Figure II.11) :

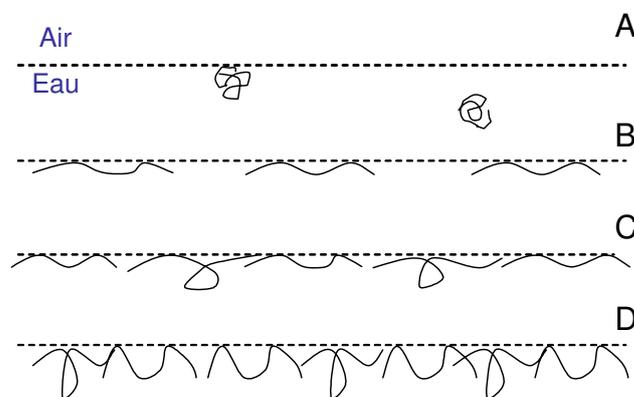


Figure II.11 : Conformation probable des macromolécules au cours du temps lors de l'adsorption à une interface eau/air.

- A. Transport des molécules par diffusion : Les molécules arrivent à l'interface des deux phases non miscibles vers la zone appelée interphase correspondant à la zone de solution très fine proche de l'interface.
- B. Etalement et dépliement des molécules à l'interface.
- C. Adsorption de segments de chaînes à l'interface.
- D. Réarrangement de la macromolécule adsorbée entre la surface et l'interface.

Plusieurs modèles ont été proposés pour rendre compte de ces phénomènes d'adsorption des polymères amphiphiles. Une approche générale a été apportée par Ward et Tordai [52] dans le cas d'une tension de surface dynamique contrôlée par la diffusion. Ainsi, l'adsorption interfaciale est limitée par le transfert de matière dans la phase continue. En partant de l'équation de Fick, ils arrivent à l'équation générale suivante :

$$\Gamma = 2\sqrt{\frac{D}{\pi}} \left(C_0 \sqrt{t} - \int_0^{\sqrt{t}} \Phi(z) d[\sqrt{t-z}] \right) \quad \text{II. 17}$$

où la surface se forme à un temps $t = 0$. Γ est la concentration à la surface (mol/m^2) ; C_0 la concentration en tensioactif dans la phase continue (mol/m^3) ; D le coefficient de diffusion des molécules amphiphiles (m^2/s) ; z une variable auxiliaire et $\Phi(z)$ une fonction décrivant la variation de la concentration à l'interphase.

Cette équation décrit la dynamique sur toute l'échelle du temps et s'applique dans les conditions idéales. Cependant, elle ne peut pas être directement utilisée car la fonction $\Phi(z)$ n'est généralement pas connue [53]. Les auteurs font donc l'approximation que la rétrodiffusion peut être négligée et que la surface libre est capable de fixer les molécules au fur et à mesure qu'elles arrivent. Ils considèrent alors qu'un équilibre s'établit instantanément entre la surface et l'interphase. Notons que contrairement aux tensioactifs de faibles masses molaires, l'équilibre local entre la surface et l'interphase n'est pas encore établi lorsqu'un site est occupé par une molécule, mais seulement lorsqu'un grand nombre de segments de chaînes de polymères est en contact avec la surface. L'équation II.17 peut alors se simplifier sous la forme suivante :

$$\gamma(t) = \gamma_0 - 2nC_0RT\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad \text{II. 18}$$

où γ_0 est la tension de surface à $t = 0$. Le paramètre n qui a été ajouté plus tard est égal à 1 pour les tensioactifs non ioniques et à 2 pour les ioniques [49]. Etant donné les hypothèses énoncées, cette équation ne peut être valable qu'aux temps courts.

Plus tard, Hansen [54] a proposé d'autres approximations qui peuvent être appliquées à des temps plus longs en supposant que l'adsorption des molécules se décrit par une isotherme de Langmuir. La variation asymptotique de la tension de surface en fonction du temps pour un phénomène contrôlé par la diffusion est alors :

$$\gamma(t) = \gamma_e + \frac{\Gamma^2 RT}{C_0} \sqrt{\frac{1}{\pi D t}} \quad \text{II. 19}$$

où γ_e est la tension de surface de la solution quand l'équilibre est atteint ($t \rightarrow \infty$).

Une autre description de la dynamique de tension de surface a été suggérée par Filippov [55, 56] :

$$\frac{\gamma_0 - \gamma(t)}{\gamma(t) - \gamma_e} = \left(\frac{t}{t^*} \right)^n \quad \text{II. 20}$$

où n et t^* sont respectivement un paramètre sans dimension et un temps caractéristique (s). t^* représente en fait le temps nécessaire pour atteindre la moitié de l'abaissement total de la tension interfaciale. Cette équation est empirique car elle décrit assez bien les résultats obtenus mais il n'est pas possible de relier facilement n et t^* à des grandeurs physico-chimiques. Nous pouvons également calculer la vitesse absolue à partir du rapport $\frac{\Pi_{\text{éq}}}{2 \times t^*}$ qui rend compte de la vitesse d'abaissement de tension superficielle ou interfaciale (avec $\Pi_{\text{éq}} = \gamma_0 - \gamma_e$).

4.2. Méthodes et matériels

L'appareil utilisé pour déterminer la tension interfaciale eau/dodécane en présence des polymères amphiphiles est un tensiomètre IT Concept (Longessaigne, France) dont le schéma est donné sur la figure II.12. Une goutte (de liquide ou de gaz) est formée automatiquement à l'extrémité d'une aiguille plongée dans la solution à étudier. Cette dernière est thermostatée par un bain circulant. L'aiguille est reliée à une seringue dont le piston est commandé par un moteur. Elle peut être droite pour former des bulles pendantes, ou bien recourbée à 180° pour

les bulles montantes. Une source lumineuse assure un éclairage uniforme de la goutte qui permet d'obtenir un contraste constant de l'image et de son contour par rapport à l'arrière plan, sans conduire à un échauffement de la solution par rayonnement. La formation de la goutte est ainsi filmée au cours du temps par une caméra. Le tensiomètre est également relié à un système informatique dont le logiciel permet le réglage de l'appareil, l'acquisition et le traitement des données.

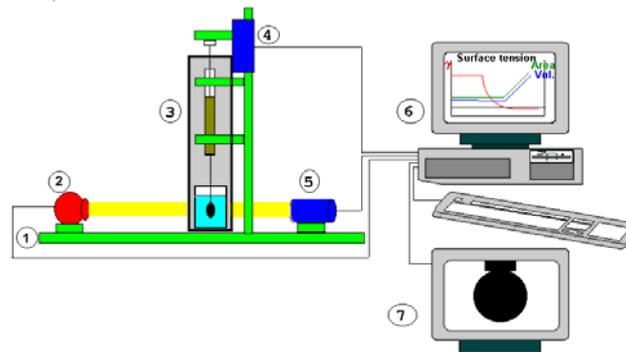


Figure II.12 : Schéma du tensiomètre IT Concept. ① Banc d'optique ; ② Source lumineuse ; ③ Cellule de mesure Thermostatée et/ou pressurisée ; ④ Pousse seringue ; ⑤ Optique et caméra ; ⑥ Ordinateur ; ⑦ Ecran de contrôle.

La tension interfaciale entre deux milieux liquide-liquide ou liquide-gaz peut être calculée à partir de l'étude du contour d'une goutte présentant une symétrie de révolution. Le traitement des données s'appuie sur deux équations fondamentales :

- l'équation de Laplace-Young, qui traduit le fait que la différence de pression causée par la courbure de la surface est proportionnelle à la courbure moyenne. La tension interfaciale est donnée par le coefficient de proportionnalité :

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right) \quad \text{II. 21}$$

Cette équation résulte d'un équilibre thermodynamique.

- la deuxième équation résulte de l'écriture d'un équilibre des forces à travers tout plan horizontal :

$$2\pi x \gamma \sin \theta = V(\rho_h - \rho_l)g + \pi x^2 p \quad \text{II. 22}$$

où P est la pression due à la courbure (N/m^2) ; γ est la tension interfaciale (N/m) ; R et R' sont les rayons de courbure principaux de la surface (m) ; x l'abscisse du point de la méridienne d'ordonnée z (m) ; θ l'angle entre la normale et l'axe de révolution ; V le volume

du fluide sous le plan (m^3) ; ρ_h et ρ_l les masses volumiques respectives des deux fluides (kg/m^3) ; g l'accélération de la pesanteur ($9,81 m/s^2$).

De ces deux équations, on en déduit une équation du profil de la goutte, qui va prendre en compte tous les points de contour et ainsi, par une méthode des moindres carrés, faire l'estimation de γ .

Conditions opératoires

Une solution de polymère amphiphile, préparée 24 heures à l'avance avec de l'eau MilliQ, est placée dans une cuve thermostatée à 30°C. La seringue en verre utilisée a un volume de 1 ml. L'embout de l'aiguille est plongé dans la solution, et une goutte de dodécane est formée. Son volume est fixé à 5 mm³ dans le cas des DexP _{τ} et à 3 mm³ pour les dérivés du POE, et maintenu constant tout au long de la mesure grâce à la régulation automatique. L'évolution de la tension interfaciale est suivie pendant 16 000 s pour les DexP _{τ} , et 14 000 s pour les dérivés du POE. Le temps t_0 correspond au temps immédiat après la formation de la goutte. Le dodécane est purifié par distillation sous vide avant d'être utilisé.

4.3. Résultats des mesures de la tension interfaciale eau/dodécane

La tension interfaciale eau/dodécane a été mesurée pour des DexP _{τ} de taux de substitution variables (DexP₁₁, DexP₁₆, DexP₂₂, DexP_{22d} issu de la dégradation du DexP₂₂ à pH 1 et 75°C) et trois dérivés du POE (Brij[®]78, Brij[®]700, et Tween[®]80). Sur la [figure II.13](#), nous présentons à titre d'exemple, l'abaissement de la tension interfaciale eau/dodécane au cours du temps pour des solutions de DexP₁₆ de concentration croissante. Sur la même figure, nous présentons l'abaissement de tension interfaciale eau/dodécane en absence du polymère amphiphile.

Pour les différentes concentrations, les allures des courbes sont similaires : la tension interfaciale diminue rapidement au départ, puis reste constante au bout d'un certain temps. L'effectivité (abaissement total de la tension interfaciale) est d'autant plus importante que la concentration augmente. Dans le cas où la phase aqueuse ne contient pas de polymère amphiphile, une diminution est également observée, probablement liée à la présence d'impuretés dans le dodécane. Ces impuretés n'ont pas pu être éliminées par distillation. Elles ont un comportement de tensioactif. De plus, nous observons que la courbe de la tension interfaciale au cours du temps obtenue pour une concentration de 10⁻³ g/l est superposée à

celle obtenue en absence de polymère amphiphile. Ce phénomène est également observé dans le cas du DexP₁₁ et DexP₂₂. La superposition apparaît à une concentration plus faible (10^{-5} g/l) pour les dérivés du POE (Figure II.14). A faible concentration en polymère amphiphile, la cinétique d'abaissement de la tension interfaciale est fortement influencée par les impuretés du dodécane.

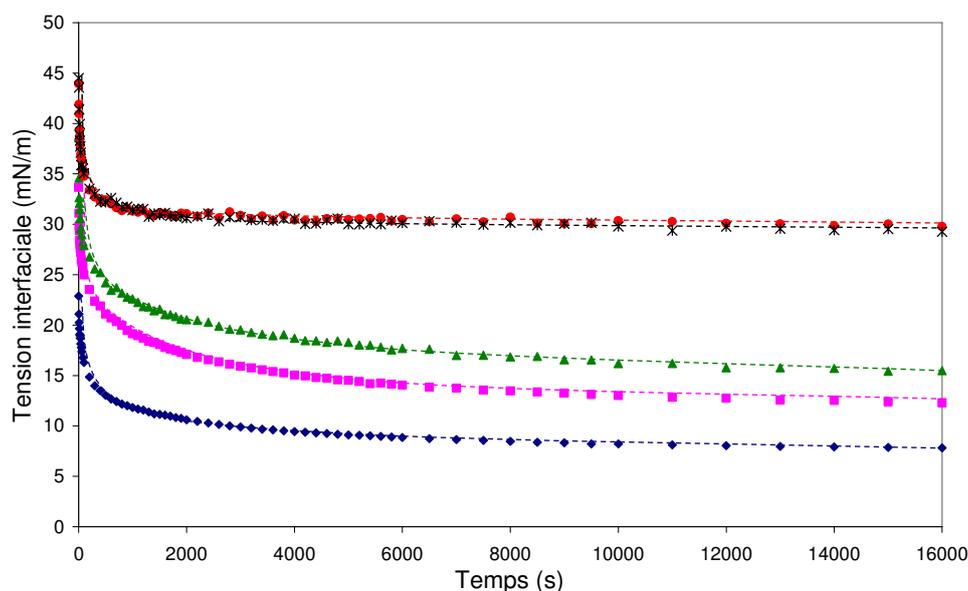


Figure II.13 : Abaissement de la tension interfaciale au cours du temps pour des solutions de DexP₁₆ à différentes concentrations à 30°C : 5 g/l (◆), 1 g/l (■), 0,1 g/l (▲), 10^{-3} g/l (●) et eau/dodécane (*). Les lignes sont tracées à titre indicatif.

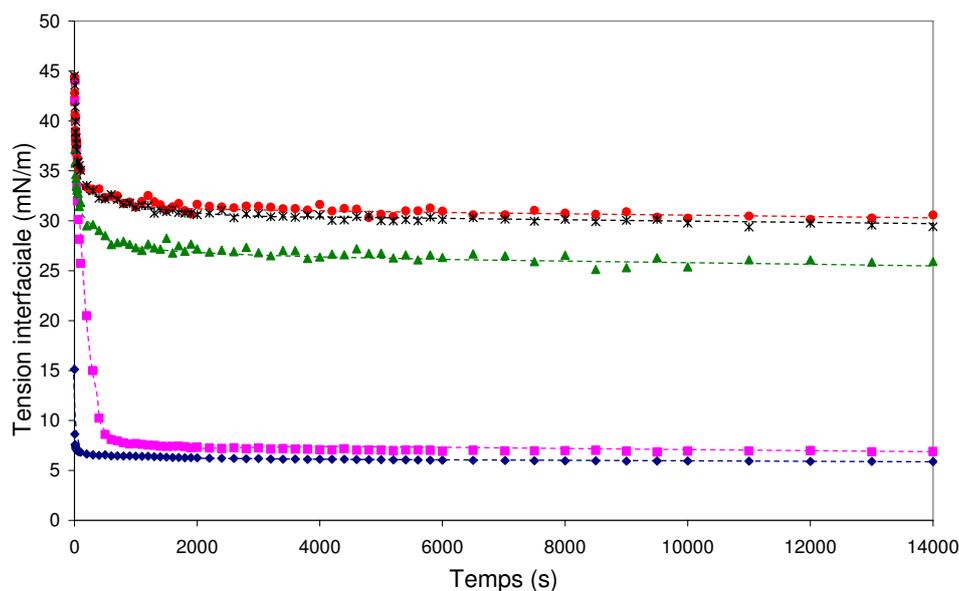


Figure II.14 : Abaissement de la tension interfaciale au cours du temps pour des solutions de Brij[®]78 à différentes concentrations à 30°C : 1 g/l (◆), 0,1 g/l (■), 10^{-4} g/l (▲), 10^{-5} g/l (●) et eau/dodécane (*). Les lignes sont tracées à titre indicatif.

4.3.1. Détermination des coefficients de diffusion

L'équation de Ward et Tordai (Equation II.18) relie la tension interfaciale au coefficient de diffusion du polymère amphiphile aux temps courts. Elle permet donc de déterminer le coefficient de diffusion à partir des tensions mesurées. Dans notre cas, les coefficients de diffusion obtenus pour les DexP_τ sont de l'ordre de 10⁻³ m²/s. Ces valeurs sont beaucoup plus élevées que celles déjà observées dans notre laboratoire pour des dérivés amphiphiles de DexP_τ (de l'ordre de 10⁻¹⁰ m²/s) [57]. De plus, ces valeurs ne correspondent pas aux valeurs classiques de coefficient de diffusion des polymères en solution. L'influence des impuretés dans le dodécane semble masquer l'effet du polymère amphiphile aux temps courts sur la tension interfaciale. Nous avons alors considéré la différence entre la tension interfaciale eau/dodécane de solutions de polymères amphiphiles et celle mesurée en absence de ces tensioactifs macromoléculaires (Figures II.15 et II.16).

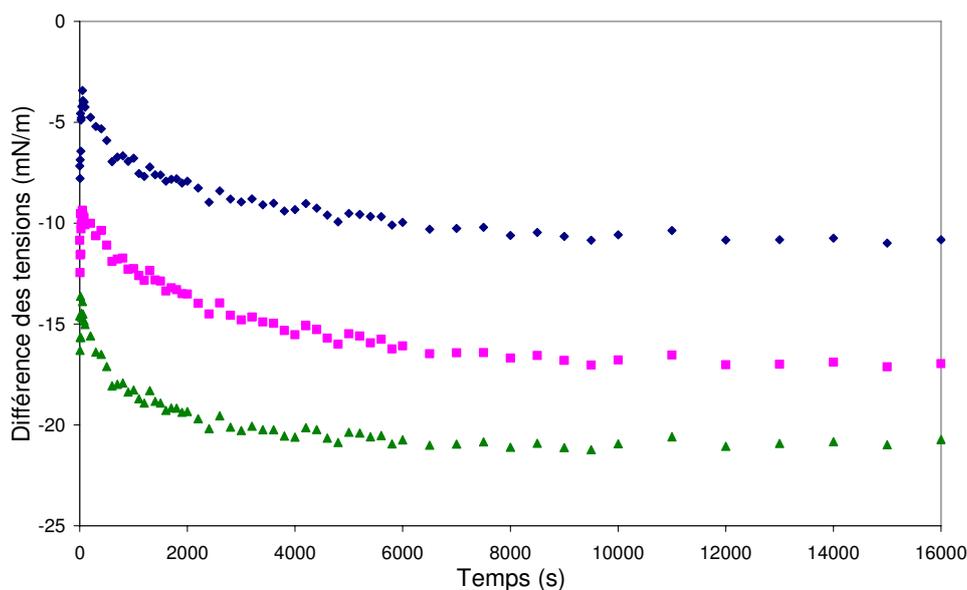


Figure II.15 : Différence entre la tension interfaciale eau/dodécane de solutions de DexP_τ à 1 g/l et celle mesurée en absence de polymère amphiphile. DexP₁₁ (◆), DexP₁₆ (■) et DexP₂₂ (▲).

Dans le cas des DexP_τ (Figure II.15), cette différence commence par augmenter très rapidement aux temps très courts puis diminue lentement avant d'atteindre une valeur constante. Ceci est sans doute dû à la présence d'impuretés dans le dodécane dont la diffusion très rapide masque celle, beaucoup plus lente, des espèces macromoléculaires que l'on observe durant la première demi-heure.

Dans le cas des dérivés du POE (Figure II.16) la différence atteint très rapidement un plateau aux temps courts. Ces composés sont des molécules de petite taille par rapport aux DexP $_{\tau}$. Ils diffusent donc plus rapidement, et l'équilibre est atteint plus vite.

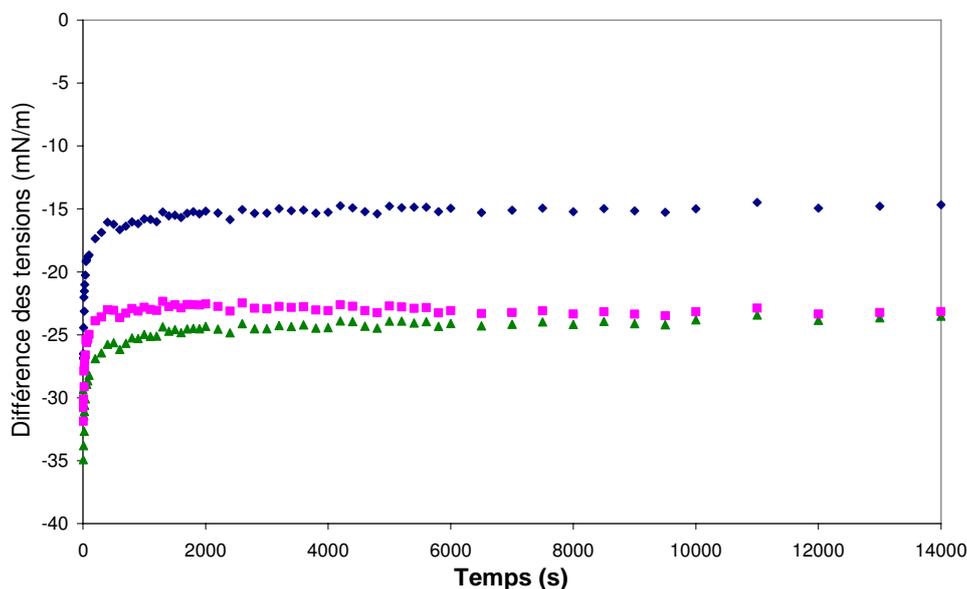


Figure II.16 : Différence entre la tension interfaciale eau/dodécane de solutions de dérivés du POE à 1 g/l et celle mesurée en absence de polymère amphiphile. Brij[®]78 (◆), Brij[®]700 (■) et Tween[®]80 (▲).

Nous avons calculé une nouvelle fois les coefficients de diffusion en utilisant les valeurs de la tension interfaciale obtenus après avoir soustrait la tension interfaciale correspondant au système sans polymère. Les valeurs calculées sont de l'ordre de 10^{-5} m²/s, ce qui reste toujours très élevé par rapport aux valeurs habituelles. Nous sommes probablement au-delà de la période de temps pour laquelle l'équation de Ward et Tordai s'applique. Nous n'avons donc pas pu déterminer de coefficient de diffusion.

4.3.2. Détermination des isothermes de Gibbs

Pour chaque concentration d'un polymère donné, la tension interfaciale à l'équilibre γ_e a été déterminée à l'aide de l'équation Hansen (Equation II.19). Cette équation est applicable aux temps longs, donc l'influence des impuretés du dodécane est négligeable. Nous prenons les valeurs des dernières 4 000 s pour calculer γ_e . Les résultats sont tracés en fonction de la concentration en chaîne alkyle pour obtenir l'isotherme de Gibbs (Figures II.17 et II.18).

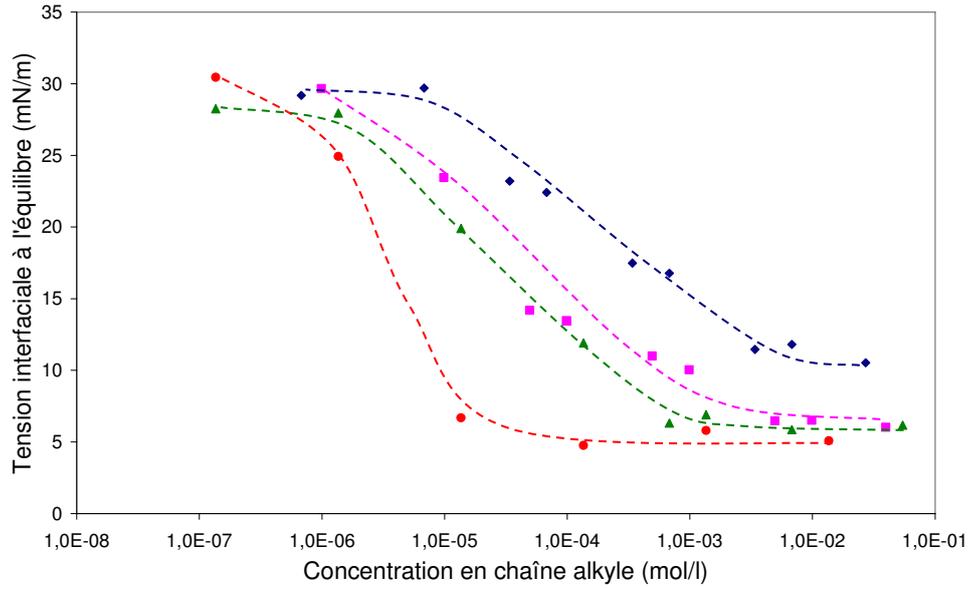


Figure II.17 : Abaissement de la tension interfaciale des DexPr en fonction de la concentration en chaîne alkyle.

DexP₁₁ (◆), DexP₁₆ (■), DexP₂₂ (▲) et DexP_{22d} après traitement à pH1 et 75°C (●).

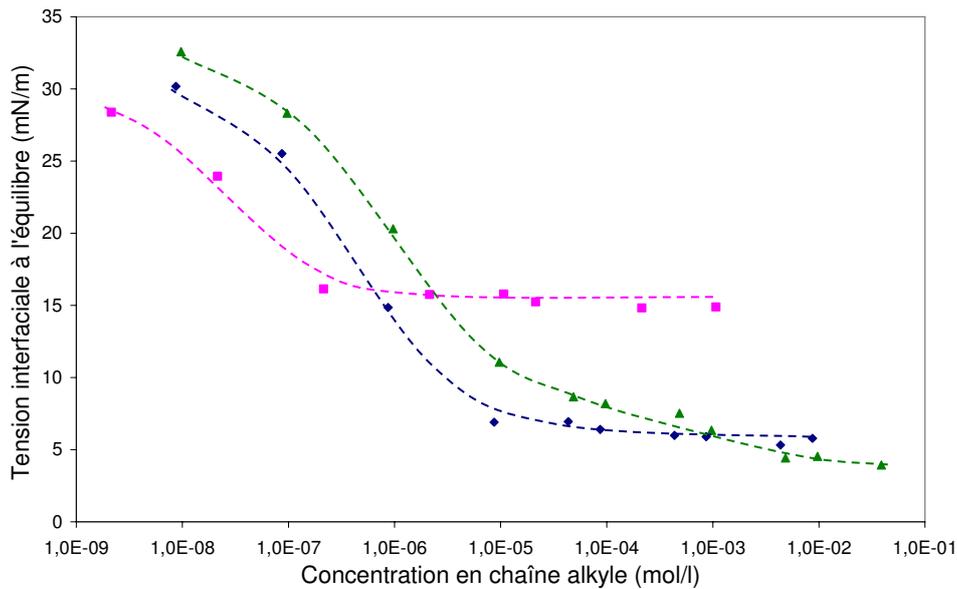


Figure II.18 : Abaissement de la tension interfaciale des dérivés du POE en fonction de la concentration en chaîne alkyle. Brij[®]78 (◆), Brij[®]700 (■) et Tween[®]80 (▲).

Comme le démontre l'équation II.16, il est possible d'estimer à partir de ces courbes le taux de recouvrement maximal Γ_{\max} en moles de chaîne alkyle par m², ainsi que les aires d'adsorption par chaîne hydrophobe A :

$$A = \Gamma_{\max} / N_A$$

II.23

où N_A est le nombre d'Avogadro

La concentration critique (CC), concentration au-delà de laquelle il n'y a plus de variation significative de γ_e , et la baisse maximale de la tension interfaciale Π_{CC} ($\Pi_{CC} = \gamma_0 - \gamma_e$) sont aussi obtenues lorsque l'équilibre d'adsorption est atteint. L'ensemble des valeurs est rassemblé dans le [tableau II.3](#).

Tableau II.3 : Propriétés tensioactives des polymères amphiphiles à 30°C à l'interface eau/dodécane.

	Concentration critique		Π_{CC}	Taux de recouvrement Γ_{max}		A	
	g/l	mol/l en chaîne hydrophobe		mol/m ² en chaîne hydrophobe	mg/m ²	nm ² /chaîne hydrophobe	nm ² /molécule du stabilisant
DexP₁₁	8,5	$6,79 \cdot 10^{-3}$	19,3	$1,03 \cdot 10^{-6}$	3,4	1,6	15,7
DexP₁₆	1,6	$4,94 \cdot 10^{-3}$	24,1	$1,16 \cdot 10^{-6}$	2,7	1,4	20,3
DexP₂₂	0,3	$6,79 \cdot 10^{-4}$	24,2	$1,38 \cdot 10^{-6}$	2,3	1,2	23,5
DexP_{22a}	0,01	$1,36 \cdot 10^{-5}$	25,3	$1,64 \cdot 10^{-6}$	2,7	1,0	19,8
Brij[®]78	$1 \cdot 10^{-3}$	$4,34 \cdot 10^{-5}$	25,5	$1,74 \cdot 10^{-6}$	2,0	0,95	0,95
Brij[®]700	$5 \cdot 10^{-3}$	$2,14 \cdot 10^{-5}$	15,3	$7,41 \cdot 10^{-7}$	3,5	2,24	2,24
Tween[®]80	0,06	$4,6 \cdot 10^{-5}$	27,7	$8,45 \cdot 10^{-7}$	0,87	1,96	1,96

Dans le cas des DexP _{τ} , la tension interfaciale diminue avec l'augmentation de la concentration en chaîne alkyle pour atteindre une valeur constante. Une faible effectivité est obtenue en présence du DexP₁₁ qui présente un taux de substitution relativement faible. Les valeurs minimales de la tension interfaciale obtenues en présence du DexP₁₆ et du DexP₂₂ sont relativement identiques (24 mN/m).

Nous remarquons sur les [figures II.17](#) et [II.18](#) qu'il est difficile de déterminer les CC, car la rupture de pente dans l'abaissement de la tension interfaciale est peu prononcée. La raison peut provenir, d'une part, de la polydispersité des polymères en termes de masses molaires et de répartition des groupes hydrophobes le long du squelette hydrophile, et d'autre part, d'une affinité différente pour l'interface des différents types d'agrégats formés causés par le caractère amphiphile associatif des polymères. Nous avons cependant évalué la CC par l'intersection des tangentes et nous remarquons qu'elle diminue avec l'augmentation du taux de substitution. Ce résultat est conforme à ce qui a déjà été observé pour des dérivés similaires [\[57\]](#). De plus, Γ_{max} varie entre $1 \cdot 10^{-6}$ et $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/m² (en chaîne hydrophobe), et l'aire occupée par un motif hydrophobe entre 1,6 et 1 nm². Ces résultats sont du même ordre de grandeur que ceux observés par C. Rouzes (Γ_{max} varie entre $1,3 \cdot 10^{-6}$ et $2,9 \cdot 10^{-6}$ mol/m² (en chaîne hydrophobe) et A entre 1,3 et 0,6 nm², pour des taux de substitution compris entre 7 et

22) ^[40]. Lors de l'augmentation du taux de substitution, Γ_{\max} augmente et A diminue. En effet, les polymères peuvent adopter des conformations permettant une adsorption dense de groupements hydrophobes.

Nous observons qu'à taux de substitution pratiquement identique, le DexP₂₂ dégradé présente des propriétés tensioactives différentes du DexP₂₂ initial avec un Γ_{\max} plus élevé et une plus faible CC. La diminution de masse molaire lors du traitement à pH 1 et 75°C semble avoir amélioré ses propriétés tensioactives et sa capacité à s'adsorber aux interfaces. Malgré sa dégradation, il pourra donc stabiliser les miniémulsions lors de la polymérisation des alkylcyanoacrylates, contrairement au Brij dont nous avons déjà montré qu'il perdait son caractère tensioactif.

Dans le cas des dérivés du POE, l'allure des courbes est similaire à celui des courbes obtenues dans le cas des DexP _{τ} . Leurs propriétés tensioactives sont influencées par la valeur HLB du composé : le Brij[®]700 possédant une HLB plus élevée que les deux autres dérivés, présente une effectivité et une CC plus faibles. Pour une même valeur HLB, les propriétés tensioactives sont également influencées par la structure des dérivés. Le Brij[®]78 et le Tween[®]80 ont une valeur HLB proche de 15, mais le Tween[®]80 présente un Γ_{\max} plus faible en raison de l'encombrement de ses trois branches hydrophiles. Par ailleurs, le Brij[®]78 peut adopter une conformation en brosse à l'interface, ce qui permet d'augmenter la compacité de la couche hydrophile et donc d'accroître Γ_{\max} .

4.3.3. Détermination du t^*

Enfin, nous avons utilisé l'équation de Filippov (Equation II.20) pour calculer le t^* qui représente la vitesse de l'abaissement de la tension. Pour calculer t^* , nous avons fixé arbitrairement la valeur de n à 0,5. En effet, des études précédentes ^[57] ont montré que n restait compris entre 0,47 et 0,58 dans tous les cas. Pour tous les polymères, l'abaissement de la tension interfaciale est assez bien décrit par l'équation de Filippov, représentée par les lignes en traits fins sur la [figure II.19](#).

Le t^* ne peut pas être lié à des propriétés physiques telles que le coefficient de diffusion. Toutefois, il permet de faire une comparaison quantitative des polymères entre eux.

A titre d'exemple, nous donnons dans le [tableau II.4](#) les valeurs de t^* et la vitesse absolue ($\frac{\Pi_{\text{éq}}}{2 \times t^*}$) pour l'ensemble des polymères étudiés à une concentration de 1 g/l.

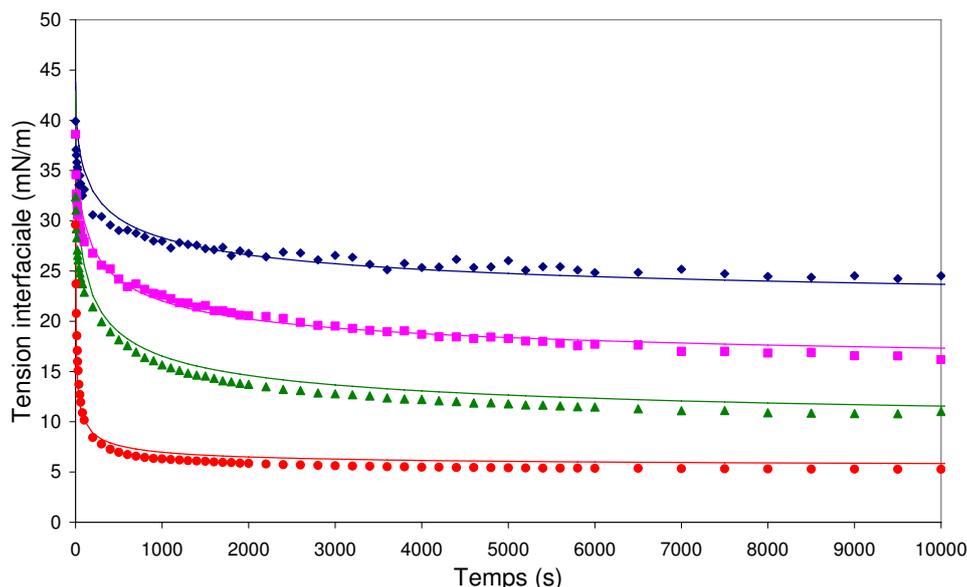


Figure II.19 : Abaissement de la tension interfaciale au cours du temps pour des solutions des DexP_τ à 1 g/l : DexP₁₁ (◆), DexP₁₆ (■), DexP₂₂ (▲) et DexP_{22d} (●). Les lignes en traits fins correspondent aux courbes calculées par l'équation de Filippov.

Tableau II.4 : Paramètre t^* issus de l'équation de Filippov et vitesse absolue à une concentration de 1 g/l.

Polymère	t^* (s)	$\Pi_{\text{éq}} / (2 \times t)$ (mN/m·s)
DexP ₁₁	223	0,04
DexP ₁₆	120	0,09
DexP ₂₂	81	0,15
DexP _{22d}	2	6,45
Brij [®] 78	0,05	254,8
Brij [®] 700	0,1	76,5
Tween [®] 80	2	6,91

Pour les DexP_τ, nous observons que le t^* diminue lorsque le taux de substitution augmente. Pour ce type de polymère amphiphile, l'équilibre est atteint plus rapidement lorsque le caractère hydrophobe du polymère augmente. Toutefois, les t^* obtenus dans le cas des DexP_τ restent beaucoup plus longs que ceux correspondant aux dérivés du POE. Ceci peut confirmer les observations mentionnées dans le paragraphe 4.3.1 : les molécules du DexP_τ diffusent plus lentement que celles des dérivés du POE en raison de leur taille. Nous

observons également que le DexP_{22d} diffuse beaucoup plus vite, probablement en raison de sa plus faible masse molaire.

5. CONCLUSIONS

Deux types de polymères amphiphiles ont été choisis pour cette étude : les dérivés amphiphiles du dextrane type DexP_τ et dérivés du POE. Trois DexP_τ ont été préparés par fixation de groupements phénoxy en présence du 1,2-époxy-3-phénoxypropane en milieu basique. Selon la quantité de réactif, nous pouvons obtenir des DexP_τ présentant des taux de substitution plus ou moins importants ($\tau = 11, 16$ et 22). Les dérivés du POE utilisés sont des produits commerciaux : le Brij[®]78, le Brij[®]700, et le Tween[®]80.

Dans un premier temps, la stabilité des dérivés amphiphiles a été étudiée à différents pH (1 à 3) et à température ambiante ou à 75°C. Ces conditions correspondent aux conditions de polymérisation qui seront utilisées par la suite pour élaborer les nanoparticules. Les produits obtenus ont été caractérisés par RMN ¹H et SEC-MALLS. Nous avons montré que les DexP_τ sont bien stables dans les conditions étudiées. Le taux de substitution reste constant tandis qu'une diminution de la masse molaire n'a été observée qu'à pH 1 et 75°C, du fait du clivage de la liaison éther entre les motifs glucopyranose. Enfin, une dégradation du Brij[®]78 a été observée dans ces mêmes conditions.

Ensuite, les propriétés tensioactives des différents polymères amphiphiles ont été caractérisées en tensiométrie dynamique. Les tensions interfaciales eau/dodécane en présence de ces polymères amphiphiles ont donc été mesurées au cours du temps. A cause de la présence probable d'impuretés dans le dodécane, les coefficients de diffusion des polymères amphiphiles n'ont pas pu être déterminés. Les équations de Hansen et de Filippov ont toutefois été appliquées avec succès pour décrire les relations entre les propriétés tensioactives et les structures des polymères amphiphiles. Dans le cas des DexP_τ, l'augmentation du taux de modification permet d'avoir un polymère plus tensioactif et présentant une cinétique d'adsorption plus rapide. Il faut noter que la dégradation du DexP₂₂ à pH 1 et 75°C pendant 24 heures a renforcé son caractère tensioactif, sa faible masse molaire facilitant, apparemment, sa diffusion aux interfaces. Pour les dérivés du POE, les cinétiques d'adsorption sont très rapides. Le Brij[®]700 possédant une HLB élevée, présente une

effectivité faible. Pour une même valeur de HLB, c'est le composé le moins encombré qui présente le Γ_{\max} le plus fort.

Dans le chapitre suivant, nous tenterons de relier les caractéristiques tensioactives des différents polymères amphiphiles préparés à leurs propriétés de stabilisation des miniémulsions et d'adsorption à la surface de nanoparticules de PACA.

6. REFERENCES

1. E. Rotureau, M. Leonard, E. Dellacherie, and A. Durand. «Emulsifying properties of neutral and ionic polymer surfactants based on dextran». *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2004**, 6(7): p.1430-1438.
2. E. Rotureau, M. Leonard, E. Dellacherie, and A. Durand. «Amphiphilic derivatives of dextran: Adsorption at air/water and oil/water interfaces». *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, 279(1): p.68-77.
3. E. Rotureau, C. Chassenieux, E. Dellacherie, and A. Durand. «Neutral Polymeric Surfactants Derived from Dextran: A Study of Their Aqueous Solution Behavior». *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2005**, 206(20): p.2038-2046.
4. C. Rouzes. «Nanosphères à coeur de poly(acide lactique) et couronne de dextrane : élaboration, propriétés et applications biomédicales». Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, **2001**. p.186.
5. T. Heinze, T. Liebert, and A. Koschella. «Esterification of polysaccharides». ed. T. Heinze, T. Liebert, and A. Koschella. Springer. **2006**. p.232.
6. P. Monsan, S. Bozonnet, C. Albenne, G. Joucla, R.M. Willemot, and M. Remaud-Simeon. «Homopolysaccharides from lactic acid bacteria». *International Dairy Journal*, **2001**, 11(9): p.675-685.
7. A.G. De Segura, M. Alcalde, N. Lopez-Cortes, and F.J. Plou. «Modulating the synthesis of dextran with the acceptor reaction using native and encapsulated dextransucrases». *Food Technology and Biotechnology*, **2004**, 42(4): p.337-342.
8. E. Khalikova, P. Susi, and T. Korpela. «Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications». *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2005**, 69(2): p.306-325.
9. C.E. Ioan, T. Aberle, and W. Burchard. «Structure properties of dextran. 2. Dilute solution». *Macromolecules*, **2000**, 33(15): p.5730-5739.
10. R.M. Alsop and G.J. Vlachogiannis. «Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel permeation chromatography on TSK PW type columns». *Journal of Chromatography*, **1982**, 246(2): p.227-240.
11. P.E. Barker, K.S. Bhambra, R.M. Alsop, and R. Gibbs. «Fractionation of dextran using ethanol». *Chemical Engineering Research and Design*, **1987**, 65(5): p.390-395.
12. A.R. Jeanes, W.C. Haynes, C.A. Wilham, J.C. Rankin, E.H. Melvin, M.L. Austin, J.E. Cluskey, B.E. Fisher, H.M. Tsuchiya, and C.E. Ris. «Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria». *Journal of the American Chemical Society*, **1954**, 76: p.5041-5052.
13. L. Simonsen, L. Hovgaard, P.B. Mortensen, and H. Brondsted. «Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. V. Degradation in human intestinal incubation models». *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1995**, 3(6): p.329-337.
14. C. Nouvel. «Synthèse contrôlée de copolymères dextrane-g-polyactide: de leur utilisation comme surfactifs biodégradables à la mise en oeuvre de système de vectorisation particulière». Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, **2002**. p.226.
15. R. Mehvar. «Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents». *Journal of Controlled Release*, **2000**, 69(1): p.1-25.
16. H.M. Tsuchiya, H.J. Koepsell, G.B. J. Corman, M.O. Bogard, V.H. Feger, and R.W. Jackson. «The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*». *Journal of bacteriology*, **1952**, 64(4): p.521-526.

17. E.L. Rozenfel'd and A.S. Senko. «Metabolism in vivo of clinical dextran». *Clinica Chimica Acta*, **1964**, 10(3): p.223-228.
18. V.P. Torchilin, E.V. Il'ina, A.V. Mazaev, B.S. Lebedev, V.N. Smirnov, and E.I. Chazov. «Study of modified Sephadex-bound insulin in animal experiments». *Journal of Solid-Phase Biochemistry*, **1977**, 2(3): p.187-193.
19. M. Baudys, D. Letourneur, F. Liu, D. Mix, J. Jozefonvicz, and S.W. Kim. «Extending insulin action in vivo by conjugation to carboxymethyl dextran». *Bioconjugate chemistry*, **1998**, 9(2): p.176-183.
20. I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur. «Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2002**, 54(5): p.631-651.
21. C.C. Berry, S. Wells, S. Charles, and A.S.G. Curtis. «Dextran and albumin derivatized iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro». *Biomaterials*, **2003**, 24(25): p.4551-4557.
22. L. Rimondini, N. Nicoli-Aldini, M. Fini, G. Guzzardella, M. Tschon, and R. Giardino. «In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **2005**, 99(2): p.148-154.
23. Y. Li, C. Volland, and T. Kissel. «Biodegradable brush-like graft polymers from poly(D,L-lactide) or poly(D,L-lactide-coglycolide) and charge-modified, hydrophilic dextrans as backbone—in-vitro degradation and controlled releases of hydrophilic macromolecules». *Polymer*, **1998**, 39(14): p.3087-3097.
24. C. Fournier, M. Léonard, I. LeCoq-Léonard, and E. Dellacherie. «Coating polystyrene particle by adsorption of hydrophobically modified dextrans». *Langmuir*, **1995**, 11: p.2344-2347.
25. N. Behan, C. Birkinshaw, and N. Clarke. «Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerization and particle formation». *Biomaterials*, **2001**, 22(11): p.1335-1344.
26. K. Langer, E. Seegmueller, A. Zimmer, and J. Kreuter. «Characterization of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: I. Quantification of PBCA polymer and dextrans». *International Journal of Pharmaceutics*, **1994**, 110(1): p.21-27.
27. J.C. Olivier, C. Vauthier, M. Taverna, D. Ferrier, and P. Couvreur. «Preparation and characterization of biodegradable poly(isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles with the surface modified by the adsorption of proteins». *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **1995**, 4(6): p.349-356.
28. S. Pirker, J. Kruse, C. Noe, K. Langer, A. Zimmer, and J. Kreuter. «Characterization of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. Part II: Determination of polymer content by NMR analysis». *International Journal of Pharmaceutics*, **1996**, 128(1,2): p.189-195.
29. W.E. Hennink, O. Franssen, W.N.E. van Dijk-Wolthuis, and H. Talsma. «Dextran hydrogels for the controlled release of proteins». *Journal of Controlled Release*, **1997**, 48(2,3): p.107-114.
30. O. Franssen, L. Vandervennet, P. Roders, and W.E. Hennink. «Degradable dextran hydrogels: controlled release of a model protein from cylinders and microspheres». *Journal of Controlled Release*, **1999**, 60(2-3): p.211-221.
31. M.A. Casadei, F. Cerreto, S. Cesa, M. Giannuzzo, M. Feeney, C. Marianecchi, and P. Paolicelli. «Solid lipid nanoparticles incorporated in dextran hydrogels: a new drug delivery system for oral formulations». *International Journal of Pharmaceutics*, **2006**, 325(1-2): p.140-146.
32. L.M. Landoll. «Cellulose derivatives». **1980**, DE 3004161.
33. L.M. Landoll. «Nonionic polymer surfactants». *Journal of Polymer Science, Polymer Chemistry Edition*, **1982**, 20(2): p.443-455.

34. I. Belsky, D.L. Gutnick, and E. Rosenberg. «Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier-bound fatty acids». *FEBS Letters*, **1979**, 101(1): p.175-178.
35. M. Sanchez-Chaves and F. Arranz. «Water-insoluble dextran polymers by grafting of hydrophobic groups. I. Reaction with butyric anhydride and heterogeneous hydrolysis of the partially modified dextran». *Angewandte Makromolekulare Chemie*, **1983**, 118: p.53-63.
36. M. Sanchez-Chaves and F. Arranz. «Water-insoluble dextrans by grafting, 2. Reaction of dextrans with n-alkyl chloroformates. Chemical and enzymic hydrolysis». *Makromolekulare Chemie*, **1985**, 186(1): p.17-29.
37. T. Reinhart and K.H. Bauer. «Investigations on the hemolysis and solubilization behavior of nonionic polymeric surfactants». *Pharmazie*, **1995**, 50(6): p.403-407.
38. M. Nichifor and A. Carpov. «Bile acids covalently bound to polysaccharides 1. Esters of bile acids with dextran». *European Polymer Journal*, **1999**, 35(12): p.2125-2129.
39. K. Kobayashi and H. Sumitomo. «Regioselectively modified stereoregular polysaccharides. 2. Synthesis of 3-O-methyl-(1 → 6)- α -D-glucopyranan». *Macromolecules*, **1981**, 14(2): p.250-253.
40. C. Rouzes, A. Durand, M. Leonard, and E. Dellacherie. «Surface activity and emulsification properties of hydrophobically modified dextrans». *Journal of Colloid and Interface Science*, **2002**, 253(1): p.217-223.
41. A. Durand. «Synthesis of amphiphilic polysaccharides by micellar catalysis». *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2006**, 256(1-2): p.284-289.
42. E. Rotureau, 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.
43. A. Durand and E. Dellacherie. «Aqueous Solutions of Native and Hydrophobically Modified Polysaccharides: Temperature Effect». *Biomacromolecules*, **2006**, 7(3): p.958-964.
44. D. Chognot, M. Leonard, J.-L. Six, and E. Dellacherie. «Surfactive water-soluble copolymers for the preparation of controlled surface nanoparticles by double emulsion/solvent evaporation». *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **2006**, 51(1): p.86-92.
45. F.R. Dintzis and R. Tobin. «Light scattering and specific refractive increment behavior of amylose and dextran in methyl sulfoxide-water». *Carbohydrate Research*, **1978**, 66: p.71-83.
46. A.M. Basedow, K.H. Ebert, and U. Ruland. «Specific refractive index increments of dextran fractions of different molecular weights». *Makromolekulare Chemie*, **1978**, 179(5): p.1351-1353.
47. S. Patai. «The chemistry of the ether linkage». ed. S. Patai. Interscience Publishers. **1967**. p.372.
48. A. DeJongh, C. LeBel, and J. Stenvens. «Chimie organique». Edition française dirigée par Eric Brown edEdiscience international. **1994**, Vol.2 Réactions. p.667.
49. S.S. Dukhin and G. Kretzschmar. «Thermodynamics and macro-kinetics of adsorption». *Studies in Interface Science*, ed. S.S. Dukhin and G. Kretzschmar. Elsevier. **1995**, Vol.I (Dynamics of adsorption at liquid interfaces). p.30-67.
50. P.G. De Gennes. «Polymers at an interface; a simplified view». *Advances in Colloid and Interface Science*, **1987**, 27(3-4): p.189-209.
51. I. Nahrungbauer. «Dynamic surface tension of aqueous polymer solutions, I: ethyl(hydroxyethyl)cellulose (BERMOCOLL cst-103)». *Journal of Colloid and Interface Science*, **1995**, 176(2): p.318-328.
52. A.F.H. Ward and L. Tordai. «Time-dependence of boundary tensions of solutions I. The role of diffusion in time-effects». *Journal of Chemical Physics*, **1946**, 14: p.453-461.

53. A.V. Makievski, V.B. Fainerman, R. Miller, M. Bree, L. Liggieri, and F. Ravera. «Determination of equilibrium surface tension values by extrapolation via long time approximations». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1997**, 122: p.269-273.
54. F.K. Hansen. «The theory of diffusion controlled adsorption kinetics with accompanying evaporation». *Journal of Chemical Physics*, **1960**, 64: p.637-641.
55. L.K. Filippov. «Dynamic surface tension of aqueous surfactant solutions 1. Diffusion-convective controlled adsorption». *Journal of Colloid and Interface Science*, **1994**, 163: p.49-60.
56. L.K. Filippov. «Dynamic surface tension of aqueous surfactant solutions 2. Diffusion-kinetic-convective controlled adsorption». *Journal of Colloid and Interface Science*, **1994**, 164: p.471-482.
57. E. Rotureau, M. Leonard, E. Dellacherie, and A. Durand. «Amphiphilic derivatives of dextran: Adsorption at air/water and oil/water interfaces». *Journal of Colloid and Interface Science*, **2004**, 279(1): p.68-77.

Chapitre III

Préparation et caractérisation de nanoparticules de poly(*n*-butyl cyanoacrylate)

1. INTRODUCTION

Le nombre de publications concernant la synthèse de nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate) (PACA) pour la vectorisation n'a cessé de croître ces dernières années. Un effort particulier a été porté sur le contrôle des propriétés de surface. En effet, ces dernières vont conditionner le devenir *in vivo* des nanoparticules. En particulier, une surface hydrophobe va favoriser la capture des nanoparticules par le système immunitaire, et réduire ainsi fortement leur persistance intravasculaire. C'est pourquoi la majorité des nanoparticules sont recouvertes par une couche macromoléculaire hydrophile à base de poly(oxyde d'éthylène) (POE) ou de polysaccharide. Parallèlement, le LCPM a développé une famille complète de dérivés amphiphiles du dextrane. Ces composés sont capables de s'adsorber aux interfaces liquide/liquide ou liquide/solide, et de conférer un caractère hydrophile à des particules. Ils sont également capables de stabiliser la polymérisation en miniémulsion du styrène.

Le travail présenté dans ce chapitre s'inscrit dans la continuité de ces recherches et concerne la préparation de nanoparticules de poly(*n*-butyl cyanoacrylate) (PBCA) recouvertes par une couche hydrophile en une seule étape. Elles ont été préparées par polymérisation du *n*-butyl cyanoacrylate (BCA) en miniémulsion directe en présence d'un polymère amphiphile. Deux familles de polymères amphiphiles ont été étudiés : des dextrans phénoxy (DexP₁₁, DexP₁₆ et DexP₂₂) et des dérivés du POE (Brij[®]78, Brij[®]700, et Tween[®]80). Leurs propriétés tensioactives ont été étudiées dans le chapitre précédent.

Le BCA est très sensible aux traces d'eau et polymérise dès la mise en contact des phases aqueuse et organique. Pour minimiser simultanément la quantité de monomère ayant réagi pendant l'émulsification et la taille des particules obtenues, une série d'expériences a été effectuée pour optimiser les conditions de préparation des miniémulsions.

Lors de la polymérisation en miniémulsion, le stabilisant reste à la surface des gouttelettes puis des nanoparticules et contrôle leurs propriétés de surface. Par ailleurs, la taille des nanoparticules obtenues dépend beaucoup de la concentration en stabilisant. Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules obtenues (taille des particules, épaisseur de la couche hydrophile, taux de recouvrement en polymère amphiphile) ont donc été étudiées en

fonction de la nature des polymères amphiphiles et de leur concentration dans la phase continue. Différentes techniques telles que la granulométrie, la zétamétrie, la spectroscopie UV/visible ont été utilisées pour cela. Enfin, la stabilité de la couche hydrophile notamment en présence d'agent détergent a été évaluée.

2. POLYMERISATION EN MINIEMULSION

Les miniémulsions sont obtenues en dispersant une phase organique, constituée par le monomère et un composé hydrophobe, dans une phase aqueuse contenant le tensioactif. Le processus se décompose en trois étapes : homogénéisation, sonication et polymérisation (Figure III.1). Tout d'abord, les phases aqueuse et organique sont préparées indépendamment : la phase aqueuse contient le stabilisant tandis que la phase organique contient le monomère, l'amorceur et l'hydrophobe. La phase organique est alors ajoutée sous forte agitation magnétique dans la phase aqueuse. L'émulsion grossière obtenue est soniquée au moyen d'ultrasons pour former des gouttelettes plus fines avec une faible distribution de taille. Leur taille varie entre 50 et 500 nm selon les conditions expérimentales. Les monomères sont finalement polymérisés au sein de ces gouttelettes.

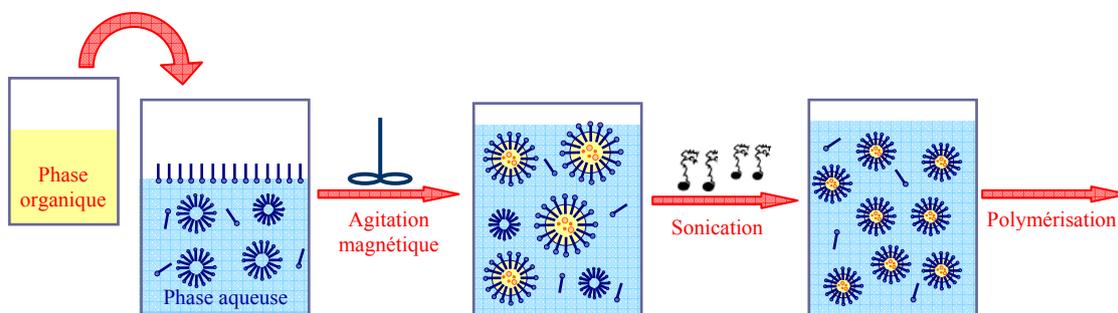


Figure III.1 : Principe de la polymérisation en miniémulsion directe.

Les miniémulsions sont des systèmes très stables. Il n'y a pas de processus de crémage ou de sédimentation car la taille des gouttelettes est très faible. De plus, la coalescence est limitée parce que la concentration en tensioactif est suffisante pour stabiliser l'interface créée par la sonication. Enfin, le mûrissement d'Ostwald est limité par ajout d'un composé hydrophobe.

Le mûrissement d'Ostwald se traduit, dans le cas d'émulsion huile dans eau (H/E) par exemple, par une diffusion moléculaire de l'huile contenue dans les petites gouttelettes vers

les plus grosses à travers la phase continue, conduisant à la disparition des gouttelettes les plus fines. Il est une conséquence de la différence de pression de Laplace entre deux gouttes de tailles différentes. La pression de Laplace augmente lorsque la taille des gouttelettes diminue (Equation III.1).

$$\frac{2\gamma_{LL}}{R} = P_{Laplace} \quad \text{III. 1}$$

$$\text{Avec } \gamma_{LL} = \frac{A_{dense}}{A_{surf}} \gamma_{LL,dense} + \left(1 - \frac{A_{dense}}{A_{surf}}\right) \gamma_{LL,naked} \quad \text{III. 2}$$

où R représente le rayon des gouttelettes ; γ_{LL} l'énergie à l'interface eau/huile. $\gamma_{LL,dense}$ et $\gamma_{LL,naked}$ sont les tensions interfaciales en présence et en absence du tensioactif. A_{surf} est la surface moyenne occupée par molécule de tensioactif sur la particule ; A_{dense} la surface moyenne occupée par molécule de tensioactif sur la particule lorsque l'interface eau/huile est saturée. Donc, à l'équilibre $A_{surf} = A_{dense}$.

La vitesse de mûrissement d'Ostwald dépend de la taille des particules, de la polydispersité et de la solubilité de l'huile dans la phase continue. L'utilisation de composés hydrophobes (hexadécane [1, 2], 1-hexadécanol [3, 4]) permet d'inhiber le mûrissement d'Ostwald en créant une pression osmotique [5] (Equation III.3) dans les gouttelettes qui contrebalance la pression de Laplace (Figure III.2).

$$\Pi_{osm} = \frac{RTc}{M} \quad \text{III. 3}$$

avec R la constante des gaz parfaits ; T la température ; c la concentration en composé hydrophobe dans les particules et M sa masse molaire.

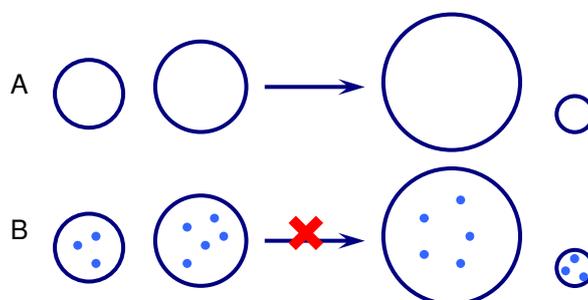


Figure III.2 : Mécanisme du mûrissement d'Ostwald.

A. En absence du composé hydrophobe ; B. En présence d'un composé hydrophobe.

Contrairement à la polymérisation en émulsion, chaque gouttelette de monomère se comporte donc comme un « nanoréacteur » isolé dans lequel s'effectue la polymérisation. Il n'y a pas de diffusion du monomère et les particules de polymère ont la même taille que les gouttelettes de monomère initiales [6]. Ce principe de nanoréacteur permet d'envisager de nombreuses réactions de polymérisation en milieu dispersé. Ainsi, la miniémulsion a permis de synthétiser des latex par polyaddition [7] ou par polymérisation anionique [8,9]. Par ailleurs, cette technique permet l'obtention de particules structurées. Ainsi, des nanocapsules [10] ainsi que des particules dites "core-shell" ont été synthétisées [11]. Enfin, l'utilisation de tensioactifs permet de contrôler les propriétés des particules obtenues puisque, en fin de polymérisation, le tensioactif se trouve à leur surface [12]. Ceci permet de faire varier les caractéristiques superficielles telles que la charge ou l'hydrophilie, et d'envisager de conférer aux particules des propriétés de biocompatibilité.

Protocole expérimental standard (voir paragraphe 4)

Le polymère amphiphile est dissous dans 12,5 ml de solution aqueuse dont le pH est ajusté à 2 par une solution d'HCl (standard 1,0 N, Aldrich). Cette solution est maintenue sous agitation magnétique pendant 12 heures avant d'être utilisée. La phase organique contenant 0,5 ml de BCA (Loctite, Ireland), 25 µl de dodécane (≥99%, Aldrich), et 5 mg d'azobisisobutyronitrile (AIBN, 98%, Acros), est préparée juste avant utilisation. Après ajout goutte à goutte de la phase organique dans la phase aqueuse, l'émulsion est maintenue à 4°C sous agitation magnétique à 1 000 tr/min pendant 5 minutes. Elle est ensuite soniquée (modèle Vibracell 600 W, Sonics & Materials Inc, Danbury, CT) à 50% d'amplitude et 5 W de la puissance dans un bain glacé pendant 1 min. Puis, la miniémulsion est maintenue sous agitation magnétique à 75°C pendant 20 heures.

3. METHODES DE CARACTERISATION DES NANOPARTICULES

3.1. Mesure de la taille des particules

3.1.1. Granulométrie

La taille des particules a été mesurée par un HPPS (High Performance Particle Sizer, modèle HPP5002, Malvern). Il permet de mesurer la taille de particules submicroniques à l'aide de la diffusion de lumière dynamique. Cette technique est basée sur la mesure du mouvement brownien des particules. Ce dernier consiste en un mouvement aléatoire des

particules provoqué par les impacts des molécules du solvant sur la surface de la particule. La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du solvant. A une viscosité du milieu dispersant donnée, les fluctuations de l'amplitude et de la fréquence du mouvement brownien sont relativement importantes (Figure III.3).

Les signaux de ces fluctuations sont captés par l'appareil, puis traités par un corrélateur numérique, et enfin transformés en vitesse de déplacement des particules. Ce déplacement est défini par le coefficient de diffusion de translation D_t , qui d'après la loi de Stokes-Einstein est inversement proportionnel au diamètre hydrodynamique d_H de la particule :

$$d_H = \frac{k_B T}{3\eta\pi D_t} \quad \text{III. 4}$$

où k_B est la constante de Boltzmann ; T la température absolue du milieu dispersant et η sa viscosité. La mesure du coefficient de diffusion de translation D_t permet par conséquent de déterminer le diamètre hydrodynamique d_H de la particule.

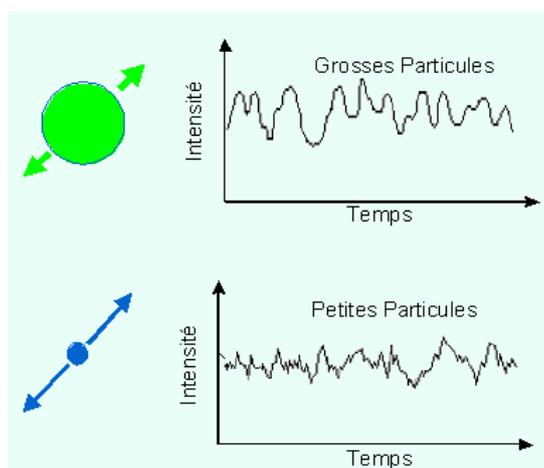


Figure III.3 : Mouvement brownien des particules : fluctuation de l'intensité en fonction de la taille.

La particularité de cet appareil est qu'il mesure la lumière diffusée, non pas à 90° comme la plupart des appareils mais à un angle de 173° . La mesure en rétrodiffusion permet de travailler sur des échantillons relativement concentrés avec une certaine opacité. Pour cette étude, les échantillons sont toutefois dilués avec une solution d'HCl à pH 2, et les suspensions sont maintenues au repos pendant au moins 15 min avant mesure afin qu'elles soient bien homogènes.

3.1.2. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique permettant d'observer des particules submicroniques. Les expériences ont été réalisées au moyen d'un appareil JEOL JSM. Les particules en suspension dans l'eau sont déposées sur un porte-échantillon recouvert d'un ruban adhésif double-face. L'évaporation de l'eau est réalisée à température ambiante pendant une nuit. La métallisation de la surface des échantillons est ensuite réalisée avec un mélange constitué de 60% de palladium et de 40% d'or, pendant 5 min sous vide à 1,2 kV et 5 mA de courant imposé. La couche métallique ainsi déposée mesure environ 7 nm d'épaisseur.

3.2. Détermination de l'épaisseur de la couche hydrophile

3.2.1. Principe des mesures du potentiel zêta

La présence de groupes chargés à la surface d'une particule affecte la distribution ionique dans la région interfaciale entre la particule et le liquide. Il en résulte une augmentation de la concentration en contre-ions près de la surface de la particule, qui peut être modélisée sous la forme d'une double couche électrostatique comme le montre la [figure III.4](#).

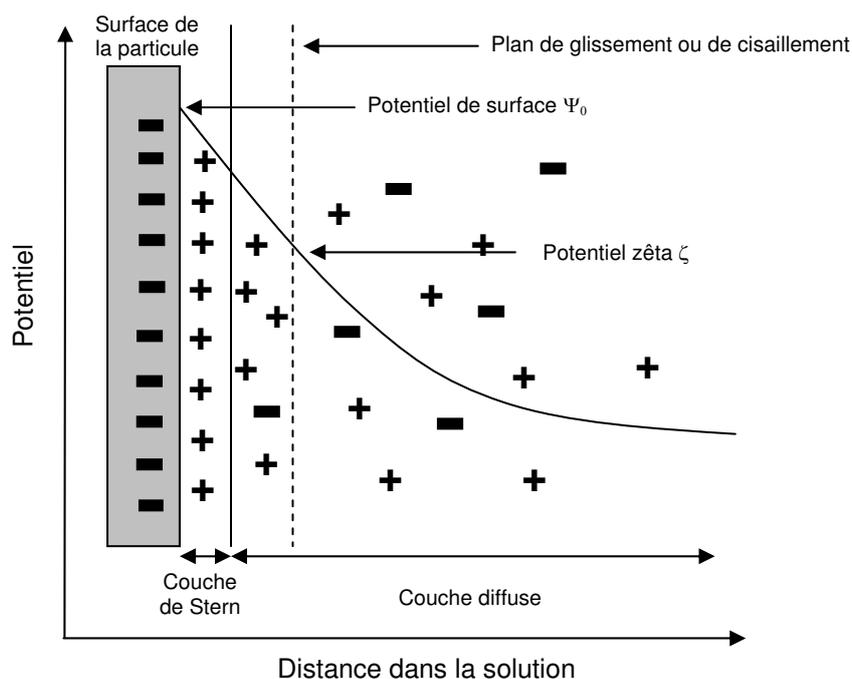


Figure III.4 : Modélisation de la double-couche électrostatique autour d'une particule chargée.

La première couche appelée couche de Stern, correspond à la région la plus proche de la surface et comporte des contre-ions solidement liés. La seconde couche appelée couche de Gouy-Chapman, est plus diffuse et son épaisseur dépend de la force ionique du milieu. Au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface de la particule, le potentiel chimique de la couche diffuse décroît.

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. Quand l'équilibre entre ces deux forces est atteint, les particules se déplacent à vitesse constante. Leur vitesse dépend du champ électrique, du milieu et de la charge de la particule. Sous l'effet des forces de frottement, la couche d'ions diffuse est arrachée jusqu'à un certain plan appelé plan de cisaillement. Le potentiel mesuré au niveau de ce plan de cisaillement est appelé potentiel zêta (ζ).

La valeur du potentiel ζ donnée par le zétamètre est calculée à partir de la mobilité électrophorétique μ_E des particules, selon la loi de Henry :

$$\mu_E = \left(\frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} \right) f(k_H, r) \quad \text{III. 5}$$

où $\varepsilon = \varepsilon_R \cdot \varepsilon_0$ (avec ε_R la constante diélectrique du milieu et ε_0 la permittivité du vide) ; η la viscosité du milieu ; k_H le paramètre de Debye-Hückel ; r le rayon des particules et f la fonction de Henry.

La valeur de la fonction $f(k_H, r)$ est fixée à 1,5 par l'appareil. Cette approximation dite de Smoluchowski n'est cependant valable que pour des valeurs de (k_H, r) très supérieures à 1, et suppose que le champ électrique est uniforme et parallèle à la surface.

L'appareil utilisé est un Zétasizer muni d'un laser Hélium Néon à 633 nm. Les mesures sont effectuées à 20°C, dans des solutions de NaCl à diverses concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-2} mol/l. La concentration en particules est d'environ 0,4% (v/v).

Pour une particule donnée dans un champ électrique donné, quelle que soit la composition ionique du milieu, la distance de la surface au plan de cisaillement ne varie pas.

En pratique, le potentiel ζ que nous avons utilisé n'est pas celui mesuré par l'appareil, mais est recalculé à partir de la mobilité électrophorétique μ_E (exprimée en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) des particules, selon l'équation modifiée de Booth ^[13] :

$$\zeta (mV) = 25,7 \left[\frac{E}{f_1} - \frac{C_3 \left(\frac{E}{f_1} \right)^3 + C_4 \left(\frac{E}{f_1} \right)^4}{f_1 + 3C_3 \left(\frac{E}{f_1} \right)^2 + 4C_4 \left(\frac{E}{f_1} \right)^3} \right] \quad \text{III. 6}$$

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, alors que les effets de relaxation sont pris en compte par les coefficients C_3 et C_4 .

Une méthode permettant la détermination de f_1, C_3, C_4 et donc le calcul du potentiel ζ à partir de la taille et de la mobilité électrophorétique μ_E des particules, et en fonction de la concentration saline du milieu, a été décrite par Deshiikan et Papadopoulos ^[13]. Cette équation permet le calcul du potentiel ζ , quelles que soient les valeurs du paramètre k_H de Debye-Hückel et du rayon r des particules. En effet, les approximations de Smoluchowski et de Hückel ne sont respectivement applicables que pour des facteurs $(k_H \cdot r) > 100$ et $(k_H \cdot r) < 0,1$.

De plus, l'épaisseur de la couche diffuse est égale à l'inverse du paramètre de Debye-Hückel k_H et dépend de la force ionique du milieu :

$$k_H = 10^9 \left[\left(1000 e^2 N_A \sum_i (C_i Z_i^2) \right) / \varepsilon k_B T \right]^{1/2} \quad \text{III. 7}$$

où e est la charge élémentaire de l'électron ; N_A est le nombre d'Avogadro ; C_i, Z_i sont la concentration et la valence de l'ion considéré dans le milieu ; k_B est la constante de Boltzmann ; T est la température absolue du milieu.

Selon la théorie de Debye-Hückel, la décroissance du potentiel en fonction de la distance à la surface suit une loi exponentielle du type :

$$\psi = \psi_0 \exp(-k_H x) \quad \text{d'où} \quad \zeta = \psi_0 \exp(-k_H x) \quad \text{III. 8}$$

où ψ_0 est le potentiel de surface de la particule, et ψ le potentiel à une distance x de la surface. Le potentiel ζ est le potentiel au plan de cisaillement. Par conséquent, si on considère que la distance de la surface au plan de cisaillement est constante et égale à x , on obtient :

$$\ln \zeta = \ln \psi_0 - k_H x \quad \text{d'où} \quad \zeta = \psi_0 \exp(-k_H x) \quad \text{III. 9}$$

Cette équation, qui prend en compte un certain nombre d'approximations, n'est valable que lorsque $\psi < 25,7$ mV. Par contre, la relation de Gouy-Chapman exprime l'évolution du potentiel ζ en fonction de k_H , sans les limitations de Debye-Hückel :

$$\tanh\left(\frac{Z e \zeta}{4 k_B T}\right) = \tanh\left(\frac{Z e \psi_0}{4 k_B T}\right) \exp(-k_H x) \quad \text{III. 10}$$

Cette théorie implique une variation continue du potentiel depuis la surface vers la solution. Par conséquent, en mesurant le potentiel ζ à différentes forces ioniques, 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 droite dont la pente est égale à x , soit la distance de la surface au plan de cisaillement.

Enfin, si on considère l'existence de la couche de Stern d'épaisseur Δ_s et de potentiel ψ_s , l'équation de Gouy-Chapman devient alors ^[14] :

$$\tanh\left(\frac{Z e \zeta}{4 k_B T}\right) = \tanh\left(\frac{Z e \psi_s}{4 k_B T}\right) \exp[-k_H(x - \Delta_s)] \quad \text{III. 11}$$

où la valeur $(x - \Delta_s)$ est la distance de la couche de Stern au plan de cisaillement.

3.2.2. Calcul de l'épaisseur de la couche hydrophile

Lorsqu'une particule chargée est recouverte d'un polymère neutre et que la couche de polymère d'épaisseur Δ est supérieure à la distance x , il y a déplacement du plan de cisaillement de la particule, de la distance x à une distance de la surface notée Δ_{PZ} . On observe alors une diminution du potentiel ζ , qui tend vers zéro au fur et à mesure que la quantité de polymère déposé et que l'épaisseur Δ_{PZ} de la couche interfaciale augmentent.

L'équation de Gouy-Chapman qui relie l'épaisseur Δ_{PZ} au potentiel ζ devient :

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

dont un exemple de représentation graphique est donné dans la [figure III.5](#). Pour de faibles forces ioniques c'est-à-dire lorsque l'épaisseur Δ_{PZ} est inférieure à celle de la couche diffuse $1/k_B$, l'évolution de la courbe en fonction de k_H est linéaire et la pente de la droite correspond à la valeur de Δ_{PZ} . Par contre, lorsque Δ_{PZ} est supérieure à $1/k_B$, la droite s'incurve et les valeurs tendent vers zéro. L'épaisseur Δ_{PZ} ne peut donc plus être déterminée à partir des valeurs du potentiel ζ mesurées à des forces ioniques plus élevées.

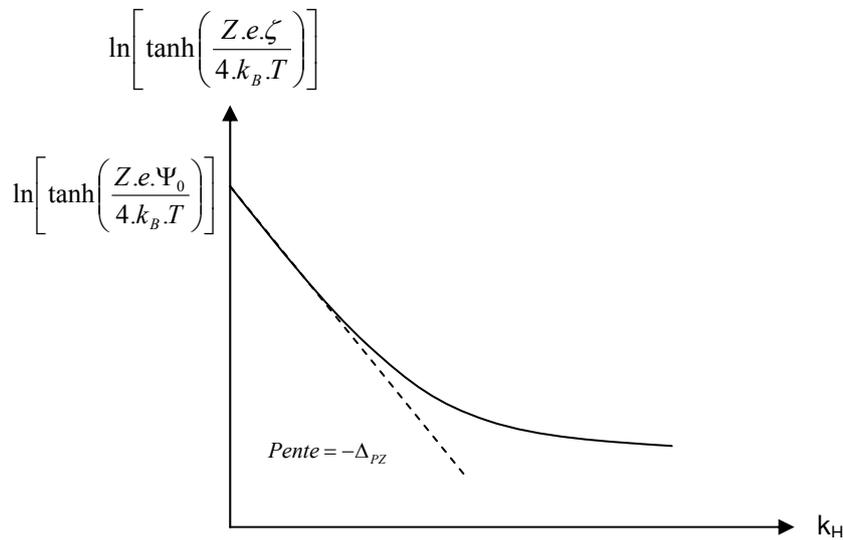


Figure III.5 : Détermination de Δ_{PZ} , d'après la mesure de potentiel ζ au niveau du plan de cisaillement des particules calculé par la relation de Gouy-Chapman et en fonction du paramètre de Debye-Hückel k_H .

3.3. Détermination du taux de recouvrement

Le taux de recouvrement (Γ) est défini comme la quantité de polymère adsorbé pour 1 m² de surface de particules. Il est donc calculé à partir de la différence entre la quantité de dextrane introduite et celle restant dans le surnageant après élimination des particules par centrifugation de la miniémulsion, selon la relation suivante :

$$\Gamma = \frac{C_i V - C_{\text{éq}} V}{m S} \quad \text{III.13}$$

où V est le volume total de la miniémulsion ; C_i la concentration initiale du dextrane dans la miniémulsion ; C_{eq} la concentration du dextrane dans le surnageant à l'équilibre ; S l'aire des nanoparticules ; m la quantité du BCA introduite au départ.

3.3.1. Détermination de la quantité de polymère amphiphile adsorbé à la surface de particules

La quantité de polymère amphiphile adsorbé à la surface des particules de PBCA est obtenue de manière indirecte par différence entre la quantité de polymère amphiphile introduite dans la solution au départ et la quantité non adsorbée, mesurée dans le surnageant.

➤ Dosage à l'antrone du dextrane phénoxy

Le dosage à l'antrone permet de déterminer la concentration en dextrane dans une solution aqueuse [15]. Cette technique est basée sur la réaction de l'antrone avec les motifs glucose du dextrane qui conduit, en milieu acide et chaud, à la formation d'un complexe vert quantifiable par spectroscopie d'adsorption dans le visible. Il a été vérifié précédemment que la présence de chaînes hydrophobes greffées sur le squelette polysaccharidique n'a pas d'influence sur le dosage [16].

Préparation de la solution d'antrone

1 g d'antrone (97%, Aldrich) et 150 ml d'eau osmosée sont introduits dans un bécher de 1 litre, que l'on place dans un bain d'eau froide. 350 ml d'acide sulfurique concentré (95-98%) sont ensuite ajoutés petit à petit sous agitation magnétique. L'antrone se dissout au fur et à mesure pour conduire à un mélange jaune visqueux. Après homogénéisation et retour à température ambiante, le mélange est stocké à 4°C jusqu'à utilisation (dans un délai maximum d'environ 1 mois).

Dosage du dextrane par l'antrone

La miniémulsion est tout d'abord centrifugée (GR 20 22, Jouan) à 16 500 tr/min et 15°C pendant 30 min. Le surnageant est alors prélevé. 200 µl du surnageant, dilué si nécessaire, sont ajoutés à 5 ml de solution d'antrone dans un tube en verre, qui après fermeture est vigoureusement agité à l'aide d'un vortex. Les tubes sont placés dans un bain-marie maintenu à 80°C pendant 30 min. Après retour à température ambiante (pendant au moins une heure) et homogénéisation au vortex, les densités optiques (DO) des solutions sont mesurées contre un blanc préparé avec 200 µl d'eau osmosée par spectroscopie UV/visible (Uvikon XL Bio-Tek Instruments) à 625 nm.

Chaque dosage nécessite un étalonnage effectué en simultanément avec des solutions aqueuses de concentrations connues du même DexP_τ utilisé pour la préparation de nanoparticules, contre un blanc préparé avec 200 µl d'eau osmosée. La concentration en DexP_τ ne doit pas excéder 0,8 g/l (soit DO < 1).

➤ Dosage du dérivé du POE à l'iode

La quantité de dérivé du POE résiduel dans le surnageant est déterminée par la méthode de Baleux et Champetier^[17]. Cette technique est basée sur la réaction entre les motifs d'oxyde d'éthylène et une solution iodo-iodurée (I₂/KI), conduisant à la formation d'un complexe quantifiable en spectroscopie d'adsorption par dosage à 500 nm.

Dosage à l'iode

La solution d'iodo-iodurée, contenant 1% (w/w) d'iode (99,99+%, Aldrich) et 2% (w/w) d'iodure de potassium (cristallisé, PROLABO), est préparée dans l'eau MilliQ, et stockée au frais à l'abri de la lumière. Les surnageants sont prélevés selon le protocole utilisé pour le dosage du DexP_τ à l'antrone, puis dilués pour que la concentration en dérivé du POE soit inférieure à 15 mg/l. Ensuite, 100 µl de la solution d'iodo-iodurée sont ajoutées dans 4 ml d'une solution d'échantillon à doser. Après agitation au vortex, le mélange est laissé au repos à l'obscurité pendant 15 min. La DO de la solution est ensuite mesurée pour chaque échantillon à 500 nm après 15 min exactement car il existe des variations du signal avec le temps.

Chaque dosage nécessite un étalonnage effectué en simultanément avec des solutions du même dérivé du POE utilisé pour la préparation de nanoparticules de concentrations connues (1 à 15 mg/l), contre un blanc préparé avec 4 ml d'eau MilliQ.

3.3.2. Aire des particules

A partir du diamètre des particules et de la quantité de BCA introduite, il est possible de calculer la surface spécifique des nanoparticules. En négligeant l'augmentation du rayon des particules liée à la présence du polymère amphiphile, nous pouvons estimer le nombre de particules présentes dans la suspension (N_{part}) et l'aire des nanoparticules est déterminée selon la relation suivante :

$$V = \frac{m_{BCA}}{d_{PBCA}} = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d_H}{2} \right)^3 N_{part} \quad \text{et} \quad S = 4 \pi \left(\frac{d_H}{2} \right)^2 N_{part} \quad \text{III.14}$$

où V est le volume occupé par les particules ; m_{BCA} la quantité du BCA introduite ; d_{PBCA} la densité du PBCA ($d_{PBCA}=1,1$) ; d_H le diamètre dynamique des nanoparticules déterminé par HPPS ; N_{part} le nombre des nanoparticules ; S l'aire des nanoparticules.

3.3.3. Calcul du taux de recouvrement

Le taux de recouvrement Γ est calculé à partir de la différence entre la quantité initiale en polymère dans la solution et celle dosée dans le surnageant (concentration à l'équilibre) après centrifugation, à partir de la relation suivante :

$$\Gamma = \frac{C_i \cdot V_T - C_{ex} \cdot V_T}{S} \quad \text{III. 15}$$

où V_T est le volume total de la phase aqueuse, C_i la concentration initiale en polymère, C_{ex} la concentration en polymère en excès dans la phase aqueuse après l'émulsification, S l'aire des gouttelettes.

3.4. Stabilité de la couche hydrophile

Après adsorption des différents polymères amphiphiles à la surface des particules, la couche hydrophile formée peut être partiellement désorbée pendant l'étape de lavage des particules, ou bien au contact de molécules plus ou moins amphiphiles telles que les protéines ou les détergents. Cette désorption peut entraîner une perte de la stabilité colloïdale de la suspension. Par conséquent, afin d'évaluer la résistance de la couche de polymère immobilisée sur les particules de PBCA, nous avons étudié le devenir de celle-ci après lavage des particules et ensuite au contact d'une solution de tensioactif tel que le dodécyle sulfate de sodium (SDS), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$.

3.4.1. Désorption au lavage

Pour cette étude, nous avons choisi de travailler dans le même milieu que celui de la synthèse (solution d'HCl, pH 2) pour ne pas dégrader les nanoparticules de PBCA.

Protocole expérimental

Après centrifugation et lyophilisation des particules, 40 mg de particules sèches sont mises en suspension dans 3 ml d'une solution d'HCl à pH 2. Les suspensions sont alors placées sous agitation orbitale à 250 tr/min et température ambiante pendant 20 heures. Puis, les suspensions sont centrifugées à 16 500 g et 15°C pendant 30 min. Les surnageants sont finalement prélevés, et les particules lyophilisées.

3.4.2. Désorption en présence de dodécyl sulfate de sodium

Les nanoparticules sèches issues de l'étape de lavage à l'eau sont mises en suspension dans une solution de SDS à pH 2 en respectant une concentration de 40 mg / 3 ml de solution.

Les concentrations en SDS varient entre 0 et 1% (w/w). Le protocole du paragraphe 3.4.1 a été utilisé pour isoler les surnageants. La quantité de polymère amphiphile désorbé a été déterminée par dosage du surnageant à l'antrone dans le cas des DexP₇ et à l'iode dans le cas des dérivés du POE. Ces méthodes ont été détaillées dans le paragraphe 3.3.1 de ce chapitre. Comme pour la détermination de la quantité de polymère adsorbé, cette méthode exige une grande précision. Afin de minimiser les erreurs, les volumes prélevés puis dilués sont calculés à partir de la masse précise des prélèvements effectués.

4. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EMULSIFICATION

Dans le cas de la polymérisation en miniémulsion, les temps d'homogénéisation et de sonication sont deux paramètres importants qui influencent la taille des particules. Pour une concentration en stabilisant et une quantité d'énergie fournies, ils peuvent permettre de minimiser la taille des particules. Dans notre cas, le BCA est très réactif et polymérise en présence de traces d'eau. La polymérisation anionique du monomère démarre donc dès la mise en contact des phases aqueuse et organique. Pour minimiser la quantité de monomère polymérisant pendant l'homogénéisation, le pH de la phase aqueuse est ajusté à 2 par ajout d'HCl. En effet, les acides forts inhibent la polymérisation anionique [18, 19]. De plus, l'étape d'homogénéisation est effectuée à 4°C. Cependant, ces précautions ne permettent pas de supprimer complètement la polymérisation anionique du BCA. Nous avons donc réalisé une série d'expériences afin d'optimiser les conditions d'émulsification de manière à minimiser simultanément la taille des particules et la quantité de monomère ayant réagi lors de cette étape.

4.1. Influence du temps d'homogénéisation

Pendant l'étape d'homogénéisation, les phases aqueuse et organique sont mélangées sous forte agitation magnétique pour former une émulsion primaire. Cette étape est cruciale, car elle facilite le processus de sonication, ce qui permet de réduire la taille finale et la polydispersité des nanogouttelettes formées. Cependant, dans notre cas, la probabilité d'amorcer la polymérisation anionique du BCA augmente avec le temps d'homogénéisation. Le but de cette série d'expériences était de trouver le temps d'homogénéisation optimum permettant de minimiser à la fois la taille des particules et la quantité de monomère ayant réagi à la fin de cette étape.

Protocole expérimental

200 mg de DexP₁₆ sont dissous dans 25 ml de solution aqueuse dont le pH est ajusté à 2 par une solution d'HCl (standard 1,0 N, Aldrich). Cette solution est maintenue sous agitation magnétique pendant 12 heures avant d'être utilisée. La phase organique contenant 0,5 ml de BCA (Loctite, Ireland), 25 µl de dodécane ($\geq 99\%$, Aldrich), et 5 mg d'azobisisobutyronitrile (AIBN, 98%, Acros), est préparée juste avant utilisation. Après ajout goutte à goutte de la phase organique dans la phase aqueuse, l'émulsion est maintenue à 4°C sous agitation magnétique à 1 000 tr/min pendant une durée comprise entre 1 et 20 min. Elle est ensuite soniquée (modèle Vibracell 600 W, Sonics & Materials Inc, Danbury, CT) à 50% d'amplitude et 5 W de la puissance dans un bain glacé pendant 2 min. Puis, la miniémulsion est maintenue sous agitation magnétique à 75°C pendant 20 heures.

La taille des particules a été déterminée par HPPS. Les résultats obtenus sont présentés sur la [figure III.6](#). La taille des particules de PBCA recouvertes par du DexP₁₆ augmente légèrement au cours de la polymérisation pour atteindre une valeur d'environ 165 nm en fin de réaction. Elle semble indépendante du temps d'homogénéisation. De plus, les polydispersités (PDI) sont toutes inférieures à 0,2. Le temps d'homogénéisation avant sonication semble donc n'avoir que peu d'influence sur la taille et la PDI des particules. Nous avons choisi de le fixer à 5 min. En effet, les résultats du suivi RMN ¹H de la polymérisation anionique du BCA ont montré que la conversion du monomère pendant cette durée est très faible (voir chapitre IV).

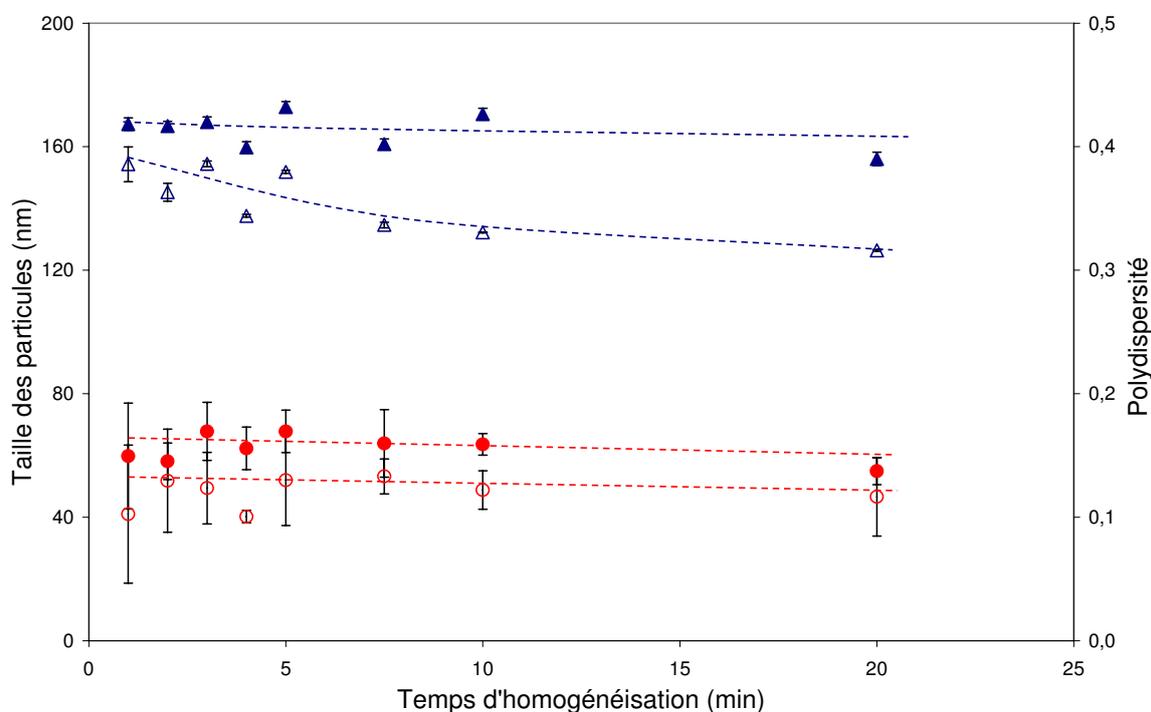


Figure III.6 : Variation de la taille et de la polydispersité des particules avant et après la polymérisation en fonction du temps d'homogénéisation. Taille avant la polymérisation (△), Taille après la polymérisation (▲) ; PDI avant la polymérisation (○) et PDI après la polymérisation (●).

4.2. Influence de la durée de sonication

Durant l'étape de sonication, une grande quantité d'énergie est fournie au système pour obtenir des tailles de particules largement inférieures au micron. Une bonne partie de cette énergie est dissipée sous forme de chaleur. Afin d'éviter une élévation brutale de la température de l'échantillon, ce dernier est refroidi au moyen d'un bain de glace.

Par ailleurs, l'interface générée lors de la sonication est très grande et les phases aqueuse et organique sont intimement mélangées. Ce contact favorise l'amorçage de la polymérisation anionique du BCA. Ainsi, la sonication permet de diminuer la taille des gouttelettes, mais favorise la polymérisation du monomère. Nous avons donc cherché à trouver une valeur optimale pour le temps de sonication. Le mode opératoire est identique à celui présenté dans le paragraphe 4.1. Le temps d'homogénéisation est fixé à 10 min et la durée de sonication varie entre 30 s et 30 min.

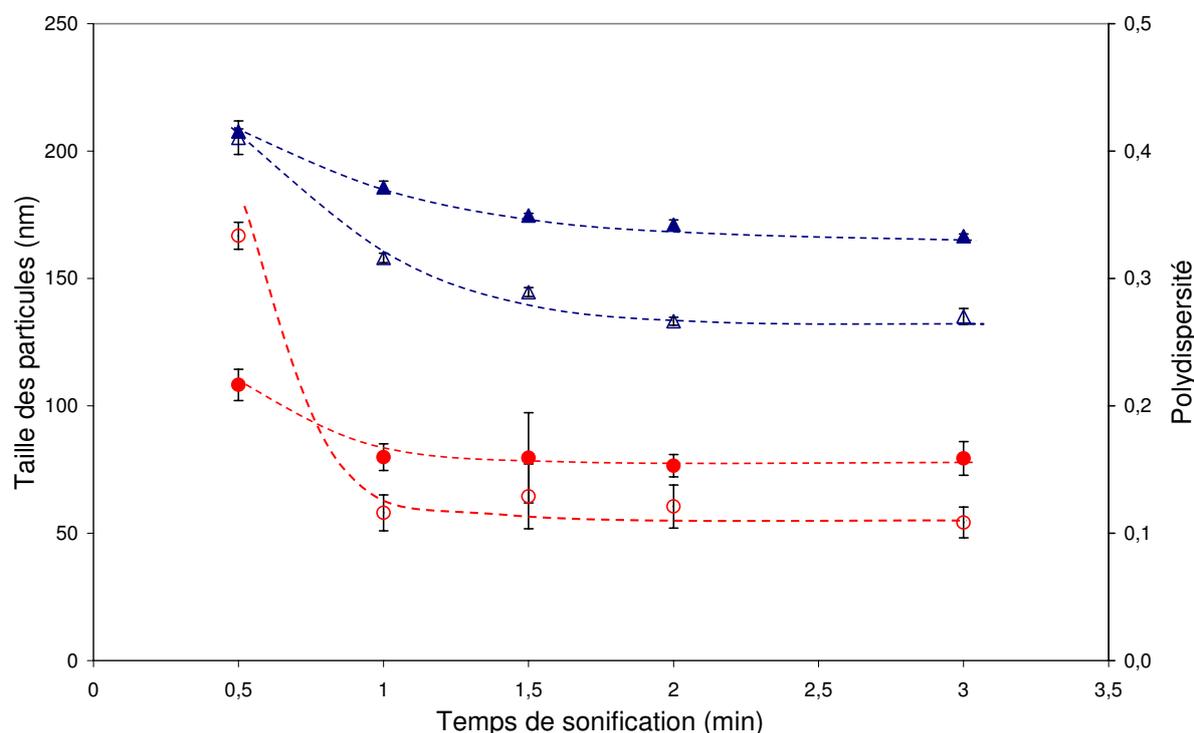


Figure III.7 : Variation de la taille et de la polydispersité des particules avant et après la polymérisation en fonction du temps de sonication. Taille avant la polymérisation (Δ), Taille après la polymérisation (\blacktriangle) ; PDI avant la polymérisation (\circ) et PDI après la polymérisation (\bullet).

Les résultats obtenus sont présentés sur la [figure III.7](#). La taille des particules diminue de 200 à 160 nm lorsque le temps de sonication passe de 30 s à 3 min. Une faible variation entre la taille avant et après polymérisation est observée. La PDI reste constante pour des temps de sonication supérieurs à 60 s. C'est pourquoi cette valeur a finalement été retenue dans la suite de l'étude.

Pour conclure, les quantités et les conditions choisies pour la suite des expériences sont résumées sur la [figure III.8](#).

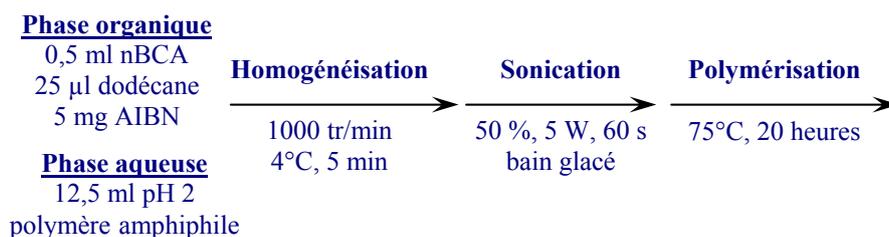


Figure II.8 : Quantités et conditions utilisées pour la polymérisation du BCA en miniémulsion.

5. RESULTATS DE CARACTERISATION DES NANOPARTICULES

5.1. Nanoparticules recouvertes par les dextrans phénoxy

Les nanoparticules de PBCA présentées dans ce paragraphe ont été synthétisées en présence de trois DexP_τ de taux de substitution croissants : DexP₁₁, DexP₁₆ et DexP₂₂. Leurs propriétés physico-chimiques ont été caractérisées en fonction de leur concentration en DexP_τ dans la phase aqueuse (16 à 32 g/l).

➤ Taille des nanoparticules

Après polymérisation, la taille des particules a été déterminée à l'aide de l'HPPS. Les suspensions sont diluées avec une solution d'HCl à pH 2, et maintenues au repos avant mesure pendant au moins 15 min afin que les suspensions soient homogènes. Les résultats obtenus sont présentés sur la [figure III.9](#).

La taille des particules est comprise entre 270 et 170 nm, lorsque la concentration en DexP_τ passe de 16 à 32 g/l. Les allures des courbes sont similaires pour les trois dérivés

DexP_τ. La taille des particules diminue lorsque la concentration en DexP_τ dans la phase aqueuse augmente pour atteindre un palier aux environs de 170 nm. Le taux de substitution du dextrane modifié semble avoir peu d'influence sur la taille de particules. Pour le DexP₁₁, nous observons toutefois que la taille obtenue à faible concentration en polymère amphiphile est plus élevée que pour le DexP₁₆ et le DexP₂₂. Ces résultats sont comparables à ceux observés dans le cas de la polymérisation en miniémulsion du styrène [20]. Lorsque le taux de modification est faible, les DexP_τ semblent insuffisamment tensioactifs pour stabiliser les miniémulsions pendant la polymérisation.

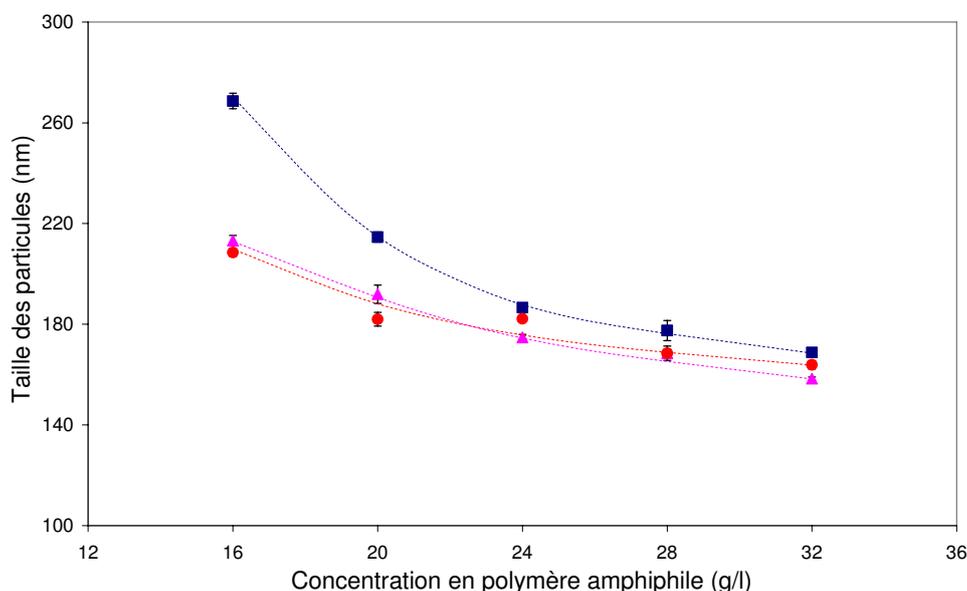


Figure III.9 : Taille des particules en fonction de la concentration en DexP_τ dans la phase aqueuse.

DexP₁₁ (■), DexP₁₆ (▲) et DexP₂₂ (●).

En comparant nos résultats à ceux trouvés dans la littérature pour des polymérisations en émulsion de BCA, nous constatons que les concentrations en DexP_τ nécessaires pour obtenir des particules de même taille (220 à 250 nm) sont plus importantes que dans le cas d'une émulsion stabilisée par DexT70 [21-24]. Cependant, les taux de solide obtenus par polymérisation en émulsion (1%) sont bien inférieurs au taux de solide que nous pouvons obtenir en miniémulsion (4%). Le rapport masse de polymère amphiphile sur masse de monomère est donc comparable dans les deux cas. Par ailleurs, il faut noter que la polydispersité de nos particules est toujours inférieure à 0,25. Sur la figure III.10, est présenté, à titre d'exemple, le cliché obtenu par MEB de particules de PBCA recouvertes par le DexP₁₆. Les nanoparticules obtenues pour une concentration initiale de DexP₁₆ de 32 g/l dans la phase aqueuse sont sphériques et relativement monodisperses.

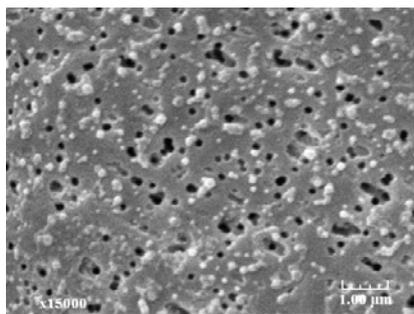


Figure III.10 : Cliché MEB de particules de PBCA (≈ 170 nm) obtenues pour une concentration initiale de DexP₁₆ dans la phase aqueuse de 32 g/l (.

➤ Epaisseur de la couche hydrophile

L'épaisseur de la couche hydrophile a été calculée à partir de la taille et des potentiels zêta des particules mesurées par Zêtasizer (Nano Z, Malvern) à force ionique croissante de 10^6 à 10^{-2} mol/l. Les résultats obtenus sont donnés sur la [figure III.11](#).

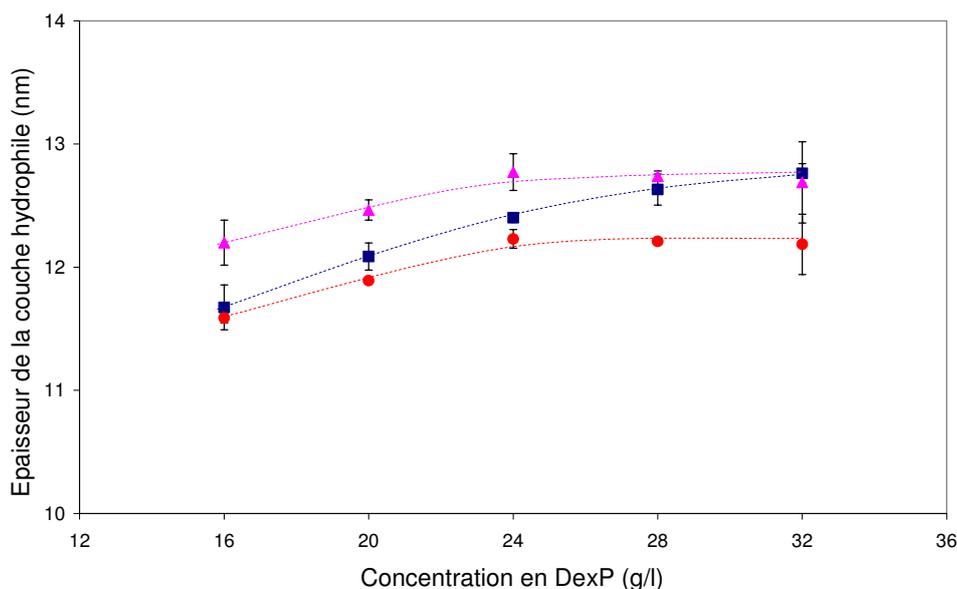


Figure III.11 : Epaisseur de la couche hydrophile en fonction de la concentration en DexP _{τ} dans la phase aqueuse. DexP₁₁ (■), DexP₁₆ (▲) et DexP₂₂ (●).

L'épaisseur de la couche hydrophile des nanoparticules de PBCA recouvertes par des dérivés de type DexP _{τ} est comprise entre 11 et 13 nm lorsque la concentration en DexP _{τ} varie entre 16 et 32 g/l. Au-delà de 20 g/l, l'épaisseur de la couche hydrophile atteint un palier. La valeur au plateau ne dépend pas du taux de substitution. Dans le cas de particules de PBCA recouvertes de DexT70, aucune épaisseur de couche n'a été calculée. Nos valeurs sont cependant comparables à celles mesurées dans le cas de nanoparticules de polystyrène

recouvertes de DexP₂ et de DexP₁₁ obtenues par adsorption du polymère amphiphile sur des particules préformées [25]. Ces valeurs sont toutefois plus élevées que celles obtenues pour des particules de polystyrène synthétisées par polymérisation en miniémulsion en présence des DexP₁₅, DexP₂₂ et DexP₂₈ [26].

L'indépendance de l'épaisseur vis à du taux de substitution est surprenante. Dans le cas de nanoparticules de poly(acide lactique) (PLA) obtenues par émulsion/évaporation de solvant, l'épaisseur de la couche hydrophile de DexP_τ diminue avec le taux de substitution lorsque que celui-ci est compris entre 7 et 15% [16]. En effet, le nombre de points d'ancrage à la surface augmente lorsque le taux de substitution augmente, ce qui diminue la longueur des boucles hydrophiles à la surface et donc l'épaisseur de la couche hydrophile.

➤ Taux de recouvrement

Le taux de recouvrement des particules a été mesuré de façon indirecte par dosage du DexP_τ résiduel dans la phase aqueuse après polymérisation. La figure III.12 présente les résultats obtenus.

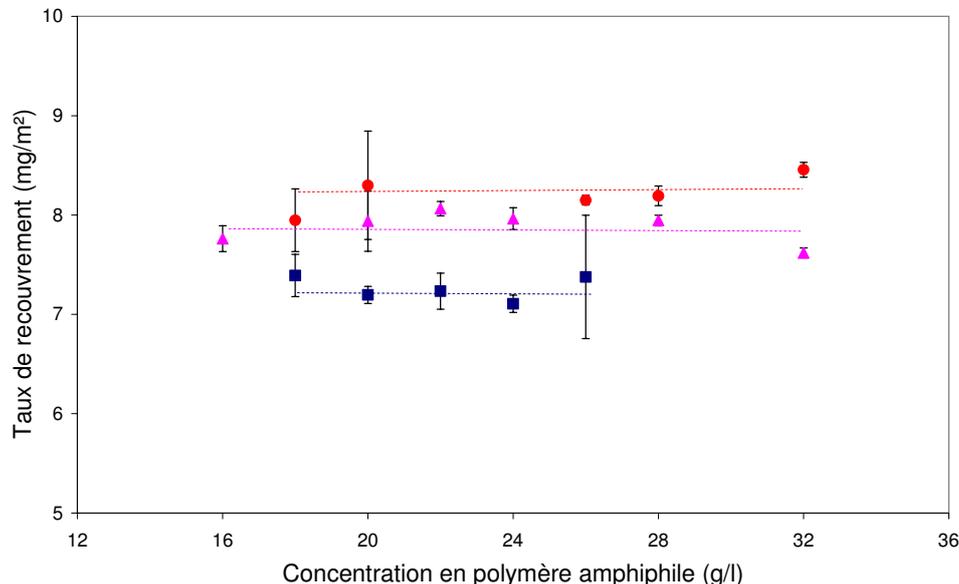


Figure III.12 : Taux de recouvrement en fonction de la concentration en DexP_τ dans la phase aqueuse.

DexP₁₁ (■), DexP₁₆ (▲) et DexP₂₂ (●).

Les résultats montrent que le taux de recouvrement ne varie pas de façon significative en fonction de la concentration en DexP_τ. Il dépend également assez peu du taux de substitution. Les taux de recouvrement sont d'environ $7,3 \pm 0,6$ mg/m² pour le DexP₁₁, $7,9 \pm 0,3$

mg/m² pour le DexP₁₆ et 8,2±0,5 mg/m² pour le DexP₂₂. Ces valeurs sont plus élevées que celles que l'on peut trouver dans la littérature. Par exemple, dans le cas de nanoparticules de PLA recouvertes de DexP₁₅ le taux de recouvrement est de 3 mg/m² [27], et de 2 mg/m² pour des nanoparticules du polystyrène recouvertes de DexP₂ [25, 28]. Nous pouvons supposer que l'affinité de la couche hydrophile vis-à-vis du cœur de la nanoparticule est certainement plus élevée dans notre cas. En effet, les fonctions OH résiduelles le long de la chaîne du dextrane peuvent amorcer la polymérisation anionique du monomère [29], créant ainsi des greffons PBCA. La présence de ces greffons renforce les interactions cœur-couronne.

Par ailleurs, les aires occupées à la surface des particules par une molécule de DexP_τ peuvent être calculées d'après l'équation II. 23. Elles sont de 7,4 nm² pour le DexP₁₁, 6,8 nm² pour le DexP₁₆ et 6,5 nm² pour le DexP₂₂. Ces valeurs sont plus faibles que celles calculées à partir des tensions interfaciales eau/dodécane dans le chapitre II paragraphe 4.3.2 (15,7 nm² pour le DexP₁₁, 20,3 nm² pour le DexP₁₆ et 23,5 nm² pour le DexP₂₂). Ceci implique que seule une partie des chaînes hydrophobes portées par le DexP_τ s'adsorbent à la surface des particules. De plus, les aires diminuent lorsque le taux de substitution augmente, contrairement à ce qui a été observé dans le chapitre II paragraphe 4.3.2.

➤ Stabilité de la couche hydrophile

La stabilité de la couche hydrophile des nanoparticules obtenues en présence de concentration croissante de DexP₁₁, DexP₁₆ et DexP₂₂ a été déterminée dans des solutions SDS à pH 2 dont la concentration est comprise entre 0 et 1% (w/w). Nous présentons, à titre d'exemple, les pourcentages de DexP₁₆ désorbé, par rapport à la quantité adsorbée avant le traitement, en fonction de la concentration en SDS. La concentration en DexP₁₆ présent initialement dans la phase aqueuse est comprise entre 16 et 32 g/l (Figure III.13).

Quelle que soit la concentration en DexP₁₆ présent initialement dans la phase aqueuse, les pourcentages de DexP₁₆ désorbé sont toujours inférieurs à 20% même pour de fortes concentrations en SDS. Ils augmentent toutefois légèrement lorsque la concentration en SDS augmente entre 0 et 1%.

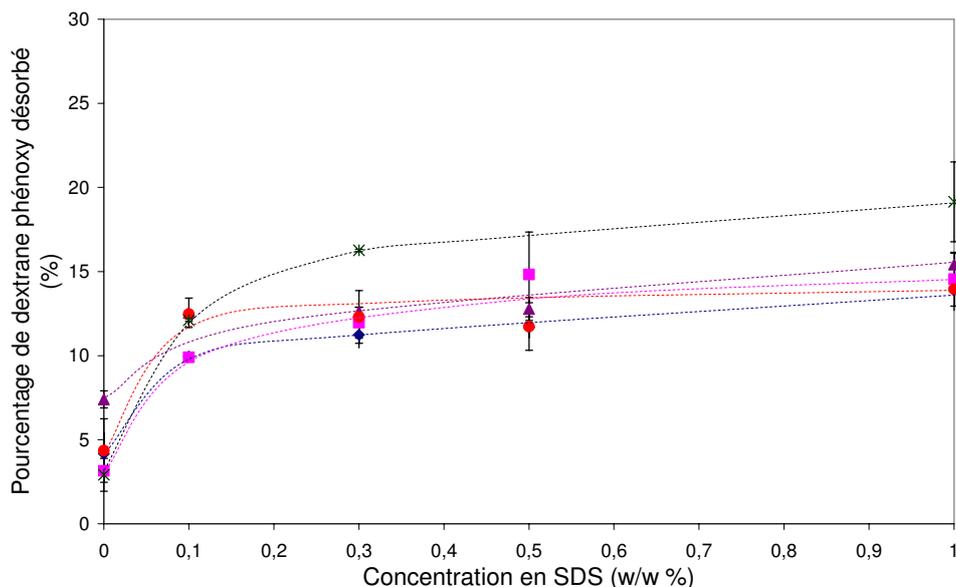


Figure III.13 : Pourcentages de DexP₁₆ désorbé, par rapport à la quantité adsorbée avant le traitement, en fonction de la concentration en SDS. Les concentrations en DexP₁₆ présent initialement dans la phase aqueuse sont de 18 g/l (◆), 20 g/l (■), 24 g/l (▲), 28 g/l (●) et 32g/l (*).

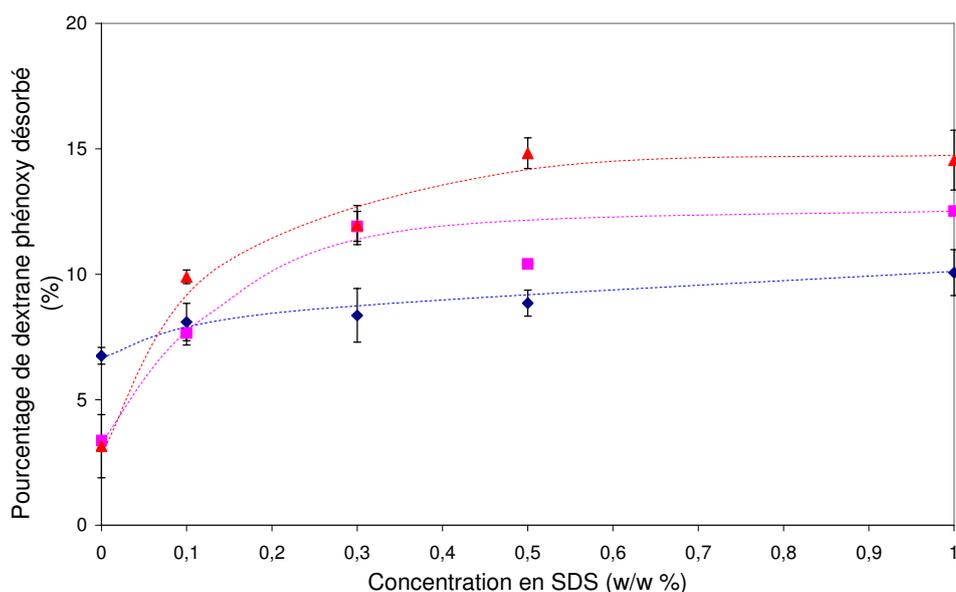


Figure III.14 : Pourcentages des DexP_τ désorbé, par rapport à leur quantité adsorbée avant le traitement, en fonction de la concentration en SDS. Les particules ont été obtenues en présence de DexP₁₁ (◆), DexP₁₆ (▲) et DexP₂₂ (●) à une concentration initiale dans la phase aqueuse de 20 g/l.

La figure III.14 présente les pourcentages de dérivés amphiphiles désorbés, par rapport à leur quantité adsorbée avant le traitement, en fonction de la concentration en SDS pour des particules obtenues en présence des trois DexP_τ à la concentration initiale dans la phase aqueuse de 20 g/l. Les résultats sont comparables pour les trois types de DexP_τ utilisés. Le taux de substitution semble n'avoir que peu d'influence sur la stabilité de la couche

hydrophile. La quantité désorbée augmente avec la concentration en SDS dans la phase aqueuse mais reste toutefois inférieure à 20%. Ces valeurs sont beaucoup plus faibles que celles obtenues pour des nanoparticules de PLA recouvertes par des DexP_τ (pourcentage de DexP_τ désorbé supérieur à 70%) [16]. Ces résultats prouvent que la couche hydrophile du DexP_τ est très stable même en milieu détergent. Cette grande stabilité peut être liée à la présence de greffons de PBCA, formés par polymérisation du monomère amorcée par les fonctions OH du dextrane lors de la synthèse des nanoparticules. Ces greffons assurent la compatibilisation entre le cœur et la couronne.

5.2. Nanoparticules recouvertes par des dérivés du POE

Les nanoparticules de PBCA présentées dans ce paragraphe ont été synthétisées en présence de dérivés du POE : Brij[®]78, Brij[®]700, et Tween[®]80 selon les conditions décrites dans le paragraphe 4 de ce chapitre. Leurs propriétés physico-chimiques sont étudiées en fonction de la concentration en dérivé du POE dans la phase aqueuse (1 et 16 g/l).

➤ Taille des nanoparticules

La taille des particules recouvertes par des dérivés du POE a été déterminée de la même façon que pour les particules obtenues en présence des DexP_τ. Les résultats sont présentés sur la [figure III.15](#).

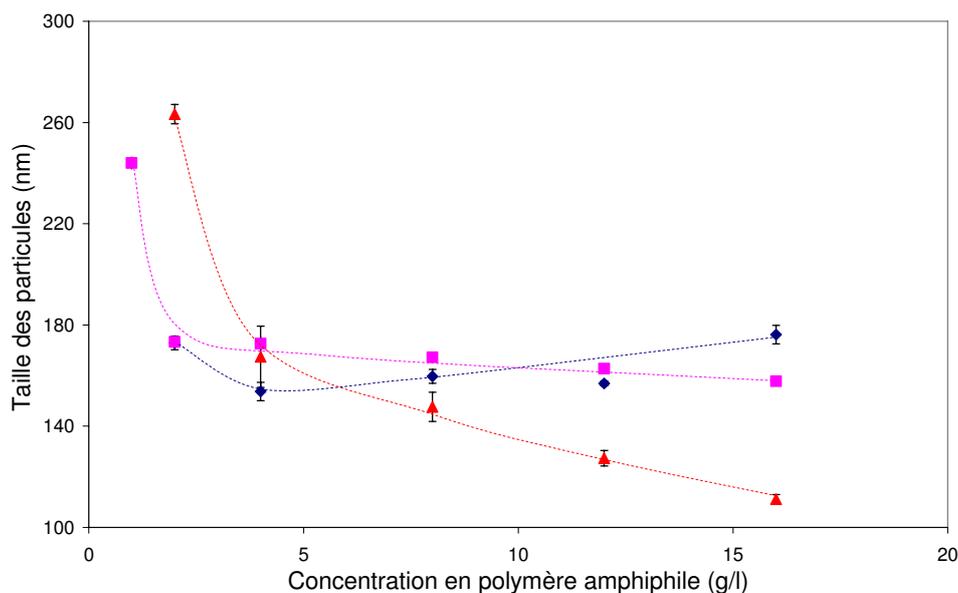


Figure III.15 : Taille des particules en fonction de la concentration en dérivé du POE dans la phase aqueuse.

Brij[®]78 (◆), Brij[®]700 (■) et Tween[®]80 (▲).

La taille des particules obtenues en présence de dérivés du POE est du même ordre de grandeur qu'en présence des DexP_τ. Cependant, les concentrations en dérivé du POE nécessaires pour atteindre le palier d'équilibre sont nettement plus faibles. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les caractéristiques des polymères utilisés. En effet, dans le cas des dérivés du POE, les concentrations critiques (CC) nécessaires à l'obtention d'une tension interfaciale constante et minimum sont plus faibles que celles des DexP_τ (voir le chapitre II paragraphe 4.3.2).

Pour le Brij[®]78, la taille des particules diminue jusqu'à 150 nm pour une concentration voisine de 4 g/l. Au-delà de cette concentration, elle augmente à nouveau. Cette augmentation correspond vraisemblablement à la formation de multicouches de POE à la surface des particules comme cela a déjà été rapporté [30]. Dans le cas du Brij[®]700, la taille des particules diminue avec l'augmentation de la concentration en dérivé du Brij[®]700 pour atteindre un plateau vers 160 nm. Pour le Tween[®]80, ce plateau se situe aux environs de 100 nm. Ce tensioactif a le taux de recouvrement le plus faible des trois dérivés (voir chapitre II paragraphe 4.3.2). A concentration égale, il est donc capable de stabiliser une plus grande quantité d'interface et donc de générer des particules plus petites. Par ailleurs, les tailles de particules obtenues sont beaucoup plus faibles que celles des particules de PBCA préparées par polymérisation en émulsion à pH 2 en présence du Tween 80 (220 à 260 nm) [31]. La technique de la polymérisation en miniémulsion nous permet donc d'obtenir des particules de taille plus petite.

Sur la [figure III.16](#), sont présentés les clichés MEB de particules de PBCA recouvertes par le Brij[®]78. Les concentrations en Brij[®]78 sont de 2 et 16 g/l. Nous observons que les particules sont sphériques, et que la taille et la PDI sont plus faibles pour la concentration la plus élevée, soit 16 g/l.

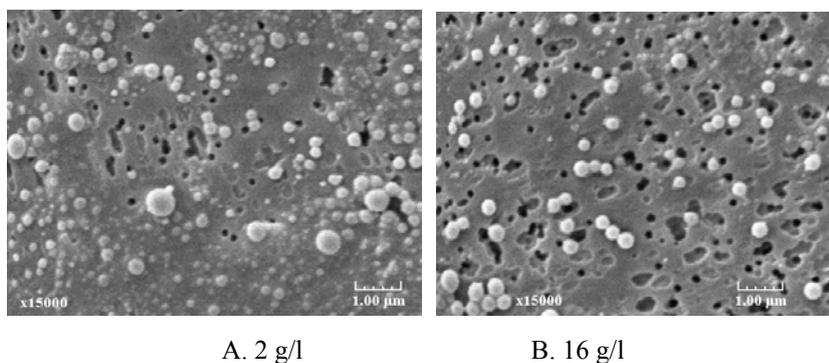


Figure III.16 : Clichés MEB de particules de PBCA recouvertes de Brij[®]78.

➤ Epaisseur de la couche hydrophile

L'épaisseur de la couche hydrophile a été déterminée de la même manière que pour les DexP_τ. Les résultats obtenus sont présentés sur la [figure III.17](#).

Dans le cas des dérivés de type Brij, l'épaisseur de la couche hydrophile augmente jusqu'à atteindre un plateau (environ 10 nm pour le Brij[®]78 et 11 nm pour le Brij[®]700) pour des concentrations supérieures à 4 g/l. Dans le cas du Tween[®]80, le plateau (environ 8 nm) est atteint dès que la concentration en tensioactif est supérieure à 2 g/l.

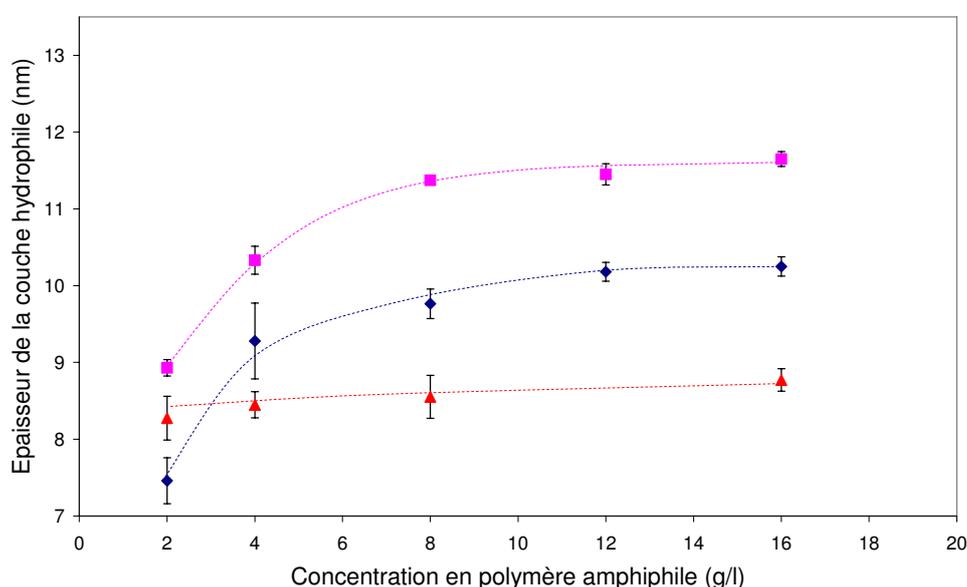


Figure III.17 : Epaisseur de la couche hydrophile en fonction de la concentration en dérivé du POE dans la phase aqueuse. Brij[®]78 (◆), Brij[®]700 (■) et Tween[®]80 (▲).

La différence d'épaisseur au plateau est probablement liée à la structure des dérivés du POE utilisés. En effet, la longueur de la partie hydrophile de ces tensioactifs est très variable : Brij[®]700 > Brij[®]78 > Tween[®]80. D'ailleurs, la taille des micelles de tensioactif de ces composés dépend également de leur structure. Nous avons vérifié par HPPS que le diamètre est de 9 nm pour le Tween[®]80, de 11 nm pour le Brij[®]78 et de 15 nm pour le Brij[®]700. Ainsi, l'épaisseur de la couche hydrophile augmente avec la longueur de la partie POE ([Figure III.18](#)). Les résultats obtenus sont tout à fait cohérents avec la structure des polymères amphiphiles utilisés.

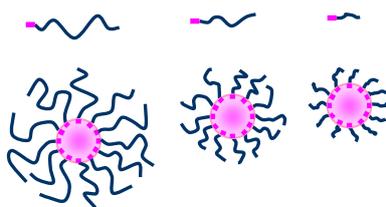


Figure III.18 : Schéma de l'influence de la longueur de la chaîne hydrophile sur l'épaisseur de la couche hydrophile.

➤ Taux de recouvrement

Le taux de recouvrement des nanoparticules a été calculé de la même manière que pour les DexP_τ. La figure III.19 présente les résultats obtenus.

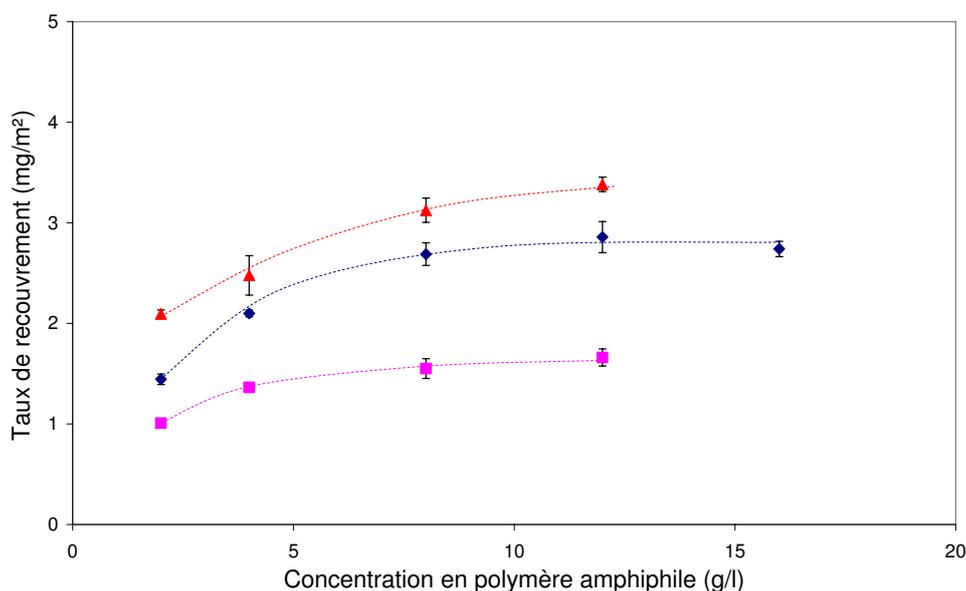


Figure III.19 : Taux de recouvrement en fonction de la concentration en dérivé du POE dans la phase aqueuse. Brij®78 (◆), Brij®700 (■) et Tween®80 (▲).

Lorsque la concentration en dérivés du POE passe de 2 à 12 ou 15 g/l, le taux de recouvrement augmente pour atteindre une valeur au plateau qui est d'environ 3,4 mg/m² pour le Tween®80, 2,8 mg/m² pour le Brij®78 et 1,6 mg/m² pour le Brij®700. Le plateau est atteint pour des concentrations supérieures à 8 g/l. Les résultats montrent que le taux de recouvrement diminue quand la longueur de la chaîne hydrophile augmente. En effet, les chaînes déjà adsorbées freinent l'approche des tensioactifs encore en solution par gêne stérique, cette dernière étant d'autant plus forte que les chaînes hydrophiles sont longues. Par ailleurs, les valeurs obtenues sont beaucoup plus faibles que celles observées dans le cas des DexP_τ. Ceci est cohérent avec les valeurs trouvées dans le chapitre II par tensiométrie. En

effet, les taux de recouvrement à l'interface eau/dodécane des dérivés du POE sont plus faibles que dans le cas des dérivés DexP_τ.

Les aires occupées par une molécule de dérivés du POE sont de 0,68 nm² pour le Brij[®]78 et 0,5 nm² pour le Tween[®]80. Elles sont plus faibles que celles calculées à l'interface eau/dodécane et mentionnées dans le chapitre II paragraphe 4.3.2 (0,95 nm² pour le Brij[®]78 et 2 nm² pour le Tween[®]80). Ceci peut être expliqué par la formation de multicouche de dérivés du POE [30]. Cependant, pour le Brij[®]700, cette valeur (4,8 nm²) est plus élevée que celle déterminée à partir des tensions interfaciales eau/dodécane (2,2 nm²). La surface des particules n'est donc pas saturée dans le cas du Brij[®]700. Ce dernier adopte probablement une conformation intermédiaire entre la forme champignon et la forme en brosse lui permettant de stabiliser la surface des particules.

Sur la [figure III.20](#), est présentée, l'évolution de l'épaisseur de la couche hydrophile en fonction du taux de recouvrement.

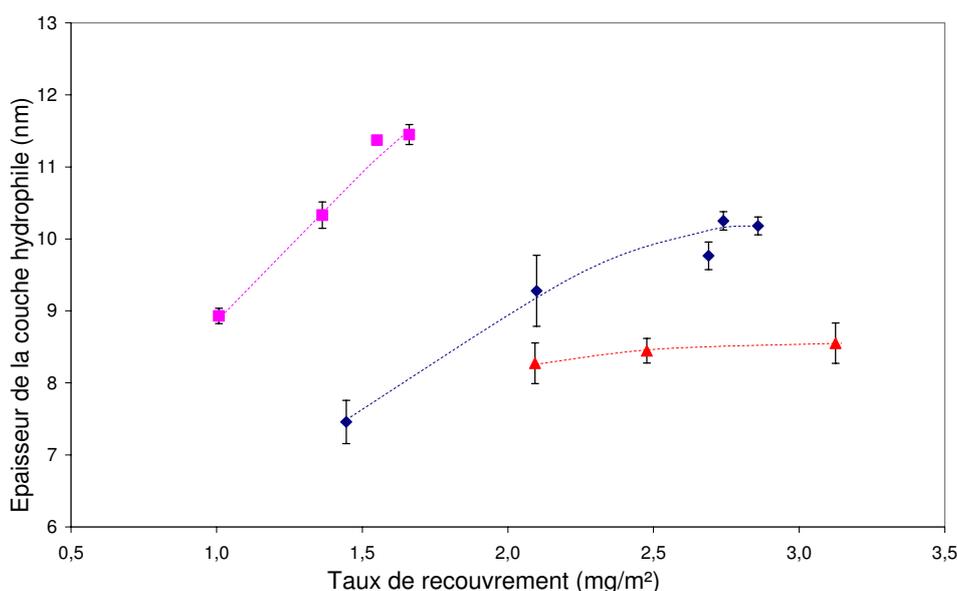


Figure III.20 : Epaisseur de la couche hydrophile en fonction du taux de recouvrement.

Brij[®]78 (◆), Brij[®]700 (■) et Tween[®]80 (▲).

Dans le cas du Brij, l'épaisseur augmente avec le taux de recouvrement. A faible taux de recouvrement, les molécules tensioactives s'adsorbent sous une conformation dite champignons ([Figure III.21](#)). Lorsque le taux de recouvrement augmente, la chaîne hydrophile s'étire en solution pour minimiser la gêne occasionnée par ses voisines. Elle

adopte alors une conformation totalement étendue dite en brosse. L'épaisseur de la couche hydrophile atteint alors sa valeur maximale.

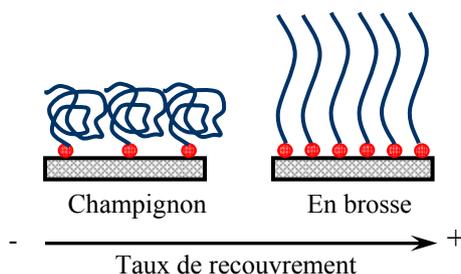


Figure III.21 : Conformation des chaînes hydrophiles en solution en fonction du taux de recouvrement.

Dans le cas du Tween[®]80, les chaînes hydrophiles sont courtes, et donc moins flexibles. La variation de l'épaisseur en fonction du taux de recouvrement est moins visible.

➤ Stabilité de la couche hydrophile

Les pourcentages de Brij[®]78 désorbé, par rapport à la quantité adsorbée avant le traitement, en fonction de la concentration en SDS sont présentés dans la [figure III.22](#).

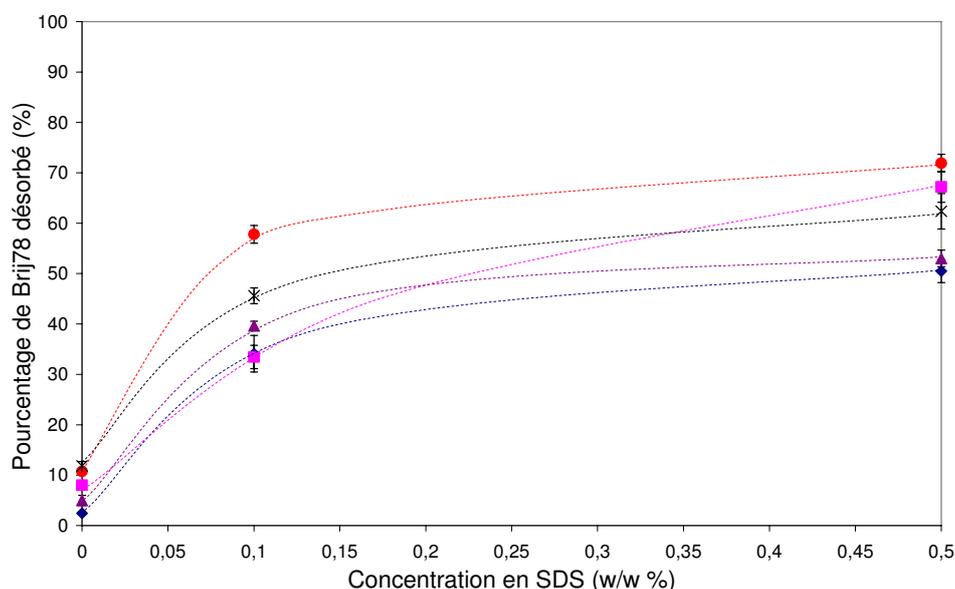


Figure III.22 : Pourcentage du Brij[®]78 désorbé, par rapport à la quantité adsorbée avant le traitement, en fonction de la concentration en SDS. Les concentrations en Brij[®]78 présent initialement dans la phase aqueuse sont de 2 g/l (◆), 4 g/l (■), 8 g/l (▲), 12 g/l (●) et 16 g/l (✱).

Les particules étudiées ont été obtenues en présence de Brij[®]78 à des concentrations variant entre 2 et 16 g/l. Il apparaît que la concentration initiale en Brij[®]78 dans la phase aqueuse a peu d'influence sur le pourcentage désorbé. Par contre, la quantité désorbée

augmente fortement avec la concentration en SDS pour atteindre des valeurs bien supérieures à 50%. En effet, la molécule de SDS est capable de déplacer les chaînes de polymère par adsorption compétitive et/ou en déstructurant la surface du polymère en raison de sa forte affinité pour la surface hydrophobe [32]. Les allures des courbes obtenues pour des particules synthétisées en présence du Brij[®]700 et du Tween[®]80 sont similaires.

La figure III.23 présente les pourcentages de quantité désorbée, par rapport à leur quantité adsorbée avant le traitement, pour des particules synthétisées en présence des trois dérivés du POE à une concentration initiale dans la phase aqueuse de 12 g/l. Les pourcentages de polymère désorbé varient entre 2 et 80% pour les trois dérivés. La couche hydrophile obtenue dans le cas du Tween[®]80 est plus stable puisque le pourcentage désorbé n'est que de 40%. Cette valeur reste cependant très élevée par rapport aux DexP_τ. Ceci peut être expliqué par le fait que les dérivés du POE ne sont adsorbés que par un seul point d'ancrage à la surface des particules.

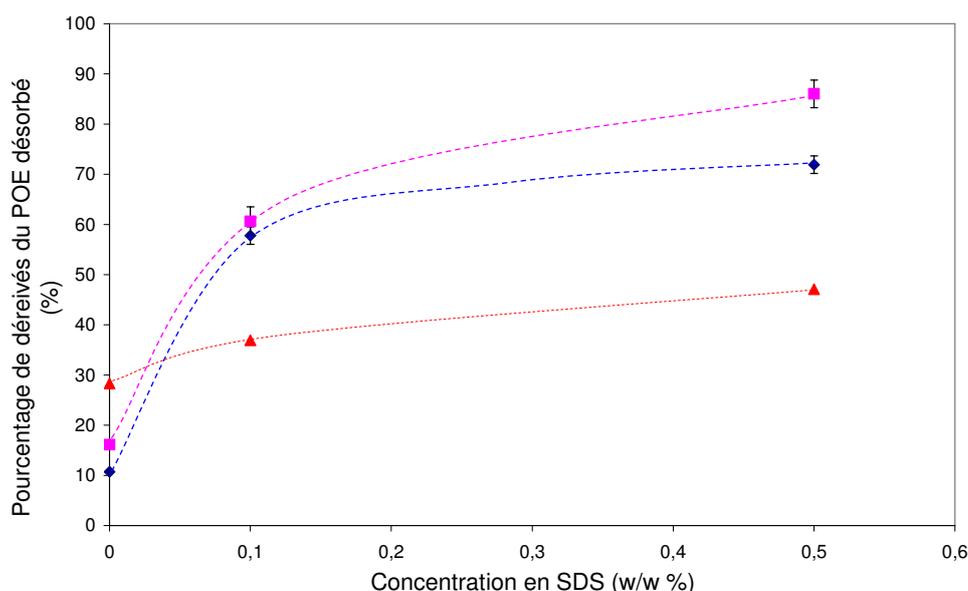


Figure III.23 : Pourcentages des dérivés du POE désorbés, par rapport à leur quantité adsorbée avant le traitement, en fonction de la concentration en SDS. Les particules ont été obtenues en présence de Brij78 (◆), Brij700 (■) et Tween80 (▲) à une concentration de 12 g/l.

6. CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous avons décrit la préparation de nanoparticules de PBCA recouvertes d'une couche hydrophile, par polymérisation en miniémulsion en présence de

différents dérivés amphiphiles. Nous avons fait varier la nature du polymère amphiphile et sa concentration dans la phase aqueuse.

Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions de préparation des miniémulsions pour minimiser simultanément la polymérisation anionique lors de l'étape d'émulsification et la taille de particules. Nous avons ainsi fixé la durée d'homogénéisation à 5 min et celle de sonication à 60 s. Ces conditions nous ont permis d'émulsifier le monomère dans une phase aqueuse contenant différents polymères amphiphiles, dérivés soit du dextrane, soit du POE.

Les propriétés physico-chimiques des particules obtenues telles que la taille des particules, l'épaisseur de la couche hydrophile, le taux de recouvrement en polymère amphiphile ont été ensuite étudiées. Quel que soit le polymère, la taille des nanoparticules de PACA obtenues est comprise entre 100 et 200 nm avec une distribution de taille étroite. La taille des particules peut être ajustée en jouant sur la concentration en polymère amphiphile.

Dans le cas des DexP_τ, nous observons que les propriétés physico-chimiques de la couche hydrophile dépendent assez peu du taux de substitution du dextrane. Cependant, l'épaisseur et le taux de recouvrement de la couche hydrophile sont plus élevés que les valeurs reportées dans la littérature pour des particules analogues.

Dans le cas des dérivés du POE, les propriétés physico-chimiques de la couche hydrophile dépendent au contraire fortement de leur structure. En effet, ces dérivés adoptent une conformation en brosse à la surface des particules. L'adsorption physique des dérivés du POE se produit par un seul point d'ancrage sur la surface des particules. L'épaisseur de la couche hydrophile augmente avec la longueur de la chaîne hydrophile. De plus, le taux de recouvrement diminue lorsque la longueur de la chaîne hydrophile augmente. En effet, les molécules déjà adsorbées à la surface vont repousser par gêne stérique celles restant encore en solution.

La stabilité de la couche hydrophile est très variable d'une famille de polymère amphiphile à l'autre. Si les dérivés du POE se désorbent en grande partie sous l'effet du SDS, les dérivés de type DexP_τ sont beaucoup plus solidement ancrés à la surface. En effet, le nombre de points d'ancrage par molécule amphiphile est beaucoup plus grand dans le cas des

dextranes greffés en peigne. De plus, les fonctions OH résiduelles le long de la chaîne polysaccharide peuvent amorcer la polymérisation anionique du BCA, créant ainsi des greffons PBCA. Ces greffons augmentent la compatibilité entre le cœur et la couronne des nanoparticules.

7. REFERENCES

1. C.D. Anderson, E.D. Sudol, and M.S. El-aasser. «Elucidation of the miniemulsion stabilization mechanism and polymerization kinetics». *Journal of Applied Polymer Science*, **2003**, 90(14): p.3987-3993.
2. K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks, and M. Antonietti. «Formulation and stability mechanisms of polymerizable miniemulsions». *Macromolecules*, **1999**, 32(16): p.5222-5228.
3. P.J. Blythe, A. Klein, J.A. Phillips, E.D. Sudol, and M.S. El-Aasser. «Miniemulsion polymerization of styrene using the oil-soluble initiator AMBN». *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **1999**, 37(23): p.4449-4457.
4. C.M. Miller, E.D. Sudol, C.A. Silebi, and M.S. El-Aasser. «Miniemulsion polymerization of styrene: evolution of the particle size distribution». *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **1995**, 33(8): p.1391-1408.
5. A.J. Webster and M.E. Cates. «Stabilization of emulsions by trapped species». *Langmuir*, **1998**, 14(8): p.2068 -2079.
6. K. Landfester, N. Bechthold, S. Förster, and M. Antonietti. «Evidence for the preservation of the particle identity in miniemulsion polymerization». *Macromolecular Rapid Communications*, **1999**, 20(2): p.81-84.
7. F. Tiarks, K. Landfester, and M. Antonietti. «One-step preparation of polyurethane dispersions by miniemulsion polyaddition». *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2001**, 39(14): p.2520-2524.
8. M. Barrère, F. Ganachaud, D. Bendejacq, M.A. Dourges, C. Maitre, and P. Hémerly. «Anionic polymerization of octamethylcyclotetrasiloxane in miniemulsion. II. Molar mass analyses and mechanism scheme». *Polymer*, **2001**, 42: p.7239-7246.
9. M. Barrère, C. Maitre, M.A. Dourges, and P. Hémerly. «Anionic polymerization of 1,3,5-Tris(trifluoropropylmethyl)cyclotrisiloxane (F3) in miniemulsion». *Macromolecules*, **2001**, 34: p.7276-7280.
10. F. Tiarks, K. Landfester, and M. Antonietti. «Preparation of polymeric nanocapsules by miniemulsion polymerization ». *Langmuir*, **2001**, 17(3): p.908-918.
11. J.W. Gooch, H. Dong, and F.J. Schork. «Waterborne oil-modified polyurethane coatings via hybrid miniemulsion polymerization». *Journal of Applied Polymer Science*, **2000**, 76(1): p.105-114.
12. B. zuPutlitz, H.P. Hentze, K. Landfester, and M. Antonietti. «New cationic surfactants with sulfonium headgroups ». *Langmuir*, **2000**, 16(7): p.3214-3220.
13. S.R. Deshiikan and K.D. Papadopoulos. «Modified Booth equation for the calculation of zeta potential». *Colloid and Polymer Science*, **1998**, 276(2): p.117-124.
14. W.G. Eversole and W.W. Boardman. «The effect of electrostatic forces on electrokinetic potentials». *Journal of Chemical Physics*, **1941**, 9(11): p.798-801.
15. T.A. Scott and E.H. Melvin. «Determination of dextran with anthrone». *Analytical Chemistry*, **1953**, 25: p.1656-1661.
16. C. Rouzes. «Nanosphères à coeur de poly(acide lactique) et couronne de dextrane : élaboration, propriétés et applications biomédicales». Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, **2001**. p.186.
17. B. Baleux and G. Champetier. «Chimie analytique - Dosage colorimétrique d'agent de surface non ioniques polyoxyéthylène à l'aide d'une solution iode-iodurée.». *C.R. Acad. Sc. Paris, série C*, **1972**, 274: p.1617-1620.

18. J. Kreuter. «Nanoparticle-based drug delivery systems». *Journal of Controlled Release*, **1991**, 16(1-2): p.169-176.
19. C. Vauthier, P. Couvreur, and C. Bubernet. «Poly(alkylcyanoacrylate)». *Surfactant Science Series*, ed. A. Elaissari. Marcel Dekker. **2003**, Vol.116 (Colloidal biomolecules, biomaterials, and biomedical applications). p.349-370.
20. E. Rotureau, E. Marie, M. Leonard, E. Dellacherie, T.A. Camesano, and A. Durand. «From polymeric surfactants to colloidal systems (2): Preparation of colloidal dispersions». *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2006**, 288(1-3): p.62-70.
21. J.C. Olivier, C. Vauthier, M. Taverna, D. Ferrier, and P. Couvreur. «Preparation and characterization of biodegradable poly(isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles with the surface modified by the adsorption of proteins». *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **1995**, 4(6): p.349-356.
22. Y. Nakada, E. Fattal, M. Foulquier, and P. Couvreur. «Pharmacokinetics and biodistribution of oligonucleotide adsorbed onto poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration in mice». *Pharmaceutical Research*, **1996**, 13(1): p.38-43.
23. R.N. Alyaudtin, A. Reichel, R. Lobenberg, P. Ränge, J. Kreuter, and D.J. Begley. «Interaction of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles with the blood-brain barrier in vivo and in vitro». *Journal of Drug Targeting*, **2001**, 9(3): p.209-221.
24. N. Behan, C. O'Sullivan, and C. Birkinshaw. «Synthesis and in-vitro drug release of insulin-loaded poly(*n*-butyl cyanoacrylate) nanoparticles». *Macromolecular Bioscience*, **2002**, 2(7): p.336-340.
25. A. De Sousa Delgado, M. Leonard, and E. Dellacherie. «Surface modification of polystyrene nanoparticles using dextrans and dextran-POE copolymers: polymer adsorption and colloidal characterization». *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **2000**, 11(12): p.1395-1410.
26. A. Durand, 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.
27. C. Rouzes, 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.
28. C. Fournier, M. Leonard, I. LeCoq-Leonard, and E. Dellacherie. «Coating polystyrene particles by adsorption of hydrophobically modified dextran». *Langmuir*, **1995**, 11(7): p.2344 - 2347.
29. N. Behan, C. Birkinshaw, and N. Clarke. «Poly *n*-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerization and particle formation». *Biomaterials*, **2001**, 22(11): p.1335-1344.
30. S.J. Douglas, L. Illum, and S.S. Davis. «Particle size and size distribution of poly(butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. II. Influence of stabilizers». *Journal of Colloid and Interface Science*, **1985**, 103(1): p.154-163.
31. A. Ambruosi, S. Gelperina, A. Khalansky, S. Tanski, A. Theisen, and J. Kreuter. «Influence of surfactants, polymer and doxorubicin loading on the anti-tumour effect of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in a rat glioma model». *Journal of Microencapsulation*, **2006**, 23(5): p.582-592.
32. W. Brown and J. Zhao. «Adsorption of sodium dodecyl sulfate on polystyrene latex particles using dynamic light scattering and zeta potential measurements». *Macromolecules*, **1993**, 26(11): p.2711-2715.

Chapitre IV

Cinétique de polymérisation du *n*-butyl cyanoacrylate en émulsion et en miniémulsion

1. INTRODUCTION

Les travaux présentés dans le chapitre III nous ont permis de mieux comprendre l'influence de divers paramètres, notamment de la nature et de la concentration du polymère amphiphile sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules de poly(*n*-butyl cyanoacrylate) (PBCA). Nous sommes ainsi en mesure de contrôler la taille des nanoparticules, l'épaisseur de la couche hydrophile et le taux de recouvrement en polymère amphiphile. Nous souhaitons maintenant définir les conditions pour maîtriser les propriétés du cœur des nanoparticules.

Le PBCA peut être obtenu par deux voies : la polymérisation anionique, amorcée par les ions OH^- , et la polymérisation radicalaire du *n*-butyl cyanoacrylate (BCA). Selon le mode de polymérisation, les PBCA obtenus ont des masses molaires différentes. La polymérisation radicalaire favorise les fortes masses molaires contrairement à la polymérisation anionique. De plus, la cinétique de dégradation par un processus de dépolymérisation, catalysée par les ions OH^- , des polymères synthétisés par polymérisation radicalaire est plus lente que celui synthétisé par voie anionique. Or, deux des mécanismes les plus importants de la libération d'un principe actif, encapsulé au sein d'une matrice polymère, sont la diffusion du principe actif au sein de la matrice et la dégradation de cette dernière. Ceci implique que la cinétique de libération du principe actif peut probablement être contrôlée par la masse molaire du cœur des nanoparticules et le mode de polymérisation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons cherché à synthétiser des PBCA de masses molaires différentes. Pour cela, une étude approfondie de la cinétique de polymérisation du BCA en miniémulsion dans différentes conditions s'est révélée indispensable.

Dans ce chapitre, des nanoparticules de PBCA ont dans un premier temps été synthétisées par polymérisation en miniémulsion en présence de Brij[®]78. Différentes voies de polymérisation ont été étudiées : polymérisation anionique en émulsion et en miniémulsion, polymérisation radicalaire en miniémulsion. Le pH du milieu a également été ajusté à 1, 1,5, 2 et 3, afin de moduler la cinétique de la polymérisation anionique. La conversion du monomère a été suivie par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H) tandis que l'évolution des masses molaires des polymères a été étudiée par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser (SEC-MALLS).

Ensuite, nous avons encapsulé une molécule modèle, le pyrène, dans des nanoparticules dont le cœur est constitué de PBCA de masses molaires différentes. Le taux d'encapsulation du pyrène a été mesuré de manière directe par spectroscopie UV/visible en dissolvant les particules dans le THF. La cinétique de libération du pyrène a été ensuite étudiée par spectroscopie de fluorescence. Cette étude a été menée en collaboration avec le Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR).

2. GENERALITES SUR LA CINETIQUE DE POLYMERISATION EN EMULSION ET EN MINIEMULSION

2.1. Cinétique de polymérisation en émulsion

La polymérisation en émulsion est souvent utilisée pour l'élaboration de particules de taille comprise entre 0,05 et 5 μm . La très grande majorité des polymérisations en émulsion sont effectuées en milieu aqueux, mais il est également possible de réaliser des polymérisations en émulsion inverse. Dans ce cas, le milieu dispersant est un solvant organique dans lequel le monomère est insoluble. Il faut noter que la polymérisation radicalaire en émulsion directe est toujours amorcée par un amorceur hydrosoluble comme par exemple le persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ^[1-3] et que la concentration en tensioactif doit dépasser la concentration micellaire critique (CMC).

La polymérisation en émulsion est un système relativement complexe, sa cinétique étant contrôlée à la fois par le mécanisme de la polymérisation du monomère, mais aussi par des phénomènes colloïdaux. Le processus de la cinétique peut être décomposé en trois périodes : nucléation, période stationnaire et terminaison.

2.1.1. Nucléation

Au début de la polymérisation en émulsion, le monomère se partage en trois fractions (Figure IV.1) : la majeure partie se trouve dans des gouttes de monomère stabilisées par un tensioactif ; une faible quantité est dans les micelles de tensioactifs ; une très petite fraction

est soluble dans la phase aqueuse continue. Après activation de l'amorceur, les radicaux libres formés réagissent dans un premier temps avec la fraction de monomère soluble dans la phase aqueuse pour former des radicaux-oligomères. L'hydrophobie de ces radicaux-oligomères augmente avec la longueur de leur chaîne. Dès que cette longueur atteint un certain nombre d'unités, les radicaux-oligomères deviennent totalement hydrophobes. Par conséquent, ils pénètrent à l'intérieur des micelles et y déclenchent la polymérisation du monomère [4-7]. La période de la nucléation est nommée « Intervalle I ». Dès que le premier radical entre à l'intérieur d'une micelle, cette dernière devient une particule de polymère en croissance. Le nombre des particules augmente au cours de la période de nucléation [8], et il dépend de la concentration en tensioactif.

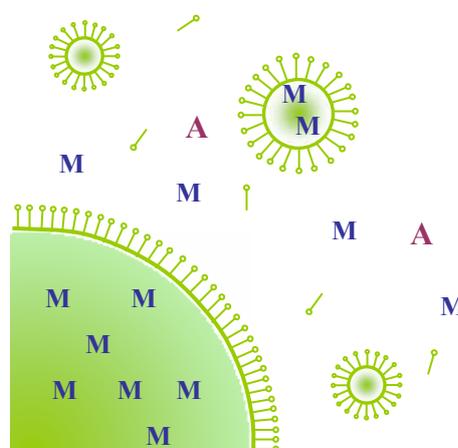


Figure IV.1 : Représentation du stade initial de la polymérisation en émulsion.

Monomère (M), amorceur (A) et tensioactif (—○).

2.1.2. Période stationnaire

Après nucléation des particules, le monomère diffuse depuis la goutte de monomère vers les sites réactifs. En raison de la diffusion constante du monomère vers les particules, la vitesse de polymérisation reste constante pendant cette période, et est indépendante de la concentration globale en monomère. Les gouttes de monomère peuvent être considérées comme des « réservoirs » de monomère [5]. Au fur et à mesure de la polymérisation, les particules en croissance grossissent tandis que la taille des gouttes de monomère diminue. De plus, le nombre de radicaux par particule reste constant. Cette période est nommée « Intervalle II ».

2.1.3. Terminaison

Quand les gouttes de monomère sont quasiment consommées, la vitesse de polymérisation commence à diminuer. Cette période est appelée « Intervalle III ». La fraction massique de polymère ainsi que la viscosité à l'intérieur des particules augmentent. La vitesse de terminaison dépend de la longueur des chaînes : les chaînes courtes et mobiles diffusent plus vite et peuvent donc réagir plus vite. Quelquefois une augmentation de la cinétique de polymérisation, liée à l'augmentation de la viscosité, peut être observée. Dans ce cas, le nombre de radicaux par particule peut augmenter car la viscosité du milieu limite la diffusion des espèces et donc les réactions de terminaison. Cet effet correspond à l'Intervalle IV. Cependant, des réactions de terminaison peuvent avoir lieu pendant les périodes de nucléation et stationnaire par recombinaison de deux radicaux résidant dans la même particule. Dans ce cas, le degré de polymérisation est plus faible.

2.2. Cinétique de polymérisation en miniémulsion directe

La cinétique de polymérisation radicalaire en miniémulsion a été beaucoup étudiée dans la littérature. La [figure IV.2](#) ^[1] présente un cas classique de polymérisation en miniémulsion du styrène, suivie par calorimétrie, en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS, tensioactif), de $K_2S_2O_8$ (amorceur), et d'hexadécane (HD, hydrophobe). Les Intervalles I, III, et IV décrits précédemment sont observés.

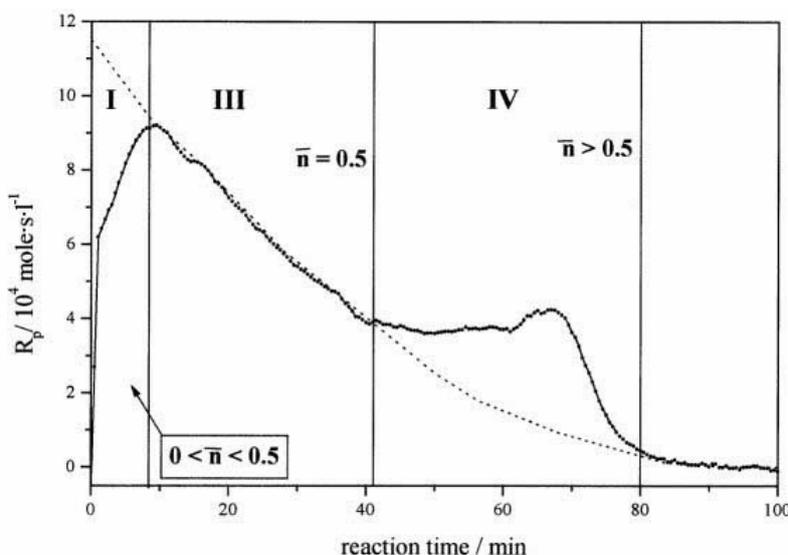


Figure IV.2 : Suivi calorimétrique de la cinétique de polymérisation du styrène en miniémulsion ^[1].
(SDS tensioactif, HD hydrophobe et $K_2S_2O_8$ amorceur)

L'Intervalle I correspond à l'étape de nucléation. Il décrit le processus permettant d'atteindre une concentration d'équilibre en radicaux libres dans chaque gouttelette formée pendant l'étape d'homogénéisation. Pendant cet intervalle, le nombre moyen des radicaux (\bar{n}) par particule passe de 0 à 0,5. Cette augmentation est due à la diffusion des radicaux libres qui sont formés dans la phase aqueuse au travers de la surface des particules. Durant l'Intervalle III, la cinétique de polymérisation ralentit progressivement, et \bar{n} reste égal à 0,5. Le pic situé dans l'Intervalle IV est dû à l'effet Trommsdorff : la viscosité augmentant fortement au sein des gouttelettes, le nombre de radicaux macromoléculaires par particule peut augmenter, leur diffusion étant limitée. L'Intervalle II, correspondant à la période stationnaire de la polymérisation en émulsion, est ici absent. En effet, dans le cas de la polymérisation en miniémulsion, le monomère se situe dans les nanogouttelettes stabilisées par le tensioactif et il n'y a pas de diffusion du monomère.

2.2.1. Influence de la taille des particules

L'influence de la taille des particules sur la cinétique de polymérisation du styrène en miniémulsion a été étudiée par Tang et al. [2,9] en présence de SDS, d'alcool cétylique utilisé comme hydrophobe et de $K_2S_2O_8$ utilisé comme amorceur. Deux modes d'émulsification, le microfluidiseur et l'omni-mixer ont été étudiés. Il apparaît que l'utilisation du microfluidiseur accélère la cinétique de polymérisation car les gouttelettes obtenues sont plus petites. Des comportements similaires ont été observés dans le cas de la polymérisation du méthyl méthacrylate en miniémulsion en présence de SDS, d'HD et $K_2S_2O_8$ [3]. La diminution de la taille des particules, par augmentation de la vitesse d'agitation lors de l'émulsification ou de la concentration en tensioactif, accélère la cinétique de la polymérisation.

2.2.2. Influence de l'hydrophobe

Les hydrophobes sont souvent des molécules de petite taille, comme par exemple l'alcool cétylique [10, 11], ou l'hexadécane (HD) [4, 12, 13]. Leur utilisation lors de la polymérisation en miniémulsion directe permet de réduire le mûrissement d'Ostwald, et donc de stabiliser la miniémulsion, comme cela a été décrit dans le chapitre III. Leur concentration influence également la cinétique de polymérisation en miniémulsion : une augmentation de la quantité d'HD peut diminuer la vitesse de la polymérisation [14, 15]. En effet, l'HD gonfle les particules en formation, ce qui diminue la concentration en monomère dans les particules.

2.2.3. Influence de l'amorceur

Pour une polymérisation en miniémulsion directe, l'amorceur peut être hydrosoluble ou organosoluble. Dans le cas d'un amorceur hydrosoluble, la formation des radicaux libres se fait dans la phase aqueuse. La période de nucléation est plus longue pour des concentrations en amorceur faibles. Une augmentation de la concentration en amorceur ne change pas le nombre de particules, mais augmente la vitesse de polymérisation en raison de l'augmentation du nombre de radicaux par particule [16]. Dans le cas d'un amorceur organosoluble, il se décompose par apport d'énergie au sein des gouttelettes de monomère, et y démarre la polymérisation du monomère. Certains amorceurs très hydrophobes, comme le 2,2'-azobis(2-méthyl-butyronitrile), peuvent jouer simultanément le rôle de l'hydrophobe [10].

Dans le cas d'une polymérisation anionique en miniémulsion, l'amorceur est toujours hydrosoluble. La masse molaire du polymère formé diminue lorsque la concentration en amorceur augmente [6, 17].

3. CINÉTIQUE DE LA POLYMERISATION DU *n*-BUTYL CYANOACRYLATE EN EMULSION ET EN MINIEMULSION

Il n'y a que peu de résultats publiés concernant la cinétique de polymérisation des alkyl cyanoacrylates en milieu dispersé. En effet, la cinétique de polymérisation anionique de ces monomères est extrêmement rapide : quelques secondes suffisent pour atteindre 100% de conversion dans le tétrahydrofurane (THF) lorsque la polymérisation est amorcée par la triphénylphosphine ($2,6 \times 10^{-5}$ M) [18]. Il est donc difficile de suivre la réaction en milieu dispersé.

Dans la littérature, les nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate) sont souvent préparées par polymérisation anionique en émulsion en présence de stabilisants macromoléculaires comme le dextrane [18-20] et des dérivés du POE [21-24]. Le pH du milieu réactif est un des facteurs importants influençant la cinétique de la polymérisation. En effet, la polymérisation anionique des ACAs est amorcée par les ions OH^- . Le pH influence donc la concentration en amorceur, et la vitesse de la polymérisation. Bootz et al. [24] ont montré que la masse molaire du PBCA obtenu par polymérisation anionique en émulsion en présence de

Poloxamer[®] 188 diminue avec le pH lorsque celui-ci est compris entre 1 et 3. De plus, Behan et al. [18] ont étudié l'évolution de la masse molaire du PBCA constituant le cœur des particules pour des valeurs de pH comprises entre 2 et 5. Ils ont montré que la cinétique de la polymérisation est lente à faible pH (<3,5), et rapide à pH 5.

Beaucoup plus récemment, la polymérisation anionique en miniémulsion a été développée pour préparer des nanoparticules de PACA. Limouzin et al. [25] ont étudié l'évolution des masses molaires du PBCA par chromatographie d'exclusion stérique au cours d'une polymérisation anionique en miniémulsion stabilisée par un tensioactif acide, l'acide dodécyl benzène sulfonique (DBSA, C₁₂H₂₅C₆H₄SO₃H). Leur étude a montré que le monomère disparaît progressivement au début de la réaction pour former simultanément des oligomères et des polymères de fortes masses molaires. Ensuite, ces populations disparaissent, alors que des traces de monomère sont à nouveau observées. Ceci est dû à une dépolymérisation pas à pas du polymère. Simultanément, une population dont la distribution de masses molaires est intermédiaire entre celle des oligomères et celle des polymères de fortes masses molaires apparaît. Un équilibre est atteint au bout de 48 heures.

La taille des particules augmente quant à elle pendant la réaction. En effet, les oligomères formés sont relativement hydrophiles et peuvent diffuser à travers la phase aqueuse (mûrissement d'Ostwald).

Une autre étude présente le suivi cinétique de la polymérisation anionique du BCA en miniémulsion stabilisée par du SDS [26]. Cette fois, de l'HD est ajouté pour minimiser le mûrissement d'Ostwald. La miniémulsion est préparée à pH 1 et différentes quantités de solution basique sont ajoutées pour amorcer la polymérisation. Les résultats montrent que la masse molaire du polymère formé diminue lorsque la concentration en SDS augmente ou que la concentration en OH⁻ diminue. De plus, l'évolution de la masse molaire est beaucoup plus lente dans ce cas par rapport à ce qui a été observé par Limouzin et al.: une durée d'un mois est nécessaire pour atteindre une masse molaire constante.

Dans les paragraphes suivants, nous présentons nos résultats concernant la cinétique de la polymérisation du BCA en (mini)émulsion en fonction du mode de polymérisation (radicalaire et anionique) et du pH du milieu réactif (1, 1,5, 2 et 3). La méthode de suivi de la cinétique, mise au point par Limouzin et al. a été adaptée à nos conditions de synthèse des nanoparticules.

3.1. Optimisation du protocole de suivi de la polymérisation

La technique décrite par Limouzin et al. [25] est la suivante. Des prélèvements sont effectués au cours de la polymérisation en miniémulsion. Pour stopper brutalement la polymérisation, ces prélèvements sont introduits immédiatement dans un mélange contenant du dichlorométhane (CH_2Cl_2), du sulfate d'aluminium et de potassium ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), et de l'acide méthane sulfonique ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$). L'acide permet de stopper la polymérisation anionique, le sel déstabilise la miniémulsion, et le dichlorométhane permet l'extraction du monomère et du polymère. Ce mélange permet donc de stopper la réaction, de séparer les phases organique et aqueuse, et d'extraire les composés à doser simultanément. Les mélanges sont ensuite analysés par RMN ^1H et SEC-MALLS. Certaines modifications, décrites ci-dessous, ont été effectuées pour tenir compte de nos conditions.

3.1.1. Choix du polymère amphiphile

Le DBSA utilisé par Limouzin et al. est un composé tensioactif acide qui ne porte aucune fonction alcool. Il peut non seulement stabiliser la miniémulsion, mais aussi acidifier le système et donc ralentir la vitesse de la polymérisation. Or nous avons choisi de nous intéresser à deux types de polymères amphiphiles : les dextrane phénoxy (DexP_τ) et les dérivés du POE (Brij[®]78, Brij[®]700 et Tween[®]80). Ces deux familles sont porteuses de fonctions alcool, et peuvent donc réagir avec le BCA.

Les miniémulsions stabilisées par les dérivés de type DexP_τ sont extrêmement stables et seulement partiellement déstabilisées par l'ajout de sel. Par ailleurs, les DexP_τ ne sont pas solubles dans le dichlorométhane. Ceci entraîne des difficultés lors de l'étape d'extraction du monomère et du polymère. En effet, après centrifugation, une couche blanche de polymère, entre les phases organique et aqueuse, est observée, probablement à base de DexP_τ précipité par le CH_2Cl_2 . Le monomère résiduel et le polymère formé n'ont donc pas pu être extraits de manière quantitative.

Les trois dérivés du POE sont au moins partiellement solubles dans le CH_2Cl_2 et ne précipitent pas en sa présence. Après centrifugation, le BCA et le PBCA sont extraits de manière quantitative dans la phase organique. Cependant, une fraction du dérivé du POE est entraînée dans la phase organique.

Le Brij[®]78 a été finalement retenu pour cette étude. Ce composé stabilise parfaitement la miniémulsion, permet un bon contrôle de la taille des particules, et est relativement soluble dans le CH₂Cl₂. Après centrifugation, les phases aqueuse et organique sont bien séparées, et le BCA résiduel et le PBCA formé sont extraits de manière quantitative. Ceci est confirmé par analyses des phases aqueuse et organique par RMN ¹H. Signalons que les prélèvements sont maintenus à 4°C pendant tout le traitement, y compris pendant la centrifugation. En effet, la fonction alcool terminale du Brij[®]78 peut amorcer la polymérisation du BCA.

3.1.2. Utilisation de l'isocyanate de trichloroacétyle

La phase organique prélevée après centrifugation contient le monomère résiduel, le polymère formé et la fraction soluble de Brij[®]78. Le Brij[®]78 peut amorcer la polymérisation du BCA dans le CH₂Cl₂. En effet, l'acide méthane sulfonique est éliminé dans la phase aqueuse lors de l'extraction. Pour bloquer rapidement la fonction alcool du Brij[®]78, une petite quantité d'isocyanate de trichloroacétyle (TAIC) est ajoutée dans la phase organique directement après la centrifugation. Ce composé réagit rapidement avec la fonction alcool du Brij[®]78, pour former des extrémités uréthane de trichloroacétyle (Figure IV.3). Cette réaction se fait facilement dans le CH₂Cl₂ à température ambiante à l'aide d'une agitation manuelle. De plus, le TAIC ne porte aucun proton. Il n'apparaît donc pas sur le spectre RMN ¹H même en cas d'excès.

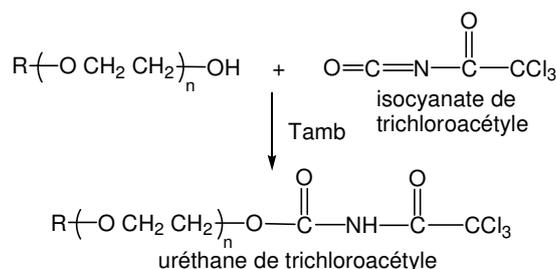


Figure IV.3 : Réaction entre le dérivé du POE et le TAIC.

3.1.3. Protocole expérimental

Préparation de la (mini)émulsion

50 mg de Brij[®]78 (Sigma) sont dissous à 50°C la veille dans 12,5 ml de solution aqueuse dont le pH (pH=1, 1,5, 2 et 3) est ajusté avec de l'acide chlorhydrique (solution standard 1,0 N, Aldrich). 0,5 ml de BCA (Loctite, Ireland), 25 µl de dodécane (≥99%, Aldrich), et si nécessaire 5 mg d'azobisisobutyronitrile (AIBN, 98%, Acros) sont mélangés pour obtenir une phase homogène. Après ajout goutte à goutte de la phase organique,

Chapitre IV : Cinétique de polymérisation du *n*-butyl cyanoacrylate en émulsion et en miniémulsion

l'émulsion est maintenue à 4°C sous agitation magnétique à 1 000 tr/min pendant 5min. Dans le cas de la polymérisation anionique en émulsion, cette émulsion est laissée à température ambiante pendant 20 heures. Dans le cas de la polymérisation en miniémulsion, l'émulsion formée est soniquée (modèle Vibracell 600 W, Sonics & Materials Inc, Danbury, CT) à 50% d'amplitude et 5 W de puissance dans un bain glacé pendant 60 s, puis maintenue pendant 20 heures sous agitation magnétique à température ambiante ou 75°C pour la polymérisation radicalaire. Les quantités et les conditions sont résumées dans le [tableau IV.1](#).

Tableau IV.1 : Résumé des quantités et des conditions utilisées lors de la préparation de l'émulsion et de la miniémulsion.

Type de polymérisation		Quantités *				Conditions		
		Brij [®] 78 (mg)	nBCA (ml)	Dodécane (μl)	AIBN (mg)	Homogénéisation (min)	Sonication (min)	PM**
Emulsion anionique		50	0,5	25	–	4°C	–	Tamb
Mini émulsion	Anionique				–	1 000 tr/min	50%, 5 W	Tamb
	Radicalaire				5	5 min	60 s	75°C

* phase aqueuse : 12,5 ml solution d'HCl contenant 50 mg de Brij[®]78

** polymérisation pendant 20 heures

Suivi de la cinétique (schématisé sur la [figure IV.4](#))

Au cours de la polymérisation en (mini)émulsion, des échantillons de 0,5 ml de (mini)émulsion sont prélevés et mis dans un tube en verre pour centrifugeuse à 4°C contenant 0,5 ml de CH₃SO₃H (99%, Acros), 25 mg d'AlK(SO₄)₂·12H₂O (98+%, Lancaster) et 1 ml de CH₂Cl₂ (≥99.8%, Sigma-Aldrich). Après agitation sous vortex, le mélange est centrifugé (GR 20 22, Jouan) à 4°C et 10 000 tr/min pendant 10 min. La phase organique est prélevée dans un pilulier sec. Une goutte de TAIC (NMR grade, Acros) est aussitôt ajoutée, puis bien mélangée. Après séchage pendant une nuit, les produits obtenus sont enfin analysés par RMN ¹H et SEC-MALLS.

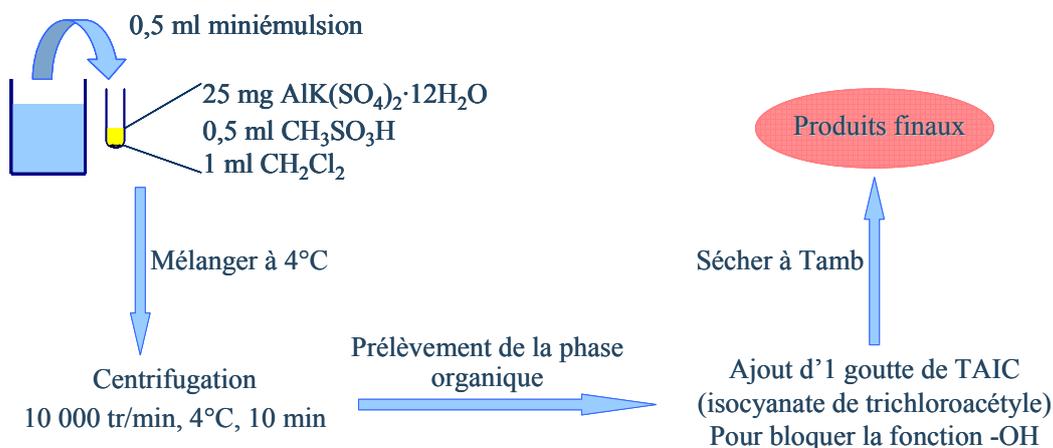


Figure IV.4 : Préparation des échantillons avant analyse lors du suivi de la cinétique de polymérisation du BCA en émulsion ou en miniémulsion.

3.2. Méthodes de caractérisation

Deux données caractéristiques de la cinétique ont été suivies : le taux de conversion du monomère (suivi par RMN ^1H) et la masse molaire du polymère (suivie par SEC-MALLS).

3.2.1. Taux de conversion du monomère

Le taux de conversion du BCA a été suivi par RMN ^1H (300,13 MHz, spectromètre Brüker Avance 300) dans le CDCl_3-d . Le BCA présente trois massifs sur son spectre RMN ^1H (Figure IV.5).

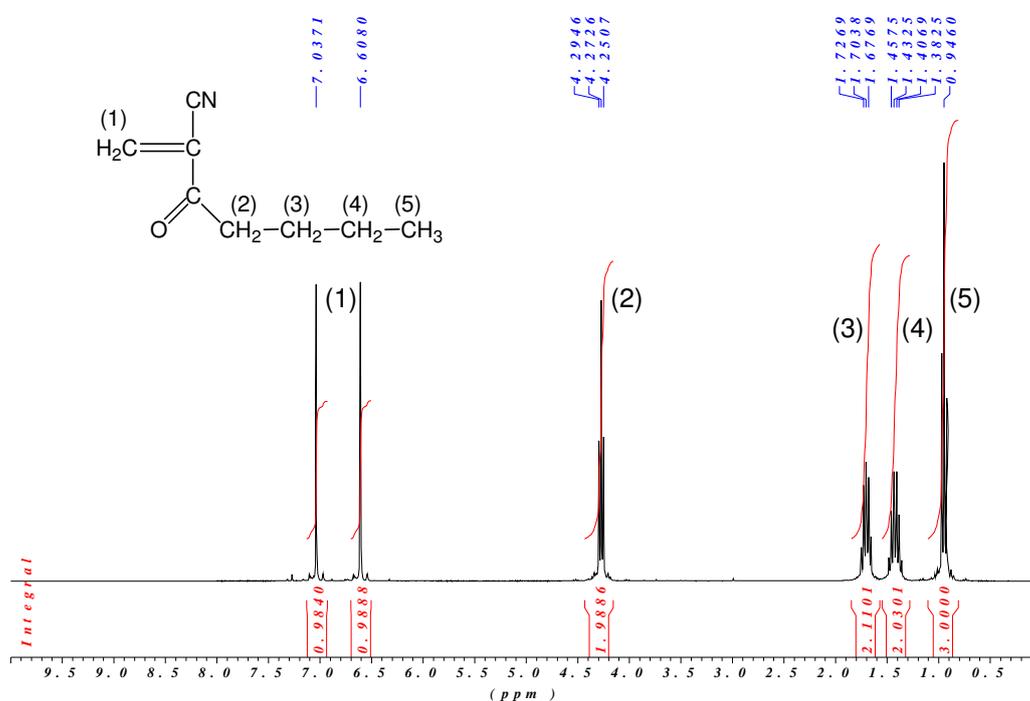


Figure IV.5 : Spectre RMN ^1H du BCA dans CDCl_3-d .

- Entre 7,0 et 6,5 ppm : deux singulets correspondant aux protons de la double liaison.
- A 4,2 ppm : un triplet correspondant aux deux protons en α de la liaison ester.
- Entre 2,0 et 0,9 ppm : trois pics caractéristiques des autres CH_2 et CH_3 du groupe alkyle.

Le BCA disparaissant au cours de la polymérisation, les signaux caractéristiques de la double liaison diminuent, puis disparaissent. Les signaux du groupe alkyle demeurent quant à eux identiques. Dans le spectre RMN ^1H d'un PBCA (Figure IV.6), le large massif entre 3,5 et 2,0 ppm correspond aux protons de la chaîne macromoléculaire.

Le taux de conversion du monomère peut donc être calculé en faisant le rapport entre l'intégration des protons de la double liaison et celle des protons de la liaison ester (Equation IV.1) :

$$\text{Taux de conversion} = \frac{\text{Intégration du pic entre 7,0 et 6,5 ppm}}{\text{Intégration du pic à 4,2 ppm}} \times 100\% \quad \text{IV.1}$$

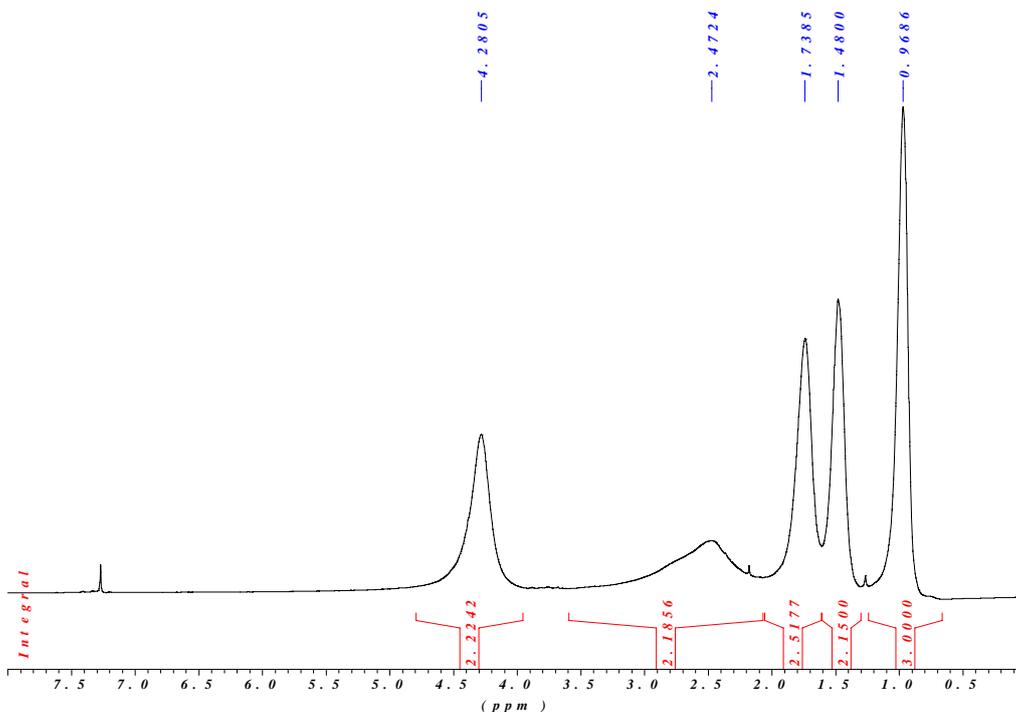


Figure IV.6 : Spectre RMN ¹H du PBCA dans CDCl₃-d.

3.2.2. Evolution de la masse molaire du PBCA

L'évolution de la masse molaire a été suivie par SEC-MALLS. Le THF a été choisi comme éluant. Pour minimiser la dépolymérisation du PBCA pendant la préparation des solutions et la séparation sur les colonnes, une faible quantité de CH₃SO₃H (5x10⁻⁴ mol/l) a été ajoutée dans l'éluant.

Equipements :

- une pompe Merck L-6200A ;
- un dégazeur ;
- une boucle d'injection de 100 µl ;
- une série de colonnes Polymer Laboratories :
- Pré-colonne: PLgel 5µl Guard, 50x7,5 mm, Part. No. 1110-1520 ;
- Colonnes : PLgel 5µm 100Å, 300x7,5mm, P/N 1110-6520, S/N 5M-2-200-60 ;
- PLgel 5µm 10E3Å, 300x7,5mm, P/N 1110-6530, S/N 5M-3-097-32.

Chapitre IV : Cinétique de polymérisation du *n*-butyl cyanoacrylate en émulsion et en miniémulsion

A la sortie des colonnes, un photodiffusiomètre de modèle MiniDawn (Wyatt Technology Coporation) est en place. La longueur d'onde du laser est fixée à 690 nm par le constructeur, et trois photodiodes mesurent l'intensité diffusée à 47,6°, 90,0° et 132,4°. Une double détection est effectuée à l'aide d'un réfractomètre différentiel de type Waters 410 installé en série. Les mesures sont pilotées avec le logiciel Astra en place.

Conditions expérimentales utilisées :

L'éluant utilisé est du THF (pour HPLC, VWR) acidifié par du $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ (5×10^{-4} mol/l). Le débit de la pompe est fixé à 0,7 ml/min; 24 heures sont nécessaires pour que le système soit à l'équilibre. Les solutions de polymères sont préparées la veille dans l'éluant utilisé, à des concentrations d'environ 15 g/l. Chaque solution est injectée deux fois et les courbes sont traitées selon la méthode de Zimm.

Les colonnes de séparation utilisées sont destinées à la séparation de masses molaires comprises entre 60 000 et 500 g/mol en équivalents polystyrène. Des échantillons étalons de polystyrène (200 000 et 49 170 g/mol) ont été injectés sur ces colonnes. On voit sur la [figure IV.7](#) que les deux échantillons ont des volumes d'éluion très proches. Le polystyrène de 200 000 g/mol sort dans le volume exclu aux environs de 12 ml tandis que l'autre échantillon sort à un volume voisin car sa masse molaire (60 000 g/mol) n'est pas très éloignée. Le calcul des masses molaires pour les deux échantillons a donné les valeurs de 208 400g/mol et de 51 450 g/mol, très proches des valeurs données par le fournisseur. Compte tenu de la littérature, où les PBCA ont généralement des masses molaires peu élevées, nous avons supposé que ce système chromatographique pourrait être adapté à nos analyses.

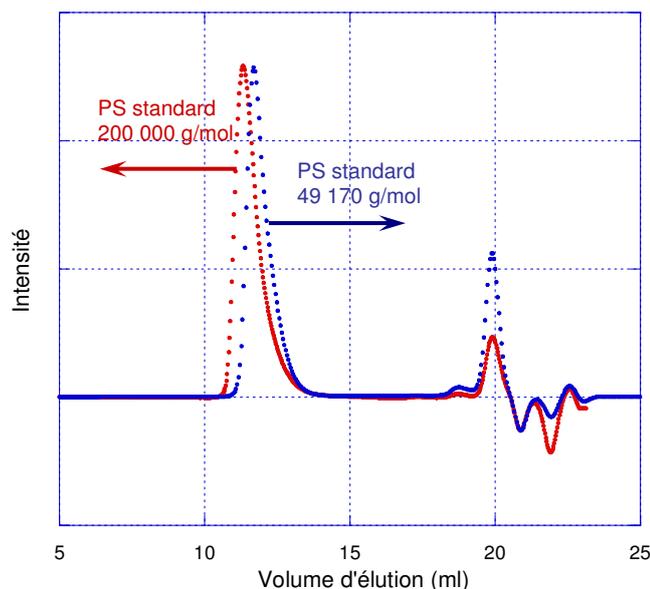


Figure IV.7 : Chromatogramme d'exclusion stérique du polystyrène étalon : concentration en échantillon 15 g/l ; temps de préparation 24 heures ; débit de la pompe 0,7 ml/min et température ambiante.

Pour calculer la masse molaire par la méthode de Zimm, le paramètre dn/dc est nécessaire. Ce paramètre a été mesuré au préalable pour un échantillon de PBCA synthétisé par polymérisation radicalaire en solution. Il a été trouvé égal à 0,078. Par la suite, nous avons considéré que ce paramètre ne dépendait pas de la masse molaire des échantillons macromoléculaires analysés lors des prélèvements.

Le BCA et le TAIC ont également été injectés sur ces colonnes dans les mêmes conditions. Leurs chromatogrammes et celui d'un blanc (THF acidifié) sont présentés sur la figure IV.8.

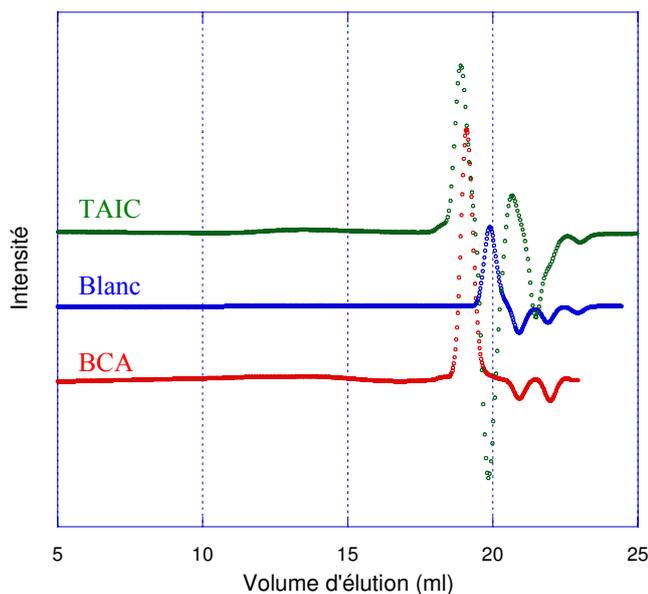


Figure IV.8 : Chromatogramme d'exclusion stérique du TAIC et du BCA : concentration en échantillon 15 g/l ; temps de préparation 24 heures ; débit de la pompe 0,7 ml/min et température ambiante.

Le pic de l'éluant se situe vers 20 ml. Les pics du BCA et du TAIC sont superposés. Par ailleurs, le Brij[®]78 a également été injecté avec une concentration de 1,2 g/l, similaire à celle que l'on peut estimer dans les prélèvements de cinétique (la concentration en particules dans le THF est de 15 g/l, et il y a environ 8% de Brij[®]78 dans les particules). Un signal extrêmement faible a été détecté vers 15 ml. La perturbation entraînée par le signal de Brij[®]78 sur ceux du polymère est donc négligeable.

3.3. Suivi de la polymérisation du BCA en miniémulsion

Après polymérisation, la taille des particules a été déterminée par HPPS (High Performance Particule Sizer, modèle HPP5002, Malvern). Les suspensions ont été diluées de

façon précise dans des solutions d'HCl dont le pH est identique à celui utilisé pour préparer les particules, et maintenues au repos pendant au moins 15 min avant mesure afin que la suspension soit homogène. Dans le cas de la polymérisation en miniémulsion, la taille moyenne des particules est d'environ 160 nm, et reste constante quels que soient le pH et le mode de polymérisation. En effet, la taille des particules avant et après la polymérisation est similaire en raison de l'absence de diffusion du monomère. La taille des particules est donc essentiellement contrôlée par la concentration en tensioactif dans le milieu et non pas par le mode de polymérisation. Dans le cas de la polymérisation en émulsion, la taille moyenne des particules est de 450 nm. Elle est plus grande que celle obtenue en miniémulsion.

3.3.1. Taux de conversion du monomère

Dans un premier temps, le taux de conversion d'une polymérisation anionique **en émulsion** (sans l'étape de sonication) à pH 2 a été suivi en fonction du temps (Figure IV.9). La polymérisation ne démarre qu'au bout de 10 min. Ceci nous a conforté à posteriori dans notre choix du temps d'homogénéisation présenté dans le chapitre III paragraphe 4 : le BCA reste stable sous agitation magnétique à pH 2 et 4°C pendant 5 min. Par ailleurs, nous observons que la conversion complète est atteinte au bout de 4 heures.

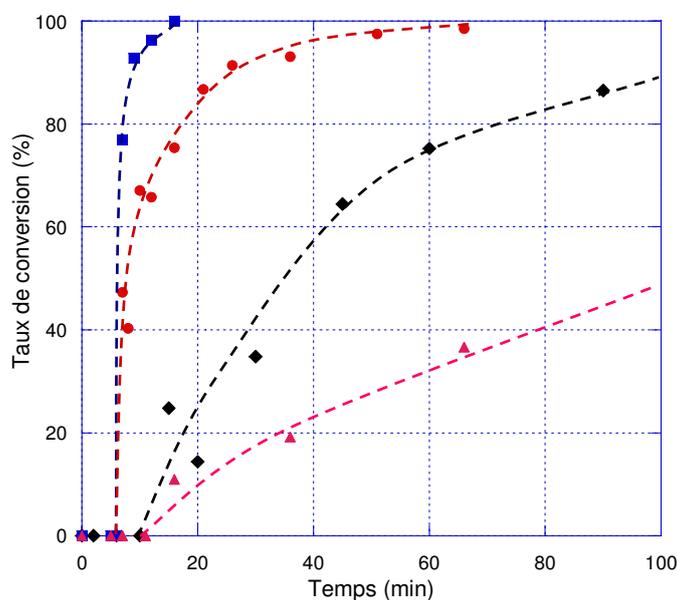


Figure IV.9 : Taux de conversion du BCA en fonction du temps et des conditions de polymérisation, calculé à partir des analyses RMN ^1H dans CDCl_3-d . Polymérisation radicalaire en miniémulsion à pH 2 et 75°C (■) ; Polymérisation anionique en miniémulsion à pH 2 et T_{amb} (●) ; Polymérisation anionique en émulsion à pH 2 et T_{amb} (◆) ; Polymérisation anionique en miniémulsion à pH 1 et T_{amb} (▲).

Parallèlement, la cinétique de la polymérisation **en miniémulsion** à pH 2 a été suivie (Figure IV.9). Le monomère est complètement consommé au bout de 1 heure en absence d'amorceur radicalaire. Dans le cas où de l'AIBN est introduit dans la phase organique, 16 min suffisent pour atteindre 100% de conversion. La cinétique de la polymérisation radicalaire est donc beaucoup plus rapide que celle de la polymérisation anionique. Cet écart nous a permis d'envisager une étude de l'influence du mode de polymérisation sur les caractéristiques des cinétiques.

A pH 1 (Figure IV.9), la cinétique de polymérisation anionique en miniémulsion est beaucoup plus lente qu'à pH 2. Le taux de conversion après sonication est très faible. La conversion totale n'est obtenue qu'au bout de 7 heures. La réaction est donc ralentie de manière efficace par l'augmentation de la concentration en H⁺.

La polymérisation radicalaire en miniémulsion à pH 1 n'a pas pu être suivie. En effet, la miniémulsion n'est plus stable dans ces conditions. Nous avons déjà montré dans le chapitre II que le Brij[®]78 se dégrade à pH 1 et 75°C.

En conclusion, une diminution du pH permet bien de ralentir la polymérisation anionique du BCA. L'étape de sonication accélère fortement la cinétique. En effet, l'interface eau/monomère, et donc la possibilité d'amorçage, se trouvent fortement accrues. Par ailleurs, la cinétique de polymérisation en miniémulsion ressemble à celle d'une polymérisation en masse et est donc plus rapide qu'une polymérisation en émulsion car celle-ci est ralentie par la cinétique de diffusion du monomère vers le site réactif. La polymérisation radicalaire est plus rapide que la polymérisation anionique. Nous avons vu que la polymérisation anionique est ralentie par l'addition d'acide mais nous n'avons jamais été en mesure de l'inhiber complètement. La polymérisation dite radicalaire en miniémulsion est donc en réalité une polymérisation mixte (radicalaire + anionique).

3.3.2. Evolution de la masse molaire

➤ Influence de la sonication sur l'évolution de la masse molaire

Pour former la miniémulsion, une étape de sonication est nécessaire. Un des inconvénients de cette technique est la forte dissipation d'énergie sous forme d'énergie

thermique. La température de l'échantillon peut monter jusqu'à 80°C si aucune précaution n'est prise. C'est pourquoi un bain glacé a été utilisé pendant l'étape de sonication pour dissiper la chaleur produite. De plus, l'interface eau/monomère est plus grande en miniémulsion qu'en émulsion simplement à cause de la taille des gouttelettes. L'amorçage de la polymérisation anionique est donc plus rapide en miniémulsion.

Afin d'étudier l'influence des ultrasons sur la cinétique de la polymérisation, des expériences de polymérisation en émulsion (sans l'étape de sonication) et en miniémulsion ont été menées à température ambiante pour des quantités de réactifs identiques, à pH 1 et 2. La [figure IV.10](#) présente, à titre exemple, les résultats obtenus à pH 2. Ils montrent qu'il y a toujours deux populations dans les prélèvements effectués 7 min après la mise en contact des deux phases (soit 1 min après la sonication dans le cas de la miniémulsion). L'intensité du signal correspondant aux faibles masses molaires est similaire, que la polymérisation soit menée en émulsion ou en miniémulsion. Cependant, l'intensité correspondant aux fortes masses molaires est beaucoup plus forte en miniémulsion qu'en émulsion. Des résultats comparables sont obtenus à pH 1. Ceci montre que la polymérisation du monomère en miniémulsion a été accélérée pendant l'étape de la sonication du fait de la grande interface eau/monomère créée. De plus, il apparaît que cette étape favorise la formation de fortes masses molaires.

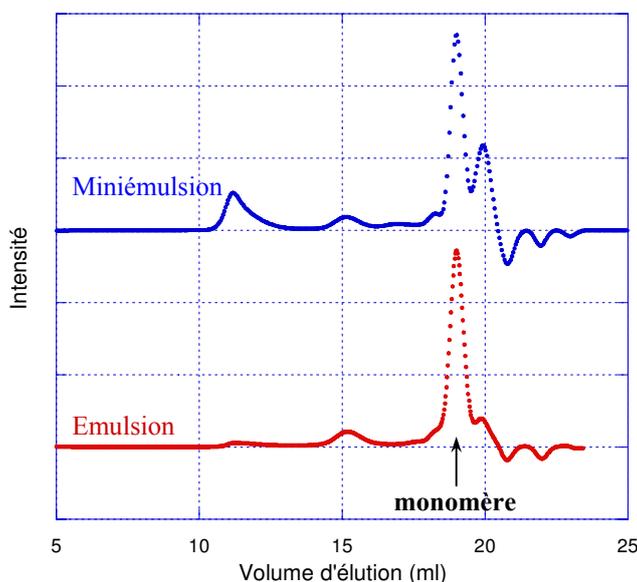


Figure IV.10 : Chromatogrammes SEC de prélèvements effectués 7 min après le début de la polymérisation à pH 2 et T_{amb} . Emulsion : échantillon non passé aux ultrasons ; miniémulsion : échantillon passé aux ultrasons.

➤ Evolution de la masse molaire au cours de la polymérisation (20 heures)

Des prélèvements au cours des 20 heures de polymérisation ont été réalisés pour les différentes conditions choisies : polymérisation anionique à T_{amb} et à pH 1 et 2, polymérisation radicalaire à pH 2 et 75°C. Les résultats sont présentés sur la figure IV.11.

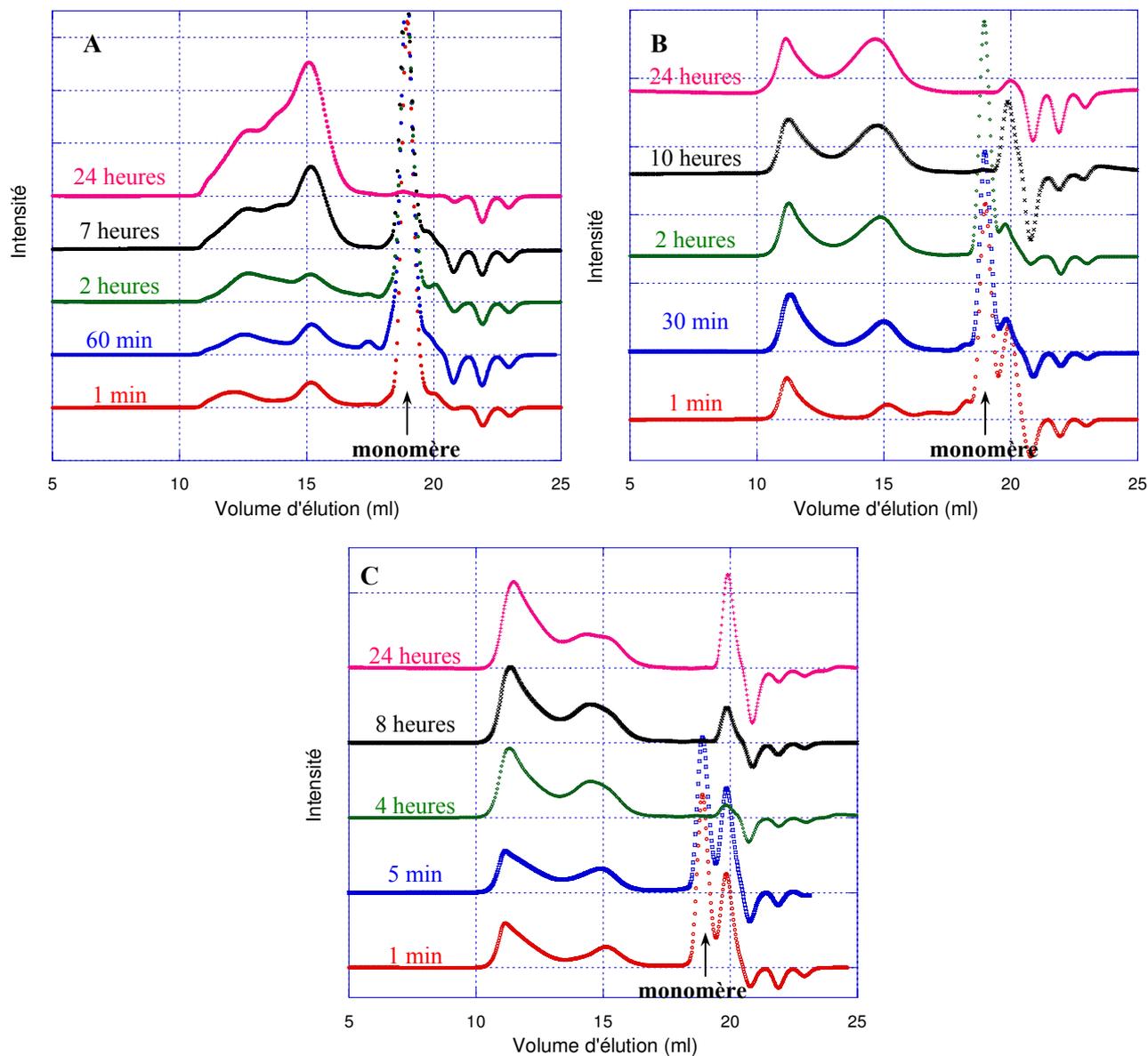


Figure IV.11 : Chromatogrammes SEC de prélèvements effectués pendant les 20 heures de polymérisation en miniémulsion du BCA. A. Polymérisation anionique à pH 1 et T_{amb} ; B. Polymérisation anionique à pH 2 et T_{amb} ; C. Polymérisation radicalaire à pH 2 et 75°C.

Ils montrent que dans tous les cas, nous avons deux populations de masse molaire : une de fortes masses molaires (volume exclu) et une de faibles masses molaires (≈ 16 ml). Dans le cas de la polymérisation anionique, que ce soit à pH 1 ou 2, la distribution de la masse

moléculaire évolue au cours du temps, même après conversion totale du monomère. De plus, la proportion de faibles masses moléculaires augmente au cours de la réaction. En effet, la polymérisation anionique est une réaction réversible [27-29] (voir chapitre I paragraphe 5.3). Après dépolymérisation et repolymérisation, la masse moléculaire du PBCA reformé est généralement plus faible que celle du PBCA initial [28, 29]. Dans le cas de la polymérisation radicalaire, la distribution de la masse moléculaire n'évolue qu'au début de la réaction. En effet, la dépolymérisation du PBCA obtenu par polymérisation radicalaire est beaucoup plus lente que celle du PBCA obtenu par polymérisation anionique, et n'est donc pas observable sur cette échelle de temps [28]. Ceci explique que la distribution de la masse moléculaire obtenue ne change pratiquement pas une fois le monomère consommé.

➤ Evolution de la masse moléculaire du PBCA aux temps longs

L'évolution de la masse moléculaire aux temps longs a été également étudiée (Figure IV.12).

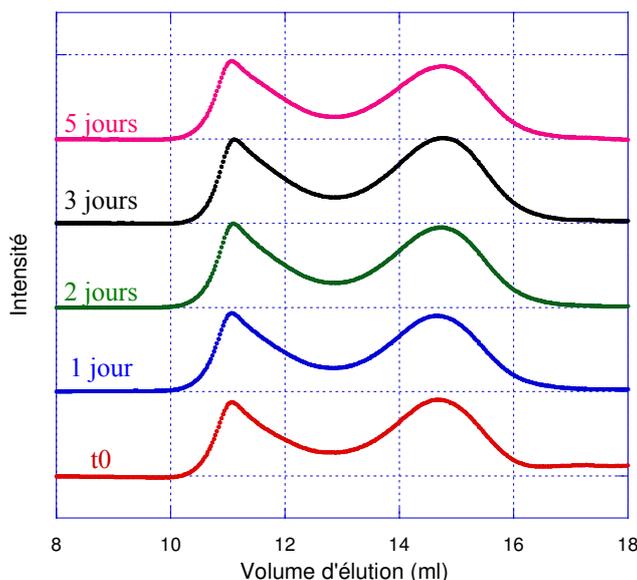


Figure IV.12 : Chromatogrammes SEC de prélèvements effectués 1, 2, 3 et 5 jours après la fin de la polymérisation (t_0) à pH 2 et T_{amb} .

Toutes les expériences ont été menées avec des suspensions obtenues par polymérisation anionique en miniémulsion à pH 2 et T_{amb} . Les suspensions, après les 20 heures de polymérisation, ont été conservées sous agitation à température ambiante. Des prélèvements ont été effectués à la fin de la polymérisation (t_0), et 1, 2, 3, et 5 jours après le prélèvement. Nous observons que les allures des courbes sont similaires pour tous les

prélèvements. La masse molaire du PBCA ne varie pas pendant au moins 5 jours au pH auquel la miniémulsion a été préparée.

➤ Distribution de la masse molaire au bout de 20 heures de polymérisation en miniémulsion pour différents pH et différentes conditions

Trois pH (1,0, 1,5, et 2,0) et deux types de polymérisation (anionique et radicalaire) en miniémulsion ont été étudiés. Les résultats sont présentés sur la [figure IV.13](#). Dans tous les cas, deux populations sont observées mais les proportions des populations correspondantes dépendent des conditions de synthèse.

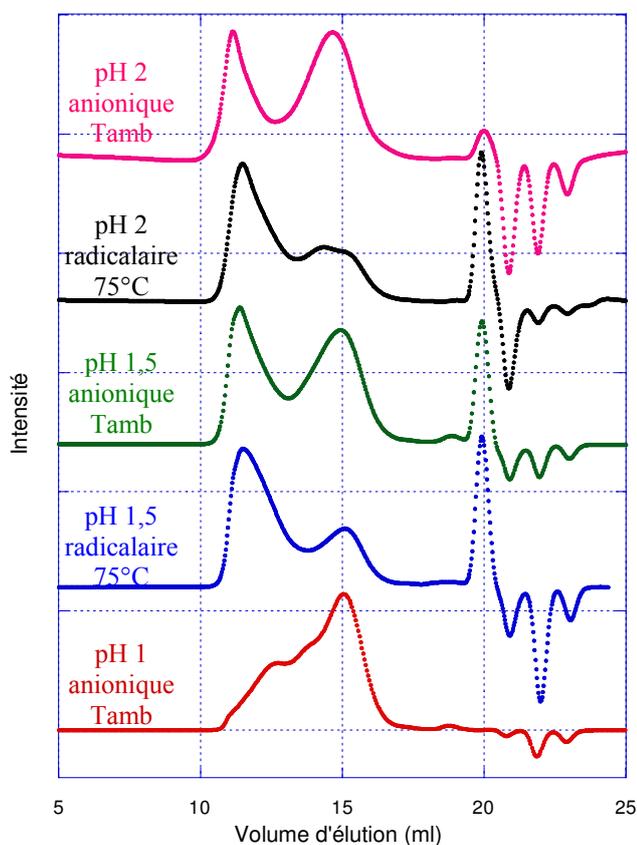


Figure IV.13 : Résumé : comparaison des chromatogrammes SEC des PBCA obtenus dans différentes conditions de polymérisation en miniémulsion.

A pH 1 et Tamb en polymérisation anionique, le pic correspondant aux faibles masses molaires est plus important que celui des fortes masses molaires. La forte concentration en ion H^+ limite la polymérisation du BCA et favorise la terminaison des chaînes. Les chaînes formées sont donc courtes et la masse molaire est faible. A pH 2 et Tamb, toujours en polymérisation anionique, deux pics distincts sont observés. L'intensité des pics des fortes

masses molaires et des faibles masses molaires sont comparables. A pH 2, la cinétique est plus rapide et la terminaison est moins favorisée qu'à pH 1 en raison d'une concentration en ions H⁺ plus faible.

En ce qui concerne la polymérisation radicalaire en miniémulsion à pH 2 et 75°C, nous observons que le pic des fortes masses molaires est plus important. En effet, le PBCA ne dépolymérise pas après conversion totale du monomère pour former des oligomères. Finalement, à pH 1,5, les profils d'éluion sont comparables à ceux obtenus à pH 2. A titre indicatif, la population de faibles masses molaires a une masse molaire moyenne en nombre (\overline{M}_n) d'environ 3 000 g/mol tandis que celle de fortes masses molaires a un \overline{M}_n de 161 000 g/mol. Il n'a pas été possible de réaliser une étude à pH 3, car la cinétique est beaucoup trop rapide pour être contrôlée.

4. ENCAPSULATION ET LIBERATION D'UN PRINCIPE ACTIF MODELE

4.1. Généralité

En fonction de son affinité pour le polymère constituant les vecteurs et de la voie d'administration, le principe actif peut être encapsulé soit par adsorption à la surface des nanoparticules après leur préparation, soit par incorporation dans le système au cours du processus de fabrication des nanoparticules ^[30]. Dans le premier cas, le principe actif peut rester à la surface ou diffuser au sein de la matrice des nanoparticules ^[31]. Dans le deuxième cas, le principe actif est enfermé dans la membrane de polymère (cas des nanocapsules) ou dispersé dans la matrice (cas des nanosphères). Parfois, un couplage covalent peut être établi entre le principe actif et le polymère. C'est souvent le cas pour des principes actifs basiques encapsulés par le processus de polymérisation en émulsion des alkyl cyanoacrylates ^[32-34].

Un système à libération contrôlée se définit comme une entité qui délivre un principe actif à une vitesse prédéterminée (constante ou pulsée) pendant un temps défini. Les deux mécanismes fondamentaux de libération à partir de vecteurs polymères de type nanoparticule,

sont la diffusion des principes actifs à travers la membrane/matrice et la dégradation chimique ou physico-chimique des nanoparticules (Figure IV.14) :

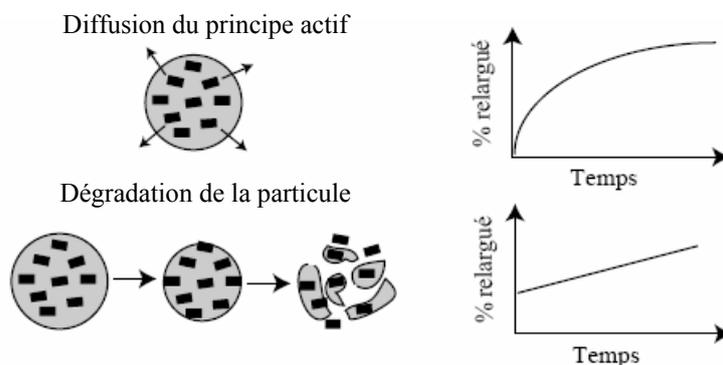


Figure IV.14 : Représentation schématique des différents modes de libération du principe actif et des allures des cinétiques de libération correspondantes ^[31].

- **Diffusion du principe actif.** Ce phénomène correspond à la migration et donc à la libération du principe actif au travers de la membrane polymère (cas des systèmes réservoirs tels que les nanocapsules) ou de la matrice macromoléculaire (cas des systèmes matriciels comme les nanosphères). Selon la porosité de la membrane ou de la matrice, la vitesse de libération du principe actif est plus ou moins rapide. D'autres paramètres peuvent également intervenir comme par exemple l'affinité chimique du principe actif pour la matrice.
- **Dégradation de la particule.** Il peut s'agir d'une dégradation réelle du polymère matriciel provoquée par hydrolyse chimique ou enzymatique, ou du clivage de la liaison entre le polymère et le principe actif (cas des prodrogues). Dans les deux cas, le principe actif est alors libéré. Des phénomènes de dégradation physique (érosion de la matrice) peuvent ainsi provoquer la libération de la molécule encapsulée.

La diffusion du principe actif et la dégradation de la particule sont deux phénomènes interconnectés. Pour un principe actif encapsulé, le coefficient de diffusion du principe actif, la vitesse de dégradation de la particule et la stabilité de la liaison entre les particules et le principe actif sont les principaux facteurs gouvernant la cinétique de libération. Cette dernière est également influencée par l'environnement biologique. Par exemple, des protéines plasmatiques s'adsorbant à la surface des particules peuvent constituer une barrière à la diffusion ; ceci conduit alors à un retard de libération ^[35]. En plus de ces mécanismes généraux, il existe d'autres facteurs pouvant accélérer la cinétique de libération du principe

actif. Les ultrasons peuvent également accentuer l'érosion de la matrice de polymère, et accélérer ainsi la libération [35]. Enfin, d'autres facteurs peuvent influencer les profils de libération des principes actifs encapsulés tels que la distribution en taille des particules, la répartition du principe actif encapsulé dans la matrice polymère, la charge en principe actif, la nature et la masse molaire du polymère constituant le cœur des particules. Ces multiples paramètres entraînent divers profils de libération cumulée au cours du temps, dans le cas de systèmes (bio)dégradables (Figure IV.15) :

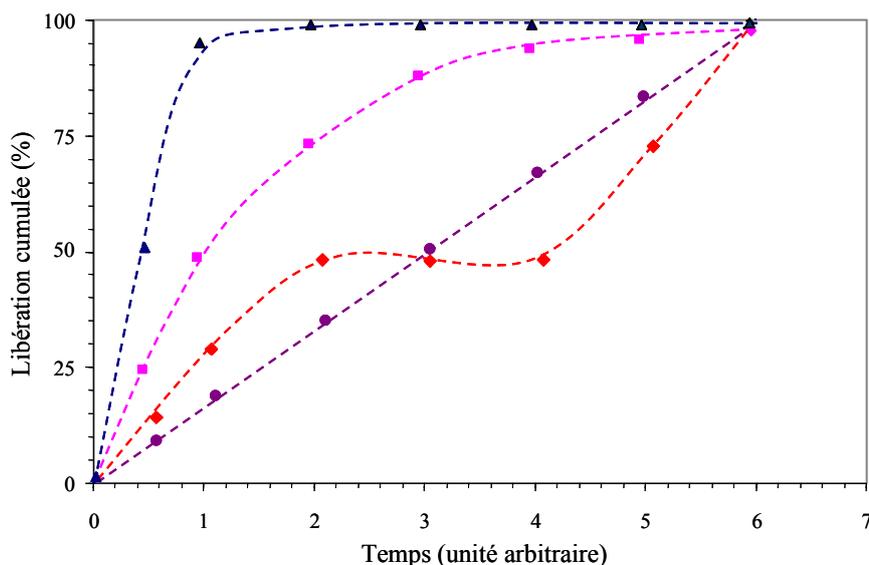


Figure IV.15 : Représentation des différents profils de libération de principe actif à partir de vecteurs polymères à libération contrôlée [35]. Effet de libération rapide (▲), Cinétique d'ordre zéro (■), Cinétique de premier ordre (●) et Cinétique biphasique (◆).

- **L'effet de libération rapide aux temps courts**, communément appelé « burst effect », caractérise une libération immédiate du principe actif. Le vecteur n'est donc pas efficace pour une libération contrôlée/prolongée. Ce profil de libération peut être observé dans le cas de médicaments adsorbés en surface des particules lorsque les interactions principe actif-polymère ne sont pas très fortes.
- **La cinétique d'ordre zéro** reflète une libération idéale et totalement contrôlée.
- **La cinétique de premier ordre** correspond à la majorité des profils observés lors de la libération de principes actifs encapsulés dans les nanoparticules. Au début de la libération, la vitesse est rapide (diffusion du principe actif encapsulé proche de la surface) puis se ralentit (diffusion plus lente au travers de la matrice).

- **La cinétique biphasique** reflète un mode de libération généralement dépendant de la dégradation de la matrice. Dans un premier temps, la cinétique de libération correspond à la diffusion du principe actif au voisinage de la surface. Dans un second temps, il faut attendre la dégradation de la matrice pour que la totalité du médicament soit libérée.

4.2. Encapsulation du pyrène

Pour étudier l'influence de la masse molaire du PBCA constituant le cœur des nanoparticules sur la cinétique de libération, nous avons choisi de travailler avec une molécule modèle, le pyrène. En effet, le pyrène (Figure IV.16) est une molécule inerte et hydrophobe qui ne porte aucune fonction réactive. Ainsi, il peut être encapsulé dans le cœur des nanoparticules de PBCA lors de leur préparation sans création de liaisons covalentes entre le principe actif et le polymère. Le pyrène est une sonde de fluorescence couramment utilisée. Sa faible solubilité dans l'eau ($4 \text{ à } 6 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$), sa longue durée de vie de fluorescence (jusqu'à 400 ns) et sa sensibilité à la polarité et à la viscosité de son environnement direct en font une sonde tout à fait intéressante.

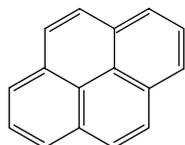


Figure IV.16 : Molécule de pyrène.

En nous basant sur les résultats du chapitre IV, nous avons choisi de travailler avec deux types de particules. Les premières sont obtenues par polymérisation radicalaire à pH 2 à 75°C en miniémulsion (voir Figure IV.13), les secondes par polymérisation anionique à pH 1 et T_{amb} (voir Figure IV.13). Ceci nous permet d'encapsuler le pyrène dans des matrices polymères possédant des masses molaires relativement différentes, afin d'étudier une éventuelle influence de cette masse molaire sur la cinétique de libération.

Processus d'encapsulation du pyrène

50 mg de Brij[®]78 (Sigma) sont dissous à 50°C la veille dans 12,5 ml de solution dont le pH (pH=1 ou 2) est ajusté par de l'HCl (solution standard 1,0 N, Aldrich). 5 mg de pyrène (1 % de la masse de solide), 0,5 ml de BCA (Loctite, Ireland), 25 μ l de dodécane ($\geq 99\%$, Aldrich), et si nécessaire 5 mg d'azobisisobutyronitrile (AIBN, 98%, Acros) sont mélangés pour obtenir une phase homogène. Après ajout goutte à goutte de la phase organique, l'émulsion est maintenue à 4°C sous agitation magnétique à 1 000 tr/min pendant 5min. Elle est

ensuite soniquée (modèle Vibracell 600 W, Sonics & Materials Inc, Danbury, CT) à 50% d'amplitude et 5 W de puissance dans un bain glacé pendant 60 s, puis maintenue pendant 20 heures sous agitation magnétique à 75°C dans le cas de la polymérisation radicalaire ou à température ambiante pour la polymérisation anionique. Après polymérisation, les miniémulsions sont centrifugées (GR 20 22, Jouan) à 30 000 tr/min et 15 °C pendant 30 min, puis lyophilisées.

La taille des particules après polymérisation a été mesurée par HPPS. La taille moyenne des nanoparticules obtenues est d'environ 150 nm dans les deux cas, ce qui est comparable aux résultats obtenus sans pyrène (160 nm). L'encapsulation du pyrène a donc peu d'influence sur la taille des particules.

Dosage du pyrène par spectroscopie UV/visible

Après lyophilisation, 4 mg de particules sèches sont dissoutes dans 10 ml de THF. Les solutions sont alors analysées par spectroscopie UV/visible (Uvikon XL Bio-Tek Instruments) entre 300 et 500 nm.

Le dosage nécessite un étalonnage effectué en simultanément avec des solutions de pyrène à des concentrations connues dans le THF, contre un blanc préparé avec le THF. La concentration en pyrène ne doit pas excéder 5 mg/l (soit $DO < 1$).

Le taux d'encapsulation (η) est le rapport entre la quantité de pyrène réellement contenue dans les particules et la quantité utilisée lors de la préparation (Equation V.1). Les taux moyens d'encapsulation obtenus sont supérieurs à 95% pour tous les échantillons. Nous avons donc obtenu un excellent rendement d'encapsulation du pyrène.

$$\eta = \frac{C_{pyr} \times V_{THF} / m_{part}}{m_{pyr} / (m_{pyr} + m_{BCA} + m_{Brij})} 100\% \quad \text{V. 1}$$

où C_{pyr} est la concentration en pyrène mesurée par spectroscopie UV/visible dans les solutions de THF ; V_{THF} est le volume de THF utilisé ; m_{part} est la masse des particules dissoutes dans le THF ; m_{pyr} , m_{BCA} , m_{Brij} sont les masses de pyrène, de BCA et de Brij[®]78 introduites lors de la préparation des particules.

4.3. Cinétique de libération du pyrène

4.3.1. Matériel et méthode

Pour étudier la cinétique de libération, le principe actif doit avoir une concentration initiale dans le milieu inférieure à sa solubilité. Dans notre cas, le pyrène est très peu soluble dans l'eau, nous avons donc dû travailler avec un grand volume de milieu de libération.

Protocole expérimental

15 mg de nanoparticules lyophilisées sont mises en suspension dans 1 l de tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4 en présence d'azide de sodium à une concentration de 0,02% (w/v). La libération s'effectue à 37°C sous agitation douce. Pour des temps donnés, 5 ml de suspensions sont prélevées, et mis à centrifuger (GR 20 22, Jouan) à 30 000 tr/min et 15°C pendant 30 min. Le surnageant est prélevé et dosé par spectroscopie de fluorescence. 5 ml de tampon frais sont ajoutés dans le milieu de libération.

Dosage du pyrène par spectroscopie de fluorescence

Ces études ont été réalisées en collaboration avec le Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR, UMR CNRS-INPL 7630). Les spectres de fluorescence sont obtenus en utilisant un spectroscopie de fluorescence SPEX Fluorolog-3, thermostaté à 25°C, équipé d'une lampe Xénon 450W et d'un double monochromateur. La fente est fixée à 1,5 nm. Les mesures d'intensité émise par fluorescence sont des mesures relatives qui sont liées à l'appareillage (lampe, monochromateur, fente, etc.). C'est pourquoi le spectre d'émission de fluorescence d'une solution de référence de concentration connue est réalisé avant chaque série de mesures. De plus, pour éviter l'effet de peau (modification des propriétés spectrales et de l'efficacité de la fluorescence lors d'une très forte concentration en molécule fluorescente), l'absorbance des solutions aqueuses est maintenue inférieure à $0,20 \pm 0,02$. Ceci est vérifié par spectroscopie UV/visible pour des longueurs d'onde comprises entre 300 et 500 nm.

Le spectre d'émission de fluorescence du pyrène présente cinq bandes de transitions électroniques situées entre 370 et 400 nm (Figure IV.17).

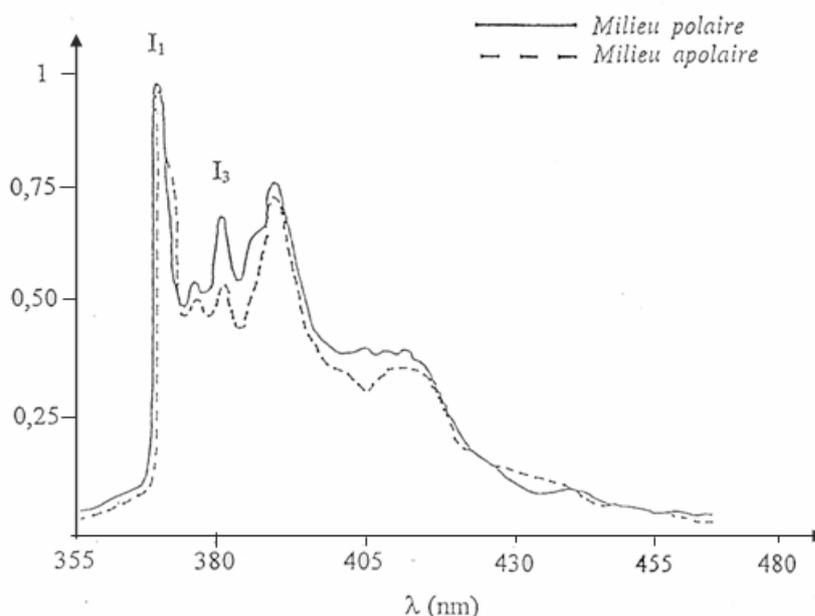


Figure IV.17 : Evolution du spectre d'émission de fluorescence du pyrène en fonction de la polarité du solvant.

Les intensités respectives de ces bandes évoluent avec la polarité de l'environnement. Le rapport I_1/I_3 (I_1 représentant l'intensité de la première bande à 372 nm et I_3 celle de la

troisième bande à 383 nm) est notamment un indicateur du changement de polarité [36, 37]. I_1/I_3 est de l'ordre de 1,9 dans l'eau et de 0,6 dans les solvants apolaires non aromatiques [37, 38].

En raison de la faible solubilité du pyrène dans l'eau, la cinétique de libération est très lente : seulement 3% maximum du pyrène est libéré au bout de 5 jours. Afin d'accélérer la cinétique de libération, nous avons ajouté 30 % (v/v) d'éthanol absolu dans le tampon de pH 7,4.

4.3.2. Résultats de la cinétique de la libération du pyrène

Dans un premier temps, nous avons déterminé le rapport I_1/I_3 du pyrène dans le surnageant eau/éthanol pour chaque prélèvement. Les rapports obtenus sont de 1,6, ce qui correspond à des valeurs typiques de pyrène libre dans ce type d'environnement. En effet, l'ajout d'éthanol diminue le rapport I_1/I_3 du pyrène en raison du changement de polarité du milieu. Par ailleurs, le rapport I_1/I_3 du pyrène encapsulé a également été déterminé dans l'eau distillée et désionisée (EDD) pour les deux échantillons de particules. Pour cela, l'intensité émise par des suspensions de particules a été mesurée. Les valeurs d' I_1/I_3 obtenus sont de 1,4, ce qui est plus faible que celle du pyrène dissous dans l'EDD ($I_1/I_3 \approx 1,9$). Ceci confirme l'incorporation à l'intérieur des particules du pyrène, qui voit ainsi un microenvironnement moins polaire.

Après confirmation que l'émission de fluorescence mesurée correspond à celle du pyrène dans le surnageant et non pas encapsulé (vérification de la valeur du rapport I_1/I_3), les pourcentages de pyrène libéré ont été calculés à partir des aires d'intégration du pyrène et des étalons. L'évolution de la quantité du pyrène libéré au cours du temps est présentée sur la [figure IV.18](#).

Nous observons que les cinétiques de libération du pyrène sont différentes selon le type de particules utilisé. Dans le cas des nanoparticules synthétisées par polymérisation anionique en miniémulsion à pH 1, la libération du pyrène a lieu pendant les premières 8 heures. Le pourcentage du pyrène libéré augmente au cours du temps pour atteindre un plateau aux environs de 70%. Même au bout de 48 heures, ce pourcentage reste constant. Le pyrène n'est donc pas totalement libéré. Un phénomène similaire a été observé dans le cas de la libération dans un tampon pH 7,4 de lidocaïne encapsulée dans des particules de poly(acide

lactique) [39]. Cette libération partielle est liée à l'obtention d'un équilibre de partage de la molécule encapsulée entre les nanoparticules et le surnageant.

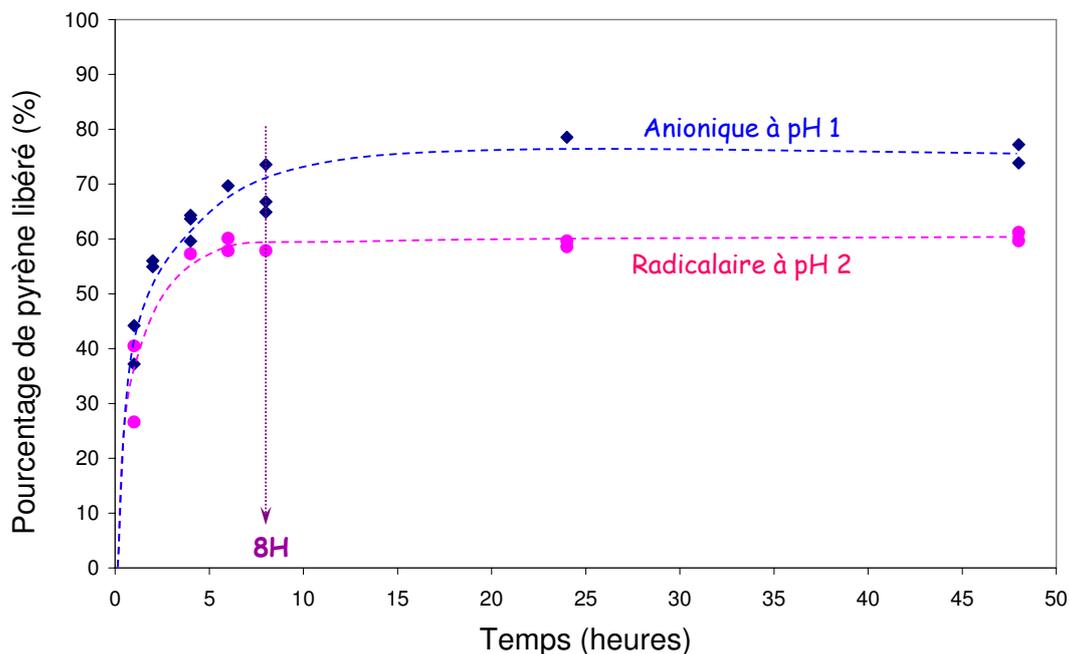


Figure IV.18 : Cinétique de libération du pyrène dans un tampon pH 7,4 contenant 30 % (v/v) d'éthanol. Polymérisation anionique en miniémulsion à pH 1(♦) et Polymérisation radicalaire en miniémulsion à pH 2(■).

Dans le cas des particules synthétisées par polymérisation radicalaire en miniémulsion à pH 2, la cinétique de libération est beaucoup plus lente. 48 heures sont nécessaires pour atteindre un pourcentage du pyrène libéré de 70%. En effet, le PBCA synthétisé par voie radicalaire comporte une fraction de fortes masses molaires plus importante que celui synthétisé par voie anionique (voir chapitre IV paragraphe 3.3.2). Cette différence de masse molaire peut induire une différence de coefficient de diffusion du pyrène au sein de la matrice polymère. Par ailleurs, le PBCA synthétisé par voie radicalaire en miniémulsion a une cinétique de dépolymérisation plus lente, ce qui peut également influencer sur la cinétique de libération du pyrène.

5. CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous avons décrit la cinétique de polymérisation du BCA en miniémulsion en présence de Brij[®]78. Deux modes de polymérisation (anionique et radicalaire) et trois pH (1, 1,5 et 2) ont été étudiés. Pour pouvoir stopper brutalement la réaction, un mélange contenant du CH₃SO₃H, de l'AlK(SO₄)₂·12H₂O et du CH₂Cl₂ a été

utilisé. Ce mélange permet à la fois de stopper la polymérisation, de séparer les phases organique et aqueuse, et d'extraire les composés organiques. Par ailleurs, une faible quantité de TAIC a été ajoutée dans la phase organique pour bloquer la fonction OH du Brij[®]78 entraîné lors de l'extraction. Cette méthode nous a permis d'analyser les différents prélèvements par RMN ¹H et SEC-MALLS.

Dans un premier temps, nous avons suivi par RMN ¹H la conversion du BCA lors de la polymérisation en émulsion et en miniémulsion en fonction du temps pour différentes conditions. Les résultats montrent que la polymérisation en miniémulsion est logiquement beaucoup plus rapide que la polymérisation en émulsion. Une diminution du pH permet de ralentir la cinétique de la polymérisation anionique en miniémulsion. Par ailleurs, la polymérisation radicalaire est plus rapide que la polymérisation anionique. Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'inhiber cette dernière totalement.

La masse molaire des prélèvements effectués a été mesurée par SEC-MALLS dans le THF acidifié. Bien que n'ayant pas accès aux masses molaires exactes, la comparaison des profils d'élution nous a apporté de nombreuses informations.

Dans tous les cas, deux populations sont obtenues. Leur proportion varie en fonction du pH du milieu et du mode de polymérisation. La voie radicalaire favorise les fortes masses molaires alors qu'une diminution du pH en polymérisation anionique favorise les faibles masses molaires.

Dans le cas de la polymérisation anionique, la distribution des masses molaires continue d'évoluer même lorsque la conversion atteint 100%. Ceci est cohérent avec les résultats observés dans la littérature ^[25]. Toutefois, un état stable est atteint dès 20 heures dans notre cas, alors que la littérature fait état de 48 heures ou plus pour obtenir une masse constante. Dans le cas de la polymérisation radicalaire, la distribution des masses molaires est figée dès la conversion totale du monomère. En effet, les macromolécules obtenues par cette voie dépolymérisent beaucoup plus lentement, et ce phénomène n'est pas observable sur l'échelle de temps étudiée.

Grâce à cette étude approfondie de la polymérisation en miniémulsion du BCA, nous sommes maintenant en mesure de jouer sur les conditions opératoires pour contrôler la masse molaire du PBCA constituant le cœur de la nanoparticule.

Enfin, une étude préliminaire a pu être réalisée pour mettre en évidence l'influence éventuelle de la masse molaire du polymère constituant le cœur des nanoparticules sur la cinétique de libération d'un principe actif. Nous avons choisi de travailler avec une molécule fluorescente modèle, le pyrène. Ce composé très hydrophobe est chimiquement inerte et ne peut pas réagir avec le monomère pendant la polymérisation pour créer des liaisons covalentes matrice-pyrène.

Deux séries de particules ont été étudiées. La première est obtenue par polymérisation anionique en miniémulsion à pH 1. La seconde est synthétisée par polymérisation radicalaire à pH 2. Les masses molaires du cœur des nanoparticules sont ainsi très différentes.

Le taux d'encapsulation du pyrène a été déterminé par spectroscopie UV/visible dans le THF. Des taux très élevés (>95%) ont été obtenus.

Après optimisation des conditions de suivi, la libération du pyrène dans un mélange tampon à pH 7,4 contenant 30 % (v/v) en volume d'éthanol absolu a été suivie au cours du temps par spectroscopie de fluorescence. Les résultats montrent une influence de la masse molaire du PBCA constituant le cœur de particules sur la cinétique de libération du pyrène.

Ces expériences avec le pyrène n'ont été réalisées que pour vérifier qu'il était possible d'encapsuler une molécule dans les nanoparticules de PBCA préparées par polymérisation en miniémulsion et ensuite d'obtenir sa libération. Il sera envisageable d'encapsuler d'autres molécules ayant un intérêt thérapeutique. On pourrait citer en exemple des molécules anticancéreuses pour des applications en chimiothérapie ou thérapie photodynamique.

D'autres expériences seront bien sûr indispensables pour aller plus loin dans ce domaine. De nouvelles molécules modèles moins hydrophobes pourront être utilisées pour accélérer le processus de libération dans des milieux purement aqueux. Toutefois, à chaque système nanoparticulaire, à chaque molécule encapsulée et à chaque condition de libération (nature du milieu, température...) correspond un profil de libération spécifique.

Enfin, pour des systèmes nanoparticulaires polymères renfermant des molécules d'intérêt biomédical, ces expériences de libération *in vitro* sont indispensables pour montrer qu'un relargage est possible, mais bien évidemment les résultats ne préjugent en rien de ce qui se passera après une administration *in vivo*.

6. REFERENCES

1. N. Bechthold and K. Landfester. «Kinetics of Miniemulsion Polymerization As Revealed by Calorimetry». *Macromolecules*, **2000**, 33(13): p.4682-4689.
2. P.L. Tang, E.D. Sudol, C.A. Silebi, and M.S. El-Aasser. «Miniemulsion polymerization - a comparative study of preparative variables». *Journal of Applied Polymer Science*, **1991**, 43(6): p.1059-1066.
3. K. Fontenot and F.J. Schork. «Batch polymerization of methyl methacrylate in mini/macroemulsions». *Journal of Applied Polymer Science*, **1993**, 49(4): p.633-655.
4. Y. Luo and F.J. Schork. «Emulsion and miniemulsion polymerizations with an oil-soluble initiator in the presence and absence of an aqueous-phase radical scavenger». *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **2002**, 40(19): p.3200-3211.
5. W.D. Harkins. «Theory of the mechanism of emulsion polymerization». *Journal of the American Chemical Society*, **1947**, 69: p.1428-1444.
6. K. Landfester. «Polyreactions in Miniemulsions». *Macromolecular Rapid Communications*, **2001**, 22(12): p.896-936.
7. C.S. Chern. «Emulsion polymerization mechanisms and kinetics». *Progress in Polymer Science*, **2006**, 31(5): p.443-486.
8. L.V. De La Rosa, E.D. Sudol, M.S. El-Aasser, and A. Klein. «Emulsion polymerization of styrene using reaction calorimeter. I. Above and below critical micelle concentration». *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **1999**, 37(22): p.4054-4065.
9. P.L. Tang, E.D. Sudol, M.E. Adams, C.A. Silebi, and M.S. El-Aasser. «Miniemulsion polymerization». *ACS Symposium Series*, **1992**, 492(Polym. Latexes): p.72-98.
10. P.J. Blythe, A. Klein, J.A. Phillips, E.D. Sudol, and M.S. El-Aasser. «Miniemulsion polymerization of styrene using the oil-soluble initiator AMBN». *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **1999**, 37(23): p.4449-4457.
11. C.M. Miller, E.D. Sudol, C.A. Silebi, and M.S. El-Aasser. «Miniemulsion polymerization of styrene: evolution of the particle size distribution». *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **1995**, 33(8): p.1391-1408.
12. I. Aizpurua, J.I. Amalvy, and M.J. Barandiaran. «Influence of the polymeric hydrophobe on the kinetics of vinyl acetate miniemulsion polymerization». *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2000**, 166(1-3): p.59-66.
13. J.A. Alduncin, J. Forcada, and J.M. Asua. «Miniemulsion Polymerization Using Oil-Soluble Initiators». *Macromolecules*, **1994**, 27(8): p.2256-2261.
14. V.S. Rodriguez, J.M. Asua, M.S. El-Aasser, and C.A. Silebi. «Mathematical modeling of seeded miniemulsion copolymerization for oil-soluble initiator». *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, **1991**, 29(4): p.483-500.
15. V.S. Rodriguez, M.S. El-Aasser, J.M. Asua, and C.A. Silebi. «Miniemulsion copolymerization of styrene-methyl methacrylate». *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **1989**, 27(11): p.3659-3671.
16. J. Reimers and F.J. Schork. «Robust nucleation in polymer-stabilized miniemulsion polymerization». *Journal of Applied Polymer Science*, **1996**, 59(12): p.1833-1841.

Chapitre IV : Cinétique de polymérisation du *n*-butyl cyanoacrylate en émulsion et en miniémulsion

17. M. Antonietti and K. Landfester. «Polyreactions in miniemulsions». *Progress in Polymer Science*, **2002**, 27(4): p.689-757.
18. N. Behan, C. Birkinshaw, and N. Clarke. «Poly *n*-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerization and particle formation». *Biomaterials*, **2001**, 22(11): p.1335-1344.
19. S.J. Douglas, L. Illum, S.S. Davis, and J. Kreuter. «Particle size and size distribution of poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles : I. Influence of physicochemical factors». *Journal of Colloid and Interface Science* **1984**, 101(1): p.149-158.
20. J. Weyermann, D. Lochmann, C. Georgens, I. Rais, J. Kreuter, M. Karas, M. Wolkenhauer, and A. Zimmer. «Physicochemical characterisation of cationic polybutylcyanoacrylate-nanoparticles by fluorescence correlation spectroscopy». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 58(1): p.25-35.
21. J.M. Rollot, P. Couvreur, L. Roblot-Treupel, and F. Puisieux. «Physicochemical and morphological characterization of polyisobutyl cyanoacrylate nanocapsules». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1986**, 75(4): p. 361-364.
22. K. Langer, E. Seegmüller, A. Zimmer, and J. Kreuter. «Characterisation of polybutylcyanoacrylate nanoparticles: I. Quantification of PCBA polymer and dextrans». *International Journal of Pharmaceutics* **1994**, 110(1): p.21-27.
23. A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, and J. Kreuter. «Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2004**, 57(2): p.369-375.
24. A. Bootz, T. Russ, F. Gores, M. Karas, and J. Kreuter. «Molecular weights of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles determined by mass spectrometry and size exclusion chromatography». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2005**, 60(3): p.391-399.
25. C. Limouzin, A. Caviggia, F. Ganachaud, and P. Hemery. «Anionic polymerization of *n*-butyl cyanoacrylate in emulsion and miniemulsion». *Macromolecules*, **2003**, 36(3): p.667-674.
26. C.K. Weiss, U. Ziener, and K. Landfester. «A route to nonfunctionalized and functionalized poly(*n*-butylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation in miniemulsion». *Macromolecules*, **2007**, 40(4): p.928-938.
27. W.R. Vezin and A.T. Florence. «*In vitro* heterogeneous degradation of poly(*n*-alkyl α -cyanoacrylates)». *Journal of Biomedical Materials Research*, **1980**, 14: p.93-106.
28. D.R. Robello, T.D. Eldridge, and M.T. Swanson. «Degradation and stabilization of polycyanoacrylates». *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **1999**, 37(24): p.4570-4581.
29. C. Vautier, P. Couvreur, and C. Bubernet. «Poly(alkylcyanoacrylate)». *Surfactant Science Series*, ed. A. Elaissari. Marcel Dekker. **2003**, Vol.116 (Colloidal biomolecules, biomaterials, and biomedical applications). p.349-370.
30. T. Harmia, P. Speiser, and J. Kreuter. «A solid colloidal drug delivery system for the eye: encapsulation of pilocarpine in nanoparticles». *Journal of Microencapsulation*, **1986**, 3(1): p.3-12.
31. J. Kreuter. «Nanoparticles». *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, ed. J. Kreuter. Marcel Dekker. **1994**, Vol.66 (Colloidal Drug Delivery Systems). p.219-343.
32. F. Brasseur, P. Couvreur, B. Kante, L. Deckers-Passau, M. Roland, C. Deckers, and P. Speiser. «Actinomycin D adsorbed on polymethylcyanoacrylate nanoparticles: increased efficiency against an experimental tumor». *European Journal of Cancer (1965-1981)*, **1980**, 16(11): p.1441-1445.

Chapitre IV : Cinétique de polymérisation du *n*-butyl cyanoacrylate en émulsion et en miniémulsion

33. P. Couvreur, B. Kante, L. Grislain, M. Roland, and P. Speiser. «Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1982**, 71(7): p.790-792.
34. J. Kreuter and H.R. Hartmann. «Comparative study on the cytotoxic effects and the tissue distribution of 5-fluorouracil in a free form and bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in sarcoma 180-bearing mice». *Oncology*, **1983**, 40(5): p.363-366.
35. D. Chognot. «Nanosphères de PLA/POE : nouveau procédé d'élaboration, caractérisation et encapsulation de la protéine C». Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, **2003**. p.214.
36. K. Kalyanasundaram and J.K. Thomas. «Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in the studies of micellar systems». *Journal of the American Chemical Society*, **1977**, 99(7): p.2039-2044.
37. D.S. Karpovich and G.J. Blanchard. «Relating the polarity-dependent fluorescence response of pyrene to vibronic coupling. Achieving a fundamental understanding of the py polarity scale». *Journal of Physical Chemistry*, **1995**, 99(12): p.3951-3958.
38. F.M. Winnik and S.T.A. Regismond. «Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants with polymers». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1996**, 118(1): p.1-39.
39. C. Rouzes. «Nanosphères à coeur de poly(acide lactique) et couronne de dextrane : élaboration, propriétés et applications biomédicales». Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, **2001**. p.186.

CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES

Depuis de nombreuses années, le Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire s'intéresse à l'élaboration de nanoparticules polymères (bio)dégradables à vocation biomédicale. Il a ainsi acquis une grande expérience notamment dans l'élaboration et la caractérisation de nanoparticules à base de polyesters tels que le poly(acide lactique) ou les copolymères d'acide lactique et glycolique par la technique dite d'émulsion/évaporation de solvant. L'utilisation de tensioactifs biocompatibles synthétisés au laboratoire et à base de polysaccharides a permis l'élaboration de nanoparticules à surface hydrophile. Ces particules sont peu détectées par le Système des Phagocytes Mononuclées, ce qui accroît leur persistance intravasculaire. Dans le cas d'une couverture par l'acide hyaluronique, un ciblage des chondrocytes, cellules du cartilage, a même été obtenu.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des recherches menées au LCPM. L'objectif était de combiner les connaissances acquises au laboratoire sur les dérivés amphiphiles du dextrane aux possibilités offertes par la technique de polymérisation en miniémulsion pour synthétiser en une étape des nanoparticules biocompatibles à couronne hydrophile et cœur de poly(*n*-butyl cyanoacrylate) (PBCA). Ce polymère, utilisé depuis les années 60 pour ses propriétés adhésives, fait l'objet de recherches poussées depuis le début des années 80 pour des applications dans le domaine de la vectorisation. Toutefois, la très grande réactivité du monomère rend difficile le contrôle de la synthèse des nanoparticules. Notre but était de maîtriser les différentes caractéristiques physico-chimiques des nanosphères (taille, taux de recouvrement de la couche hydrophile, masse molaire des chaînes polymères constituant le cœur...) afin d'étudier de manière systématique leur influence sur l'encapsulation d'un principe actif et sa cinétique de libération.

Deux familles de polymères tensioactifs ont été choisies pour stabiliser la polymérisation en miniémulsion du *n*-butyl cyanoacrylate (BCA). La première est composée de dérivés amphiphiles hydrosolubles du dextrane synthétisés au laboratoire. Trois dextrane-phénoxy (DexP_r) ont été préparés par fixation du 1,2-époxy-3-phénoxypropane en milieu aqueux basique : les DexP₁₁, DexP₁₇ et DexP₂₂ ont un taux de substitution respectivement de 11, 17 et 22% (en groupes phénoxy pour 100 unités glucose). La deuxième famille est constituée de dérivés commerciaux du poly(oxyde d'éthylène) (POE) : le Brij[®]78, le Brij[®]700, et le Tween[®]80.

Dans un premier temps, la stabilité des polymères amphiphiles a été étudiée à différents pH (de 1 à 3) et à température ambiante ou à 75°C. Ces conditions correspondent

aux conditions de polymérisation qui ont été utilisées par la suite pour élaborer les nanoparticules. Nous avons montré que les DexP_τ sont remarquablement stables dans les conditions étudiées. Par contre, le Brij[®]78 perd tout pouvoir tensioactif lorsqu'il est maintenu à pH 1 et 75°C pendant quelques heures.

Les propriétés tensioactives des différents polymères amphiphiles ont ensuite été caractérisées en tensiométrie dynamique, par mesure des tensions interfaciales eau/dodécane au cours du temps. Dans le cas des DexP_τ, l'augmentation du taux de modification permet d'avoir un polymère au pouvoir tensioactif plus marqué et présentant une cinétique d'adsorption plus rapide. Dans le cas des dérivés du POE, les cinétiques d'adsorption sont extrêmement rapides. Le Brij[®]700 possédant une HLB élevée présente une effectivité relativement faible. Le Tween[®]80 permet quant à lui de stabiliser une plus grande interface, à quantité de molécules amphiphiles égale, car son taux de recouvrement est faible.

Le BCA est un monomère extrêmement réactif qui polymérise en présence de traces d'eau. Sa polymérisation anionique démarre donc dès la mise en contact des deux phases organique et aqueuse. Après avoir optimisé les conditions de préparation des miniémulsions pour minimiser simultanément la polymérisation anionique lors de l'étape d'émulsification et la taille de particules, des nanoparticules de PBCA ont pu être synthétisées avec succès par polymérisation en miniémulsion stabilisée par les polymères amphiphiles choisis. Leurs propriétés physico-chimiques ont été ensuite étudiées en fonction de la nature et de la concentration du polymère amphiphile dans la phase aqueuse.

Quel que soit le polymère, le diamètre des nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate) obtenues est compris entre 100 et 200 nm avec une distribution de taille étroite. La taille des particules peut être ajustée en jouant sur la nature et la concentration du polymère amphiphile. C'est le Tween[®]80 qui permet d'obtenir les particules les plus fines, conformément aux résultats des mesures de tensiométrie dynamique.

Dans le cas des DexP_τ, nous observons que les propriétés physicochimiques de la couche hydrophile dépendent assez peu du taux de substitution du dextrane, contrairement à ce qui est observé dans les cas des dérivés de POE. L'épaisseur de la couche hydrophile augmente en effet avec la longueur de la chaîne hydrophile car ces dérivés doivent adopter

une conformation étendue à la surface des particules. De plus, le taux de recouvrement diminue lorsque la longueur de la chaîne hydrophile augmente.

La stabilité de la couche hydrophile est très variable d'une famille de polymère amphiphile à l'autre. Si les dérivés du POE se désorbent en grande partie lors des lavages et en présence de dodécyle sulfate de sodium, les dérivés de type DexP_τ sont solidement ancrés à la surface. En effet, dans le cas des polymères greffés en peigne, le nombre de points d'ancrage par molécule amphiphile est beaucoup plus grand que pour les polymères à blocs. De plus, les fonctions OH résiduelles le long de la chaîne polysaccharidique peuvent amorcer la polymérisation anionique du BCA, créant ainsi des greffons PBCA.

La technique de polymérisation en miniémulsion nous a donc permis de contrôler la taille des nanoparticules de PBCA, le taux de recouvrement en polymère amphiphile et l'épaisseur de la couche adsorbée. En parallèle, nous avons cherché à contrôler les propriétés du cœur de la nanoparticule et en particulier la masse molaire du polymère le constituant. En effet, celle-ci dépend fortement du mode de polymérisation choisi, anionique ou radicalaire.

La conversion en BCA a été suivie dans différentes conditions par RMN du ¹H. Les résultats montrent que la polymérisation en miniémulsion est logiquement plus rapide que la polymérisation en émulsion. Une diminution du pH permet d'en ralentir la cinétique. Par ailleurs, la polymérisation radicalaire est plus rapide que la polymérisation anionique. Toutefois, nous ne sommes pas en mesure de stopper totalement la polymérisation anionique.

La masse molaire a quant à elle été suivie par SEC-MALLS dans le THF acidifié. Comme attendu, la distribution des masses molaires continue d'évoluer, dans le cas de la polymérisation anionique, même lorsque la conversion atteint 100%. Dans tous les cas, deux populations sont obtenues. Leur proportion varie en fonction du pH du milieu et du mode de polymérisation. La voie radicalaire favorise les fortes masses molaires alors qu'une diminution du pH favorise les faibles masses molaires.

Ce contrôle des masses molaires du polymère constituant le cœur des nanoparticules nous a permis de vérifier si cette masse molaire avait une influence sur la cinétique de libération d'une molécule encapsulée. Nous avons choisi de travailler avec une molécule modèle, le pyrène. Ce composé très hydrophobe est chimiquement inerte et ne peut pas réagir

avec le monomère pendant la polymérisation pour créer des liaisons covalentes matrice-pyrène.

Le taux d'encapsulation du pyrène a été déterminé par spectroscopie UV/visible dans le THF. Des taux très élevés (>95%) ont été obtenus. Après optimisation des conditions de suivi, la libération du pyrène dans un mélange tampon à pH 7,4 contenant 30% (v/v) en volume d'éthanol absolu, a été suivie au cours du temps. Les résultats obtenus montrent que la masse molaire du PBCA constituant le cœur de la nanoparticule a une influence sur la cinétique de libération du pyrène. Ces résultats préliminaires demandent toutefois confirmation.

En conclusion, cette étude nous a permis de mieux appréhender les facteurs influençant les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules. La nature et la concentration du polymère amphiphile dans la phase aqueuse lors de la polymérisation en miniémulsion, contrôlent la taille des particules, leur taux de recouvrement et l'épaisseur de la couche hydrophile à leur surface. La masse molaire du polymère constituant le cœur de la nanoparticule est quant à elle influencée par le pH de la phase continue et le mode de polymérisation (anionique ou radicalaire).

L'influence de ces divers facteurs sur l'encapsulation d'une molécule modèle et sa libération n'a été qu'abordée, faute de temps. Ce point reste donc à traiter en détail. L'utilisation d'une molécule modèle, inerte chimiquement, doit permettre d'étudier de manière systématique, l'influence de la masse molaire du cœur de la nanoparticule ou des propriétés de la couche hydrophile en s'affranchissant de l'influence d'éventuelles réactions entre la molécule encapsulée et la matrice polymère. Toutefois, ce n'est qu'une étape et des molécules biologiquement actives devront être testées.

Enfin, à l'avenir nous envisageons d'aborder des tests biologiques pour déterminer entre autres les facteurs influençant le devenir *in vivo* des nanoparticules. On sait que dans ce domaine, la route est longue, mais le laboratoire travaille depuis longtemps en collaboration avec plusieurs équipes de biologistes et de pharmacologues qui pourront apporter leurs compétences au bon déroulement de ces évaluations biologiques.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Christine VAUTHIER, Directeur de Recherche, Université Paris XI, LPCPB, Châtenay-Malabry

Monsieur François GANACHAUD, Chargé de Recherche, ENSCM, LCM, Montpellier

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame WU Man

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Synthèse de nanoparticules à propriétés de surface contrôlées par polymérisation en miniémulsion pour la vectorisation de molécules actives"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie des procédés et des produits** »

Fait à Vandoeuvre, le 27 novembre 2007

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANCEUVRE CEDEX