



HAL
open science

Nanoparticules photosensibles pour un traitement anticancéreux plus efficace

Meriem El Founi

► **To cite this version:**

Meriem El Founi. Nanoparticules photosensibles pour un traitement anticancéreux plus efficace. Génie des procédés. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0325 . tel-02141623

HAL Id: tel-02141623

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02141623>

Submitted on 11 Dec 2020

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>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**



THESE

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des Procédés, des Produits et des Molécules

Par

Meriem EL FOUNI

**Nanoparticules photosensibles pour un traitement
anticancéreux plus efficace**

Soutenance publique le 5 décembre 2018 devant le jury constitué de :

Mme Valérie HÉROGUEZ	Directeur de recherche CNRS, Bordeaux	Présidente
Mme Catherine LADAVIÈRE	Directeur de recherche CNRS, Lyon	Rapporteur
M. Hamed LAROUÏ	Assistant Professor, Georgia State University, USA	Rapporteur
Mme Valérie LANGLOIS	Professeur, Université de Paris Est Créteil	Examineur
Mme Isabelle CHEVALOT	Professeur, Université de Lorraine	Examineur
M. Samir ACHERAR	Maître de Conférences, Université de Lorraine	Examineur
M. Jean-luc SIX	Professeur, Université de Lorraine	Directeur de thèse
M. Jérôme BABIN	Maître de Conférences, Université de Lorraine	Invité
M. Régis VANDERESSE	Chargé de recherche CNRS, Nancy	Invité

1 rue Grandville, BP 20451, 54001 Nancy Cedex

Remerciements

*Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire. Je remercie en premier lieu Monsieur **Alain Durand**, Directeur du laboratoire et Professeur à l'Université de Lorraine de m'y avoir accueilli.*

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce mémoire et de m'avoir délivré le titre de docteur.

*Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de thèse, Monsieur **Jean-Luc Six**, Professeur à l'Université de Lorraine pour m'avoir encadré au cours de ce doctorat, pour la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien ce travail, pour ses nombreux conseils qui m'ont permis d'aboutir à la réalisation de ce travail. Je tiens à exprimer ma gratitude à Jean-Luc qui m'avraiment pris sous son aile pendant près de 4 ans, sa porte toujours ouverte pour des discussions professionnelles, des échanges scientifiques mais aussi pour simplement parler de tout. J'ai vraiment eu immense plaisir à travailler avec toi. Je pense que si j'ai vécu cette thèse de manière « presque » sereine, c'est en grande partie grâce à toi. Cette thèse te doit beaucoup. Et pour tout cela je te dis un très grand merci.*

*J'adresse ensuite mes remerciements les plus sincères à **Régis Vandéresse**, **Samir Acherar** et **Jérôme Babin** pour les nombreux échanges scientifiques et pratiques qui ont enrichi ce travail et qui m'ont énormément apporté.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à Madame **Isabelle Chevalot**, Professeur à l'Université de Lorraine pour son aide précieuse sur la partie biologique. Isabelle, merci de m'avoir initié à la réalisation des tests biologiques. Je te remercie également pour tes conseils et ta disponibilité. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec toi.*

*Je présente aussi mes remerciements à Monsieur **Olivier Fabre** pour les analyses RMN, à Madame **Mathilde Achard** pour son aide précieuse pour la synthèse peptidique, à Madame **Caroline Sejil** pour les analyses par MDSC et Monsieur **Jean-Claude Sivault** pour son appui technique tout au long de ma thèse.*

*Je tiens à remercier particulièrement Madame **Nathalie Brenon** pour son aide administrative et sa bonne humeur.*

*J'exprime aussi ma reconnaissance à tous les membres du LCPM pour leur bienveillance, leur bonne humeur et l'excellente ambiance pendant ces trois années de thèse! Un grand merci à tous les permanents et doctorants pour les moments partagés ensembles. Une petite pensée particulière à **Khalid**, **Carole**, **Marie**, **Caroline**, et **Anne**.*

Je pense aussi à tous les doctorants, post-doctorants, stagiaires et tous ceux qui ne sont plus au LCPM aujourd'hui mais qui en ont fait partie: **Tanya, Albert, Audrey, Valentin, Xavier, Laura, Lupita, Natcha, Djallal, Ali, Marthe, Nessrine,**

J'adresse un grand merci à **Asma** ma copine de maternelle. Je te remercie pour tous les moments partagés ensemble. Je te remercie d'être toujours présente dans ma vie. Quand je t'appelle, tu m'écoutes. Quand j'ai besoin d'un avis, tu es toujours là pour me conseiller.

Je remercie également ma belle famille pour leur soutien et pour leur bienveillance : « **Teta Radhia** », **Amin, Amina, Ichraf, Sami, Dorra et Slim.** Je vous remercie pour votre soutien.

Enfin, je ne pourrais finir ces remerciements sans penser à ma famille dont l'affection, l'amour, le soutien et l'encouragement constants m'ont été d'un grand réconfort et ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Je tiens à remercier ma tante **Rafia** pour son amour inconditionnel et son soutien continu. Mes plus profonds remerciements vont à mes parents. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. **Mamma**, je tiens à te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Ta présence et tes encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. **Papa**, tu as été toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et ton perfectionnisme. Même si tu n'es plus parmi nous, j'espère que j'ai pu réaliser l'un de tes rêves. Aucune dédicace ne saurait t'exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. **Walid**, mon grand frère aucune dédicace ne peut exprimer la profondeur des sentiments fraternels et d'amour, d'attachement que j'éprouve à ton égard. **Malek**, une « petite » ou plutôt « grande » sœur comme on ne peut trouver nulle part ailleurs. Tu es précieuse dans mon cœur et ta présence est inestimable. Merci de toujours chercher des réponses cachées en moi. Je vous remercie tous, pour être là, à mes côtés!

En dernier lieu, je souhaiterais exprimer ma plus profonde reconnaissance à mon mari **Chedli** pour son soutien constant et pour tous les efforts fournis durant ces années. Depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler. Tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie et tu as été toujours à mes côtés pendant les moments les plus difficiles de ma vie. Je suis vraiment chanceuse de t'avoir à mes côtés. Enfin, je dédie cette thèse à mon rayon de soleil et ma raison de vivre, mon fils **Salim**.

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
D) LE CANCER COLORECTAL	7
1) Tumeurs cancéreuses du côlon ou du rectum	7
a) Tumeurs	7
b) Le côlon et le rectum	7
c) Cancer colorectal	8
2) Traitements du cancer colorectal	8
a) Chirurgie du cancer colorectal	9
b) Chimiothérapie	9
c) Radiothérapie	10
d) Chimioradiothérapie	10
e) Traitement ciblé	12
II) LA VECTORISATION POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS	13
1) Classification des principaux vecteurs	13
a) Liposomes	14
b) Dendrimères	16
c) Micelles	16
d) Nanocapsules	17
e) Nanoparticules	17
2) Évolution des vecteurs	18
a) Les vecteurs de 1 ^{ère} génération : les vecteurs hépatospléniques	18
b) Les vecteurs de 2 ^{ème} génération :	18
c) Les vecteurs de 3 ^{ème} génération :	21
3) Elaboration des nanoparticules	22
a) Préparation de nanoparticules par polymérisation de monomères	22

b)	Préparation de nanoparticules à partir de polymères préformés.....	27
III)	LIBERATION DES PRINCIPES ACTIFS	37
1)	Libération par diffusion (libération passive).....	38
2)	Libération stimulée d'un principe actif.....	39
a)	Température.....	40
b)	Champ magnétique	41
c)	pH	42
d)	Oxydo-réduction.....	44
e)	Lumière.....	44
f)	Systèmes multi-sensibles.....	58
IV)	CONCLUSION.....	61
V)	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	63
	PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION	79
	OBJECTIFS ET STRATEGIE DE SYNTHESE	81
	CHAPITRE I : SYNTHESSES ET CARACTERISATIONS DES POLYMERES	
	PRECURSEURS.....	85
I)	INTRODUCTION	87
II)	SYNTHESE DES DIFFERENTS PANB	87
1)	Généralités sur la SET-LRP.....	87
2)	Polymérisation de l'acrylate d' <i>o</i> -nitrobenzyle par SET-LRP	95
3)	Modification chimique de l'extrémité du PANB-Br	101
III)	SYNTHESE DU DERIVE DU DEXTRANE	103
1)	Généralités sur le dextrane.....	103
2)	Caractérisation par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).....	106
3)	Etude des propriétés tensioactives du DexAlcyne-15	107
IV)	SYNTHESE DES GLYCOPOLYMERES DEX-g-PANB	108
V)	CONCLUSION.....	112

VI)	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	114
CHAPITRE II : ELABORATION ET CARATERISATIONS DES NANOPARTICULES....		119
I)	INTRODUCTION	121
II)	ELABORATION DES NANOPARTICULES.....	122
1)	Nanoprécipitation.....	122
2)	Emulsion/évaporation de solvant organique.....	124
III)	CARACTERISATION DE LA COUCHE EXTERNE HYDROPHILE	126
1)	Mise en évidence du recouvrement hydrophile	127
2)	Détermination de l'épaisseur de la couche externe.....	128
3)	Détermination du taux de recouvrement en dextrane	129
IV)	STABILITE COLLOÏDALE DES NANOPARTICULES.....	131
1)	Stabilité colloïdale en fonction de la force ionique	132
2)	Stabilité du recouvrement en dextrane en présence d'un tensioactif compétitif	133
3)	Stabilité du recouvrement en présence du milieu de culture des cellules Caco-2 ...	135
V)	CONSERVATION DES NPS.....	137
VI)	DETERMINATION DE LA QUANTITE DU CUIVRE RESIDUEL.....	138
VII)	CARACTERE PHOTOSENSIBLE DES NPS	139
VIII)	CONCLUSION DU CHAPITRE	141
IX)	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	144
CHAPITRE III : ENCAPSULATION ET LIBERATION PHOTO-PROVOQUEE D'UNE SUBSTANCE ACTIVE A PARTIR DES NANOPARTICULES		145
I)	INTRODUCTION	147
II)	LA DOXORUBICINE.....	147
III)	ENCAPSUALTION DE LA DOX DANS LES NANOPARTICULES PHOTOSENSIBLES	148
1)	Encapsulation de la DOX dans les NPs	149
a)	Test de solubilité dans le solvant organique.....	149
b)	Stabilité de la DOX encapsulée dans le PANB	149

c)	Etude de l'encapsulation de la DOX dans les NPs	150
IV)	LIBERATION DE LA DOX	154
1)	Solubilité de la DOX dans les milieux de libération.....	155
2)	Libération par simple diffusion.....	156
3)	Libération provoquée par irradiation UV	158
V)	CONCLUSIONS DU CHAPITRE	161
VI)	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	163
CHAPITRE IV : POTENTIEL BIOLOGIQUE DES NANOPARTICULES		
PHOTOSENSIBLES		
165		
D)	INTRODUCTION	167
II)	ÉVALUATION DE LA BIOCOMPATIBILITÉ DES NANOPARTICULES	168
1)	Effet du tréhalose	168
2)	Evaluation de la cytotoxicité des nanoparticules vides.....	169
III)	ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE DES CELLULES CACO-2 A	
	L'IRRADIATION.....	171
1)	Irradiation des cellules Caco-2 seules.....	171
2)	Effet du changement du milieu de culture	173
3)	Irradiation des cellules Caco-2 en présence des NPs.....	174
IV)	LIBÉRATION <i>IN VITRO</i> DE LA DOXORUBCINE AU CONTACT DES	
	CELLULES CACO-2	175
1)	Détermination de l'IC ₅₀ de la DOX sur les cellules Caco-2	175
2)	Etude des différents types de NPs et de libération.....	176
V)	POST-FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES EN SURFACE	179
1)	Post-fonctionnalisation avec des ligands	180
2)	Post-fonctionnalisation avec un peptide de ciblage	181
3)	Evaluation de la cytotoxicité des ligands et du peptide de ciblage.....	184
4)	Libération <i>in vitro</i> de la DOX hors des NPs post-fonctionnalisées.....	184
VI)	CONCLUSION DU CHAPITRE	190

VII) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	192
PARTIE III : Matériels et méthodes	193
I) OBTENTION DES DIFFERENTS PANB.....	195
1) Synthèse du monomère (Acrylate d' <i>o</i> -nitrobenzyle).....	195
2) Polymérisation de l'acrylate d' <i>o</i> -nitrobenzyle par SET-LRP.....	197
3) Modifications chimiques du PANB-Br.....	198
a) 1ère stratégie : Modification du groupement bromure par le groupement azoture	198
b) 2ème stratégie : Modification du groupement bromure par la propargylamine	200
II) MODIFICATIONS CHIMIQUES DU DEXTRANE.....	201
1) 1ère stratégie : Synthèse du dérivé du dextrane « DexAlcyne- τ ».....	201
2) 2ème stratégie : Synthèse du dérivé « DexN ₃ - τ ».....	203
a) Synthèse de l'acide 6-azidohexanoïque :.....	204
b) Activation de l'acide 6-azidohexanoïque :.....	205
III) SYNTHÈSE DES GLYCOPOLYMERES DEX-G-PANB.....	208
IV) Elaboration des nanoparticules.....	210
1) Par nanoprécipitation.....	210
2) Par Émulsion/Évaporation de solvant organique.....	211
a) Cas des nanoparticules Clickées, chargées en Doxorubicine :.....	211
b) Cas des nanoparticules non-Clickées :.....	211
c) Cas des nanoparticules nues :.....	212
3) Stockage à l'état solide des NPs.....	212
4) Analyse par RMN ¹ H des NPs.....	212
V) TECHNIQUES DE CARACTÉRISATIONS.....	212
1) Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	212
2) Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).....	212
a) Cas du THF:.....	212

b)	Cas de DMSO + 0,1 M NaNO ₃ :	213
c)	Détermination de l'incrément d'indice de réfraction (dn/dC) :	213
3)	Propriétés tensioactives des dérivés du dextrane	214
4)	Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)	214
5)	Distribution de taille des nanoparticules (HPPS).....	214
a)	Principe de la mesure :	214
b)	Appareillage :	215
c)	Protocole opératoire :	216
6)	Détermination des taux de recouvrement en dextrane des particules	216
7)	Stabilité colloïdale des nanoparticules	217
a)	Stabilité colloïdale en fonction de la force ionique :	217
b)	Stabilité du recouvrement en dextrane en présence d'un tensioactif compétitif : 217	
c)	Stabilité du recouvrement en dextrane en présence du milieu de culture des cellules Caco-2 :	217
8)	Mesure de la mobilité électrophorétique (Détermination de l'épaisseur du recouvrement en dextrane).....	217
9)	Détermination de la quantité résiduelle de cuivre.....	219
10)	Caractère photosensible des nanoparticules	220
VI)	ENCAPSULATION ET LIBERATION DE LA DOXORUBICINE DES NANOPARTICULES.....	220
1)	Encapsulation de la Doxorubicine dans les NPs:.....	220
2)	Libération de la Doxorubicine	224
a)	Solubilités maximales.....	224
b)	Libération de Doxorubicine par simple diffusion.....	225
c)	Libération de Doxorubicine par irradiation UV :	226
VII)	POTENTIEL BIOLOGIQUE DES NANOPARTICULES	226
1)	Culture cellulaire.....	226

2)	Évaluation de la viabilité cellulaire.....	227
a)	Évaluation de la biocompatibilité des nanoparticules	228
b)	Étude de la résistance des cellules aux irradiations UV	228
c)	Analyses statistiques.....	229
VIII)	POST-FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES.....	229
1)	Post-fonctionnalisation des nanoparticules avec l'acide folique	229
a)	Fonctionnalisation de l'acide folique par un bras azoture(AF-N3).....	229
b)	Post-fonctionnalisation des nanoparticules avec l'acide folique.....	232
2)	Post-fonctionnalisation des nanoparticules avec un peptide de ciblage.....	233
a)	Synthèse du peptide ETTCASLCYP-résine 2-chlorotriyl	233
b)	Synthèse du dérivé Azidohexyl-Leu-OH	235
c)	Couplage de l'azidohexyl-Leu-OH et ETTCASLCYP-résine 2-chlorotriyl....	238
d)	Post-fonctionnalisation des nanoparticules avec l'azidohexyl-LETTCASLCYP-OH	242
3)	Post-fonctionnalisation des nanoparticules avec l'azoture de α -D-Mannopyranosyle	243
IX)	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	245
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	247
	LISTE DES TABLEAUX	255
	LISTE DES FIGURES	257

LISTE DES ABREVIATIONS

A

AAsc : Acide ascorbique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF : Acide folique

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AGET : Activateur généré par transfert d'électron

AIBN : Azobisisobutyronitrile

ANB : Acrylate d'*o*-nitrobenzyle

ARGET : Activateur régénéré par transfert d'électron

ARN : Acideribonucléique

ATRP : Atom Transfer Radical Polymerization

B

BPy : 2,2'-Bipyridine

BSA : Albumine de sérum bovin

C

CCM : Chromatographie sur couche mince

CDI : Carbonyldiimidazole

CMC : Concentration micellaire critique

CuAAC : Cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu (I)

D

D : Coefficient de diffusion du principe actif dans le polymère constituant l'objet (m^2/s)

Đ : Dispersité

D_{AB} : Coefficient de diffusion (cm^2s^{-1})

DCC : *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimide

Dex : Dextrane

DexAlcyne- τ : Dextrane modifié par des chaînes latérales hydrophobes fonctionnalisées à leur extrémité par un groupement alcyne

DexC₆- τ : Dextrane hydrophobisé par des chaînes alkyles en C₆

Dex-g-PANB :Dextrane-g-poly(acrylate d'*o*-nitrobenzyle)
Dex-g-PPMA : Dextraneg-g-poly(métacrylate de 2-hydroxypropyle)
DexP- τ : Dextrane modifié par des groupements phényle
Dex-FITC : Dextrane-Fluoresceinisothiocyanate
DIEA : Diisopropyléthylamine
DJA : Dose journalière admissible
DLS : Diffusion dynamique de la lumière
DMAC : Diméthylacétamide
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF : *N,N*-Diméthylformamide
DMPA : 4,4-Diméthylamino pyridine
DMSO : Diméthylsulfoxyde
dn/dc : Incrément d'indice de réfraction
DO : Densité optique
DOX : Doxorubicine
DOX,HCl : Doxorubicine chlorhydrate
dRI : Réfractomètre différentiel

E

E : Charge élémentaire de l'électron ($1,6022 \times 10^{-19}$ C)
E/H : Interface Eau/Huile
EBiB : 2-bromoisobutyrate d'éthyle
EC : Ethylène carbonate
EDTA : Ethylènediaminetétraacétique
EE : Efficacité d'encapsulation
EPR : Enhanced Permeability and Retention

F

F_{PANB}:Fraction massique de poly(acrylate d'*o*-nitrobenzyle)
FTIR : Infrarouge à Transformée de Fourier

G

GUV : Giant Unilamellar Vesicles

H

H/E : Interface Huile/Eau

HBTU : Hexafluorophosphate de (1H-benzotriazol-1-yloxy)(diméthylamino)-*N,N*-diméthylméthaniminium)

HDD : Haut débit de dose

HLB : Balance hydrophile-hydrophobe

HMTETA 1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylène tétraamine

HOBt : Hydroxybenzotriazole

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HPPS : High Performance Particle Sizer

I

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

ICAR : Amorceur pour la régénération continue de l'activateur

ICP-OES : Spectrométrie par torche à plasma

K

k_B : Constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)

k_H : Longueur de Debye-Hückel

L

L : Ligand

LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse

LCST : Low Critical Solubility Temperature

LS : Light Scattering

LUV : Large Unilamellar Vesicles

M

M_∞ : Quantité de principe actif totale encapsulée (g)

Man : Mannose

Man-N₃ : Azoture de α-D-Mannopyranosyle

MBP : 2-Bromopropionate de méthyle

M_{Dextrane} : Masse molaire de l'unité monomère du dextrane

Me₆TREN : Tris[2-(diméthylamino)éthyl]amine

MET : Microscopie Electronique en Transmission

MMA : Méthacrylate de méthyle

M_{PANB} : Masse molaire de l'unité monomère du PANB

mPEG-*b*-poly(Tyr)-*g*-NB : Poly(éthylène glycol)-*b*-poly(α -hydroxy acide)-*g*-(*o*-nitrobenzyle)

MTT : Méthylthiazoltétrazolium

N

NB : *o*-Nitrobenzyle

NMM : *N*-méthylmorpholine

NMP : NitroxideMediatedPolymerization

NPs : Nanoparticules

P

PA : Principe actif

PAA : Poly(acide acrylique)

PADEGChol : Poly(acrylate de diéthylène glycol cholestéryle)

PAH : Poly(allylamine)

PANB : Poly(acrylate d'*o*-nitrobenzyle)

PBS : Tampon phosphate salin

PC : Propylène carbonate

PCL : Poly(ϵ -caprolactone)

PCL-*b*-PDEAEMA-*b*-PPEGMA : Poly(ϵ -caprolactone)-*b*-poly(2-(diéthylamino)éthylméthacrylate)-*b*-poly(méthacrylate de(poly(éthylène glycol) méthyl éther))

PDEAA : Poly(*N,N*-diéthylacrylamide)

Pdi : Indice de polydispersité

PDMA : Poly(méthacrylate de (2-(diméthylamino)éthyle))

PDPA : Poly(méthacrylate de (2-(diisopropylamino)éthyle))

PEG : Poly(éthylène glycol)

PEI : Polyéthylènimine

PEO : Poly(oxyde d'éthylène)

PEO-*b*-P(DEAEMA-co-PPHMA) : Poly(oxyde d'éthylène)-*b*-polyméthacrylate de (2-(diéthylamino)éthyle-*co*-6-méthacrylate de (4-phénylazo phénoxy)hexyle)

PEO-*b*-PMABC : Poly(éthylène oxyde)-*b*-poly(N-méthacryloyl-N'-(t-butyloxycarbonyl) cystamine)

Peptide-N₃ :Peptideazidohexyl-LETTCASLCYP-OH

PISA : Polymerization Induced Self-Assembly

PLA : Poly(acidelactique)

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

P_m^{*} :Macroradicale

PMDETA :*N,N,N',N',N''*-pentaméthyl-diéthylène-triamine

PMPC : Poly(2-(méthacryloyloxy) éthylphosphorycholine)

P_m-X : Chaîne dormante

PNMB : Poly(méthacrylate d'*o*-nitrobenzyle)

POE-*b*-PNBOC : Poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(méthacrylate d'*o*-nitrobenzyloxycarbonylaminoéthyle)

Poly(MMA-*co*-DEAEMA) : Poly((méthacrylate de méthyle)-*co*-(méthacrylate de diméthylaminoéthyle))

Pr-PMI : *N-n*-propyl-2-pyridyl-méthanimine

PS : Poly(styrène)

PS-*b*-PEO : Poly(styrène)-*b*-poly(oxyde d'éthylène)

PVA : Poly(alcool vinylique)

R

R^{*} : Espèce radicalaire active

RAFT : Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaînes réversible par addition fragmentation

RMN : Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire

S

SARA : Activateurs supplémentaires et agents de réduction

SDS : Dodécyl Sulfate de Sodium

SEC-MALLS : Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière multi-angles

SET-LRP : Single-Electron Transfer Living Radical Polymerization

SOP : Procédure Opératoire Standardisée

SUV : Small Unilamellar Vesicle

T

t BA : Acrylate de t -butyle

TFA : Acide trifluoroacétique

TFE : 2,2,2-trifluoroéthanol

THF : Tétrahydrofurane

Tr/min : Tour/minute

TREN : Tris(2-aminoethyl)amine

U

UCST : Upper Critical Solubility Temperature

W

W_{DOX} : Fraction massique de DOX introduite initialement dans la phase organique

X

X : Conversion

Z

Z : Valence de l'ion considéré dans le milieu salin

Autres

ζ : Potentiel Zêta

η : Viscosité du milieu dispersant

Ψ_0 : Potentiel de surface de la particule

\bar{M}_n : Masse molaire moyenne en nombre

$\bar{M}_{n\ th}$: Masse molaire théorique

\bar{M}_w : Masse molaire moyenne en masse

Δ_{pZ} : Epaisseur de la couche externe.

k_p^{app} : Constante apparente de vitesse de propagation

γ_i^0 : Tension interfaciale entre les deux solvants purs

τ_{charge} : Taux de charge

ΔP : pression à l'interface Huile/Eau

$|n|$: Valeur absolue de la pente de la courbe $\log(DO)$ vs $\log(\lambda)$

μ_E : Mobilité électrophorétique

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Tout comme les États-Unis, l'Australie, le Japon et d'autres pays d'Europe de l'ouest, la France fait partie des pays dans lesquels le risque de cancer du côlon-rectum est élevé. Selon l'Institut National du Cancer, 44 800 nouveaux cas de cancer colorectal ont en effet été diagnostiqués en 2017 en France. Durant la même année, ce cancer a conduit au décès de 9300 hommes et 8400 femmes, ce qui est en fait le deuxième le plus meurtrier (12 % de décès), et se situe tous sexes confondus, au troisième rang des cancers les plus fréquents. Il est le deuxième chez les femmes après le cancer du sein et le troisième chez les hommes après ceux de la prostate et du poumon. Il survient en majorité chez les personnes âgées de 50 ans et plus et comme beaucoup de cancers, les chances de guérison dépendent de son stade d'évolution.

La chimiothérapie fait partie des traitements les plus prescrits dans le cas du cancer colorectal, mais les principes actifs (PAs) chimiothérapeutiques utilisés sont des anticancéreux présentant des effets secondaires importants et se révélant souvent toxiques. En effet, malgré la grande gamme d'anticancéreux disponibles, l'efficacité de la plupart d'entre eux est limitée par manque de spécificité (répartition dans tout l'organisme), d'où une certaine toxicité et l'apparition d'effets secondaires. De plus, certains de ces PAs traversent difficilement les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site à traiter. D'autres sont dégradés plus ou moins rapidement par voie chimique ou enzymatique après leur administration dans l'organisme. Beaucoup de recherches ont donc été menées pour proposer des solutions innovantes permettant de pallier ce problème. Parmi celles-ci, on peut citer la vectorisation de principes actifs *via* des nanovecteurs qui permettent d'incorporer des anticancéreux même très hydrophobes, d'éviter leur précipitation dans les fluides corporels tout en les protégeant, de les acheminer jusqu'au site à traiter, d'améliorer leur biodisponibilité en contrôlant leur distribution spatiale et temporelle, et de contrôler leur libération. Depuis plusieurs années, le Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM) développe des nanovecteurs polymères recouverts de polysaccharide neutre et hydrophile destinés à encapsuler puis libérer des PAs d'intérêt pharmaceutique ou environnemental. Dans ce cadre, l'objectif de cette thèse était de produire des nanoparticules (NPs) permettant la vectorisation et la libération contrôlée de la Doxorubicine (DOX, anticancéreux) par simple irradiation. Ces NPs ont été formulées à l'aide de matériaux biocompatibles et présentent un cœur photosensible. Elles ont été fonctionnalisées par des ligands ou peptides de ciblage afin de cibler spécifiquement les cellules du cancer colorectal. A cet effet, des cellules tumorales épithéliales isolées d'un

adénocarcinome de côlon humain (appelées cellules Caco-2) ont été sélectionnées pour effectuer les tests *in vitro* et ainsi évaluer le potentiel biologique de ces NPs.

Le challenge de cette thèse a tout d'abord été centré sur la polymérisation radicalaire contrôlée d'un monomère photosensible (l'acrylate d'*o*-nitrobenzyle, ANB) dont le polymère (le poly(acrylate d'*o*-nitrobenzyle), PANB) constituera le cœur photosensible des NPs. L'élaboration de ces NPs et l'étude de leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que l'évaluation de leur potentiel biomédical a constitué la deuxième phase de cette thèse. L'encapsulation de la DOX dans ces NPs et sa libération photo-induite par irradiation UV ont fait l'objet de la troisième partie de cette thèse. Finalement, la dernière partie de ce travail a été consacrée à la post-modification de la surface des NPs par un ligand (peptide ou molécules spécifiques) permettant un ciblage plus précis des cellules Caco-2.

La première partie de ce manuscrit est entièrement consacrée à une étude bibliographique focalisée sur trois grands thèmes. Dans un premier temps, les différentes tumeurs cancéreuses du cancer colorectal et les traitements proposés seront décrits. Dans un deuxième temps, les différents types de nanovecteurs, et plus particulièrement de NPs, ainsi que leurs procédés d'élaboration seront exposés. Enfin, la dernière partie de cette étude bibliographique sera dédiée aux différents *stimuli* qui peuvent être employés pour provoquer la libération d'un PA initialement encapsulé dans le nanovecteur. En lien avec le sujet de cette thèse, les NPs photosensibles recevront une attention plus particulière.

Après avoir rapidement explicité la stratégie de synthèse qui sera employée pour obtenir les NPs envisagées, la deuxième partie de ce document sera divisée en cinq chapitres.

Un 1^{er} chapitre sera consacré à la synthèse du polymère PANB photosensible par SET-LRP, (Single Electron Transfert-Living Radical Polymerization) puis à la modification chimique du dextrane. Ce polysaccharide naturel modifié sera ensuite employé comme tensioactif lors de l'élaboration des NPs.

Dans le 2^{ème} chapitre, différents procédés d'élaboration des NPs seront évalués. Les différentes techniques de caractérisation des NPs en termes de taille, de recouvrement en dextrane, de stabilité colloïdale ainsi que la mise en évidence du caractère photosensible des NPs seront abordées dans ce chapitre.

Le 3^{ème} chapitre sera dédié au potentiel biologique des NPs. Leur biocompatibilité sera la première caractéristique vérifiée. L'étude de la résistance des cellules Caco-2 aux irradiations UV sera également étudiée.

Le 4^{ème} chapitre concernera l'étude de l'encapsulation de la DOX au sein des NPs. Les conditions expérimentales seront adaptées pour maximiser les doses de DOX

encapsulée. Les NPs chargées de DOX seront caractérisées en terme de taille et l'efficacité d'encapsulation sera évaluée. Les cinétiques de libération de la DOX hors des NPs seront suivies par simple diffusion, ou sous l'effet de l'irradiation UV.

Le 5^{ème} chapitre sera quant à lui consacré à la post-fonctionnalisation de la surface des NPs par un ligand (peptide ou molécules spécifiques) afin d'optimiser en terme de ciblage le traitement envisagé dans le cadre de cette thèse. Les premiers tests biologiques de ces NPs post-fonctionnalisées sur le traitement du cancer colorectal feront également l'objet de ce dernier chapitre.

Les protocoles expérimentaux et techniques utilisés lors de cette thèse seront présentés en troisième partie du manuscrit.

Enfin, une conclusion générale reprenant les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse et une énumération de plusieurs perspectives de travail clôtureront le manuscrit.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les différents cancers colorectaux seront abordés dans une première partie de cette étude bibliographique et les traitements actuellement proposés seront également présentés. La deuxième partie de cette étude a pour objectif de réaliser un tour d'horizon sur la vectorisation d'anticancéreux. L'évolution des vecteurs au cours des années de recherche, les différents types de nanoparticules (NPs) et les méthodes employées pour les élaborer seront décrits. Enfin, dans une troisième et dernière partie, cette étude bibliographique sera focalisée sur les modes de libération d'un principe actif (PA) encapsulé au sein des NPs.

Ainsi, la libération par simple diffusion sera tout d'abord exposée, puis la libération provoquée par un stimulus sera approfondie, avec une attention particulière pour une libération photo-déclenchée.

Afin de faciliter la lecture de ce chapitre, un glossaire de termes médicaux et pharmaceutiques est donné au début du manuscrit.

I) LE CANCER COLORECTAL

1) Tumeurs cancéreuses du côlon ou du rectum

a) Tumeurs

Une tumeur est une masse plus ou moins volumineuse provoquée par la multiplication anormale des cellules. Elle peut être bénigne (non cancéreuse) ou maligne (cancéreuse), et ces deux types de tumeurs ont alors des caractéristiques différentes. Les tumeurs bénignes ont des contours bien délimités, ont une croissance lente et restent localisées dans le tissu ou l'organe dans lequel elles sont apparues. Au contraire, les tumeurs malignes présentent diverses anomalies par rapport aux cellules normales : forme et taille différentes, contours irréguliers... On parle alors de cellules indifférenciées car elles ont perdu leurs caractéristiques d'origine. Ces cellules cancéreuses ont une croissance rapide et ont tendance à envahir les tissus voisins. Elles peuvent s'échapper de la tumeur primitive et coloniser une autre région du corps pour y former une nouvelle tumeur qu'on appelle tumeur secondaire ou métastase.

b) Le côlon et le rectum

L'intestin est divisé en intestin grêle et en gros intestin dont le côlon et le rectum font partie. Le côlon, situé entre le caecum et le rectum, est un tube en forme de U pouvant mesurer 1,5 m de long pour 8 cm de diamètre. Il est constitué de muscles et se localise sous l'estomac. Il absorbe l'eau et les éléments nutritifs et achemine les résidus (selles ou

matières fécales) jusqu'au rectum (Figure 1).

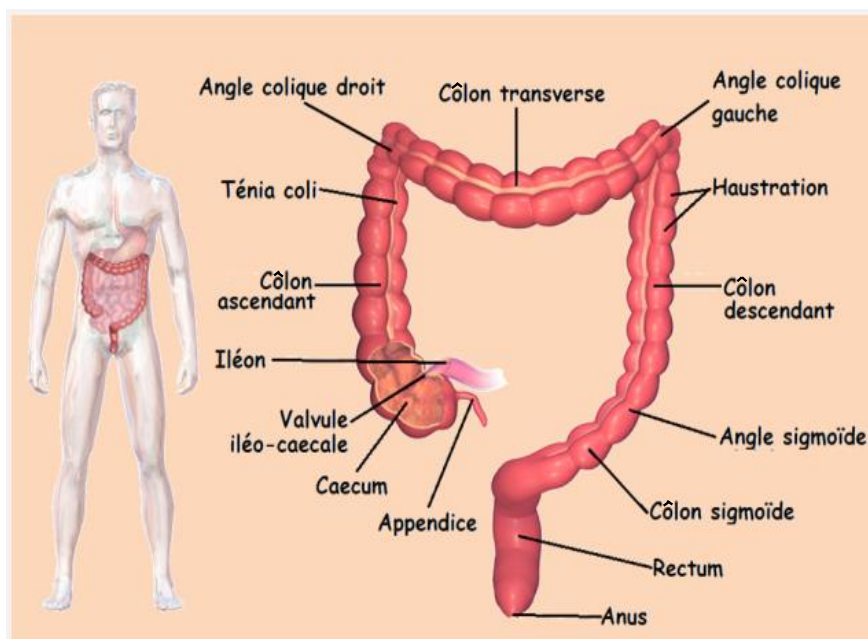


Figure 1 : Localisation du côlon et du rectum dans l'appareil digestif et descriptif du gros intestin

Le côlon et le rectum sont composés de différentes couches de tissus tels que : *la muqueuse* (revêtement interne du côlon et du rectum), *la sous-muqueuse* (couche de tissu conjonctif qui entoure la muqueuse et qui est constituée de glandes muqueuses, de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et de nerfs), *la musculieuse* (située au-dessus de la sous-muqueuse) est une couche épaisse de muscles et *la séreuse* (couche externe du côlon)¹.

c) Cancer colorectal

Le cancer colorectal est une tumeur maligne qui affecte certaines cellules du côlon ou du rectum. Il apparaît le plus souvent dans les cellules glandulaires qui tapissent la muqueuse du côlon ou du rectum et qui produisent du mucus favorisant le déplacement des selles. Ce type de cancer est appelé adénocarcinome du côlon ou du rectum ². Selon l'Institut National du Cancer, l'adénocarcinome est le type le plus courant du cancer colorectal et représente plus de 90 % des cas.

Parmi les autres cancers colorectaux on peut citer : le carcinome à petites cellules, le carcinome épidermoïde, le carcinome adénoquameux, le carcinome médullaire, les tumeurs neuroendocrines et le lymphome non hodgkinien.

2) Traitements du cancer colorectal

Différents types de traitements peuvent être proposés aux patients atteints du cancer colorectal : la chirurgie, la radiothérapie (particulièrement pour les cancers du rectum), la

chimiothérapie et les thérapies ciblées.

a) Chirurgie du cancer colorectal

La chirurgie est le traitement principal de la plupart des cancers colorectaux. Elle est pratiquée pour enlever complètement la tumeur et les ganglions lymphatiques voisins, ou bien pour enlever la plus grande partie possible de la tumeur (réduction tumorale) avant d'administrer d'autres traitements. Selon le stade et l'emplacement de la tumeur, il existe deux types de chirurgie :

- **L'excision locale** ou résection locale qui permet d'enlever un polype ou une tumeur de stade précoce sur la surface du revêtement du côlon ou du rectum (tumeur superficielle).
- **La résection intestinale** (chirurgie la plus courante du cancer colorectal) qui consiste à enlever une partie de l'intestin et les ganglions lymphatiques voisins.

La chirurgie du cancer colorectal peut cependant avoir plusieurs effets secondaires qui dépendent non seulement du type de chirurgie et de la longueur du segment de l'intestin retiré, mais aussi de l'état de santé global du patient. Parmi ces effets secondaires, on peut citer: douleurs, saignements, diarrhées, constipation, et dommages aux organes voisins.

b) Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement courant du cancer colorectal. Elle consiste à administrer des médicaments anticancéreux ou cytotoxiques (Tableau 1) pour détruire les cellules cancéreuses, les empêcher de se multiplier ou pour réduire la taille de la tumeur avant ou après une chirurgie. La chimiothérapie peut causer des effets secondaires puisqu'elle risque d'endommager les cellules saines, tout en détruisant les cellules cancéreuses. Les effets secondaires peuvent se manifester tout de suite après l'administration ou après quelques jours, quelques semaines voire des mois ou des années après la chimiothérapie (effets tardifs). Les effets secondaires dépendent surtout du PA (PA) ou de l'association médicamenteuse administrée, de la dose et du mode d'administration. Il existe plusieurs effets secondaires de la chimiothérapie du cancer colorectal comme l'aplasie médullaire (réduction du nombre des cellules sanguines telles que les globules blancs, les plaquettes, les globules rouges), la diarrhée, la perte de poils et cheveux, les nausées et vomissements, et surtout des attaques du système nerveux et du foie (le foie décompose de nombreux agents chimiothérapeutiques mais la capécitabine (Xeloda®) et l'oxaliplatine (Eloxatin®) sont par exemple susceptibles de provoquer des dommages au foie).

c) Radiothérapie

La radiothérapie externe est la radiothérapie la plus courante. On a alors recours à des rayons ou des particules de haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses. Dans le cas d'un cancer colorectal, la radiothérapie externe est réalisée avant une chirurgie (radiothérapie néoadjuvante) afin d'affaiblir la tumeur pour faciliter son retrait et diminuer le risque de réapparition du cancer au niveau du bassin.

La radiothérapie interne ou curiethérapie est quant à elle réalisée à l'aide d'une substance radioactive appelée radio-isotope insérée directement dans la tumeur ou dans son voisinage. La substance radioactive est contenue dans un applicateur spécial ou un cathéter, ce qui permet au médecin de glisser la substance dans le rectum, près de la tumeur (curiethérapie endorectale). Pour le cancer du rectum, on administre habituellement une curiethérapie à haut débit de dose (HDD, dose élevée de radiation pendant un très court laps de temps). Une fois la radiation administrée, l'applicateur ou le cathéter est enlevé. La curiethérapie endorectale engendre habituellement moins d'effets secondaires et de complications à long terme que la radiothérapie externe.

La radiothérapie du cancer colorectal peut cependant causer plusieurs effets secondaires. Parmi eux on peut citer des troubles intestinaux, des nausées et vomissements, des fractures du bassin et des cancers secondaires.

d) Chimioradiothérapie

La chimioradiothérapie est un traitement qui associe la chimiothérapie à la radiothérapie. Dans ce cas, la chimiothérapie et la radiothérapie sont administrées pendant la même période. Certains types de chimiothérapie rendent la radiothérapie plus efficace. Les agents chimiothérapeutiques les plus utilisés dans ce traitement sont le 5-fluorouracil ou la capécitabine (Tableau 1).

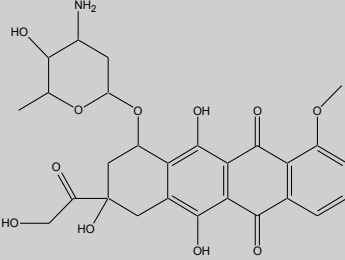
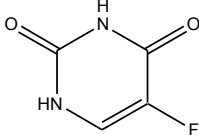
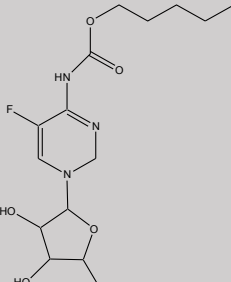
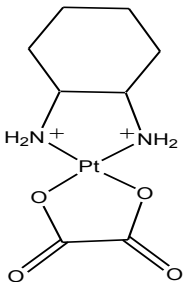
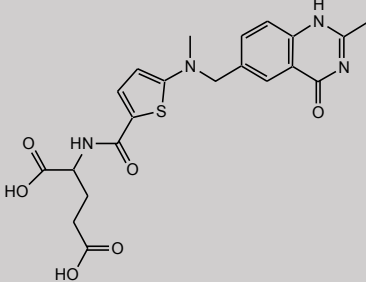
<i>Agent chimiothérapeutique</i>	<i>Noms des médicaments commercialisés (®)</i>	<i>Mode d'administration</i>	<i>Effets secondaires</i>
<p>Doxorubicine</p> 	<p>Caelyx Adriblastin Myocet</p>	<p>Voie intraveineuse Voie intravésicale</p>	<p>Affections gastro-intestinales (diarrhées, nausées, vomissements), changements au niveau de la peau et des ongles, chute des cheveux et perte d'appétit.</p>
<p>5-Fluorouracil</p> 	<p>Adrucil Fluracil</p>	<p>Voie intraveineuse</p>	<p>Effets toxiques sur la moelle osseuse, le foie, les tissus cardiaques et le tube digestif.</p>
	<p>Efudex Fluoroplex</p>	<p>Voie cutanée</p>	
<p>Capécitabine</p> 	<p>Xeloda Ecansya</p>	<p>Voie orale</p>	<p>Affections gastro-intestinales (diarrhées, nausées, vomissements), douleurs abdominales, éruption cutanée, sécheresse ou démangeaisons de la peau, fatigue et perte d'appétit.</p>
<p>Oxaliplatine</p> 	<p>Eloxatin</p>	<p>Voie intraveineuse</p>	<p>Saignement, douleur à la gorge et température élevée, diarrhée, vomissements persistants ou sévères, troubles respiratoires, extrême fatigue avec diminution du nombre de globules rouges, bleus anormaux (thrombopénie), maladie du rein (peu ou pas d'urine).</p>
<p>Raltitrexed</p> 	<p>Tomudex</p>	<p>Voie intraveineuse</p>	<p>Diarrhées, vomissements, fièvre ou frissons, infections, douleur ou ulcération de la muqueuse buccale, fatigue, perte d'appétit, nausées, maux d'estomac (douleurs abdominales), constipation et éruptions cutanées.</p>

Tableau 1 : Agents chimiothérapeutiques utilisés pour le traitement du cancer colorectal

e) **Traitement ciblé**

Les traitements ciblés (Tableau 2) du cancer colorectal sont réalisés à l'aide de médicaments pouvant cibler spécifiquement des récepteurs comme les protéines présentes à la surface des cellules cancéreuses. Ces récepteurs contribuent à l'envoi de signaux qui indiquent aux cellules cancéreuses de se diviser. En ciblant ces récepteurs, ces médicaments interrompent la croissance et la propagation des cellules cancéreuses, tout en limitant les effets secondaires subits par les cellules normales. En effet, le traitement ciblé n'endommage habituellement pas ou peu les cellules saines. Il a tendance à engendrer des effets secondaires moins nombreux et moins graves que la chimiothérapie et la radiothérapie. Le traitement ciblé peut avoir plusieurs objectifs tels que la destruction des cellules du cancer colorectal, le ralentissement de leur évolution ou le soulagement de la douleur.

Tableau 2 : Traitements ciblés pour le traitement du cancer colorectal

<i>Noms des médicaments ciblés (®)</i>	<i>Mode d'action</i>	<i>Mode d'administration</i>	<i>Réf.</i>
<i>Bévacizumab (Avastin)</i>	Anticorps monoclonal ciblant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Le VEGF aide les cellules cancéreuses à former de nouveaux vaisseaux sanguins permettant l'apport d'oxygène et des éléments nutritifs vers la tumeur.	Voie intraveineuse	3
<i>Cétuximab (Erbix)</i>	Anticorps monoclonal ciblant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) présent à la surface des cellules cancéreuses. Le EGFR émet des signaux vers ces cellules qui leur permettent de croître et de se diviser.	Voie intraveineuse	4
<i>Panitumumab (Vectibix)</i>			5
<i>Régorafénib (Stivarga)</i>	Inhibiteur de kinases (protéines présentes à la surface des cellules) qui envoient des signaux aux cellules cancéreuses pour les faire croître ou former de nouveaux vaisseaux sanguins.	Voie orale	6
<i>Aflibercept (Zaltrap)</i>	Protéine ciblant le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) à la surface des cellules cancéreuses, ce qui empêche la croissance des néovaisseaux irriguant la tumeur.	Voie intraveineuse	7

II) LA VECTORISATION POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS

La vectorisation a été imaginée à la fin du 19^{ème} siècle avec la théorie de la « balle magique » (Magic bullet) par le médecin allemand Paul Ehrlich ⁸. Cette « balle » était capable de transporter des PAs à l'intérieur du corps humain jusqu'à leur cible. Dans les années 1970, la vectorisation a été réellement utilisée en encapsulant un PA au sein de liposomes, puis de systèmes colloïdaux à base de polymères synthétiques ou naturels. Ces vecteurs transportent un PA vers la cible à traiter, ce qui permet d'éviter l'administration directe des médicaments dans le corps humain. La vectorisation augmente ainsi la biodisponibilité des médicaments (rapport entre la quantité du PA administré et celle présente au niveau de la cible), limite la dégradation de PAs pendant leur parcours et réduit la toxicité de certains médicaments très actifs grâce à une libération contrôlée spatialement, temporellement et quantitativement dans le corps humain ⁹. Les vecteurs injectés doivent cependant répondre à un certain nombre de critères. Ils doivent être biocompatibles et ne pas présenter aucune toxicité pour l'organisme. Ils doivent également pouvoir franchir les barrières biologiques dans l'organisme et protéger le PA jusqu'à son site d'action.

Dans cette partie, nous commencerons par une brève introduction sur la vectorisation dans le domaine biomédical, en précisant les différentes générations de vecteurs. Ensuite, nous mentionnerons les principaux types de vecteurs et nous aborderons les différentes techniques de formulation nécessaires à leur obtention.

1) Classification des principaux vecteurs

Le développement technologique de nouvelles formes posologiques (Figure 2) a été une approche prometteuse pour contrôler la libération des PAs¹⁰⁻¹³. Les vecteurs nanométriques, de par leur grande surface spécifique, ont été étudiés pour l'encapsulation de PAs et favoriser une libération homogène et contrôlée du médicament ¹⁴.

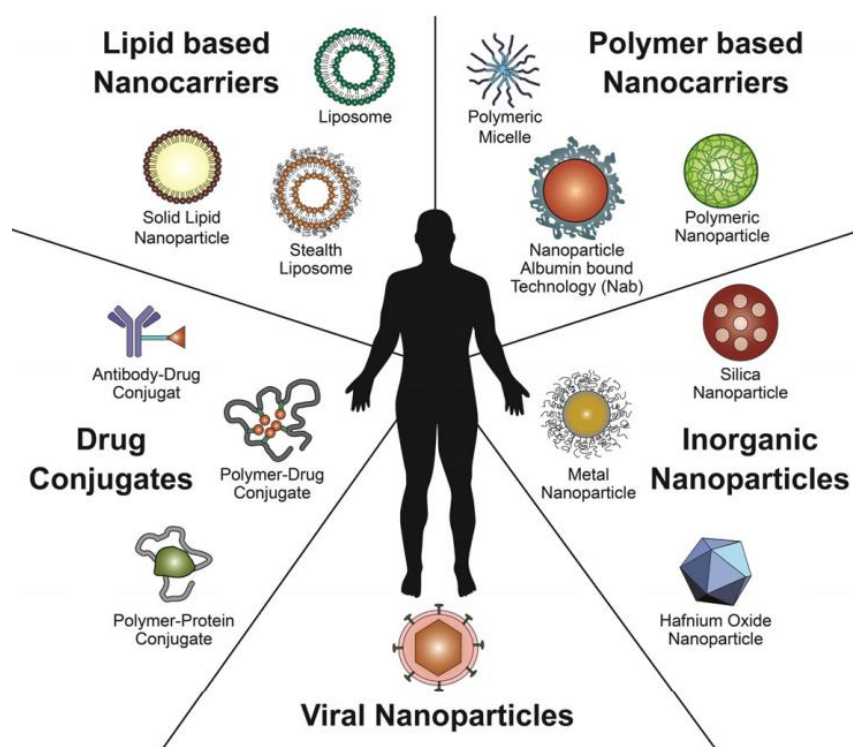


Figure 2 : Types de nanovecteurs disponibles pour la thérapie cancéreuses ¹⁵

Ces vecteurs peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de leur structure et de la nature chimique des éléments qui les constituent. Nous pouvons distinguer les liposomes, les micelles, les nanocapsules, les nanosphères et les dendrimères (Figure 3).

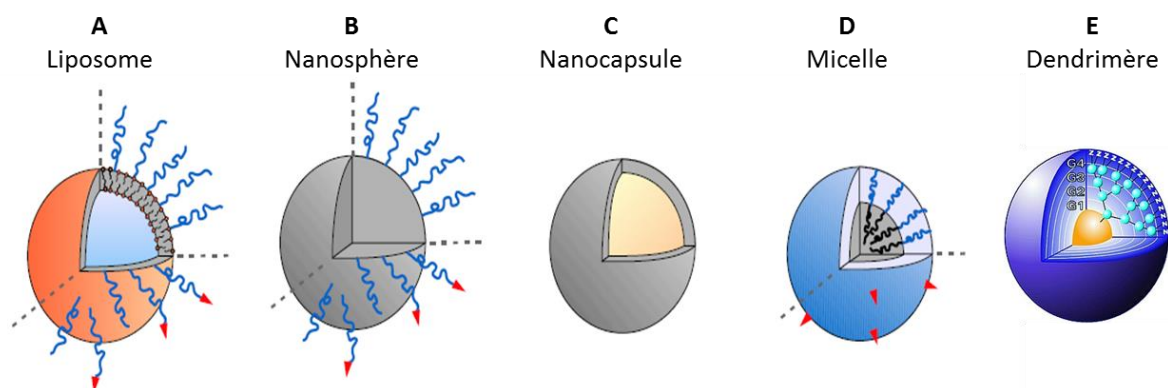


Figure 3 : Principaux nanovecteurs utilisés comme systèmes de délivrance de médicament (A) Liposome (B) Nanosphère (C) Nanocapsule (D) Micelle et (E) Dendrimère ¹⁶

a) Liposomes

Les phospholipides naturels s'organisent spontanément en milieux aqueux pour former des liposomes (Figure 4). Cette organisation stable permet de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes de ces molécules et les molécules d'eau. Ainsi les liposomes sont des vésicules artificielles sphériques, formées par une ou plusieurs bicouches de

phospholipides entourant une cavité centrale aqueuse. Ils ont été découverts il y a plus de cinquante ans ¹⁷ et ont été les premiers à être utilisés pour la vectorisation de médicaments ¹⁸. Depuis, ils ont fait l'objet de nombreuses études dans la littérature ¹⁹⁻²². En effet, il est possible d'encapsuler des PAs hydrophiles par dissolution dans la phase aqueuse interne et/ou des PAs lipophiles par insertion dans leurs bicouches lipidiques ²³.

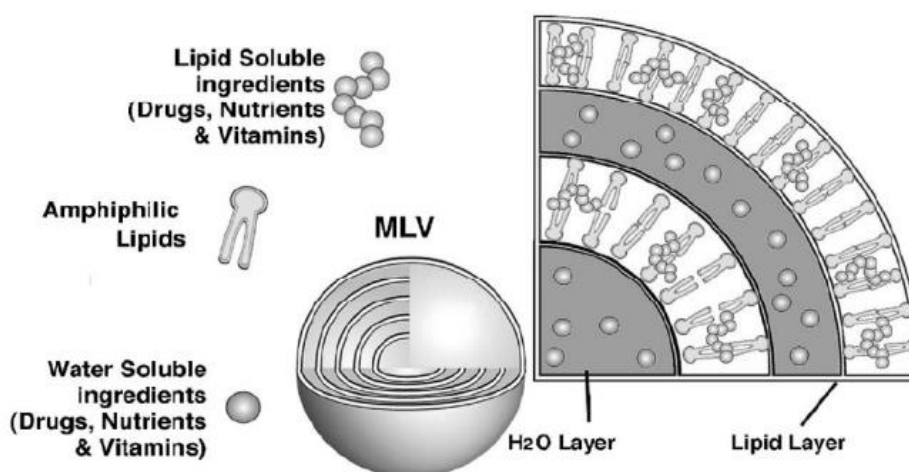


Figure 4: Schéma d'un liposome ²³

Les liposomes sont considérés comme des vecteurs biocompatibles du fait de la nature phospholipidique de leur paroi. Ils peuvent également être recouverts de chaînes de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) (liposomes pégylés) et décorés avec des ligands de ciblage ²⁴. Les liposomes ont des diamètres généralement compris entre 20 nm et 1 μm ¹⁷ et une classification a été réalisée en fonction de leur taille et du nombre de bicouches lipidiques. On distingue ainsi les SUV (Small Unilamellar Vesicle) qui présentent un diamètre inférieur à 200 nm, les LUV (Large Unilamellar Vesicles) qui ont un diamètre compris entre 200 nm et 1 μm et les GUV (Giant Unilamellar Vesicles) présentant un diamètre supérieur à 1 μm ^{25,26}. Malheureusement, l'instabilité chimique et la fragilité mécanique de la bicouche lipidique des liposomes peuvent être des paramètres limitant leur efficacité dans le domaine de la vectorisation de PAs. Ainsi, depuis une dizaine d'années, des chercheurs s'intéressent de plus en plus à une nouvelle catégorie de vésicules, appelées « polymersomes » qui sont des vésicules artificielles de taille nano- ou micrométrique, analogues aux liposomes. Ils sont obtenus par auto-organisation de copolymères amphiphiles sous forme de bicouches enfermant un cœur aqueux, et se sont avérés plus robustes et chimiquement plus stables que les liposomes. L'épaisseur de leur membrane est liée à la masse molaire des copolymères utilisés. Il existe un très grand nombre de copolymères amphiphiles

permettant l'obtention de polymersomes, mais la plupart d'entre eux sont de nature flexible et de type copolymères dibloc. Cependant, depuis quelques années, un certain nombre de publications relatent l'intérêt d'élaborer des polymersomes à partir de copolymères possédant un bloc rigide à caractère mésomorphe. La rigidité de ce bloc apporte alors un ordre supplémentaire à l'auto-organisation des copolymères, ce qui permet de renforcer la stabilité de la bicouche du polymersome et par conséquent d'accroître l'efficacité du transport de PAs. Ceci a fait l'objet des travaux réalisés par Ferji et al.²⁷ portant sur la synthèse de glycopolymères amphiphiles greffés, combinant la biodégradabilité et la biocompatibilité d'un polysaccharide hydrophile (dextrane) et le caractère cristal-liquide de greffons hydrophobes à base de cholestérol (poly(acrylate de diéthylène glycol cholestéryle) (PADEGChol)) puis de leur auto-organisation en milieu aqueux sous forme de «polymersomes».

b) Dendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules hautement ramifiées possédant une architecture tridimensionnelle contrôlée. Ces dendrimères dont les branches sont de simples molécules ou de vraies chaînes macromoléculaires, sont obtenus par deux stratégies : divergente (du cœur vers la surface) ou convergente (de la surface vers le cœur). Les dendrimères ont été utilisés comme transporteurs de médicaments soit en les encapsulant dans le noyau central, soit en attachant le PA à la surface du dendrimères par des liens chimiques²⁸⁻³¹.

c) Micelles

Les micelles polymères ont été découvertes par Ringsdorf en 1984³². Elles sont formées par auto-organisation de copolymères amphiphiles en solution aqueuse. Selon le copolymère amphiphile employé, l'auto-organisation peut produire des nano-objets sphériques avec un cœur hydrophobe et une surface hydrophile, mais d'autres types d'arrangement peuvent également être formulés. Les micelles sphériques ont une taille habituellement inférieure à 50 nm³³.

La capacité des micelles à augmenter la solubilité des médicaments hydrophobes en phase aqueuse provient de leur composition structurale caractérisée par un noyau interne hydrophobe, stériquement stabilisé par une couronne hydrophile³⁴. L'emploi de micelles comme nanovecteurs de PA offre plusieurs avantages : la taille réduite des micelles, la possibilité de cibler spécifiquement les cellules à traiter et la réduction des effets secondaires^{35,36}.

d) Nanocapsules

Les nanocapsules sont des structures sphériques à morphologie cœur/écorce constituées soit d'un cœur vide (nanocapsules creuses), solide (cœur constitué d'huiles se solidifiant à température ambiante) ou liquide (de nature aqueuse ou huileuse) entouré par une mince paroi de polymères de quelques nanomètres d'épaisseur¹⁶. Le PA peut être incorporé dans le cœur qui joue alors le rôle de réservoir, ou éventuellement adsorbé sur l'écorce ou attaché de façon covalente à la couche polymère³⁷. Le LCPM a produit récemment des nanocapsules par deux stratégies complémentaires : les travaux réalisés par Forero Ramirez³⁸ portaient sur l'élaboration des nanocapsules par polymérisation radicalaire contrôlée à partir d'un tensioactif réactif dérivé du dextrane alors que les travaux réalisés par Poltorak³⁹ s'intéressaient à la conception de nanocapsules biodégradables recouvertes de dextrane par réaction "Click" interfaciale.

e) Nanoparticules

Les NPs sont des structures matricielles de forme sphérique^{37,40} et de taille généralement comprise entre 100 et 200 nm^{16,41}. Le PA peut être piégé, dissous ou dispersé dans un polymère enchevêtré formant le cœur de l'objet, mais il peut être aussi adsorbé sur la surface du nano-objet ou lié chimiquement à sa surface⁴²⁻⁴⁴. Le PA sera libéré par simple diffusion ou par dégradation de l'objet par l'organisme. Ces NPs, dont le nombre de publications ne cesse de croître (Figure 5), constituent le sujet de cette thèse et leurs méthodes de préparation seront présentées dans les pages suivantes.

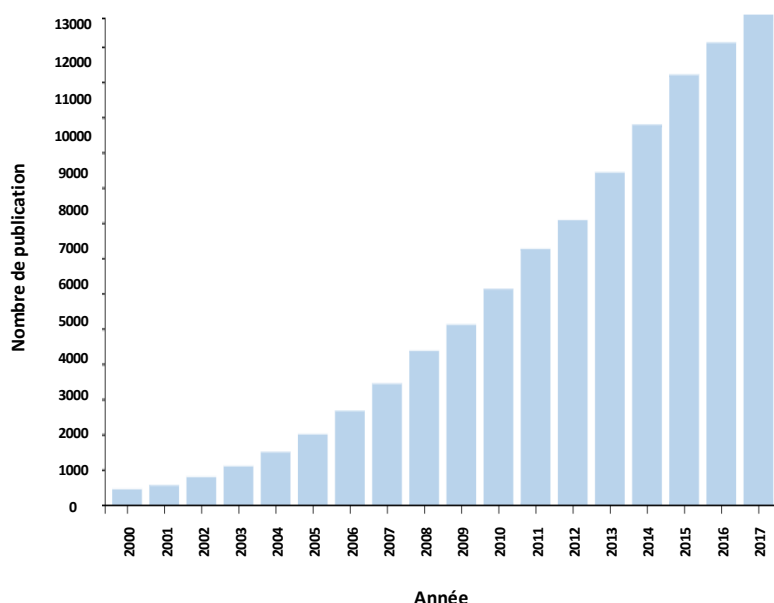


Figure 5 : Nombre de publications traitant des nanoparticules polymère durant la période 2000 et 2017

2) Évolution des vecteurs

Depuis la formulation des premiers vecteurs dans les années 1970, les procédés de vectorisation et la compréhension des phénomènes biologiques liés n'ont cessé de progresser. Selon Vauthier et Couvreur⁴⁵, les vecteurs à base de systèmes colloïdaux de taille submicronique peuvent être classés en trois générations, en fonction de leur biodistribution *in vivo*.

a) Les vecteurs de 1^{ère} génération : les vecteurs hépatospléniques

Les vecteurs synthétiques de 1^{ère} génération sont des systèmes colloïdaux développés spécialement pour des applications thérapeutiques. Comme nous l'avons détaillé dans les pages précédentes, ces vecteurs peuvent être classés selon la nature et l'organisation des éléments qui les constituent. Les NPs décrites dans la littérature sont le plus souvent constituées d'un cœur de polymère hydrophobe biodégradable tel que le poly(acide lactique) (PLA) ou le poly(acide lactique-*co*-glycolique) (PLGA). Elles présentent généralement en surface une hydrophobie plus ou moins marquée, et parfois des groupements chargés anioniques comme des carboxylates pour le PLA ou le PLGA⁴⁶⁻⁴⁸.

Après administration intraveineuse de ces vecteurs, ceux-ci s'accumulent préférentiellement dans les organes du système réticulo-endothélial comme le foie, la rate, les reins et la moelle osseuse car ces vecteurs sont reconnus par le système immunitaire comme des corps étrangers. En effet, après injection des NPs, on observe l'adsorption des opsonines sur leur surface, ce qui favorise la reconnaissance des NPs par les macrophages, puis leur phagocytose et dégradation par les macrophages. Les opsonines sont des protéines cationiques plasmatiques circulantes dans le flux sanguin, qui présentent également en surface quelques zones hydrophobes, ce qui leur confère également un caractère amphiphile. L'adsorption de ces protéines sur la surface des nanovecteurs est un phénomène complexe qui dépend de plusieurs facteurs tels que les propriétés de la surface des vecteurs (hydrophobie et charge de surface). Les molécules thérapeutiques initialement encapsulées dans ces nanovecteurs sont alors libérées au niveau des cellules du système réticulo-endothélial^{16,49,50}. Cette accumulation, principalement hépatique est intéressante pour le ciblage de ces organes, notamment dans le cas de cancer du foie. Ainsi la DOX a été vectorisée dans le foie par des liposomes⁴⁵.

b) Les vecteurs de 2^{ème} génération :

Les vecteurs de 2^{ème} génération ont été développés pour limiter ou éviter les problèmes d'opsonisation des vecteurs de 1^{ère} génération, et sont donc destinés au traitement des

cellules autres que celles du système réticulo-endothélial. Comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe précédent, l'adsorption des opsonines sur les vecteurs définit leurs destins *in vivo*⁵¹⁻⁵³. La modification de surface des vecteurs de 2^{ème} génération consiste à recouvrir ces vecteurs par une couche hydrophile et neutre, soit par adsorption physique ou par fixation chimique de polymères hydrophiles. La présence de cette couche hydrophile à la surface des vecteurs masque alors l'hydrophobie et la charge du cœur du vecteur, ce qui confère aux vecteurs un certain caractère furtif. Cette modification de surface est une étape relativement importante pour rendre les vecteurs invisibles vis-à-vis des macrophages car les molécules constituant la couche surfacique des vecteurs induisent un encombrement stérique qui limite l'adhésion des opsonines et la reconnaissance des vecteurs par les macrophages. Cette modification permet alors de diminuer l'accumulation des vecteurs dans les organes du système réticulo-endothélial et de prolonger leur temps de résidence dans le flux sanguin de quelques minutes, pour les vecteurs de 1^{ère} génération, à quelques heures pour les vecteurs de 2^{ème} génération⁵⁴⁻⁶³. Cette augmentation du temps de circulation est d'ailleurs considéré comme le facteur pharmacocinétique le plus important lors de l'étape de conception de médicaments macromoléculaires ou des nanomédicaments⁶⁴. Plusieurs molécules ont été utilisées pour rendre furtifs les vecteurs, par exemple le poly(éthylène glycol) (PEG), le dextrane, les poloxamers et les poloxamines⁶¹. Les procédés d'hydrophilisation de surface des nanovecteurs reposent principalement soit sur l'adsorption physique de polymères amphiphiles lors de la préparation des vecteurs, par exemple des NPs ; soit sur la fixation chimique (par des liaisons covalentes) de polymères hydrophiles à la surface des NPs.

(i) Adsorption physique de copolymères amphiphiles :

Cette méthode consiste à adsorber physiquement des polymères amphiphiles à l'interface solide-liquide des NPs finales, ou à l'interface liquide/liquide qui apparaît lors de la formulation de l'objet. Cette adsorption physique est due à des interactions électrostatiques ou hydrophobes selon le copolymère amphiphile employé. Ainsi, il s'agit d'interactions électrostatiques dans le cas de NPs à surface chargée sur lesquelles le chitosane⁶⁵ ou l'acide hyaluronique⁶⁶ vont s'adsorber. Dans le cas de NPs hydrophobes et neutres, des dérivés de copolymères amphiphiles vont s'adsorber sur leur surface hydrophobe pour doter les NPs d'une surface hydrophile^{67,68}.

(ii) Fixation chimique de polymère hydrophile :

Cette méthode consiste à former des liaisons covalentes entre des chaînes

hydrophiles ou amphiphiles et la surface hydrophobe des nanovecteurs à modifier. Cette fixation chimique peut être réalisée par couplage d'un polymère hydrophile sur la surface de l'objet préformé, mais on peut également utiliser des copolymères amphiphiles organosolubles préformés dans un procédé d'émulsion/ évaporation de solvant^{69,70} ou de nanopréciipitation^{71,72}. Dans ce cas, les parties hydrophobes des copolymères sont solubles dans la phase organique, alors que leurs parties hydrophiles vont s'orienter vers la phase aqueuse. L'utilisation de tels copolymères amphiphiles permet un bon contrôle de la structure cœur/couronne des vecteurs et de leur chimie de surface⁷³. Cette deuxième technique permet d'obtenir une couche hydrophile bien plus stable par rapport à celle obtenue par simple adsorption physique^{71,74,75}.

Cette durée accrue de circulation sanguine permet aux vecteurs de s'accumuler au voisinage des cellules cancéreuses grâce à l'effet « EPR » (Enhanced Permeability and Retention) découvert en 1986 par Maeda⁷⁶ (Figure 6). En effet, l'endothélium vasculaire des tissus tumoraux est plus perméable que celui des tissus sains, ce qui engendre une accumulation des vecteurs au voisinage des tumeurs. Cette accumulation proche des tumeurs est appelée « Ciblage passif »^{33,77,78}. L'effet « EPR » est un phénomène complexe à comprendre car il dépend de la taille, de l'emplacement ou le type (primaire ou métastase) des cellules tumorales⁷⁹.

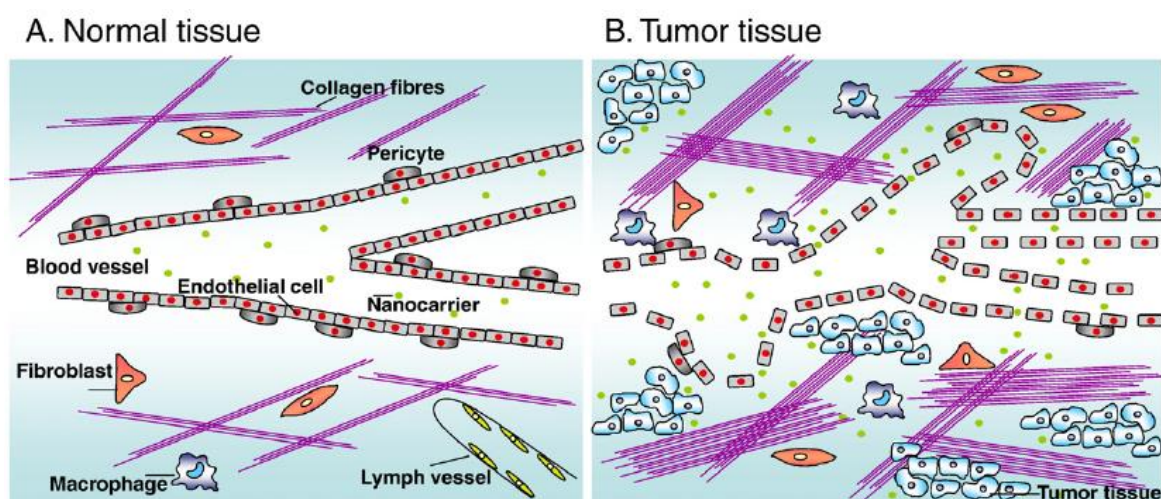


Figure 6 : Différences entre tissus normaux et tumoraux permettant d'expliquer l'effet « EPR ». (A)

Les tissus normaux contiennent des vaisseaux sanguins maintenus par des péricytes. La matrice extracellulaire contient des fibres de collagène, des fibroblastes, des macrophages et des vaisseaux lymphatiques. (B) Les tissus tumoraux contiennent des vaisseaux sanguins à l'endothélium perméable. La matrice extracellulaire contient plus de fibres de collagène, de fibroblastes et de macrophages que dans les tissus normaux⁷⁸

c) Les vecteurs de 3^{ème} génération :

L'objectif des vecteurs de 3^{ème} génération, appelés aussi des vecteurs à reconnaissance moléculaire, est de libérer le PA encapsulé au voisinage de la cible thérapeutique. Ces vecteurs sont obtenus en greffant à la surface des vecteurs « furtifs » de 2^{ème} génération des ligands particuliers (anticorps, peptides, sucres, acide folique...) capables de reconnaître des marqueurs spécifiques (antigènes ou récepteurs) surexprimés à la surface des cellules cancéreuses ou des néo-vaisseaux irriguant les tumeurs, par formation d'un complexe ligand-récepteur. On parle alors de « ciblage actif »^{33,78,80-82} (Figure 7). Grâce à cette précision de la zone de délivrance du PA, ces vecteurs de 3^{ème} génération sont caractérisés par une diminution drastique des effets secondaires du PA encapsulé.

Sahoo et al.⁸³ ont par exemple encapsulé de la DOX dans des NPs de PLGA de 110 nm de diamètre dont la surface était recouverte de transferrine. Cette protéine du sérum est un transporteur responsable de l'entrée du fer dans les cellules, et les cellules cancéreuses surexpriment fortement des récepteurs spécifiques à la transferrine. Par ce biais, les NPs décorées en surface par cette protéine ont été capables d'adhérer aux cellules cancéreuses et de délivrer spécifiquement la DOX à leur voisinage.

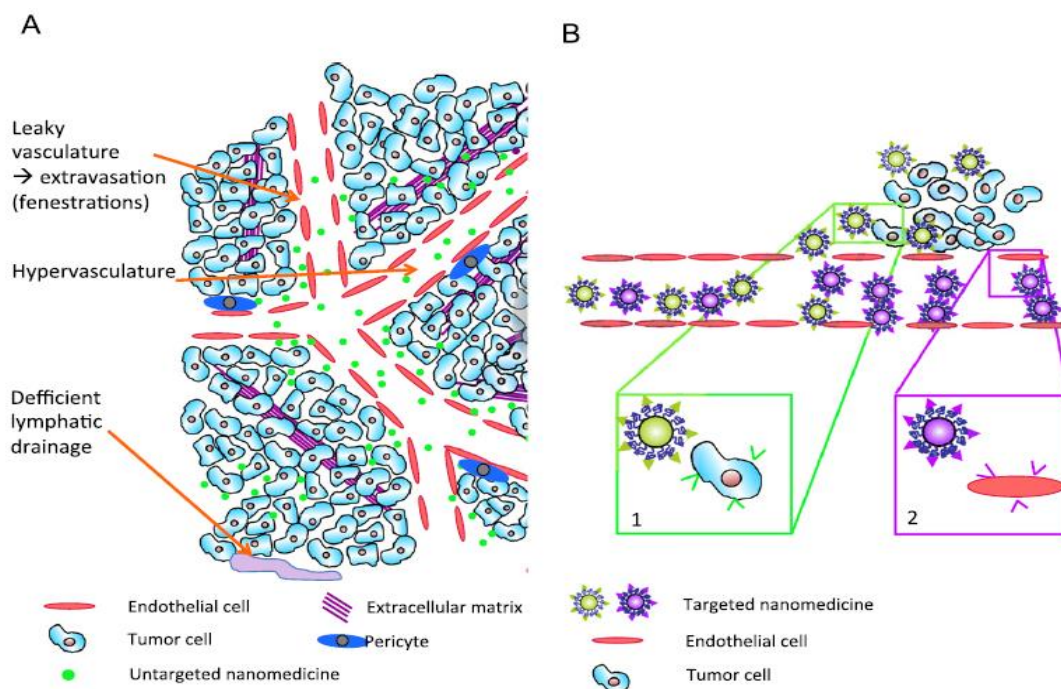


Figure 7 : Représentations schématiques du (A) ciblage passif (effet EPR) et (B) ciblage actif des vecteurs décorés en surface pour se lier aux récepteurs spécifiques surexprimés par (1) des cellules cancéreuses ou (2) des cellules endothéliales⁸⁴

3) Elaboration des nanoparticules

Il existe de nombreuses techniques pour préparer des NPs, mais elles peuvent être classées en deux catégories :

- Préparation des NPs par polymérisation de monomères
- Préparation des NPs à partir de polymères préformés

Devant le nombre important des articles/revues traitant des NPs employées comme systèmes de vectorisation, seuls quelques exemples seront mentionnés dans la suite de cette étude bibliographique.

a) Préparation de nanoparticules par polymérisation de monomères

L'élaboration de NPs peut être réalisée grâce à différents procédés de polymérisation, par exemple la polycondensation interfaciale et la polymérisation en milieu dispersé.

(i) *Polycondensation interfaciale* :

Cette technique consiste à faire réagir *in fine* deux monomères, l'un hydrosoluble et l'autre liposoluble (dans la phase dispersée), comportant chacun deux groupes fonctionnels qui peuvent réagir ensemble. Si on désire réaliser l'encapsulation d'un PA hydrophobe en même temps que l'élaboration des NPs, celui-ci peut être solubilisé avec le monomère hydrophobe dans un solvant organique. Une émulsion de cette phase organique avec une phase aqueuse (phase dispersante) contenant un tensioactif est alors réalisée, puis le monomère hydrophile est rajouté dans la phase aqueuse. Lorsque les deux monomères sont en contact, la réaction de polycondensation a lieu à l'interface des gouttelettes, ce qui génère la formation d'une membrane polymère autour de la gouttelette, d'où l'apparition de capsules. La taille des capsules préparées par ce type de procédé varie de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres, et dépend principalement de l'agitation du système et de la vitesse d'ajout des deux monomères⁸⁵.

(ii) *Polymérisations en milieu dispersé* :

Ces procédés mettent en jeu une phase de formation des particules appelée nucléation, suivie d'une phase de croissance donnant lieu à des particules de type matricielle. Deux mécanismes principaux sont à distinguer : la polymérisation en émulsion (ou en miniémulsion) et la polymérisation en dispersion.

Dans le cas de la polymérisation en émulsion, la première étape consiste à former une émulsion d'un monomère hydrophobe en phase aqueuse en employant un tensioactif avec une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC), de telle manière

que les gouttes de monomères soient stabilisées par ces tensioactifs mais qu'il existe aussi des micelles de tensioactifs à l'intérieur desquelles se localisent quelques molécules de monomères. La réaction de polymérisation est amorcée par ajout d'un amorceur hydrosoluble qui réagit avec les rares molécules de monomères solubilisés en phase aqueuse, puis l'oligomère hydrophobe en croissance diffuse vers l'intérieur des micelles pour y consommer le monomère. La polymérisation se déroule directement dans les micelles et on observe la diffusion progressive du monomère des gouttelettes vers l'intérieur des micelles jusqu'à conversion totale. *In fine*, des NPs de diamètre compris entre 100 nm et 1 μm sont obtenues et sont recouvertes d'une couronne de tensioactifs.

Ceci a fait l'objet des travaux réalisés par ForeroRamirez et al.⁸⁶ qui ont étudié la polymérisation RAFT (Polymérisation Radicalaire contrôlée par Transfert de chaîne) du MMA (Méthacrylate de méthyle) en miniémulsion en utilisant l'AIBN (Azobisisobutyronitrile) comme amorceur, un agent de transfert RAFT (dithiobenzoate de 2-cyano-2-propyle), un agent hydrophobe (Miglyol 810) et un tensioactif dérivé du dextrane (Dextrane modifié par des groupements phényle, noté DexP- τ avec τ le nombre de groupements phényle introduits pour 100 unités glucopyranose et qui est compris entre 16 % et 21 %) (Figure 8). Ils ont aussi comparé les propriétés du co-stabilisant Miglyol 810 avec d'autres huiles telles que l'huile d'olive, le Nujol et l'hexadécane et ont montré que le Miglyol 810 était le meilleur co-stabilisant pour la polymérisation en miniémulsion du MMA. La cinétique de polymérisation a été étudiée et il a été montré qu'en utilisant le Miglyol 810, la polymérisation est contrôlée jusqu'à des taux de conversion supérieur à 50 %.

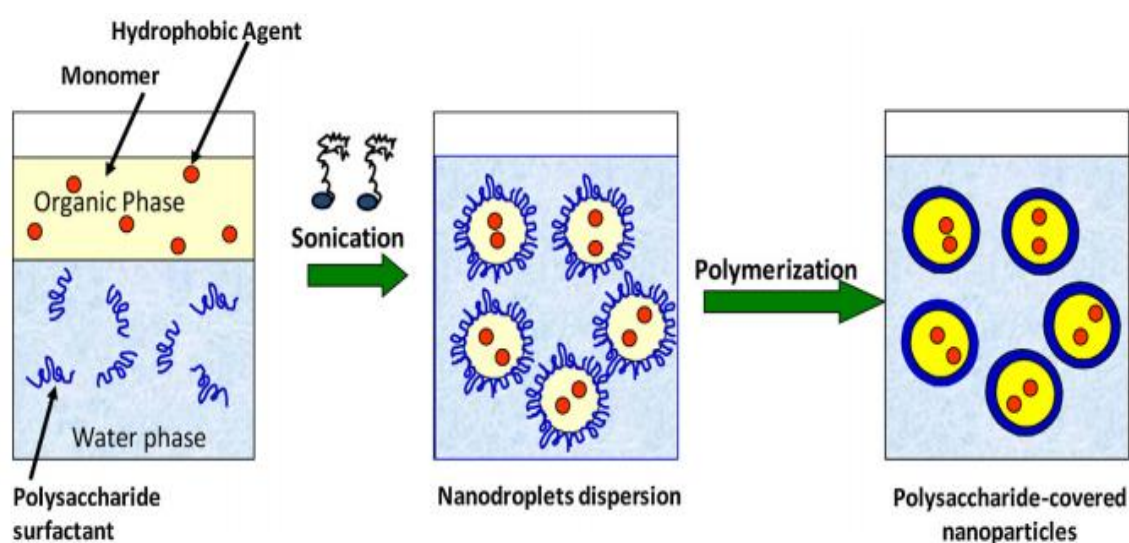


Figure 8 : Préparation de nanoparticules recouvertes de dextrane par polymérisation en miniémulsion⁸⁶

Wu et al.⁸⁷ ont élaborés des NPs cœur/couronne par polymérisation en miniémulsion. Le cœur des NPs est du poly(cyanoacrylate de *n*-butyle) et la couronne est composée de dérivés de PEO(Brij® 78, Brij® 700 et Tween® 80). Ils ont étudié deux types de polymérisation selon les conditions expérimentales : la polymérisation anionique pendant 24 h à température ambiante et la polymérisation radicalaire pendant 24 h à 75°C. Ils ont également pu réaliser l'encapsulation du pyrène pendant l'élaboration des NPs par ces deux mécanismes de polymérisation. La libération du pyrène a ensuite été étudiée dans le PBS (Tampon phosphate salin)(pH=7,4) à 37°C, et il a été montré que cette libération dépend des propriétés du cœur des NPs. Dans le cas de la polymérisation anionique, 75 % de pyrène est libéré au bout de 8h alors que seulement 60 % de pyrène est libéré après 20h si les NPs sont élaborées par polymérisation radicalaire.

Depuis une dizaine d'années, une technique appelée auto-assemblage induit par la polymérisation (PISA : PolymerizationInduced Self-Assembly) a vu le jour. Il s'agit ici d'une polymérisation radicalaire contrôlée menée en milieu hétérogène sans tensioactif (en émulsion) en présence de macro-amorceur ou de macro-agent de transfert. Ces macro-amorceurs ou macro-agents de transferts permettent d'amorcer la polymérisation du monomère hydrosoluble sélectionné. Au fur et à mesure de la croissance du bloc hydrophobe, un copolymère amphiphile progressivement insoluble dans le milieu se forme et s'auto-assemble sous forme de nanovecteurs de morphologies variées et contrôlées. Contrairement à la polymérisation en émulsion précédente, le milieu réactionnel ici est homogène au début de la polymérisation, tous les réactifs étant solubles dans la phase continue, y compris le monomère⁸⁸.

E. Groison et S. Brusseau⁸⁹ ont ainsi réussi à obtenir des nanovecteurs avec différentes morphologies par auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles *via* la NMP (Nitroxide Mediated Polymerization) menée en émulsion. Une macro-alcoxyamine à base d'acide méthacrylique et de styrène sulfonate de sodium (P(AMA-*co*-SS)-SG1) a été utilisée pour mener la PISA en émulsion aqueuse du MMA en présence d'une faible fraction de styrène à 90°C sous une pression de 3 bars (Figure 9). Des copolymères à blocs amphiphiles sont alors progressivement synthétisés de manière contrôlée. Les clichés de MET (Microscopie Electronique en Transmission) dans la Figure 9 montrent que pour un même bloc hydrophile P(AMA-*co*-SS)-SG1, le changement de morphologies des nanovecteurs (sphère, fibre puis vésicule) est provoqué par une augmentation de la masse molaire du bloc hydrophobe PMMA (24570 g.mol⁻¹, 34300 g.mol⁻¹ et 46300 g.mol⁻¹) (Figure 9).

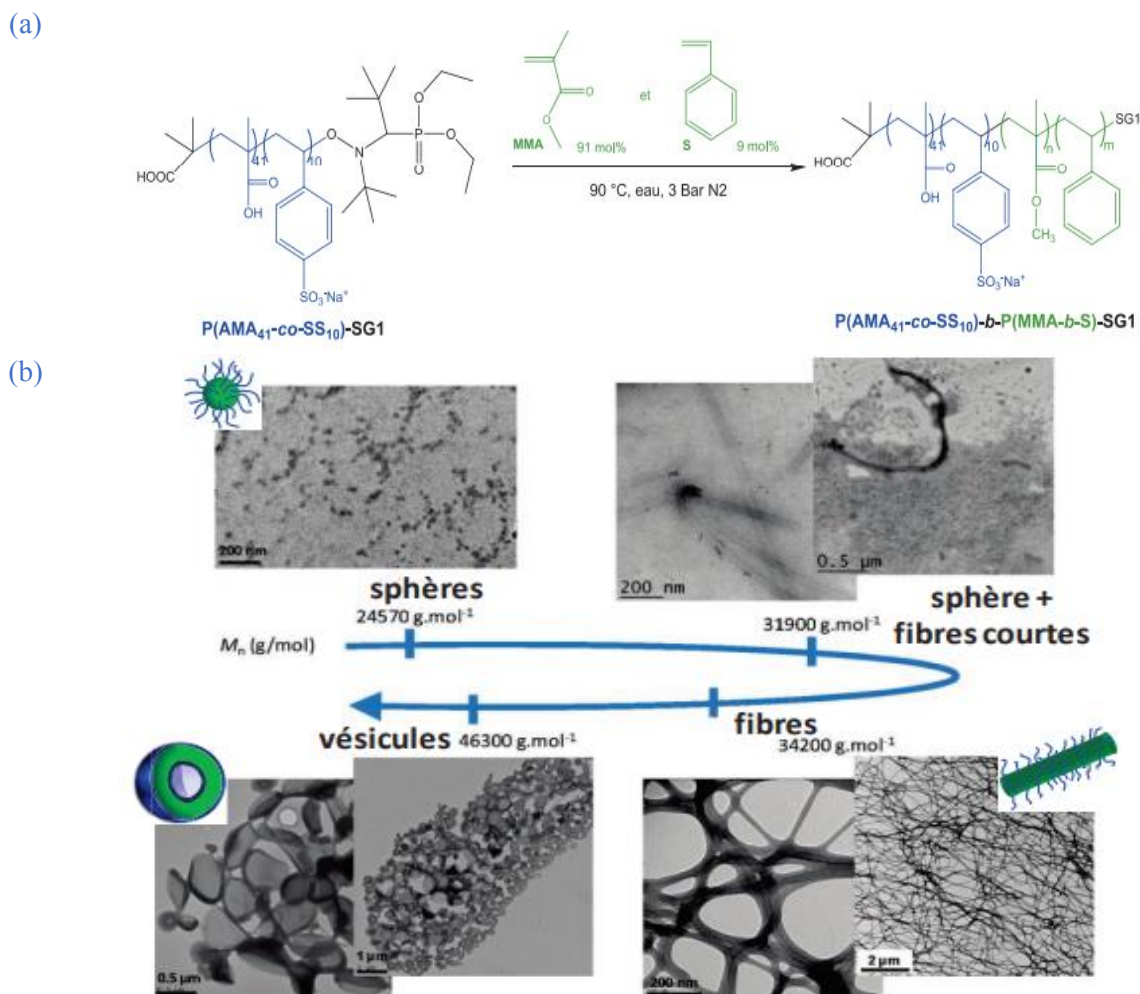


Figure 9 : (a) Schéma réactionnel de la polymérisation en émulsion aqueuse du MMA et du styrène à partir d'une macro-alcoxyamine $P(AMA_{41}\text{-co-}SS_{10})$ fonctionnalisée par un groupement SGI. (b) Clichés obtenus par MET de la dispersion finale constituée de copolymères $P(AMA_{41}\text{-co-}SS_{10})\text{-}b\text{-}P(MMA_n\text{-co-}S_m)$ en fonction de la longueur du bloc hydrophobe PMMA produit.

Dans le cas de la polymérisation en dispersion, le monomère est initialement soluble dans la phase aqueuse. Cependant, ce monomère est sélectionné pour former un polymère hydrophobe. Aussi, après amorçage de la polymérisation, les oligomères formés deviennent insolubles dans la phase aqueuse et précipitent sous forme d'agrégats stabilisés par les tensioactifs initialement ajoutés dans le milieu réactionnel. Cette technique conduit à des particules de diamètre compris entre 1 et 15 μm ⁸⁵. L'équipe de C. Pan a été la première à étudier la polymérisation RAFT en dispersion dans un solvant organique pour produire des nanovecteurs de morphologies non sphériques (Figure 10)^{90,91}. Ils ont notamment étudié la polymérisation du styrène en dispersion dans le méthanol à partir de macro-agents RAFT dérivés de poly(4-vinylpyridine) (P4VP)^{92,93}, poly(acideacrylique)⁹⁴ ou poly(méthacrylate de 2-(diméthyl amino) éthyle) (PMADAME)⁹⁵ (Figure 10).

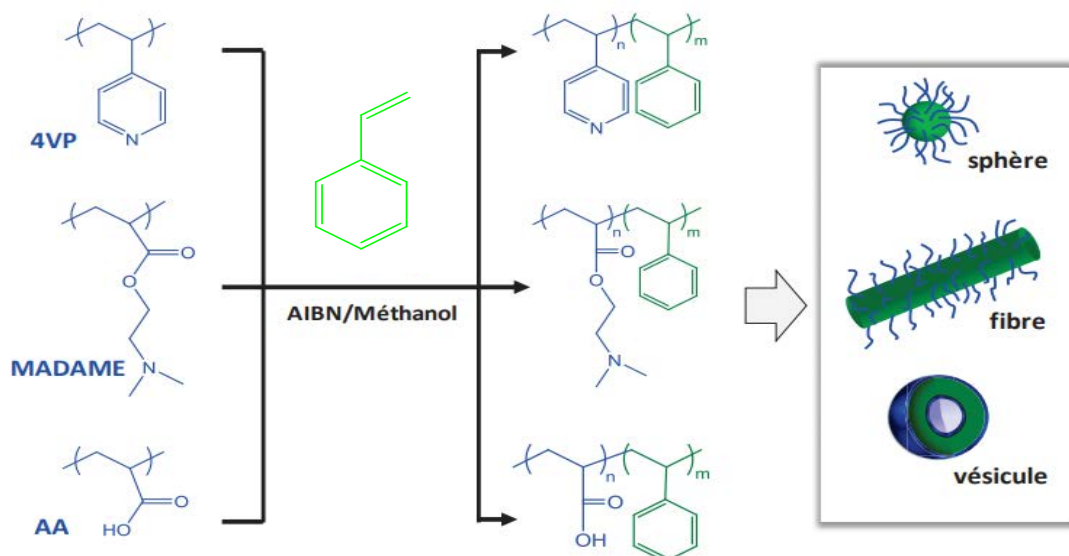


Figure 10 : Schéma réactionnel de la polymérisation du styrène en dispersion dans le méthanol, en présence de macroRAFTs hydrophiles

Ferji et al. ⁹⁶ ont étudié l'auto-assemblage de glycopolymères à base de dextrane induit par photopolymérisation appelée Photo-PISA. Ces glycopolymères (Dex-g-PHPMA) sont composés d'une dorsale dextrane et de greffons poly(métacrylate de 2-hydroxypropyle). Ils ont montré que cette polymérisation peut être réalisée à température ambiante sous irradiation UV en phase aqueuse. Les glycopolymères (Dex-g-PHPMA) qui se forment *in situ* s'auto-organisent pour conduire à des nano-objets présentant différentes morphologies selon les paramètres macromoléculaires des glycopolymères formés (Figure 11).

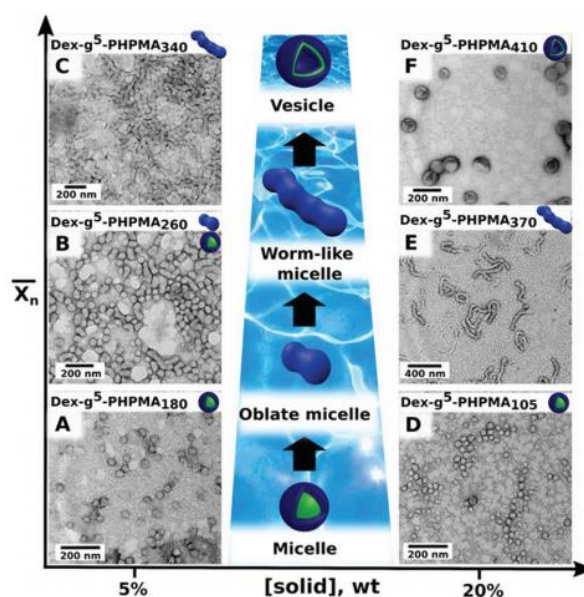


Figure 11 : Images MET des glycopolymères (Dex-g-PHPMA) qui se forment *in situ* par photo-PISA en phase aqueuse et s'auto-organisent pour conduire à des nano-objets ⁹⁶

b) Préparation de nanoparticules à partir de polymères préformés

(i) Nanoprécipitation

Le procédé de nanoprécipitation a été développé par Fessi vers la fin des années 80⁹⁷. Dans ce procédé, la phase organique polaire contient le polymère et le PA à encapsuler. Elle est ajoutée goutte à goutte et sous agitation modérée dans un deuxième solvant miscible au premier (le plus souvent de l'eau) qui représente la phase continue et contient un tensioactif assurant la stabilisation des particules formées. Ces particules sont formées par diffusion spontanée du solvant organique dans la phase aqueuse et inversement. Ce procédé est très utilisé pour l'élaboration des nanoparticules destinées à la vectorisation des médicaments (Tableau 3). Cette technique permet ainsi d'encapsuler des PAs hydrophobes avec de bons rendements, mais l'encapsulation de PAs hydrophiles par cette technique est un peu plus difficile car ceux-ci ont tendance à diffuser dans la phase aqueuse.

Tableau 3 : Quelques nanoparticules préparées par nanoprécipitation

<i>Polymère</i>	<i>Solvant organique</i>	<i>Tensioactif</i>	<i>Diamètre (nm)</i>	<i>Réf.</i>
<i>PLA</i>	Acétate d'éthyle	DexC ₆ - τ Avec $\tau = 21$ %	141	98
	THF	-	100-300	99
	Acétone	Poloxamer 188	250	100
<i>PLGA</i>	Acétone	PVA	95-560	101
	Acétone	-	165	102
	Acétone	-	164	102
<i>Poly(ϵ-caprolactone)</i>	Acétone	Polysorbate 80	266	103

(-) signifie sans tensioactif.

(ii) Émulsion-Évaporation de solvant organique

▪ Émulsion simple

L'émulsion-évaporation de solvant organique est la technique la plus utilisée pour préparer des NPs polymères (Tableau 4). Le principe de cette technique consiste à former

une émulsion à partir de deux solvants non miscibles. Le polymère devant constituer le cœur des particules, généralement hydrophobe, est tout d'abord dissout avec le PA à encapsuler dans un solvant organique volatil (par exemple le DCM, le chloroforme ou l'acétate d'éthyle) mais non miscible dans la phase continue, qui est le plus souvent l'eau. Cette phase continue contient un tensioactif qui joue le rôle de stabilisant de l'émulsion. Après évaporation du solvant organique, une suspension aqueuse de particules cœur polymère hydrophobe/couronne tensioactif est obtenue. Dans le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique, plusieurs paramètres influencent la taille des particules obtenues tels que les concentrations des phases organique et aqueuse, la miscibilité des deux solvants, les conditions d'émulsification, le taux de charge du PA ...

Tableau 4 : Encapsulation de principes actifs dans des nanoparticules cœur/couronne de PVA par simple Emulsion/Evaporation de solvant organique

<i>Polymère (cœur)</i>	<i>Tensioactif (couronne)</i>	<i>Principe actif</i>	<i>Efficacité d'encapsulation</i>	<i>Diamètre (nm)</i>	<i>Réf.</i>
PLA	PVA	Progestérone	71 %	335	104
	PVA	Proanthocyanidine	82.7 %	256	105
	PVA	Vanilline	41 %	240	106
	PVA	Tamoxifen	85 %	155	107
	PVA	Resvératrol (Polyphénol)	82 %	228	108
PLGA	PVA	Halopéridol	30 %	275	109
	PVA	Acide ellagique	61 %	293	110
	PVA	Cucurbitacin	1,3 %	399	111
Poly(ϵ-caprolactone-g-Dextrane)	PVA	Vinblastine	36-48 %	213-227	112
Poly(ϵ-caprolactone)	PVA	Acide ellagique	57 %	281	110

- **Concentration initiale du polymère dans la phase organique :**

Jeffery et al.¹¹³ ont montré qu'une augmentation de la concentration en polymère dans la phase organique entraîne un accroissement de la taille des particules. Ainsi, en variant la concentration en PLGA dans le DCM de 6 % à 20 % (w/v), on observe une augmentation du diamètre moyen des particules de 5,7 à 26,1 μm lorsque le PVA (Poly(alcool vinylique)) est employé comme tensioactif. Ce résultat peut être expliqué de différentes façons. En augmentant la concentration en polymère, on augmente la probabilité de collision entre les particules en formation, ce qui conduit à une augmentation de la taille des particules finales. Une autre explication est que la viscosité de la solution de polymère augmente avec la concentration en polymère et affecte l'étape d'émulsification.

- **Concentration initiale du tensioactif dans la phase aqueuse :**

Mahdavi et al.¹¹⁴ ont montré qu'une augmentation de la concentration du tensioactif entraîne une diminution de la taille des particules obtenues. En effet, l'interface entre les deux phases (organique et aqueuse) est recouverte avec une concentration accrue de tensioactif et les gouttelettes formées sont plus stabilisées, d'où des particules plus petites. Brakat et Ahmad¹¹⁵ ont aussi étudié ce paramètre lors de l'élaboration des particules composées d'un cœur d'acébutyrate de cellulose et d'une couronne de Span 80. Ainsi, en variant la concentration initiale de tensioactif dans la phase aqueuse de 0,25 % à 2 % (w/v), la taille des NPs diminue de 480 nm à 240 nm. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Rouzes et al.⁶⁸ concernant l'élaboration des particules de PLA stabilisées par un dérivé amphiphile de dextrane (dextrane avec un groupement phénoxy).

- **Rapport volumique entre les deux phases**

Nouvel et al.⁷⁰ ont élaboré des nanoparticules en solubilisant le PLA dans le DCM et en employant un tensioactif Dex-g-PLA solubilisé dans l'eau. En fixant les concentrations du tensioactif dans la phase aqueuse (1 g/L) et du polymère dans la phase organique (25 g/L) constantes, la diminution du rapport volumique phase organique/ phase aqueuse de 0,05 à 0,025 entraîne une augmentation de diamètre des NPs de 200 nm à 700 nm. Dans un deuxième temps, ils ont étudié l'effet de la concentration du tensioactif (Dex-g-PLA) dans la phase aqueuse sur le diamètre des NPs. Pour un rapport volumique des phases égal à 0,05 et une concentration de PLA dans le DCM égale à 25 g/L, l'augmentation de la concentration du tensioactif dans la phase aqueuse de 0,5 à 1 g/L n'a aucune influence sur le diamètre des NPs.

- **Propriétés tensioactives :**

Laville et al.⁷¹ se sont intéressés à l'étude des propriétés tensioactives de deux

dérivés de dextrane présentant le même taux de modification : un dextrane doté de plusieurs fonctions azide et un dextrane modifié par plusieurs chaînes aliphatiques C₆. Ils ont ainsi élaborés des NPs de PLA avec une couronne de dérivés de dextrane et ont observé une augmentation du diamètre des NPs avec la baisse du pouvoir interfacial du tensioactif employé.

- ***Vitesse et durée d'agitation mécanique :***

Sameni et al. ¹¹⁶ ont examiné l'influence de la vitesse et la durée d'agitation mécanique lors de l'étape d'émulsification de la phase organique dans la phase aqueuse sur la taille des NPs de PLGA. En augmentant la vitesse d'agitation de 11 000 à 22 000 tr/min, la taille des particules diminue de 1350 nm à 800 nm. La durée d'agitation influence également la taille des particules. Ainsi, plus l'émulsion est agitée, plus la taille des particules diminue. Ces résultats sont expliqués par le fait que les contraintes de cisaillement exercées sur les particules sont liées à la durée d'agitation. Donc plus la durée de l'agitation augmente, plus l'ampleur de cisaillement est importante et plus la taille des particules est petite. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Mahdavi et al. ¹¹⁴ qui ont observé qu'avec l'augmentation de la vitesse de dispersion de 2000 à 5000 tr/min entraîne une diminution de la taille des particules de 3,5 µm à 640 nm.

- ***Quantité de principe actif à encapsuler :***

Brakat et Ahmad ¹¹⁵ ont étudié l'influence de l'encapsulation de l'Eudragit S100 sur la taille des NPs de cœur acétobutyrate de cellulose et couronne de Span 80. Ils ont observé que l'augmentation du rapport massique Eudragit S100/Polymère de 1/5 à 1/1 entraînait une augmentation de la taille des NPs de 487 µm à 832 µm.

- **Émulsion double**

La double émulsion est une technique décrite dans les années 1970 pour l'encapsulation de PAs hydrophiles dans le cœur hydrophobe des NPs. Pour cela, une première émulsion est réalisée à partir d'une phase aqueuse contenant à la fois le PA à encapsuler et un premier tensioactif et d'une phase organique contenant le polymère hydrophobe qui deviendra *in fine* le cœur hydrophobe des NPs (Figure 12, Tableau 5). Cette première émulsion est émulsionnée à nouveau dans un large volume d'eau contenant un second tensioactif. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation ¹¹⁷. Le tensioactif de la première émulsion sert à stabiliser l'interface interne Eau/Huile (E/H), alors le tensioactif de la deuxième émulsion est soluble dans l'eau, et permet de stabiliser l'interface externe Huile/Eau(H/E)^{118,119}.

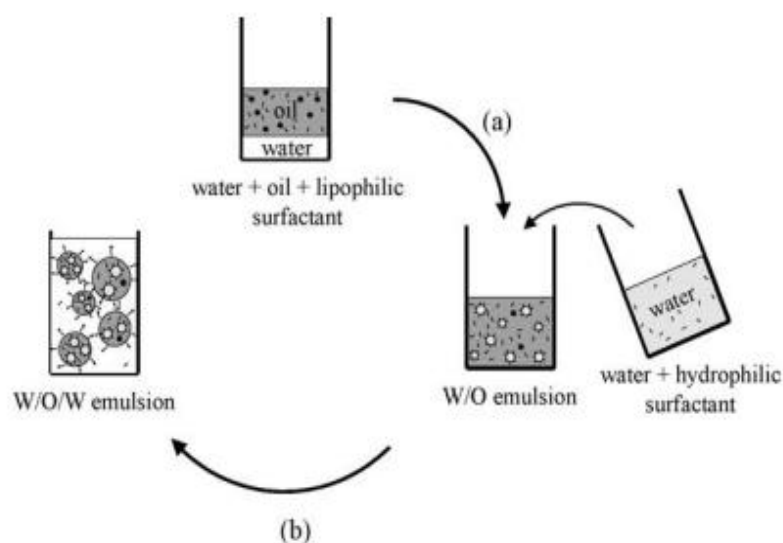


Figure 12 : Préparation des particules par double émulsion-évaporation de solvant (Emulsion E/H/E) ¹¹⁷

Rizakalla et al. ¹²⁰ ont élaboré des NPs de PLGA par double émulsion/évaporation de solvant organique et ont rapporté l'influence de plusieurs paramètres sur la taille de NPs de PLGA. Ainsi, en augmentant la concentration initiale du polymère dans la phase organique de 5 % à 10 % (%w/v) on observe une augmentation de la taille de particule de 300 nm à 600 nm. Ceci est causé par une augmentation de la viscosité de la phase organique, ce qui entraîne une réduction dans l'homogénéisation du milieu. Quintanar-Guerrero et al. ¹²¹ et Kwon et al. ¹²² ont étudié l'influence de la concentration du tensioactif dans la phase aqueuse sur la taille des nanoparticules. Ils ont observé qu'une augmentation de la concentration initiale du tensioactif (de 0,1 % à 1 % (w/v)) entraînait une diminution de la taille des NPs de 300 nm à 140 nm. Silvestri et Lostritto¹²³ ont étudié également cette relation entre concentration en tensioactif et taille des NPs. Ils ont d'ailleurs établi une équation du premier ordre reliant la concentration du tensioactif à la taille des nanogouttes produites au cours de l'étape d'émulsification :

$$\bar{r} = \frac{2\gamma_i^0}{\Delta P} - \frac{2BC_i}{\Delta P}$$

Avec :

\bar{r} : rayon moyen de la goutte

γ_i^0 : tension interfaciale entre les deux solvants purs

ΔP : pression à l'interface Huile/Eau

B : constante pour un tensioactif donné, représente la valeur d'adhésion entre l'interface et le tensioactif

C_i : concentration du tensioactif.

Tableau 5 : Encapsulation des principes actifs dans des nanoparticules produites par double Emulsion/Evaporation de solvant organique

<i>Polymère (cœur)</i>	<i>Tensioactif de la 2^{ème} émulsion</i>	<i>Principe actif</i>	<i>Efficacité d'encapsulation</i>	<i>Diamètre (nm)</i>	<i>Réf.</i>
<i>PLGA</i>	PVA	Vancomycine	38-79 %	450-466	124
<i>PLA</i>	Monoéthoxypoly(oxyde d'éthylène)- <i>b</i> -PLA	Protéine C	44-74 %	188-244	125
	PCL/PVA	BSA	49 %	300-500	126

(iii) Émulsion-Diffusion de solvant organique

Le procédé d'émulsion-diffusion de solvant organique est parmi les procédés les plus employés pour la fabrication des NPs (Figure 13, Tableau 6). Cette technique, développée par Leroux et al. ¹²⁷ a été décrite par Quintanar-Guerrero et al. ^{121,128-131}. Ce procédé se déroule en deux étapes : une première étape est une émulsification suivie de la diffusion du solvant organique dans un grand volume d'eau (deuxième étape), ce qui entraîne la formation des NPs par précipitation du polymère. Le solvant organique employé doit être ici partiellement miscible à l'eau. L'acétate d'éthyle est ainsi un bon exemple d'un solvant organique pour ce procédé d'élaboration de NPs. Bien que ce procédé permette d'obtenir des NPs de taille étroite, une grande quantité d'eau est requise pour faire diffuser le solvant organique ce qui représente une limite de ce procédé ¹³². Dans la littérature, plusieurs études ont été consacrées à l'évaluation des paramètres influençant la taille des particules obtenues par ce procédé ^{122,133-135}. Les effets de certains paramètres tels que le type et la concentration du tensioactif, la concentration du polymère et les conditions d'émulsification sont les mêmes que dans le cas du procédé d'émulsion-évaporation de solvant.

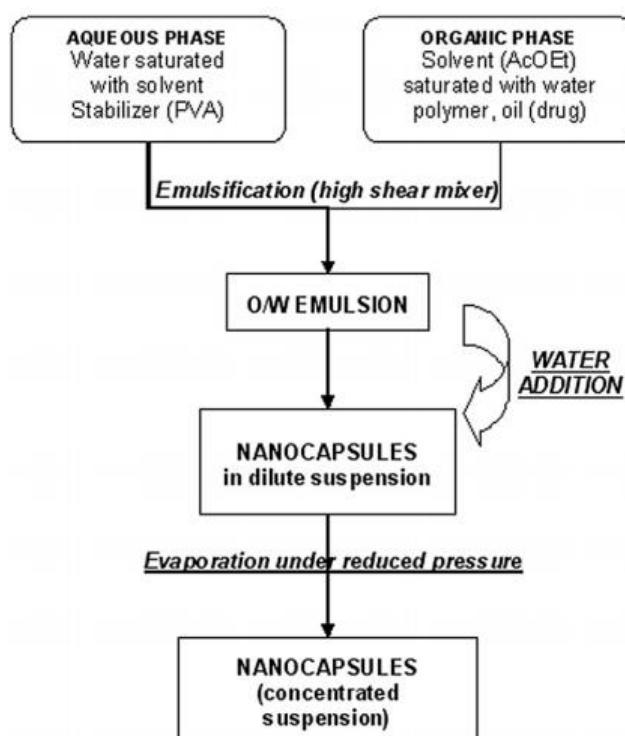


Figure 13 : Préparation des nanoparticules par le procédé d'émulsion-diffusion ¹³⁶

Hassou et al. ¹³⁷ ont modélisé le procédé d'émulsion-diffusion de solvant pour l'élaboration des nanocapsules de poly(ϵ -caprolactone). Kwon et al. ¹²² ont quant à eux élaborés des NPs de PLGA recouvertes de PVA et ont étudié l'influence de la température de la phase aqueuse sur la taille finale des NPs. Ils ont alors montré qu'une augmentation de la température de 25 à 60°C, provoquait une diminution du diamètre moyen des NPs de 204 nm à 170 nm. Ce phénomène est dû à la constante de diffusion du solvant dans l'eau qui est proportionnelle à la température selon l'équation de Stokes-Einstein suivante :

$$D_{AB} = \frac{kT}{6\pi r \eta_B}$$

D_{AB} : Coefficient de diffusion (cm^2s^{-1})

k : Constante de Boltzman ($1.3805 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)

T : Température (K)

r : Volume hydrodynamique de l'objet (cm^3)

η_B : Viscosité de la phase continue (cP)

Wilke et Chang ¹³⁸ ont également étudié l'évolution des coefficients de diffusion de différents solutés dans plusieurs milieux dilués et à différentes températures. Ils en ont tiré une équation reliant le coefficient de diffusion d'un soluté dans l'eau et la température du solvant :

$$D_{AB} = \frac{7.4 \times 10^{-8} (2.6 M_B)^{0.5} T}{\eta_B V_A^{0.6}}$$

M_B : Masse molaire de l'eau (g/mol)

V_A : Volume molaire du soluté A mesuré à sa température d'ébullition (cm³/mol)

η_B : Viscosité de la phase continue (eau)(cP)

T : Température (K)

<i>Polymère</i>	<i>Solvant</i>	<i>Tensioactif</i>	<i>Principe actif</i>	<i>Diamètre (nm)</i>	<i>Réf.</i>
PLGA	Acétate d'éthyle	Poloxamer 188	Tacrolimus	218-439	145
	Carbonate de propylène	Bromure de didodécyl diméthyl ammonium	-	50	141
	Acétate d'éthyle	PVA	-	213	
	Acétone	Pluronic	-	221	
	Dichlorométhane	PVA	-	284	
PEG-PLGA	Acétate d'éthyle	Poloxamer 188	Tacrolimus	220-498	145
PLA	Acétate d'éthyle	Poloxamère	Acétate de tocophérol	276-554	142
	Acétate d'éthyle	Pluronic F68	-	100	150
Poly(ϵ-caprolactone)	Acétate d'éthyle	PVA	Indométacine	470-694	151

Tableau 6 : Quelques nanoparticules préparées par émulsion-diffusion de solvant organique

(iv) Émulsion-Relargage

Ce procédé a été développé par Bindschaedler et al. ¹⁴⁸ en 1988 pour la préparation de pseudo-latex par dispersion d'un polymère hydrophobe ¹⁴⁹. Cette technique consiste à préparer une émulsion H/E sous agitation mécanique, en ajoutant une solution organique (acétone) contenant le polymère et le PA à encapsuler à une solution aqueuse saturée en soluté. Le soluté peut être une molécule très hydrophile comme le saccharose ou bien un électrolyte tels que le chlorure de magnésium, le chlorure de calcium ou l'acétate de magnésium ^{133,150-157}. La saturation de la phase aqueuse initiale par les électrolytes modifie non seulement la miscibilité de la phase organique dans la phase aqueuse, mais empêche

aussi la diffusion de l'acétone dans l'eau. Dans un deuxième temps, un volume d'eau important est rajouté à l'émulsion, ce qui provoque la diffusion de l'acétone vers la phase aqueuse et conduit à l'obtention des NPs par précipitation du polymère (Figure 14).

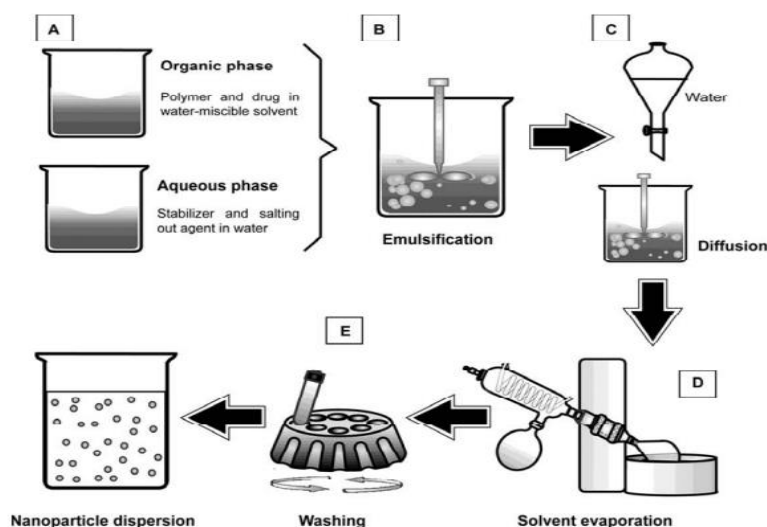


Figure 14 : Préparation des nanoparticules par le procédé d'émulsion-salting-out ¹⁴⁹

Leroux et al. ¹⁵⁸ ont adopté ce procédé pour préparer des NPs PLA/PVA. La phase aqueuse saturée en acétate de magnésium tétrahydraté (électrolyte) contient également du PVA comme tensioactif. Cette phase aqueuse est rajoutée dans la solution PLA/acétone pour former une émulsion. Par la suite, un volume d'eau important a été rajouté pour permettre la diffusion de l'acétone dans l'eau et donner naissance à des NPs d'un diamètre de 295 nm.

Quelques NPs préparées par ce procédé d'émulsion-salting out sont regroupées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Exemples de quelques nanoparticules élaborées par le procédé d'émulsion-salting out

<i>Polymère</i>	<i>Electrolyte</i>	<i>Solvant organique</i>	<i>Principe actif</i>	<i>Diamètre (nm)</i>	<i>Réf.</i>
<i>PLA</i>	MgCl ₂ .6H ₂ O	Acétone	-	279	157
<i>PEO</i>	MgCl ₂ .6H ₂ O	Acétone	-	280	157
<i>PLGA</i>	MgCl ₂ .6H ₂ O	THF	-	200	153
<i>PLGA</i>	CaCl ₂	Acétonitrile	Méthoxycinnamate d'éthylhexyle	480	152
<i>PEO-PLGA</i>	MgCl ₂ .6H ₂ O	Acétone	Dexaméthasone	190	159

(v) Émulsification-Coacervation

Le procédé d'émulsion-coacervation consiste à abaisser la solubilité d'un polymère (coacervation simple) initialement solubilisé dans un solvant organique ou en milieu aqueux, de façon à le faire précipiter. Le changement de la solubilité du polymère peut être réalisé par variation de la température du milieu ¹⁶⁰ ou par ajout d'un électrolyte (par exemple CaCl_2 ¹⁶¹, Na_2SO_4 ¹⁶²), d'un non-solvant ou d'un agent déshydratant appelé aussi agent de coacervation (par exemple un alcool¹⁶³). Au cours de ce procédé, il y a formation de deux phases liquides : l'une riche en molécules de polymère désolvaté qui vont former des gouttelettes appelées gouttelettes de coacervat, et une seconde phase pauvre en polymère ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ (Figure 15). Pour l'encapsulation d'un PA par ce procédé, différentes conditions de coacervation doivent être déterminées et respectées en établissant un diagramme ternaire tenant compte du solvant, du polymère et de l'agent de coacervation. Dans des conditions optimales d'encapsulation, appelée fenêtre de stabilité, un PA dispersé dans la solution initiale de polymère se retrouvera au sein des gouttelettes de coacervat suffisamment stables. De nombreux paramètres influencent la stabilité de ces gouttelettes qui ont tendance à s'agréger (type de polymère, concentration, vitesse d'agitation du système, vitesse d'ajout et viscosité de l'agent de coacervation), mais ce procédé permet l'encapsulation de molécules hydrophiles et hydrophobes.

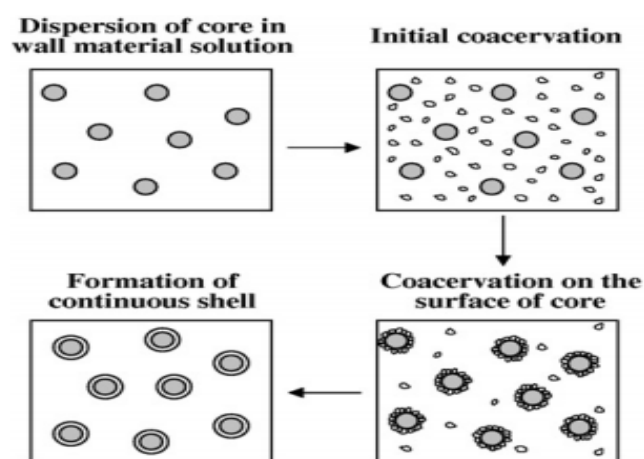


Figure 15 : Préparation des nanocapsules par le procédé d'émulsion-coacervation ¹⁶⁷

(vi) Dialyse

La méthode d'élaboration des NPs par dialyse consiste à dissoudre un polymère dans un solvant organique et de placer cette solution dans une membrane de dialyse appropriée. Les dialyses sont alors réalisées contre un non-solvant du polymère. Le déplacement du solvant de l'intérieur de la membrane de dialyse vers le milieu extérieur entraîne l'accumulation et l'agrégation progressive du polymère. Cette diminution progressive de la

solubilité du polymère dans le milieu interne des membranes de dialyses donne des suspensions homogènes de NPs. Ce procédé est donc efficace pour préparer des NPs avec une distribution de taille étroite et sans l'utilisation d'un tensio-actif ^{168,169} (Tableau 8). Jeong et al. ¹⁶⁸ se sont intéressés à l'élaboration de NPs de PLGA par dialyse, en absence de tensioactif et en testant différents solvant (DMSO, DMF, DMAC, THF et acétone). Ils ont montré que la nature du solvant organique modifie la distribution de taille des NPs formées, en relation avec les différences de solubilité du polymère dans ces solvants et avec la miscibilité des différents solvants organiques avec l'eau. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'Akagi et al. ¹⁷⁰ qui ont également étudié l'effet de différents solvants organiques sur la distribution de tailles des NPs de poly(γ -acide glutamique). Vu et al. ¹⁷¹ ont quant à eux élaboré des NPs de PLGA sans tensioactif, de taille comprise entre 100 et 200 nm et chargées de DOX. Oh et al. ¹⁷² ont élaboré des NPs de poly(γ -benzyl-L-glutamate)-*b*-poly(oxyde d'éthylène) et Lee et al. ¹⁷³ des NPs de PLA-POE par dialyse en utilisant dans les deux cas le DMF comme solvant.

Tableau 8 : Exemples de nanoparticules élaborées par dialyse

<i>Polymère</i>	<i>Solvant</i>	<i>MWCO^(a) (kg/mol)</i>	<i>Durée de dialyse (h)</i>	<i>Diamètre (nm)</i>	<i>Principe actif</i>	<i>Réf.</i>
<i>PLA-co-(d'α-Tocopheryl de PEG₁₀₀₀) succinate</i>	DMF	3,5	30	367-475	Paclitaxel	174
<i>PCL-PVA</i>	DMSO	12-14	45	457	Paclitaxel	175
				981	Doxorubicine	
<i>PLGA</i>	DMSO	10	24	635	Acide rétinoïque	176
<i>PCL-PEG-PCL</i>	1,4- dioxane	12	24	33	Clonazépam	177

(a) MWCO : Poids moléculaire de séparation de la membrane de dialyse.

III) LIBERATION DES PRINCIPES ACTIFS

Comme mentionné plus tôt, l'encapsulation d'un PA chimiothérapeutique au sein de nanovecteurs permet de maintenir, protéger et transporter le PA vers la cible à traiter, ce qui permet de limiter les effets secondaires liés aux PA eux même ¹⁷⁸. Grâce à cette

encapsulation, la pharmacocinétique du PA peut être modifiée en contrôlant sa distribution et libération dans l'organisme. Par ce biais, le seuil thérapeutique est atteint avec des doses injectées inférieures à celles requises si le PA était injecté seul. Cette libération est un axe important de la recherche dans le domaine de la vectorisation. Il existe deux mécanismes fondamentaux de libération de PA à partir de NPs : la libération du PA par diffusion hors du vecteur ou la libération du PA déclenchée par un stimulus, interne ou externe ¹⁷⁹.

1) Libération par diffusion (libération passive)

Le phénomène de diffusion implique la libération du PA au travers de la membrane ou de la matrice polymère constituant le nanovecteur. Suivant la porosité de la membrane ou de la matrice, les vitesses de libération sont plus ou moins rapides et ce phénomène est régi par le gradient de concentrations du PA entre l'intérieur du vecteur et le milieu environnant. Cette libération peut être influencée par plusieurs paramètres ^{160,179-181} tels que la distribution de taille des vecteurs, la nature du polymère, sa masse molaire, la solubilité du PA dans le milieu environnant... Généralement, plus la membrane ou la matrice polymère est épaisse, plus la libération du PA est lente ¹⁸¹. Le milieu de libération peut soit accélérer ou freiner la libération du PA selon sa solubilité dans ce milieu. Ainsi, il est recommandé de travailler dans des conditions où ce milieu de libération n'aura pas d'influence, ce que l'on appelle les conditions **Sink**. Ces conditions sont respectées si la concentration en PA dans le milieu extérieur est toujours largement inférieure à sa saturation ($\leq 20-30$ % de sa solubilité maximale, ou ≤ 10 % pour des conditions « **Perfect Sink** »).

Dans la littérature, plusieurs modèles sont employés pour modéliser la libération du PA par diffusion. Dans le cas des systèmes polymères de morphologie sphérique, la **Loi de Fick** peut être utilisée pour décrire le mécanisme de transport et de diffusion du PA :

$$F = -D \frac{dc}{dx}$$

Avec :

F : flux du PA par unité de surface (mol/m².s)

c : concentration du PA (mol/m³)

D : coefficient de diffusion du PA dans le polymère (m²/s)

En dérivant cette première loi de Fick, on obtient la deuxième loi de Fick dont la solution donne le profil de concentration du PA en fonction du temps (t) et des ordonnées spatiales (x, y, z).

$$\frac{\partial c}{\partial x} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right)$$

Il est cependant possible de trouver d'autres modèles mathématiques plus simples¹⁸². Dans la majorité des travaux, et afin de simplifier les modèles mathématiques, les chercheurs posent souvent les hypothèses suivantes¹⁸² :

- La diffusion du PA est l'étape chimiquement déterminante
- Le coefficient de diffusion D est constant
- Les conditions Sink sont bien respectées, aussi la concentration en PA dans le milieu de libération est considérée proche de zéro
- L'intégrité de la membrane ou matrice polymère est conservée tout au long de la libération (absence de dégradation qui favoriserait la fuite du PA)
- La résistance au transfert du PA, au niveau de l'interface solide/liquide du milieu de libération, est négligeable.

Dans le cas des systèmes de morphologie sphérique et en se limitant à la période de libération pendant laquelle le taux de libération est \leq à 90 %, la cinétique de libération du PA peut être modélisée par l'équation suivante :

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

Avec :

M_t : quantité de PA libérée au temps t (g)

M_∞ : quantité de PA totale encapsulée (g)

D : coefficient de diffusion du PA dans le polymère constituant l'objet (m^2/s)

R : rayon de la sphère (m)

t : temps (s)

Crank¹⁸³ a également énoncé des équations de diffusion à partir d'objets présentant d'autres géométries.

2) Libération stimulée d'un principe actif

Les polymères stimuli-sensibles présentent des modifications physiques ou chimiques provoquées par de faibles variations d'un stimulus. L'utilisation de ce type de polymère dans des systèmes de vectorisation permet d'améliorer le traitement des cellules à traiter en contrôlant la libération du principe actif dans le temps et/ou dans l'espace, et en ayant recours aux stratégies de ciblage passif et/ou actif. Ces vecteurs stimuli-sensibles

représentent un axe de recherche important et récent dans ce domaine. Ainsi, l'utilisation d'un polymère à caractère stimuli-sensible est une voie recherchée pour améliorer la libération des PAs, notamment anticancéreux ^{184,185}.

Les stimuli (Figure 16) sont classés en deux grandes catégories :

- **Stimuli physiques ou externes** : température, contrainte mécanique, lumière, champs magnétique et électrique.
- **Stimuli chimiques / biochimiques ou internes** : température, pH, force ionique, molécule chimique (glucose, espèce oxydante ou réductrice) ou biochimique (enzymes, antigènes. . .) ^{15,186,187}.

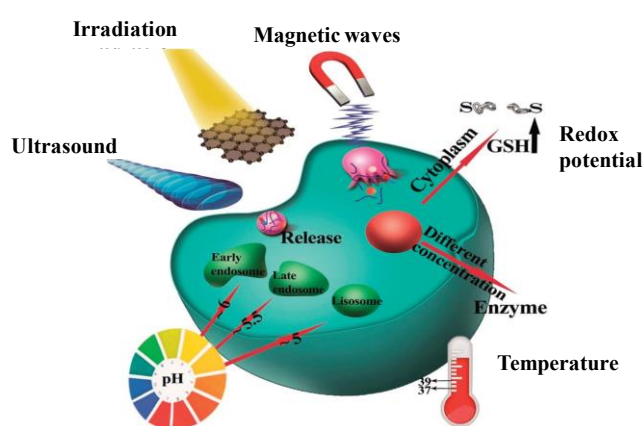


Figure 16 : Différents stimulus externes et internes employés dans les systèmes de délivrance de médicaments ¹⁸⁸

a) Température

La température est le stimulus physique le plus étudié dans la littérature ¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Certains polymères présentent une solubilité dans l'eau très fortement influencée par la température pour des raisons enthalpique et entropique (Tableau 9). Il existe deux types de polymères thermosensibles : les polymères à LCST (Low Critical Solubility Temperature) et les polymères à UCST (Upper Critical Solubility Temperature).

Fondamentalement, les polymères à LCST sont solubles dans un solvant (l'eau par exemple) à une température inférieure à une température critique (LCST), mais deviennent insolubles lorsque la température dépasse cette LCST. A l'opposé, les polymères à UCST présentent une thermosensibilité inversée. Ils sont solubles à une température supérieure à la UCST et ils deviennent insolubles par diminution de la température.

Tableau 9 : Polymères thermosensibles utilisés dans le domaine biomédical

<i>Polymère</i>	<i>Température de transition de phase en solution aqueuse</i>	<i>Réf.</i>
<i>Poly(N-isopropylacrylamide)</i>	30-34 °C	192
<i>Poly(N,N-diéthylacrylamide)</i>	32-34 °C	193
<i>Poly(méthyl vinyle éther)</i>	37 °C	194
<i>Poly(N-vinylcaprolactame)</i>	30-50 °C	195
<i>Polyacrylamide et poly(acide acrylique)</i>	25 °C	196

Chang et al. ¹⁹⁷ ont par exemple synthétisé des copolymères poly(méthacrylate de méthyle)-*b*-poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N*-acryloxysuccinimide) puis formulé des micelles encapsulant un anti-inflammatoire (acétate de prednisolone). Ils ont ensuite étudié l'effet de la température sur la libération de cet anti-inflammatoire encapsulé dans les micelles. En augmentant la température de 20 à 45 °C, la libération du PA augmente de 33 % à 50 % après 120 h dans le cas des micelles réticulées, et de 36 à 70 % dans le cas des micelles non-réticulées. Ces auteurs expliquent cette différence de libération par le fait que l'augmentation de la température ne détruit pas les micelles réticulées, ce qui entraîne une libération moins rapide dans ces micelles que dans le cas des micelles non-réticulées.

Boustta et al. ¹⁹⁸ ont quant à eux étudié le poly(*N*-acryloylglycinamide) qui possède des propriétés UCST. Au-dessus de la température critique ($T = 48^{\circ}\text{C}$ pour une concentration de 1,5 % w/w), ce polymère est soluble dans l'eau, ce qui permet son injection par seringue au niveau de tissus présentant une température légèrement supérieure à la température corporelle, pour ne pas entraîner de lésions. À la température corporelle, ce polymère gélifie. Ceci permet d'envisager d'injecter une solution de polymère/PA et former *in situ* des vecteurs de PA qui libéreront progressivement celui-ci. Ces auteurs ont ainsi encapsulé des composés modèles comme l'acétate de cobalt, des colorants comme la tartrazine et le bleu de méthylène ou de l'albumine.

b) Champ magnétique

Le champ magnétique peut être appliqué à certaines particules pour favoriser leur vectorisation et leur accumulation sur une cible donnée ¹⁹⁹. Les microparticules à base de magnétite (Oxyde de Fer, Fe_3O_4) sont les systèmes les plus cités dans la littérature. Elles sont généralement recouvertes de composés hydrophiles pour les stabiliser (dextrane, PVA, acide laurique), ou incorporés dans des hydrogels. Dans cette optique, Chen et al. ²⁰⁰ ont

élaboré des NPs pour traiter les tumeurs de manière ciblée. Les NPs de Fe_3O_4 sont alors recouvertes de silice et de PEG, et leur surface est conjuguée avec de la DOX.

Licciardi et al.²⁰¹ ont également préparé des nanovecteurs magnétiques d'environ 300 nm par émulsion/ évaporation de solvant. Ces nanovecteurs contiennent des NPs de Fe_2O_3 (10 nm) et un PA anticancéreux (flutamide) encapsulé dans des NPs à cœur α,β -poly(*N*-2-hydroxyéthyl)-D,L-aspartamideco-(*N*-2-éthylène-isobutirrate)-*g*-poly(butyl méthacrylate) (PHEA-IB-PBMA). En appliquant un aimant externe au niveau des reins de rats, ils ont alors observé une biodisponibilité très importante de ces particules à cet endroit, par rapport aux autres organes comme le foie, la rate et les poumons.

Hu et al.²⁰² ont élaboré différents types de microcapsules formées de multicouches de Fe_3O_4 /poly(allylamine) (Fe_3O_4 /PAH)₄ contenant du dextrane-FITC (Dextrane-Fluoresceinisothiocyanate) ou de la DOX. Ils ont étudié la libération de ces composés sous l'action d'un champ magnétique. Dans un premier temps, et sous l'action d'un champ magnétique de faible intensité, la diffusion du dextrane-FITC ou de la DOX est très faible. Ils ont expliqué ce phénomène par le fait qu'il y a apparition de nano-cavités sous l'action de ce faible champ magnétique favorisant une libération lente des composés. Ensuite, ils ont observé une libération de type *burst* causé par la dégradation des microcapsules due à l'accumulation des nano-cavités. Finalement, des tests biologiques ont montré la forte pénétration de ces microcapsules au sein de cellules cancéreuses.

c) pH

Un polymère pH-sensible subit un changement hydrophobe-hydrophile selon le pH du milieu. L'auto-assemblage de copolymères amphiphiles dont le bloc hydrophobe est pH-sensible est donc directement influencé par le changement du pH. Les polymères pH-sensibles présentant des fonctions acides carboxylique ou sulfonique ou des fonctions basiques comme des sels d'ammonium dont la protonation dépend du pH sont largement décrits dans plusieurs revues^{203–205} (Tableau 10).

Dans le corps humain, l'environnement extracellulaire d'une tumeur est généralement plus acide (pH variant de 6 à 7) que celui d'un tissu sain (pH = 7,4)^{206–209}. Au niveau intracellulaire, des gradients de pH sont également observés. Par exemple, le pH du cytoplasme des cellules cancéreuses est égal à 7,4, alors que le pH des endosomes est compris entre 5 et 6 et celui des lysosomes entre 4 et 5²¹⁰. Cette différence de pH à l'intérieur des cellules tumorales rend l'utilisation des nanovecteurs pH-sensibles très intéressante.

Dans la littérature plusieurs études ont ainsi été consacrées au développement des systèmes capables d'encapsuler un PA au pH physiologique, puis de le libérer par changement du pH (au voisinage ou à l'intérieur des cellules cancéreuses). Au LCPM, ceci a fait l'objet d'une étude réalisée par ForeroRamirez qui a travaillé sur la conception des nanocapsules à écorce poly((méthacrylate de méthyle)-*co*-(méthacrylate de diméthylaminoéthyle)) (poly(MMA-*co*-DEAEMA)) qui présentent un comportement pH-sensible dans des domaines de pH similaires aux variations du pH en milieu physiologique.

Tableau 10 : Polymères pH-sensibles utilisés dans le domaine biomédical

<i>Polymère</i>	<i>Réf.</i>
<i>Poly(2-Diéthylaminoéthyl Méthacrylate)</i>	211, 212
<i>Poly(acide acrylique)</i>	213, 214
<i>Chitosane</i>	215–217
<i>Acide hyaluronique</i>	218–220

Yang et al.²²¹ ont élaboré des copolymères triblocs à base de poly(ϵ - caprolactone)-*b*-poly(2-(diéthylamino)éthylméthacrylate)-*b*-poly méthacrylate de (poly(éthylène glycol) méthyl éther) (PCL-*b*-PDEAEMA-*b*-PPEGMA). Ces copolymères s'auto-organisent pour former des micelles pouvant être considérées comme des systèmes tricouches et pouvant enfermer de la DOX. La partie centrale (PCL) est hydrophobe et solubiliserait un composé hydrophobe (DOX), la deuxième partie (PDEAEMA) est pH sensible et la dernière est hydrophile (PPEGMA) assurant la furtivité du nanovecteur. À pH 7,4, la partie PDEAEMA est neutre et demeure hydrophobe, ce qui permet de maintenir la DOX au sein du cœur de la micelle. À pH 5, le PDEAEMA devient cationique, ce qui entraîne un gonflement des micelles favorisant alors la libération de la DOX.

Du et al.²²² ont élaboré des micelles et des vésicules à partir de copolymères triblocs constitués de poly(2-(méthacryloyloxy) éthylphosphorycholine) (PMPC), poly(méthacrylate de (2-(diisopropylamino)éthyle)) (PDPA) et poly(méthacrylate de (2-(diméthylamino)éthyle)) (PDMA). Ce copolymère tribloc est amphiphile à un pH supérieur à 6,2, mais devient totalement soluble dans l'eau à pH inférieur ou égal à 5. En effet, le PMPC et le PDPA contenant une amine tertiaire qui se protone à pH inférieur à 5. Le copolymère amphiphile devient alors totalement hydrosoluble.

d) Oxydo-réduction

Les espaces extracellulaires et intracellulaires présentent une différence au niveau de potentiel et sont respectivement oxydant et réducteur. Ce potentiel redox a fait l'objet de plusieurs revues et a incité les scientifiques à rechercher des nanovecteurs rédox-sensibles ²²³⁻²²⁵.

Sun et al. ²²⁶ ont ainsi élaboré des micelles d'environ 100 nm de diamètre à partir d'un copolymère dibloc poly(éthylène oxyde)-*b*-poly(*N*-méthacryloyl-*N'*-(*t*-butyloxycarbonyl) cystamine) (PEO-*b*-PMABC). Ils ont montré qu'en présence d'un réducteur comme le dithiothreitol, la rupture des liaisons S-S présentes dans le bloc PMABC entraînait un désassemblage des micelles. Cela a alors été mis à profit pour libérer de la DOX *in vivo*. Des expérimentations sur cellules ont validé la libération accélérée de ce PA en présence de cet agent réducteur. Les travaux de Li et al. ²²⁷ portent quant à eux sur la synthèse de dendrimère PEG présentant des fonctions SH. La présence de ponts disulfure obtenus par oxydation en présence de dioxygène permet la réticulation du cœur des dendrimères et leur stabilisation. Ainsi, les micelles de 30 nm de diamètre peuvent être chargées en Paclitaxel, lequel est libéré par destruction des micelles en présence de glutathion (agent réducteur).

e) Lumière

La lumière est également un facteur physique intéressant car elle est facilement et précisément applicable (pas de contact, localisée), et modulable en termes d'énergie, d'intensité, de polarisation. . . Pour conférer un caractère photosensible aux nanovecteurs, les copolymères amphiphiles qui les composent doivent posséder des fragments photochromiques dans leur bloc hydrophobe. Soumis à une irradiation lumineuse, la polarité du bloc hydrophobe augmente alors significativement, et dans certains cas ce bloc peut même devenir hydrophile. Ce changement de polarité entraîne alors une dissociation des nanovecteurs. Il existe deux grandes familles de polymères photosensibles selon l'effet de la source lumineuse.

(i) Modification de la balance hydrophile-hydrophobe (HLB) du copolymère amphiphile employé

La modification de la HLB du copolymère amphiphile permettant l'obtention de nanovecteurs représente la plus grande partie des systèmes photosensibles décrits dans la littérature. Cette modification de la HLB n'entraîne pas l'élimination du fragment photochromique mais juste une modification de la polarité du bloc hydrophobe qui devient

moins hydrophobe, ou même hydrophile dans certains cas (Figure 17).

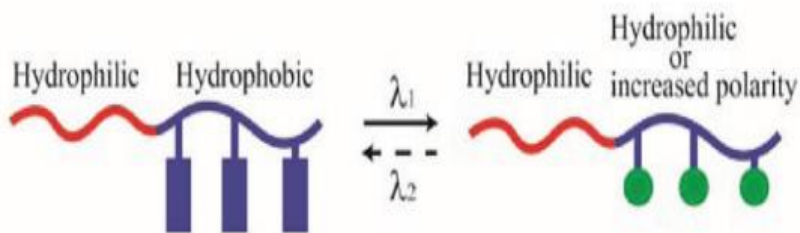


Figure 17 : Modification schématique de la balance hydrophile-hydrophobe d'un copolymère ²²⁸

Ces systèmes peuvent ainsi être classés en deux catégories selon le type de la modification de la balance hydrophile-hydrophobe : modification réversible et modification irréversible.

▪ **Modification réversible :**

Plusieurs molécules photochromes comme l'azobenzène ^{229,230}, le 1,2-diaryléthène ²³¹, le spiropyrane ²³², le diéthyléthène ²³³, le stilbène ²³⁴ ou le diazonaphthoquinone ²³⁵ ont été étudiées dans la conception des nanovecteurs photosensibles. Ces molécules présentent une réaction de photoisomérisation réversible sous ultraviolet ou lumière visible (Figure 18).

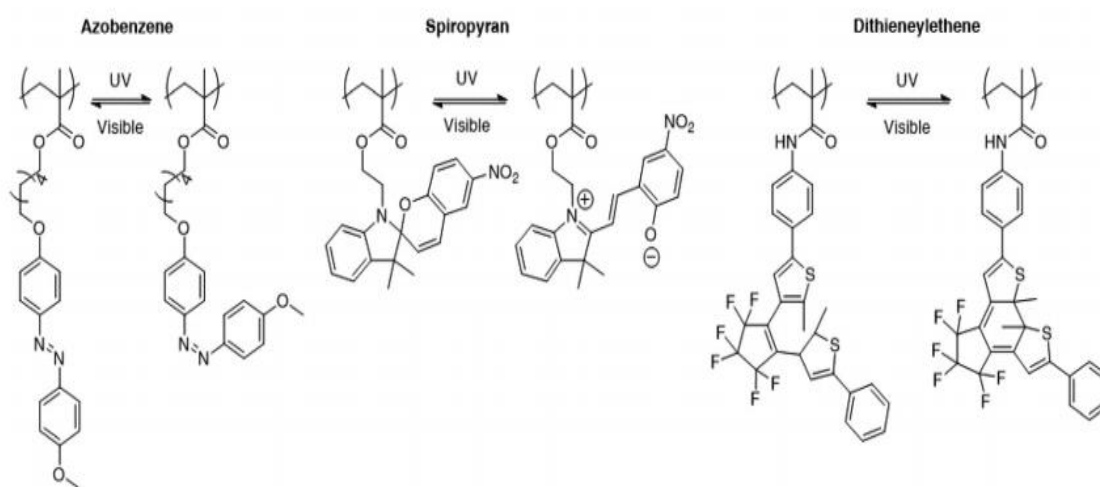


Figure 18 : Photoisomérisations réversibles de copolymères à bloc à base d'azobenzène, de spiropyrane et de 1,2-diaryléthène ²³⁶

En 1937, Hartley ²³⁷ décrit pour la première fois la photoisomérisation réversible *Trans-Cis* de l'azobenzène. Cette molécule est composée de deux benzènes liés par une double liaison N=N et présentent deux isomères structuraux, *Trans* et *Cis*. La molécule est plane sous sa forme *Trans* et non plane sous sa forme *Cis* ²³⁸. La forme *Trans* est la forme thermodynamiquement stable ^{239,240} et présente un pic d'absorption autour de 350 nm ²⁴¹, associé à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de l'azobenzène. La forme *Cis* présente quant à elle un pic d'adsorption plus petit autour de 450 nm qui correspond à la transition $n \rightarrow \pi^*$ de

l'azobenzène^{239,242}. La photoisomérisation *Trans-Cis* de cette molécule est extrêmement rapide (de l'ordre de la picoseconde) par adsorption d'un photon UV²⁴³. Le premier polymère photosensible contenant un groupement azobenzène a été décrit par Ringsdorf et al. en 1984²⁴⁴ qui a décrit la polymérisation radicalaire conventionnelle de l'acrylate de 6-[4-(4-Cyanophénylazo)phénoxy]hexyle.

Se et al.²⁴⁵ ont quant à eux développé un copolymère dibloc poly(*N,N*-diméthyl-4-vinylphenethylamine-*b*-styrène) portant un dérivé d'azobenzène (*p,p'*-Bis(chlorométhyl)azobenzène) sur la chaîne latérale. Ce groupement photosensible peut être incorporé soit dans la chaîne principale du copolymère, soit dans sa chaîne latérale.

Le processus de la photoisomérisation réversible de l'azobenzène a également été mis à contribution par Zhao et al.^{246,247} sur des systèmes micellaires composés d'un copolymère dibloc dont le bloc hydrophile est le poly(acrylate de *t*-butyle-*co*-acide acrylique) et le bloc hydrophobe est un polyméthacrylate modifié avec des groupements pendants d'azobenzène (Figure 19). Sous irradiation UV, l'isomère *Trans* de l'azobenzène qui présente un moment dipolaire égal à 0 se transforme en isomère *Cis* ayant un moment dipolaire égal à 4,4 D. Cette augmentation de la polarité modifie le caractère tensioactif du copolymère employé et entraîne alors la dissociation des micelles initiales.

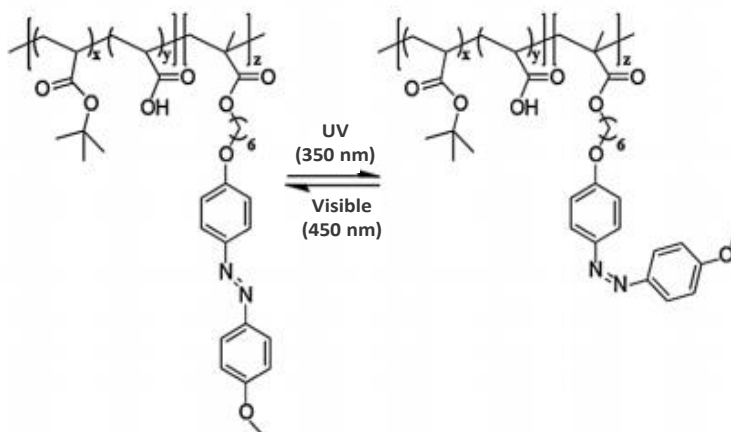


Figure 19 : Photoisomérisation réversible d'un copolymère à bloc à base d'azobenzène²²⁸

Le caractère chromophore de l'hétérocycle 1,2-diaryléthène a été découvert en 1905 et expliqué en 1988 par Irie et Mohri²⁴⁸. Les diaryléthènes sont des dérivés du Cis-Stilbène construits autour d'une double liaison C=C substituée par deux groupements aryle en Cis. Tous les diaryléthènes possèdent un motif du type 1,3,5-hexatriène. Sous irradiation UV (325 nm), le motif hexatriène (forme ouverte incolore) se transforme en un motif de type 1,3-cyclohexadiène (forme fermée colorée) par une réaction de cyclisation. La réaction réversible (cycloréversion) s'effectue par irradiation dans le domaine du visible (488 nm) et

la molécule retrouve sa forme Cis ²⁴⁹. La valeur de cette dernière longueur d'onde varie de 313 nm jusqu'à 405 nm selon les substituants du 1,2-diaryléthène ^{248,250}. Ces molécules diaryléthène photosensibles peuvent être incorporées dans la chaîne principale d'un polymère ou en groupements latéraux. Stellacci et al. ²⁵¹ ont ainsi été les premiers à développer un polymère photosensible à base de 1,2-diaryléthène. Nishi et al. ²⁵² ont ensuite élaboré des copolymères dibloc poly(diaryléthène)-*b*-polystyrène par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaînes réversible par addition fragmentation (RAFT). Le groupement terminal à l'extrémité des chaînes copolymères a ensuite été substitué par un thiol pour permettre de lier des chaînes à la surface d'une NP d'or, pour lui conférer le caractère photosensible ²⁵².

La découverte du caractère photosensible du Spiropyrane a eu lieu en 1920 avec le changement de couleur d'une solution à base de spiropyrane. Ce changement de coloration provient de la rupture d'une liaison C-O sous l'effet de l'excitation UV (Figure 20). Cette photoactivation conduit, *via* un réarrangement structural, à la formation d'une molécule à structure ouverte (mérocyanine) qui absorbe dans le visible.

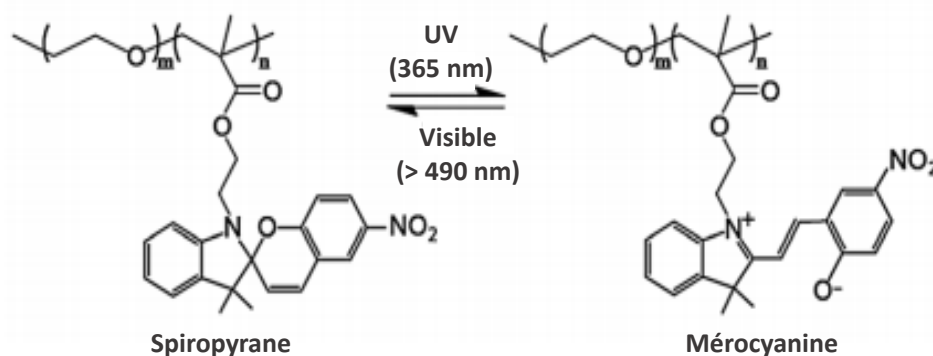


Figure 20 : Photoisomérisation réversible *Trans-Cis* du spiropyrane²⁵³

La première étude détaillée du caractère photosensible des spiropyranes a été réalisée par Fischer et al. en 1954 ²⁵⁴. Smets a ensuite étudié en 1972 le caractère photosensible de copolymères à base de MMA et comportant des groupements de spiropyrane²⁵⁵.

Lee et al. ²³², quant à eux, ont préparé des micelles à partir de copolymères dibloc de poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(méthacrylate de 2-(Triméthylsilyloxy)éthyle) modifiés par des groupements spiropyrane. La destruction des micelles produites par auto-organisation de ces copolymères est réalisée sous UV par transformation du spiropyrane neutre en mérocyanine chargée. Ces auteurs ont également étudié la libération sous irradiation UV (365 nm) de la coumarine et ont montré que l'encapsulation de cette molécule était réversible: il est à nouveau possible d'encapsuler 50 % de la coumarine initialement libérée

sous irradiation visible. Menon et al. ²⁵⁶ ont quant à eux synthétisé des copolymères dibloc de poly(méthacrylate de spiropyrane)-*b*-poly(3-*O*-4-vinylbenzoyl-*D*-glucopyranose). Ils ont étudié l'encapsulation et la libération sous l'effet de l'irradiation UV à 360 nm, et ont également observé la reformation des micelles sous irradiation à 560 nm.

▪ **Modification irréversible :**

Le changement de la balance hydrophobe-hydrophile des copolymères amphiphiles employés pour la formation des vecteurs peut également être irréversible. Dans ce cas, il existe différents types de molécules chromophores (photosensibles) tels que le méthylpyrène^{257,258}, l'*o*-nitrobenzyle, l'ester de coumarine ²⁵⁹ et l'ester de *p*-méthoxyphénacyle²⁶⁰. Sous irradiation, ces groupements fonctionnels chromophores sont clivés et le bloc initialement hydrophobe du copolymère amphiphile devient alors hydrophile par formation de fonctions acide carboxylique (Figure 21). Néanmoins, cette réaction de photoclivage ne se réalise pas dans les mêmes conditions selon les groupements chromophores. Par exemple, le photoclivage du méthylpyrène sous irradiation peut être réalisé soit en présence d'eau, soit d'un solvant protique. Ce n'est pas le cas pour l'*o*-nitrobenzyle dont le photoclivage ne nécessite pas la présence d'eau ^{261,262}. Les groupements *o*-nitrobenzyle et coumarine sont couramment utilisés pour des applications dans le domaine biomédical car ils peuvent être irradiés par deux photons, ce qui est très apprécié pour les utilisations pratiques dans ce domaine ^{263,264}.

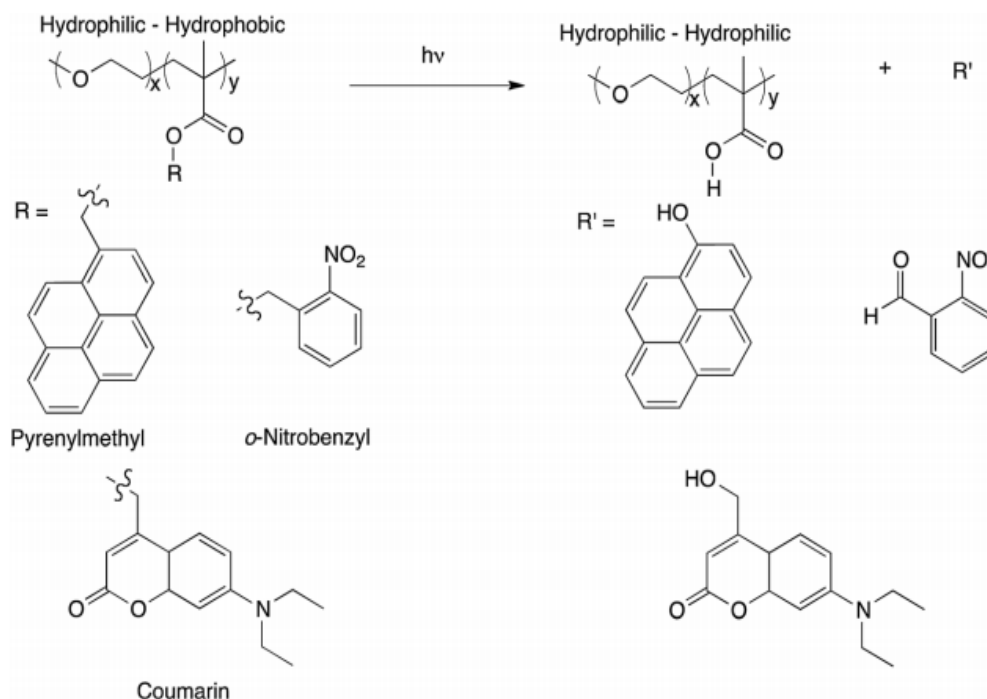
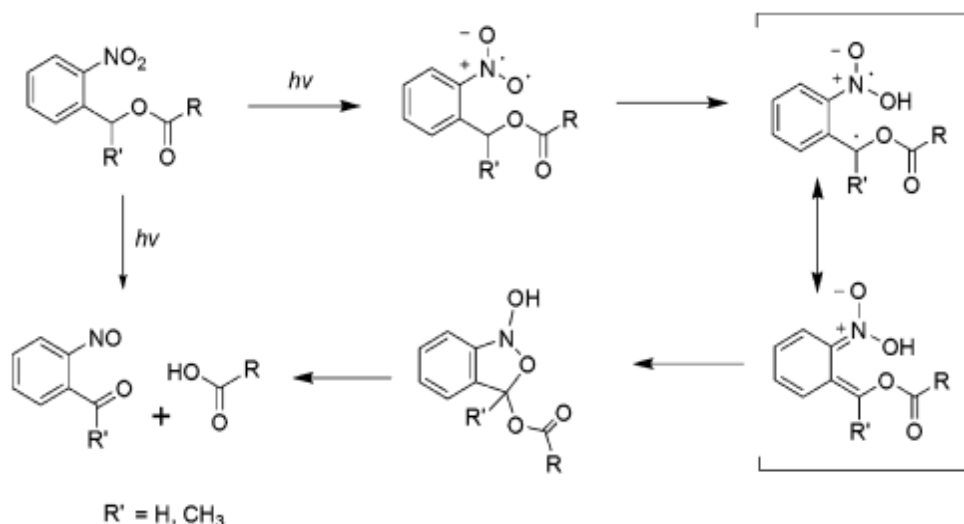


Figure 21 : Différents types d'esters photoclivables utilisés dans la modification irréversible de la balance hydrophile-hydrophobe ²⁵³

Puisque ce sujet de thèse porte sur des copolymères à base d'*o*-nitrobenzyle, nous concentrerons ce point de la bibliographie sur ce groupement photosensible. Le caractère photosensible de ce groupement a été décrit pour la première fois par Schofiels²⁶⁵, puis le mécanisme chimique de cette conversion a été expliqué par Woodward en 1970²⁶⁶. Le photoclivage du groupement *o*-nitrobenzyle (hydrophobe) donne un dérivé *o*-nitrosobenzaldéhyde (hydrophile) et un acide carboxylique²⁶⁵ (Figure 22). Si le CH₂ du *o*-nitrobenzyle est substitué, alors l'irradiation produit une *o*-nitrobenzyl cétone.



*Figure 22 : Mécanisme de photoisomérisation d'un dérivé d'*o*-nitrobenzyle²⁶⁷*

Ce groupement photosensible a été introduit dans des copolymères pour donner naissance à des nanovecteurs photosensibles. Ainsi, Lee et al.²⁶⁸ ont par exemple préparé un copolymère dibloc PEO₁₁₃-*b*-PHEMATMS₄₅ par polymérisation radicalaire contrôlée du méthacrylate de 2-triméthylsilyloxy-éthyle et en utilisant le PEO comme macroamorceur. Dans une deuxième étape le bloc hydrophobe de ce copolymère a été modifié par introduction de groupements photosensibles *o*-nitrobenzyle. Des micelles d'un diamètre moyen de 60 nm ont alors été formulées par auto-organisation de ces copolymères dans l'eau et l'encapsulation de deux types de molécules a été testée dans ces micelles : l'acide pyrène-1-butérique (lié chimiquement sur les micelles par le liant photosensible) et la coumarine (encapsulée lors de la formation des micelles). Ils ont alors montré que les deux molécules encapsulées étaient libérées simultanément sous irradiation UV (Figure 23).

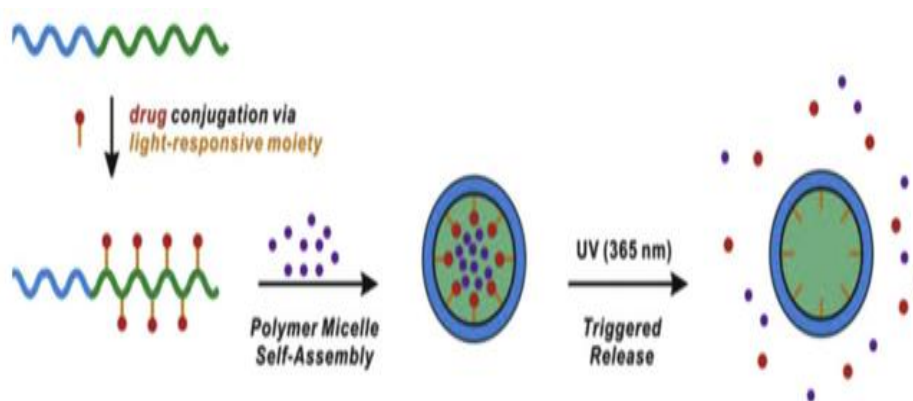


Figure 23 : Fixation d'une molécule par lien photosensible sur le bloc hydrophobe d'un copolymère amphiphile et encapsulation d'une deuxième molécule hydrophobe lors de la formation des micelles, puis libération des molécules sous irradiation UV ²⁶⁸

Zhao et al. ²⁶⁹ ont continué leurs études sur le groupement photosensible *o*-nitrobenzyle par la préparation d'un copolymère dibloc comportant un bloc poly(méthacrylate d'*o*-nitrobenzyle) (PMNB) et un bloc PEO. Ils ont montré que la photolyse du groupement PMNB (hydrophobe) produisant un poly(acide méthacrylique) hydrophile sous irradiation UV (365 nm), mais aussi sous irradiation par 2 photons (700 nm). Ils ont également employé ces copolymères pour encapsuler et libérer une sonde fluorescente (Nile Red) par simple irradiation UV (Figure 24).

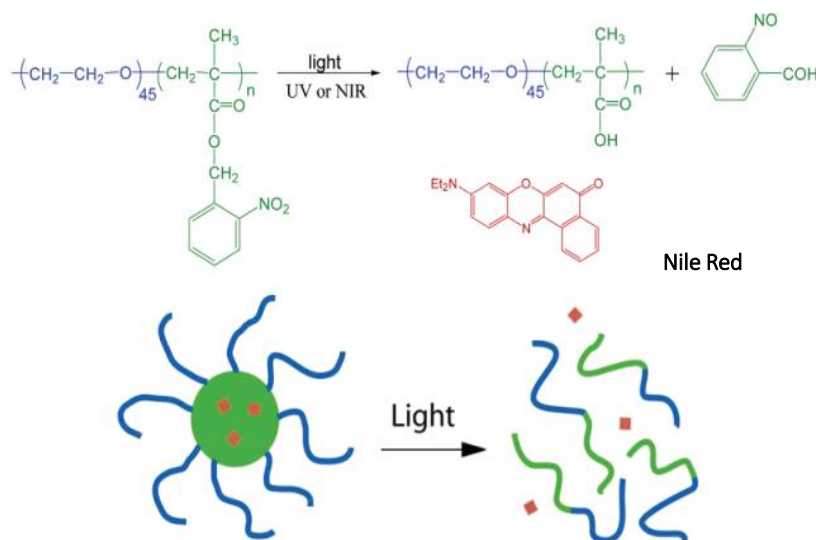


Figure 24 : (a) Irradiation d'un copolymère PEO-*b*-PNMB (b) Représentation schématique de la destruction d'une micelle et libération d'un principe actif sous l'effet de l'irradiation ²⁶⁹

La mise en évidence du caractère photosensible des nanovecteurs peut être prouvée par différentes techniques de caractérisation. Par exemple, Liu et al. ²⁷⁰ ont utilisé le microscope électronique à balayage et la diffusion dynamique de la lumière. Ils ont alors

préparé des micelles d'un copolymère Poly(éthylène glycole)-*b*-poly(α -hydroxy acides)-*g*-(*o*-nitrobenzyle) (mPEG-*b*-poly(Tyr)-*g*-NB) comportant des groupements *o*-nitrobenzyle liés chimiquement sur la chaîne latérale. Puis, sous irradiation UV, ils ont observé que ces micelles changeaient de taille et de morphologie. Ayant encapsulé le Nile Red dans ces micelles, ils ont pu suivre la libération de cette molécule par mesure de fluorescence. Tandis que la plupart des études se sont focalisées sur la formation de micelles dans l'eau, Gohy et al.²⁵³ ont synthétisé un copolymère poly(acrylate de diméthoxynitrobenzyl)-*b*-polystyrène pouvant former des micelles en solvant organique. Sous irradiation UV et dans le chloroforme, le bloc hydrophobe de ce copolymère devient hydrophile (poly(acide acrylique)) et donc insoluble dans le solvant. Le copolymère s'y auto-organise alors pour former des micelles.

(ii) Rupture de la liaison entre le bloc hydrophobe et le bloc hydrophile du copolymère amphiphile employé

Dans ce dernier cas, la rupture peut être réversible ou non, unique ou multiple. Une rupture unique permettra de séparer la partie hydrophobe de la partie hydrophile du copolymère ou encore de libérer une molécule liée au copolymère. Si la rupture est multiple, il y aura dégradation du copolymère et destruction du vecteur contenant le PA²²⁸ (Figure 25).

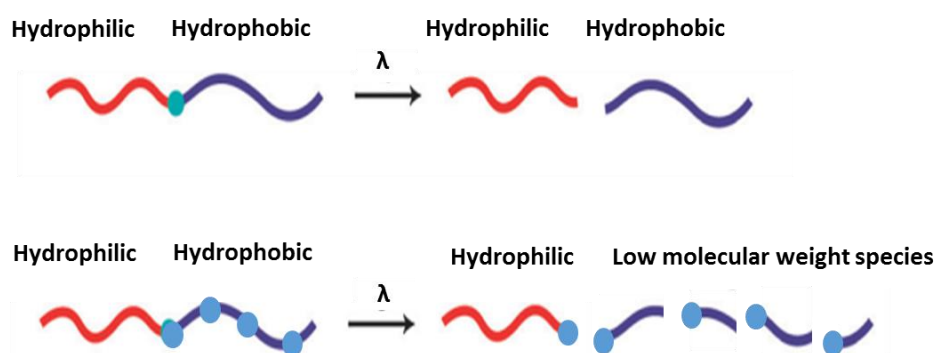


Figure 25 : Illustration schématique (A) de la rupture de la liaison entre le bloc hydrophobe et le bloc hydrophile, (B) de la rupture multiple²⁵³

▪ **Rupture réversible de la liaison entre le bloc hydrophobe et le bloc hydrophile :**

Cette catégorie de systèmes photosensibles regroupe les vecteurs à base de copolymères à blocs qui contiennent une jonction photosensible capable de détacher, ou de lier d'une manière réversible, les deux blocs du copolymère. Ceci a fait l'objet d'une étude réalisée par Yuan et al.²⁷¹ dans laquelle ils ont décrit un complexe d'inclusion photosensible à base d'azobenzène et de cyclodextrine. Pour cela, ils ont modifié

l'extrémité d'une chaîne de poly(ϵ -caprolactone) par une cyclodextrine et une deuxième chaîne poly(acide acrylique) avec de l'azobenzène. Sous irradiation visible, l'azobenzène présent sous sa forme *Trans* hydrophobe entraîne la formation d'un complexe entre l'azobenzène et la cyclodextrine, ce qui conduit à la formation d'un copolymère dibloc. En revanche, sous irradiation UV, l'azobenzène reprend sa forme *Cis* hydrophile, ce qui engendre la rupture du complexe d'inclusion d'où la séparation des deux blocs (Figure 26).

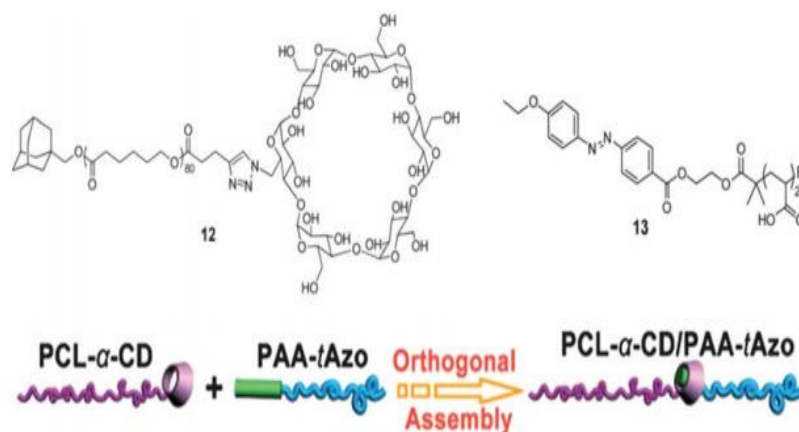


Figure 26 : Assemblage photosensible supramoléculaire à base de PCL-Cyclodextrine et poly(acide acrylique)-Azobenzène ²³⁶

▪ **Rupture irréversible de la liaison entre le bloc hydrophobe et le bloc hydrophile :**

Récemment, plusieurs études ont été consacrées au développement des nouveaux systèmes photosensibles basés sur l'insertion d'une liaison photosensible dans le copolymère amphiphile employé, qui entraîne une rupture irréversible entre ses blocs hydrophobe et hydrophile. Parmi les groupements photosensibles utilisés dans cette approche, on peut citer l'ester d'*o*-nitrobenzyle et des dérivés de l'acide truxillique²⁴⁴⁻²⁴⁶ et d'autres composés décrit dans la Figure 27.

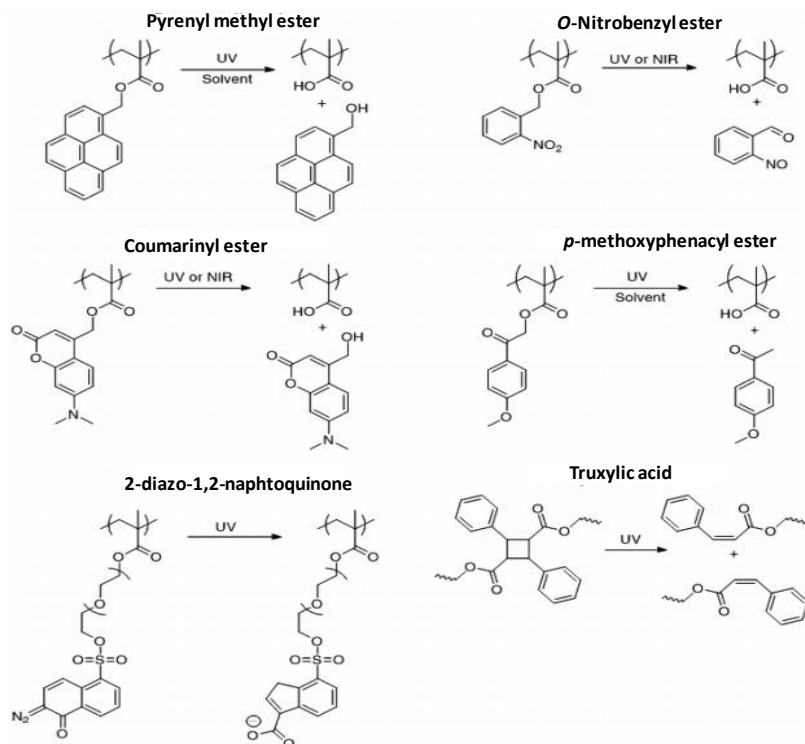
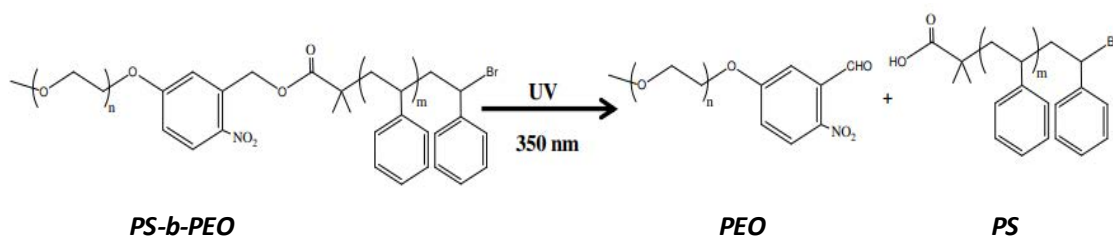


Figure 27 : Différents groupements photosensibles utilisés dans le cas d'une rupture irréversible de la jonction entre les blocs hydrophobe et hydrophile ²³⁶

Moon et al. ²⁷² ont ainsi préparé un film photosensible d'un copolymère diblocPS-*b*-PEO dont les deux blocs sont liés par une liaison photosensible *o*-nitrobenzyle. Sous irradiation UV, le lien *o*-nitrobenzyle se rompt et donne naissance à un *o*-nitrosobenzaldéhyde et un acide carboxylique d'où la rupture du copolymère comme suit (Figure 28) :



*Figure 28 : Irradiation UV du copolymère dibloc Polystyrène-*b*-Poly(oxyde d'éthylène)*

Jiang et al. ²⁶⁹ ont quant à eux préparé des micelles à partir d'un copolymère dibloc contenant une partie hydrophile (PEO) et une partie hydrophobe polyméthacrylate contenant des groupements chromophores à base de pyréne. Sous irradiation UV, la liaison ester entre chaque groupe pyréne et acrylate est rompue, ce qui entraîne la destruction de la micelle produite par auto-organisation des copolymères initiaux. Une autre possibilité pour détruire une micelle est d'avoir un groupement chromophore entre deux blocs hydrolysables. C'est ce qu'ont démontré Cabane et al. ²⁷³ qui ont travaillé sur des copolymères dibloc à base de poly(méthyle-caprolactone) substitué par un groupement d'*o*-

nitrobenzyle (bloc hydrophobe) et de poly(acide acrylique) (bloc hydrophile). Après 60 minutes d'irradiation UV à 365 nm, les micelles sont totalement disparues et ont produit des agrégats de PCL et des chaînes libres de PAA. Katz et al.²⁷⁴ ont aussi travaillé aussi sur des copolymères dibloc biocompatibles à base de poly(ϵ -caprolactone) et poly(oxyde d'éthylène). Ils ont réussi à introduire une jonction photolabile (2-nitrophenylalanine) entre les deux blocs et ils ont préparé des polymersomes contenant de la biocytine à partir de ces copolymères (Figure 29). Sous irradiation UV, la membrane de la bicouche initiale du polymersome est fragilisée, ce qui entraîne une nouvelle organisation des copolymères et la libération de la biocytine encapsulée. Des études similaires réalisées par Meier²⁷⁵ portaient sur la préparation de polymersomes capables d'encapsuler et de libérer sous irradiation des principes actifs comme des protéines, des enzymes ou de l'ADN.

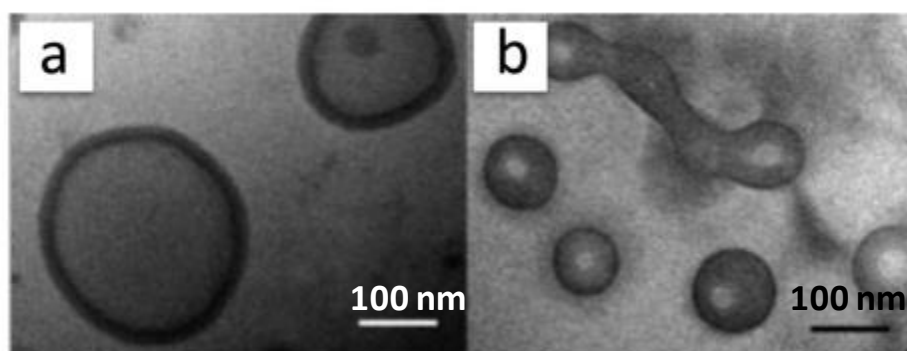
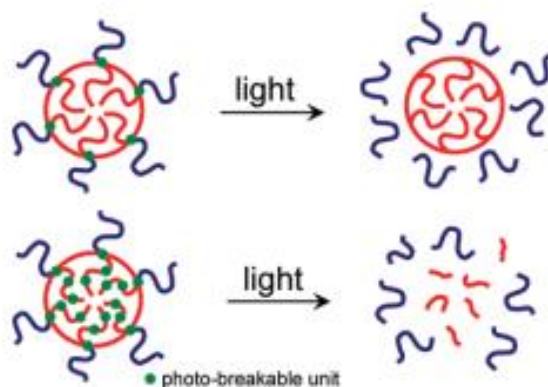


Figure 29 : Images Cryo-MET des polymersomes à base de PCL-b-PEO dont les blocs sont liés par un lien 2-nitrophénylalanine (a) avant et (b) après irradiation UV pendant 6 h²⁷⁴

▪ **Dégradation de la chaîne principale**

La conception de ce type de système est basée sur l'utilisation des groupements photosensibles placés de manière répétitive dans le bloc hydrophobe du copolymère amphiphile. Sous irradiation UV, ce bloc du copolymère est alors transformé en petites molécules, ce qui entraîne la destruction des vecteurs. Zhao et al.²⁷⁶ ont ainsi montré qu'il était possible de détruire une nanoparticule lorsque la jonction photosensible était distribuée de manière répétitive dans le bloc hydrophobe, ce qui n'est pas le cas si cette jonction fait uniquement le lien entre les blocs hydrophile et hydrophobe du copolymère (Figure 30).



*Figure 30 : Différence de sensibilité à l'irradiation entre des particules avec des jonctions photosensibles entre les deux blocs et des particules avec des groupements photosensibles placés d'une manière répétitive dans le bloc hydrophobe*²⁷⁶

Zhao et al.²⁷⁶ ont ainsi élaboré des micelles photodégradables à base d'un copolymère tribloc PEO-*b*-PUNB-*b*-PEO (où le PUNB représente un bloc hydrophobe à base de polyuréthane contenant plusieurs groupements photosensibles d'*o*-nitrobenzyle), ou encore des micelles de copolymères PEO-*b*-poly(disulfure-alterné-nitrobenzène)-*b*-PEO²⁷⁷. Sous irradiation UV, tous les groupements photosensibles sont clivés ce qui entraîne la destruction des micelles. Les auteurs ont d'ailleurs mis en évidence cette dégradation après avoir encapsulé le Nile Red au sein des micelles et suivi sa libération. Ils ont également mis en évidence par SEC (Chromatographie d'exclusion stérique) la destruction des copolymères amphiphiles en suivant la disparition du pic de haute masse molaire et l'apparition d'un pic de faible masse molaire relatif au bloc PEO qui apparaît au cours de l'irradiation.

(iii) Photo-réticulation

Comme il a souvent été décrit, les micelles peuvent encapsuler un PA mais sont en revanche des structures dynamiques qui se désagrègent en dessous d'une concentration micellaire critique. Afin d'augmenter la stabilité des structures micellaires et de réduire la diffusion des principes actifs encapsulés après injection dans le corps humain, les scientifiques ont développé des micelles pouvant être réticulées soit au niveau de leur cœur soit au niveau de leur couronne par simple irradiation^{278,279}. Cependant il faut noter que si la réticulation est trop poussée, cela peut réduire énormément la libération du PA. C'est dans l'objectif de limiter cet effet secondaire que la photo-réticulation réversible des micelles a vu le jour. A noter que la photo-réticulation, par rapport à une simple réticulation, présente l'avantage de

ne pas utiliser de réactifs chimiques et de ne pas engendrer de sous produits.

▪ **Photo-réticulation réversible**

Dans le cas de la photo-réticulation réversible, les micelles sont produites avec des copolymères portant des groupements photosensibles pouvant subir une dimérisation par cycloaddition sous la lumière visible. En revanche, sous irradiation UV les cycles formés sont détruits comme on peut le voir dans la Figure 31. La réaction de photo-réticulation réversible la plus étudiée est la photo-dimérisation par cycloaddition de groupements de coumarine sous irradiation UV, à des longueurs d'ondes supérieures à 310 nm. En revanche, sous irradiation UV à des longueurs d'ondes inférieures à 260 nm les ponts cyclobutanes préformés sont rompus²⁸⁰.

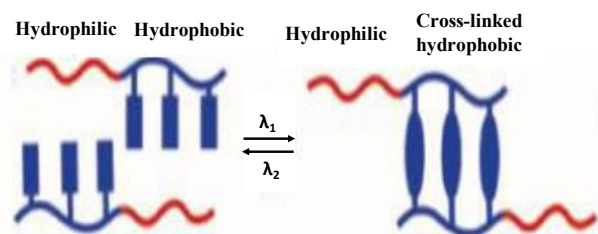
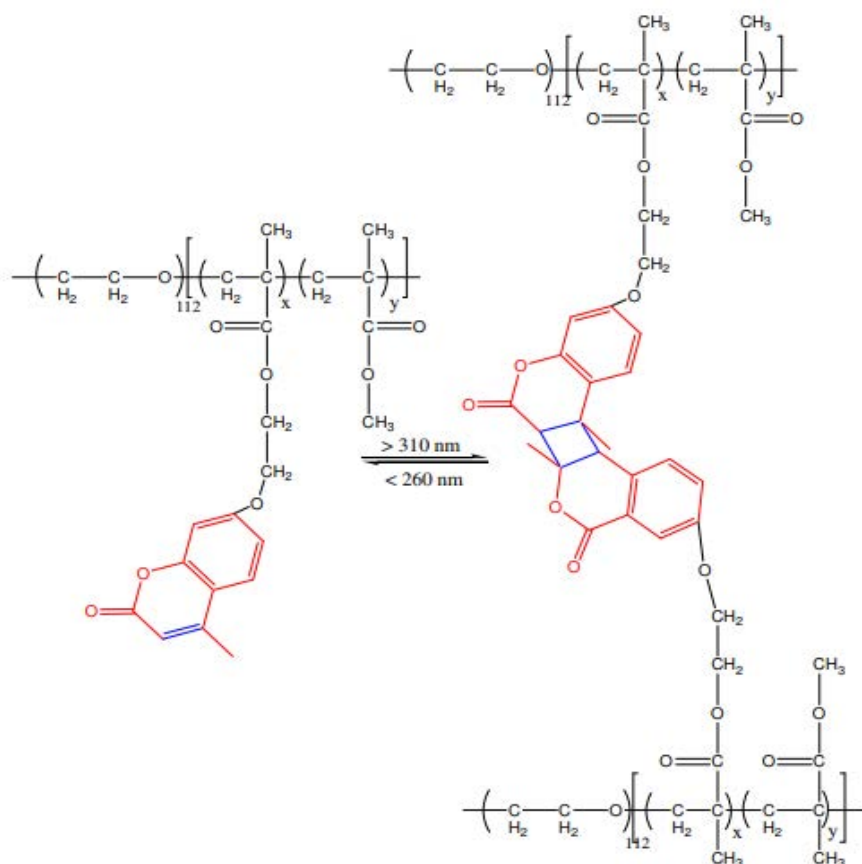


Figure 31 : Représentation schématique d'une photo-réticulation réversible d'un copolymère dibloc²²⁸

Zhao et al. ont adopté cette stratégie pour introduire des dérivés de coumarine dans des copolymères à blocs afin de stabiliser le cœur ou la couronne de micelles^{281,282} préparées à l'aide de copolymères amphiphiles à base de poly(oxyde d'éthylène) et de polyméthacrylate dont les blocs hydrophobes portaient des groupements latéraux coumarine. Ces copolymères s'auto-organisent dans l'eau pour donner des micelles²⁸¹ puis leur photo-réticulation par irradiation est réalisée à des longueurs d'ondes d'environ 310 nm. Pendant cette irradiation, les groupements coumarines subissent une cycloaddition et créent des réticulations entre plusieurs chaînes de copolymère. Ces réticulations peuvent être réversiblement cassées sous irradiation à des longueurs d'ondes inférieures à 260 nm (Figure 32). Cependant, et comme évoqué plutôt, la réticulation des micelles limite la diffusion des molécules encapsulées par rapport aux micelles non-réticulées.



*Figure 32 : Réaction de photo-réticulation réversible d'un copolymère amphiphile via des groupements de coumarine*²⁸¹

▪ **Photo-réticulation irréversible**

La première photo-réticulation irréversible a été décrite par Liu et al. qui ont étudié la photo-cycloaddition [2+2] de l'ester cinnamique^{279,283}. Des copolymères dibloccopolyisoprène-*b*-poly(méthacrylate de 2-cinnamoyléthyle) s'auto-organisent dans un mélange Hexane/THF pour former des vésicules. Par la suite, les auteurs réalisent une photo-réticulation du bloc méthacrylate de 2-cinnamoyléthyle afin d'accroître la stabilité de ces nano-objets²⁸³ (Figure 33).

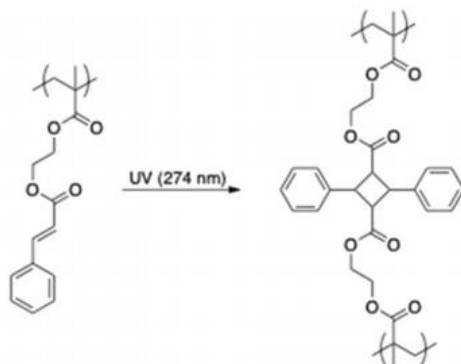


Figure 33 : Photodimérisation de l'ester cinnamique

Plus récemment, la photo-réticulation d'esters cinnamique a été combinée avec le photoclivage irréversible. Des nanocapsules peuvent aussi être préparées par photo-réticulation irréversible de l'ester cinnamique. Ceci a d'ailleurs fait l'objet d'une étude réalisée par Yusa et al.²⁸⁴.

Une autre photo-réticulation irréversible a recours au groupement *o*-nitrobenzyle. Liu et al.²⁸⁵ ont synthétisé des copolymères diblocpoly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(méthacrylate d'*o*-nitrobenzyloxycarbonylaminoéthyle) (POE-*b*-PNBOC) puis ont obtenu des vésicules par auto-assemblage de ces copolymères. Bien que le photoclivage du carbamate d'*o*-nitrobenzyle libère normalement l'amine primaire correspondante, les auteurs n'ont pas observé de destruction des vésicules sous irradiation UV à pH=7,4, mais une augmentation du rayon hydrodynamique des vésicules. Ces chercheurs ont expliqué ce phénomène par le fait que l'amine primaire produite par le photoclivage pouvait réagir avec les esters présents et induire une réticulation par réaction d'amidation (Figure 34).

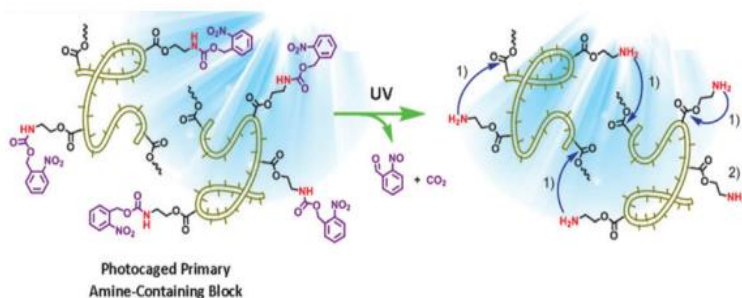


Figure 34 : Photo-réticulation irréversible des vésicules comportant un carbamate d'*o*-nitrobenzyle²⁸⁵

f) Systèmes multi-sensibles

L'utilisation des nanovecteurs multi-sensibles permet d'élargir considérablement leurs domaines d'application pour la vectorisation de PAs et permet d'avoir de multiples clés pour déclencher la libération du PA, et donc de mieux la contrôler.

(i) Systèmes photo et thermosensibles

Jiang et al.²⁸⁶ ont élaborés des micelles thermosensibles comportant également des groupements *o*-nitrobenzyle. Dans un premier temps, ils ont élaboré un copolymère comportant un bloc PEO et un deuxième bloc photo et thermosensible poly(acrylate d'éthoxytri(éthylène glycol)-*co*-acrylate d'*o*-nitrobenzyle). A des températures supérieures à la LCST (25°C) du bloc thermosensible poly(acrylate d'éthoxytri(éthylène glycol)), le copolymère dibloc amphiphile s'auto-organise pour former des micelles. Cependant, sous irradiation UV, la LCST de ce copolymère augmente de 25°C à 36°C car le bloc

hydrophobe poly(acrylate d'*o*-nitrobenzyle) se transforme alors en poly(acide acrylique) hydrophile. Dans un deuxième temps, afin d'étudier la formation et la dégradation des micelles photo et thermosensibles formées, une sonde fluorescente (Nile Red) a été encapsulée dans le cœur de ces micelles. Cette molécule, fluorescente dans un milieu hydrophobe, présente par contre une très faible fluorescence dans un milieu aqueux. Sous irradiation UV, la fluorescence des micelles contenant le Nile Red chute brusquement ce qui témoigne de la destruction des micelles et de la libération du Nile Red. L'augmentation de la température du milieu entraîne la réorganisation des copolymères PEO-*b*-poly(acide acrylique) formé, d'où la ré-encapsulation du Nile Red dans des micelles PEO/PAA.

Blasco et al.²⁸⁷ ont quant à eux synthétisé des micelles à partir d'un polymère en étoile comportant un polyméthacrylate photosensible modifié par un dérivé d'azobenzène (PAZO) et de trois bras poly(*N,N*-diéthylacrylamide) (PDEAA) thermosensibles (LCST=27°C). Une étude de ces micelles par MET montre qu'une élévation de température jusqu'à 40°C provoque l'aggrégation des micelles, en accord avec le changement de polarité de la couronne (PDEAA) des micelles qui devient alors hydrophobe (Figure 35). Ces résultats confortent ceux observés par DLS (Diffusion dynamique de la lumière) qui montrent une augmentation de la taille des micelles de 31 nm à 53 nm en chauffant de 20°C (la couronne PDEAA est alors hydrophobe) à 40°C le milieu. Ces chercheurs ont également étudié le caractère photosensible de ces micelles en utilisant une lampe UV (9W) entre 350 nm et 400 nm. Au cours de l'irradiation, une diminution de la transition p-p* et une augmentation de l'absorbance à 450 nm correspondant à la transition n-p* ont été observées et attribuées à la photo-isomérisation de l'azobenzène de la forme Trans à la forme Cis. Après 2 minutes d'irradiation, un état photo-stationnaire a été atteint et aucune évolution des spectres UV-Visible n'a été observée. Les échantillons irradiés ont été maintenus dans le noir. Leur analyse après 24 heures par UV-Visible montre une isomérisation réversible Cis-Trans. L'encapsulation du Nile Red a également été réalisée lors de l'auto-assemblage de ces polymères en étoile. A 40°C, l'intensité de fluorescence du Nile Red augmente ce qui confirme son encapsulation dans le cœur des micelles (Figure 35(b)). Cependant, à des températures inférieures à la LCST du PDEAA (LCST=27°C), les auteurs observent une diminution de la fluorescence du Nile Red liée à la diminution de l'hydrophobicité du cœur des micelles (Figure 35(a)). Après irradiation, on note également une diminution de l'intensité de fluorescence du Nile Red en accord avec la destruction des micelles et donc de sa libération (Figure 35(c)).

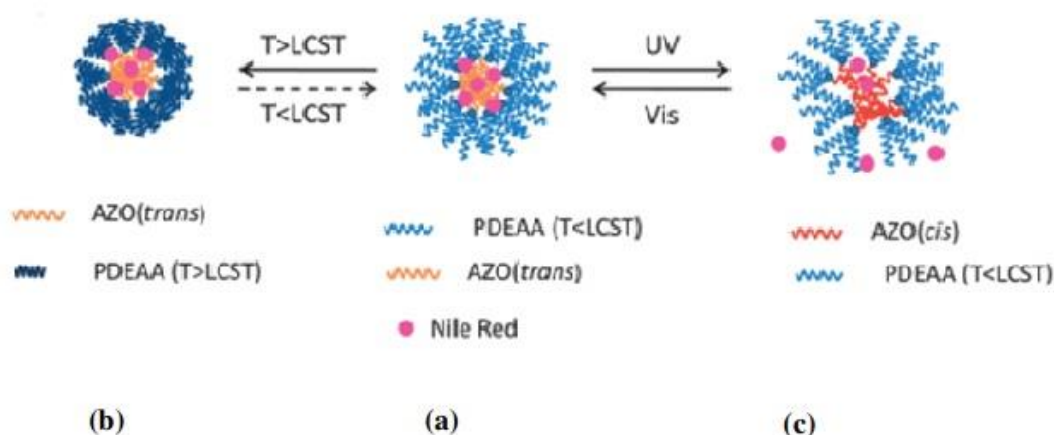


Figure 35 : Représentation schématique de la libération photo et thermo-déclenchée du Nile Red à partir de micelles ²⁸⁷

Dans la littérature, d'autres systèmes photo et thermosensibles ont également été décrits. Il s'agit par exemple de systèmes à base de copolymère tribloc poly(TEGEEA-*co*-NAB)-*b*-PEO-*b*-poly(TEGEEA-*co*-NAB) ²⁸⁸ ou de copolymère tribloc contenant des groupements azobenzène et un bloc poly(N-isopropylacrylamide) ²⁸⁹.

(ii) Systèmes photo et pH-sensibles

Meng et al. ²⁹⁰ ont élaboré des micelles photo et pH-sensibles pour véhiculer et libérer un anticancéreux (Camptothécine). Ces micelles sont formées par auto-assemblage du glycol chitosan-*o*-nitrobenzyl succinate conjugué dans l'eau. La réticulation des chaînes de la couronne de ces micelles est réalisée par réaction entre le glycol chitosane et le glutaraldéhyde (Figure 36). L'avantage d'avoir un bloc pH sensible dans ces micelles est très intéressant dans le traitement des cellules infectées puisqu'elles présentent un pH plus acide que les cellules saines. Au même temps, l'irradiation UV de ces micelles provoque leur destruction, ce qui entraîne la libération rapide du PA encapsulé.

Jin et al. ²⁹¹ ont quant à eux élaboré un copolymère poly(oxyde d'éthylène)-*b*-polyméthacrylate de (2-(diéthylamino) éthyle-*co*-6-méthacrylate de (4-phénylazo phénoxy)hexyle) [PEO-*b*-P(DEAEMA-*co*-PPHMA)] capable de s'auto-assembler en vésicules en solution aqueuse à un pH égal à 8. En ajustant le pH à 3, il y a alors une transformation des vésicules en micelles. Cette même transformation peut aussi être observée en maintenant le pH égal à 8 mais en ajoutant de la β -cyclodextrine au milieu. En présence de β -cyclodextrine, et en alternant irradiations UV et visible, il est possible d'entraîner une transition réversible des micelles en vésicules, à cause de la transition *Trans-Cis* des groupements d'azobenzène (Figure 37).

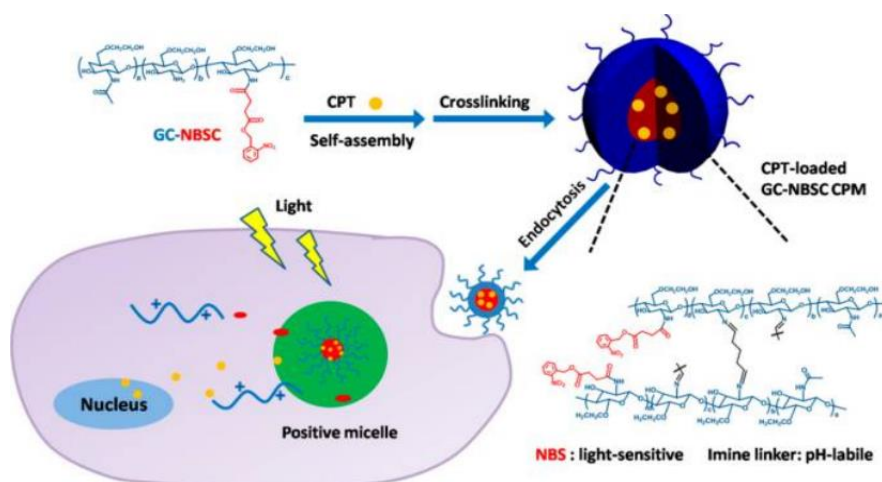


Figure 36 : Préparation de micelles photo et pH-sensibles contenant de la camptothécine et libération provoquée de ce PA ²⁹⁰

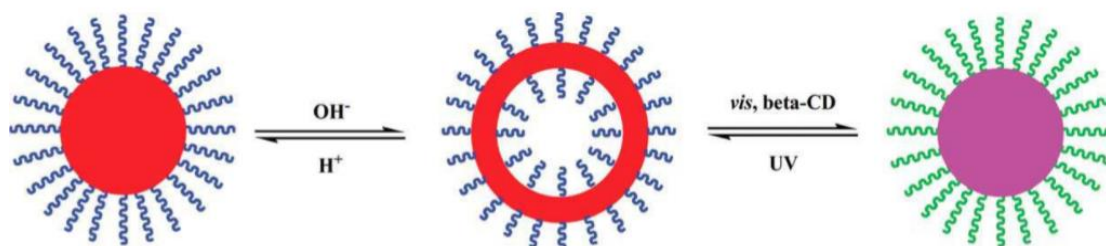


Figure 37 : Représentation schématique des transitions réversibles des micelles en vésicules ²⁹¹

Les systèmes photo et pH-sensibles ont fait l'objet de plusieurs études dans la littérature. Parmi les travaux, on peut citer les travaux réalisés par Wei et al. ²⁹² et Lin et al. ²⁹³ traitant de copolymères dibloc constitués d'un bloc hydrophile poly(oxyde d'éthylène) et un bloc polyméthacrylate hydrophobe comportant des groupements d'azopyridine photosensibles.

IV) CONCLUSION

La première partie de cette étude bibliographique était consacrée à l'étude du cancer colorectal et à la présentation des différents traitements actuellement proposés aux patients (chirurgie, chimiothérapie, chimioradiothérapie, radiothérapie et traitements ciblés). Dans la suite de cette étude bibliographique, l'évolution des nanovecteurs destinés à la vectorisation d'un PA tel qu'un anticancéreux a été présentée. Ces systèmes sont capables de protéger un PA dans le temps et dans l'espace, de l'adresser sélectivement vers le tissu ou la cellule cible et d'en contrôler la libération. Ces vecteurs ont permis de diminuer les effets secondaires des traitements anticancéreux, de diminuer la quantité du PA admis et d'augmenter sa biodisponibilité. Bien que ces vecteurs puissent présenter plusieurs

morphologies selon leur nature chimique et leur structure (liposomes, micelles, nanocapsules, nanosphères et dendrimères), les NPspolymères représentent un axe important de la recherche actuelle. Ces NPs peuvent être élaborées par divers procédés : (i) polymérisation de monomères (polycondensation interfaciale et polymérisations en milieu dispersé) ou (ii) à partir de polymères préformés (Nanoprécipitation, émulsion-évaporation de solvant organique, émulsion-diffusion de solvant organique, Emulsion/Salting-out, Emulsion/Coacervation et dialyse). Cependant, et afin d'améliorer les traitements offerts aux patients, les scientifiques se sont intéressés à déclencher la libération du PA contenu dans ces nanovecteurs en jouant sur un ou plusieurs *stimuli*. Différents *stimuli* internes et externes peuvent ainsi être employés pour déclencher et/ou contrôler la libération du PA au voisinage ou au sein de tumeurs. Ces divers stimuli ont été présentés avec une attention particulière pour les systèmes photosensibles.

Les travaux de thèse décrits dans les pages suivantes se positionnent à la croisée de quatre principales thématiques de recherche à savoir la polymérisation radicalaire contrôlée d'un monomère photosensible et l'obtention d'un copolymère amphiphile, la conception des nanovecteurs pour la thérapie cancéreuse, l'encapsulation et la libération photo-déclenchée d'un anticancéreux, et le ciblage actif des cellules cancéreuses.

V) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Kapoor, V. K.; Còlon Anatomy: Gross Anatomy, Microscopic Anatomy, Natural Variants. **2018**.
- (2) El-Shami, K.; Oeffinger, K. C.; Erb, N. L.; Willis, A.; Bretsch, J. K.; Pratt-Chapman, M. L.; Cannady, R. S.; Wong, S. L.; Rose, J.; Barbour, A. L.; et al. American Cancer Society Colorectal Cancer Survivorship Care Guidelines. *CA. Cancer J. Clin.***2015**, *65* (6), 427–455.
- (3) Becherirat, S.; Valamanesh, F.; Karimi, M.; Faussat, A.-M.; Launay, J.-M.; Pimpie, C.; Therwath, A.; Pocard, M. Discontinuous Schedule of Bevacizumab in Colorectal Cancer Induces Accelerated Tumor Growth and Phenotypic Changes. *Transl. Oncol.***2018**, *11* (2), 406–415.
- (4) Cunningham, D.; Humblet, Y.; Siena, S.; Khayat, D.; Bleiberg, H.; Santoro, A.; Bets, D.; Mueser, M.; Harstrick, A.; Verslype, C.; et al. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.***2004**, *351* (4), 337–345.
- (5) Ketzer, S.; Schimmel, K.; Koopman, M.; Guchelaar, H.-J. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Panitumumab in the Treatment of Colorectal Cancer. *Clin. Pharmacokinet.***2018**, *57* (4), 455–473.
- (6) Wang, Y.; Liu, S.; Liu, S.; Li, X.; Liu, Q.; Zou, X.; Zhu, M.; Jiang, Y. Regorafenib Treatment for Management of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of 6 Randomized Controlled Trials. *Am. J. Ther.***2018**, *25* (2), e276–e278.
- (7) Battaglin, F.; Puccini, A.; Intini, R.; Schirripa, M.; Ferro, A.; Bergamo, F.; Lonardi, S.; Zagonel, V.; Lenz, H.-J.; Loupakis, F. The Role of Tumor Angiogenesis as a Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.***2018**, *18* (3), 251–266.
- (8) Winau, F.; Westphal, O.; Winau, R. Paul Ehrlich — in Search of the Magic Bullet. *Microbes Infect.***2004**, *6*, 786–789.
- (9) Gad, S. C. *Pharmaceutical Biotechnology*; Hoboken (N.J.): Wiley-Interscience., **2007**.
- (10) Lboutounne, H.; Chaulet, J.-F.; Ploton, C.; Falson, F.; Pirot, F. Sustained Ex Vivo Skin Antiseptic Activity of Chlorhexidine in Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsule Encapsulated Form and as a Digluconate. *J. Control. Release***2002**, *82* (2), 319–334.
- (11) Müller, R. H.; Radtke, M.; Wissing, S. A. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) in Cosmetic and Dermatological Preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.***2002**, *54*, S131–S155.
- (12) Alvarez-Román, R.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H.; Fessi, H. Skin Penetration and Distribution of Polymeric Nanoparticles. *J. Control. Release* **2004**, *99* (1), 53–62.
- (13) Rocío, A.-R.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H.; Fessi, H. Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles. *Pharm. Res.***2004**, *21* (10), 1818–1825.
- (14) Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H.; Bonnet, I.; Zydowicz, N. Synthesis and Characterization of Polyurethane and Poly(Ether Urethane) Nanocapsules Using a New Technique of Interfacial Polycondensation Combined to Spontaneous Emulsification. *Int. J. Pharm.***2004**, *269* (1), 89–100.
- (15) Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges, Opportunities, and Clinical Applications. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.***2015**, *200*, 138–157.
- (16) Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' Entry into the Cell: Relevance to Drug Delivery. *Cell. Mol. Life Sci.***2009**, *66* (17), 2873–2896.
- (17) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *J. Mol. Biol.***1965**, *13* (1), 238-252, IN26-IN27.
- (18) Gregoriadis, G.; Florence, A. T. Liposomes in Drug Delivery. *Drugs***1993**, *45* (1), 15–28.
- (19) Fang, J.-Y.; Hwang, T.-L.; Huang, Y.-L. Liposomes as Vehicles for Enhancing Drug Delivery Via Skin Routes. *Curr. Nanosci.***2006**, *2* (1), 55–70.
- (20) Verma, D. D.; Verma, S.; Blume, G.; Fahr, A. Particle Size of Liposomes Influences Dermal Delivery of Substances into Skin. *Int. J. Pharm.***2003**, *258* (1), 141–151.

- (21) El Maghraby, G. M. M.; Williams, A. C.; Barry, B. W. Oestradiol Skin Delivery from Ultradeformable Liposomes: Refinement of Surfactant Concentration. *Int. J. Pharm.***2000**, *196* (1), 63–74.
- (22) Barratt, G. M. Therapeutic Applications of Colloidal Drug Carriers. *Pharm. Sci. Technol. Today***2000**, *3* (5), 163–171.
- (23) Keller, B. C. Liposomes in Nutrition. *Trends Food Sci. Technol.***2001**, *12* (1), 25–31.
- (24) Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A. M. Liposomes and Nanoparticles: Nanosized Vehicles for Drug Delivery in Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.***2009**, *30* (11), 592–599.
- (25) Lorin, A.; Flore, C.; Thomas, A.; Brasseur, R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Société Environ.***2004**, *8* (3), 163–176.
- (26) Fathi, M.; Mozafari, M. R.; Mohebbi, M. Nanoencapsulation of Food Ingredients Using Lipid Based Delivery Systems. *Trends Food Sci. Technol.***2012**, *23* (1), 13–27.
- (27) Ferji, K.; Nouvel, C.; Babin, J.; Li, M.-H.; Gaillard, C.; Nicol, E.; Chassenieux, C.; Six, J.-L. Polymersomes from Amphiphilic Glycopolymers Containing Polymeric Liquid Crystal Grafts. *ACS Macro Lett.***2015**, *4* (10), 1119–1122.
- (28) Nanjwade, B. K.; Bechra, H. M.; Derkar, G. K.; Manvi, F. V.; Nanjwade, V. K. Dendrimers: Emerging Polymers for Drug-Delivery Systems. *Eur. J. Pharm. Sci.***2009**, *38* (3), 185–196.
- (29) Svenson, S.; Tomalia, D. A. Dendrimers in Biomedical Applications—Reflections on the Field. *Adv. Drug Deliv. Rev.***2012**, *64*, 102–115.
- (30) Jain, S.; Kaur, A.; Puri, R.; Utreja, P.; Jain, A.; Bhide, M.; Ratnam, R.; Singh, V.; Patil, A. S.; Jayaraman, N.; et al. Poly Propyl Ether Imine (PETIM) Dendrimer: A Novel Non-Toxic Dendrimer for Sustained Drug Delivery. *Eur. J. Med. Chem.***2010**, *45* (11), 4997–5005.
- (31) Jiang, X.; Sha, X.; Xin, H.; Chen, L.; Gao, X.; Wang, X.; Law, K.; Gu, J.; Chen, Y.; Jiang, Y.; et al. Self-Aggregated Pegylated Poly (Trimethylene Carbonate) Nanoparticles Decorated with c(RGDyK) Peptide for Targeted Paclitaxel Delivery to Integrin-Rich Tumors. *Biomaterials***2011**, *32* (35), 9457–9469.
- (32) Bader, H.; Ringsdorf, H.; Schmidt, B. Watersoluble Polymers in Medicine. *Angew. Makromol. Chem.***1984**, *123* (1), 457–485.
- (33) Park, J. H.; Lee, S.; Kim, J.-H.; Park, K.; Kim, K.; Kwon, I. C. Polymeric Nanomedicine for Cancer Therapy. *Prog. Polym. Sci.***2008**, *33* (1), 113–137.
- (34) Gaucher, G.; Dufresne, M.-H.; Sant, V. P.; Kang, N.; Maysinger, D.; Leroux, J.-C. Block Copolymer Micelles: Preparation, Characterization and Application in Drug Delivery. *J. Control. Release* **2005**, *109* (1), 169–188.
- (35) Torchilin, V. P. Structure and Design of Polymeric Surfactant-Based Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2001**, *73* (2), 137–172.
- (36) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *J. Control. Release* **2000**, *65* (1), 271–284.
- (37) Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Vauthier, C. Nanocapsule Technology: A Review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.***2002**, *19* (2), 99–134.
- (38) Forero Ramirez, Laura Marcela. Élaboration de Nanocapsules Par Polymérisation Radicalaire Contrôlée à Partir d'un Tensioactif Réactif Dérivé Du Dextrane, Université de lorraine, **2016**.
- (39) Poltorak, K. Conception de Nanocapsules Biodégradables Recouvertes de Dextrane Par Réaction “Click” Interfaciale, Université de Lorraine, 2015.
- (40) Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. *J. Control. Release* **2001**, *70* (1), 1–20.
- (41) Shim, J.; Seok Kang, H.; Park, W.-S.; Han, S.-H.; Kim, J.; Chang, I.-S. Transdermal Delivery of Mixnoxidil with Block Copolymer Nanoparticles. *J. Control. Release* **2004**, *97* (3), 477–484.
- (42) Cruz, L.; Schaffazick, S. R.; Costa, T. D.; Soares, L. U.; Mezzalira, G.; da Silveira, N. P.; Schapoval, E. E. S.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Physico-Chemical Characterization and In Vivo Evaluation of Indomethacin Ethyl Ester-Loaded Nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, Interfacial Alkaline Hydrolysis and Antiedematogenic Activity. *J. Nanosci. Nanotechnol.***2006**, *6* (9–10), 3154–3162.

- (43) Cruz, L.; Soares, L. U.; Costa, T. D.; Mezzalira, G.; da Silveira, N. P.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Diffusion and Mathematical Modeling of Release Profiles from Nanocarriers. *Int. J. Pharm.* **2006**, *313* (1), 198–205.
- (44) Lopes, E.; Pohlmann, A. R.; Bassani, V.; Guterres, S. S. Polymeric Colloidal Systems Containing Ethionamide: Preparation and Physico-Chemical Characterization. *Pharmazie* **2000**, *55* (7), 527–530.
- (45) Vauthier, C.; Couvreur, P. *Nanotechnologies Pour La Thérapeutique et Le Diagnostic*; Ed. Techniques Ingénieur, **2008**.
- (46) Chorny, M.; Fishbein, I.; Danenberg, H. D.; Golomb, G. Lipophilic Drug Loaded Nanospheres Prepared by Nanoprecipitation: Effect of Formulation Variables on Size, Drug Recovery and Release Kinetics. *J. Control. Release* **2002**, *83* (3), 389–400.
- (47) Chawla, J. S.; Amiji, M. M. Cellular Uptake and Concentrations of Tamoxifen upon Administration in Poly (ϵ -Caprolactone) Nanoparticles. *AAPS J.* **2003**, *5* (1), 28–34.
- (48) Cohen-Sela, E.; Chorny, M.; Koroukhov, N.; Danenberg, H. D.; Golomb, G. A New Double Emulsion Solvent Diffusion Technique for Encapsulating Hydrophilic Molecules in PLGA Nanoparticles. *J. Control. Release* **2009**, *133* (2), 90–95.
- (49) Balland, O.; Pinto-Alphandary, H.; Viron, A.; Puvion, E.; Andremont, A.; Couvreur, P. Intracellular Distribution of Ampicillin in Murine Macrophages Infected with Salmonella Typhimurium and Treated with (3H) Ampicillin-Loaded Nanoparticles. *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *37* (1), 105–115.
- (50) Chiannilkulchai, N.; Ammoury, N.; Caillou, B.; Devissaguet, J. P.; Couvreur, P. Hepatic Tissue Distribution of Doxorubicin-Loaded Nanoparticles after Iv Administration in Reticulosarcoma M 5076 Metastasis-Bearing Mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1990**, *26* (2), 122–126.
- (51) Blunk, T.; Hochstrasser, D. F.; Sanchez, J.-C.; Müller, B. W.; Müller, R. H. 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), 1382–1387.
- (52) Price, M.; Cornelius, R. ; Brash, J. . Protein Adsorption to Polyethylene Glycol Modified Liposomes from Fibrinogen Solution and from Plasma. *Biomembranes* **2001**, *1512*, 191–205.
- (53) Thiele, L.; Diederichs, J. E.; Reszka, R.; Merkle, H. P.; Walter, E. Competitive Adsorption of Serum Proteins at Microparticles Affects Phagocytosis by Dendritic Cells. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1409–1418.
- (54) Stolnik, S.; Illum, L.; Davis, S. S. Long Circulating Microparticulate Drug Carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16* (2), 195–214.
- (55) Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M. T.; Trebetskoy, V.; Torchilin, V.; Langer, R. Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres. *Science* **1994**, 1600–1603.
- (56) Moghimi, S. M.; Szebeni, J. Stealth Liposomes and Long Circulating Nanoparticles: Critical Issues in Pharmacokinetics, Opsonization and Protein-Binding Properties. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42* (6), 463–478.
- (57) Torchilin, V. P.; Trubetskoy, V. S. Which Polymers Can Make Nanoparticulate Drug Carriers Long-Circulating? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16* (2), 141–155.
- (58) Gref, R.; Domb, A.; Quellec, P.; Blunk, T.; Müller, R. H.; Verbavatz, J. M.; Langer, R. The Controlled Intravenous Delivery of Drugs Using PEG-Coated Sterically Stabilized Nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16* (2), 215–233.
- (59) Zalipsky, S. Chemistry of Polyethylene Glycol Conjugates with Biologically Active Molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16* (2), 157–182.
- (60) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (5), 631–651.
- (61) Storm, G.; Belliot, S. O.; Daemen, T.; Lasic, D. D. Surface Modification of Nanoparticles to Oppose Uptake by the Mononuclear Phagocyte System. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *17* (1), 31–48.
- (62) Weiss, C.; Mailander, V.; Landfester, K. Cellular Uptake Behavior of Unfunctionalized and Functionalized PBCA Particles Prepared in a Miniemulsion. *Macromol. Biosci.* **2007**, *7* (7), 883–896.

- (63) Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; De Gennes, P. G. Protein-Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide: I. Simplified Theory. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142* (1), 149–158.
- (64) Maeda, H. Toward a Full Understanding of the EPR Effect in Primary and Metastatic Tumors as Well as Issues Related to Its Heterogeneity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *91*, 3–6.
- (65) Calvo, P.; Remuñán-López, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. Development of Positively Charged Colloidal Drug Carriers: Chitosan-Coated Polyester Nanocapsules and Submicron-Emulsions. *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275* (1), 46–53.
- (66) Barbault-Foucher, S.; Gref, R.; Russo, P.; Guechot, J.; Bochot, A. Design of Poly-ε-Caprolactone Nanospheres Coated with Bioadhesive Hyaluronic Acid for Ocular Delivery. *J. Control. Release* **2002**, *83* (3), 365–375.
- (67) Rouzes, C.; Gref, R.; Leonard, M.; De Sousa Delgado, A.; Dellacherie, E. Surface Modification of Poly(Lactic Acid) Nanospheres Using Hydrophobically Modified Dextran as Stabilizers in an o/w Emulsion/Evaporation Technique. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50* (4), 557–565.
- (68) Rouzes, C.; Durand, A.; Leonard, M.; Dellacherie, E. Surface Activity and Emulsification Properties of Hydrophobically Modified Dextran. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *253* (1), 217–223.
- (69) Calvo, P.; Gouritin, B.; Chacun, H.; Desmaële, D.; D'Angelo, J.; Noel, J.-P.; Georgin, D.; Fattal, E.; Andreux, J. P.; Couvreur, P. Long-Circulating PEGylated Polycyanoacrylate Nanoparticles as New Drug Carrier for Brain Delivery. *Pharm. Res.* **2001**, *18* (8), 1157–1166.
- (70) Nouvel, C.; Raynaud, J.; Marie, E.; Dellacherie, E.; Six, J.-L.; Durand, A. Biodegradable Nanoparticles Made from Polylactide-Grafted Dextran Copolymers. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *330* (2), 337–343.
- (71) Laville, M.; Babin, J.; Londono, I.; Legros, M.; Nouvel, C.; Durand, A.; Vanderesse, R.; Leonard, M.; Six, J.-L. Polysaccharide-Covered Nanoparticles with Improved Shell Stability Using Click-Chemistry Strategies. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93* (2).
- (72) Gavory, C.; Durand, A.; Six, J.-L.; Nouvel, C.; Marie, E.; Leonard, M. Polysaccharide-Covered Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *84* (1), 133–140.
- (73) Chognot, D.; Six, J. L.; Leonard, M.; Bonneaux, F.; Vigneron, C.; Dellacherie, E. Physicochemical Evaluation of PLA Nanoparticles Stabilized by Water-Soluble MPEO–PLA Block Copolymers. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *268* (2), 441–447.
- (74) El Founi, M.; Soliman, S. M. A.; Vanderesse, R.; Acherar, S.; Guedon, E.; Chevalot, I.; Babin, J.; Six, J.-L. Light-Sensitive Dextran-Covered PNBA Nanoparticles as Triggered Drug Delivery Systems: Formulation, Characteristics and Cytotoxicity. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *514*, 289–298.
- (75) Poltorak, K.; Durand, A.; Leonard, M.; Six, J.-L.; Nouvel, C. Interfacial Click Chemistry for Improving Both Dextran Shell Density and Stability of Biocompatible Nanocapsules. *Colloids Surf. -Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, *483*, 8–17.
- (76) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46* (12 Pt 1), 6387–6392.
- (77) Maeda, H. The Link between Infection and Cancer: Tumor Vasculature, Free Radicals, and Drug Delivery to Tumors via the EPR Effect. *Cancer Sci.* **2013**, *104* (7), 779–789.
- (78) Danhier, F.; Feron, O.; Pr eat, V. To Exploit the Tumor Microenvironment: Passive and Active Tumor Targeting of Nanocarriers for Anti-Cancer Drug Delivery. *J. Control. Release* **2010**, *148* (2), 135–146.
- (79) Prabhakar, U.; Maeda, H.; Jain, R. K.; Sevick-Muraca, E. M.; Zamboni, W.; Farokhzad, O. C.; Barry, S. T.; Gabizon, A.; Grodzinski, P.; Blakey, D. C. Challenges and Key Considerations of the Enhanced Permeability and Retention Effect for Nanomedicine Drug Delivery in Oncology. *Cancer Res.* **2013**, *73* (8), 2412–2417.

- (80) Zhang, N.; Chittasupho, C.; Duangrat, C.; Siahaan, T. J.; Berkland, C. PLGA Nanoparticle–Peptide Conjugate Effectively Targets Intercellular Cell-Adhesion Molecule-1. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (1), 145–152.
- (81) Kocbek, P.; Obermajer, N.; Cegnar, M.; Kos, J.; Kristl, J. Targeting Cancer Cells Using PLGA Nanoparticles Surface Modified with Monoclonal Antibody. *J. Control. Release* **2007**, *120* (1), 18–26.
- (82) Suh, W. H.; Suh, Y.-H.; Stucky, G. D. Multifunctional Nanosystems at the Interface of Physical and Life Sciences. *Nano Today* **2009**, *4* (1), 27–36.
- (83) Sahoo, S. K.; Labhasetwar, V. Enhanced Antiproliferative Activity of Transferrin-Conjugated Paclitaxel-Loaded Nanoparticles Is Mediated via Sustained Intracellular Drug Retention. *Mol. Pharm.* **2005**, *2* (5), 373–383.
- (84) Danhier, F. To Exploit the Tumor Microenvironment: Since the EPR Effect Fails in the Clinic, What Is the Future of Nanomedicine? *J. Control. Release* **2016**, *244*, 108–121.
- (85) Legrand, P.; Benoit, J.-P.; Briançon, S.; Fattal, E.; Fessi, H.; Passirani, C. Sphéroïdes et Formes Vectorisées. *Pharm. Galénique Formul. Technol. Pharm.* **2007**, 221–25.
- (86) Ramirez, L. M.; Babin, J.; Durand, A.; Six, J.-L.; Nouvel, C. Biocompatible Dextran-Covered Nanoparticles Produced by Activator Generated by Electron Transfer Atom Transfer Radical Polymerization in Miniemulsion. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, *486*, 60–68.
- (87) Wu, M.; Frochot, C.; Dellacherie, E.; Marie, E. Well-Defined Poly(Butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles via Miniemulsion Polymerization. *Macromol. Symp.* **2009**, *281*, 39–46.
- (88) Sugihara, S.; Blanazs, A.; Armes, S. P.; Ryan, A. J.; Lewis, A. L. Aqueous Dispersion Polymerization: A New Paradigm for in Situ Block Copolymer Self-Assembly in Concentrated Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (39), 15707–15713.
- (89) Groison, E.; Brusseau, S.; D’Agosto, F.; Magnet, S.; Inoubli, R.; Couvreur, L.; Charleux, B. Well-Defined Amphiphilic Block Copolymer Nanoobjects via Nitroxide-Mediated Emulsion Polymerization. *ACS Macro Lett.* **2012**, *1* (1), 47–51.
- (90) Sun, J.-T.; Hong, C.-Y.; Pan, C.-Y. Recent Advances in RAFT Dispersion Polymerization for Preparation of Block Copolymer Aggregates. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (4), 873–881.
- (91) Sun, J.-T.; Hong, C.-Y.; Pan, C.-Y. Formation of the Block Copolymer Aggregates via Polymerization-Induced Self-Assembly and Reorganization. *Soft Matter* **2012**, *8* (30), 7753–7767.
- (92) Wan, W.-M.; Pan, C.-Y. Formation of Polymeric Yolk/Shell Nanomaterial by Polymerization-Induced Self-Assembly and Reorganization. *Macromolecules* **2010**, *43* (6), 2672–2675.
- (93) Wan, W.-M.; Sun, X.-L.; Pan, C.-Y. Morphology Transition in RAFT Polymerization for Formation of Vesicular Morphologies in One Pot. *Macromolecules* **2009**, *42* (14), 4950–4952.
- (94) He, W.-D.; Sun, X.-L.; Wan, W.-M.; Pan, C.-Y. Multiple Morphologies of PAA-b-PSt Assemblies throughout RAFT Dispersion Polymerization of Styrene with PAA Macro-CTA. *Macromolecules* **2011**, *44* (9), 3358–3365.
- (95) Cai, W.; Wan, W.; Hong, C.; Huang, C.; Pan, C. Morphology Transitions in RAFT Polymerization. *Soft Matter* **2010**, *6* (21), 5554–5561.
- (96) Ferji, K.; Venturini, P.; Cleymand, F.; Chassenieux, C.; Six, J.-L. In Situ Glyco-Nanostructure Formulation via Photopolymerization Induced Self-Assembly. *Polym. Chem.* **2018**, *9* (21), 2868–2872.
- (97) Stainmess, S.; Fessi, H.; Devissaguet, J.-P.; Puisieux, F.; Theis, C. Process for the Preparation of Dispersible Colloidal Systems of a Substance in the Form of Nanoparticles. Patent EP 0275796A1, **1988**.
- (98) Chebil, A.; Léonard, M.; Six, J.-L.; Nouvel, C.; Durand, A. Nanoparticulate Delivery Systems for Alkyl Gallates: Influence of the Elaboration Process on Particle Characteristics, Drug Encapsulation and in-Vitro Release. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *162*, 351–361.

- (99) Legrand, P.; Lesieur, S.; Bochot, A.; Gref, R.; Raatjes, W.; Barratt, G.; Vauthier, C. Influence of Polymer Behaviour in Organic Solution on the Production of Polylactide Nanoparticles by Nanoprecipitation. *Int. J. Pharm.* **2007**, *344* (1), 33–43.
- (100) Seyler, I.; Appel, M.; Devissaguet, J.-P.; Legrand, P.; Barratt, G. Macrophage Activation by a Lipophilic Derivative of Muramyl dipeptide within Nanocapsules: Investigation of the Mechanism of Drug Delivery. *J. Nanoparticle Res.* **1999**, *1* (1), 91–97.
- (101) Yallapu, M. M.; Gupta, B. K.; Jaggi, M.; Chauhan, S. C. Fabrication of Curcumin Encapsulated PLGA Nanoparticles for Improved Therapeutic Effects in Metastatic Cancer Cells. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *351* (1), 19–29.
- (102) Nehilla, B. J.; Bergkvist, M.; Popat, K. C.; Desai, T. A. Purified and Surfactant-Free Coenzyme Q10-Loaded Biodegradable Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2008**, *348* (1), 107–114.
- (103) Zili, Z.; Sfar, S.; Fessi, H. Preparation and Characterization of Poly-ε-Caprolactone Nanoparticles Containing Griseofulvin. *Int. J. Pharm.* **2005**, *294* (1), 261–267.
- (104) Matsumoto, J.; Nakada, Y.; Sakurai, K.; Nakamura, T.; Takahashi, Y. Preparation of Nanoparticles Consisted of Poly(L-Lactide)–Poly(Ethylene Glycol)–Poly(L-Lactide) and Their Evaluation in Vitro. *Int. J. Pharm.* **1999**, *185* (1), 93–101.
- (105) Fernandez, K.; Aburto, J.; von Plessing, C.; Rockel, M.; Aspe, E. Factorial Design Optimization and Characterization of Poly-Lactic Acid (PLA) Nanoparticle Formation for the Delivery of Grape Extracts. *Food Chem.* **2016**, *207*, 75–85.
- (106) Dalmolin, L. F.; Khalil, N. M.; Mainardes, R. M. Delivery of Vanillin by Poly(Lactic-Acid) Nanoparticles: Development, Characterization and in Vitro Evaluation of Antioxidant Activity. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* **2016**, *62*, 1–8.
- (107) Altmeyer, C.; Karam, T. K.; Khalil, N. M.; Mainardes, R. M. Tamoxifen-Loaded Poly(L-Lactide) Nanoparticles: Development, Characterization and in Vitro Evaluation of Cytotoxicity. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* **2016**, *60*, 135–142.
- (108) Lindner, G. da R.; Dalmolin, L. F.; Khalil, N. M.; Mainardes, R. M. Influence of the Formulation Parameters on the Particle Size and Encapsulation Efficiency of Resveratrol in PLA and PLA-PEG Blend Nanoparticles: A Factorial Design. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15* (12), 10173–10182.
- (109) Budhian, A.; Siegel, S. J.; Winey, K. I. Production of Haloperidol-Loaded PLGA Nanoparticles for Extended Controlled Drug Release of Haloperidol. *J. Microencapsul.* **2005**, *22* (7), 773–785.
- (110) Sonaje, K.; Italia, J. L.; Sharma, G.; Bhardwaj, V.; Tikoo, K.; Kumar, M. N. V. R. Development of Biodegradable Nanoparticles for Oral Delivery of Ellagic Acid and Evaluation of Their Antioxidant Efficacy Against Cyclosporine A-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Pharm. Res.* **2007**, *24* (5), 899–908.
- (111) Alshamsan, A. Nanoprecipitation Is More Efficient than Emulsion Solvent Evaporation Method to Encapsulate Cucurbitacin I in PLGA Nanoparticles. *Saudi Pharm. J.* **2014**, *22* (3), 219–222.
- (112) Prabu, P.; Chaudhari, A. A.; Dharmaraj, N.; Khil, M. S.; Park, S. Y.; Kim, H. Y. Preparation, Characterization, in-Vitro Drug Release and Cellular Uptake of Poly(Caprolactone) Grafted Dextran Copolymeric Nanoparticles Loaded with Anticancer Drug. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *90A* (4), 1128–1136.
- (113) Jeffery, H.; Davis, S. S.; O'Hagan, D. T. The Preparation and Characterization of Poly(Lactide-Co-Glycolide) Microparticles. II. The Entrapment of a Model Protein Using a (Water-in-Oil)-in-Water Emulsion Solvent Evaporation Technique. *Pharm. Res.* **1993**, *10* (3), 362–368.
- (114) Mahdavi, H.; Mirzadeh, H.; Hamishehkar, H.; Jamshidi, A.; Fakhari, A.; Emami, J.; Najafabadi, A. R.; Gilani, K.; Minaiyan, M.; Najafi, M.; et al. The Effect of Process Parameters on the Size and Morphology of Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Micro/Nanoparticles Prepared by an Oil in Oil Emulsion/Solvent Evaporation Technique. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *116* (1), 528–534.
- (115) Barakat, N. S.; Ahmad, A. A. E. Diclofenac Sodium Loaded-Cellulose Acetate Butyrate: Effect of Processing Variables on Microparticles Properties, Drug Release Kinetics and Ulcerogenic Activity. *J. Microencapsul.* **2008**, *25* (1), 31–45.

- (116) Sameni, J.; Bukhari, N. I.; Azlan, N. A.; Julianto, T.; Majeed, A. B. A. The Effect of Preparation Parameters on the Size and Morphology of PLGA-Based Nanoparticles; Kuala Lumpur, Malaysia, 2009; Vol. 2, pp 700–704.
- (117) Vandergraaf, S.; Schroen, C.; Boom, R. Preparation of Double Emulsions by Membrane Emulsification? A Review. *J. Membr. Sci.* **2005**, *251* (1–2), 7–15.
- (118) Garti, N.; Bisperink, C. Double Emulsions: Progress and Applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1998**, *3* (6), 657–667.
- (119) Schuch, A.; Deiters, P.; Henne, J.; Köhler, K.; Schuchmann, H. P. Production of W/O/W (Water-in-Oil-in-Water) Multiple Emulsions: Droplet Breakup and Release of Water. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *402*, 157–164.
- (120) Rizkalla, N.; Range, C.; Lacasse, F.-X.; Hildgen, P. Effect of Various Formulation Parameters on the Properties of Polymeric Nanoparticles Prepared by Multiple Emulsion Method. *J. Microencapsul.* **2006**, *23* (1), 39–57.
- (121) Quintanar-Guerrero, D.; Fessi, H.; Allémann, E.; Doelker, E. Influence of Stabilizing Agents and Preparative Variables on the Formation of Poly(D,L-Lactic Acid) Nanoparticles by an Emulsification-Diffusion Technique. *Int. J. Pharm.* **1996**, *143* (2), 133–141.
- (122) Kwon, H.-Y.; Lee, J.-Y.; Choi, S.-W.; Jang, Y.; Kim, J.-H. Preparation of PLGA Nanoparticles Containing Estrogen by Emulsification–Diffusion Method. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, *182* (1), 123–130.
- (123) Silvestri, S. L.; Lostritto, R. T. Theoretical Evaluation of Dispersed Droplet Radii in Submicron Oil-in-Water Emulsions. *Int. J. Pharm.* **1989**, *50* (2), 141–146.
- (124) Zakeri-Milani, P.; Loveymi, B. D.; Jelvehgari, M.; Valizadeh, H. The Characteristics and Improved Intestinal Permeability of Vancomycin PLGA-Nanoparticles as Colloidal Drug Delivery System. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *103*, 174–181.
- (125) Chognot, D.; Six, J.-L.; Leonard, M.; Dellacherie, E.; Faivre, B.; Bonneaux, F.; Vigneron, C. Synthesis and in Vivo Studies of Protein C-Loaded Nanoparticles with PEO Modified Surfaces. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2008**, *23* (1), 49–68.
- (126) Martinez, N. Y.; Andrade, P. F.; Durán, N.; Cavalitto, S. Development of Double Emulsion Nanoparticles for the Encapsulation of Bovine Serum Albumin. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *158*, 190–196.
- (127) Leroux, J.; Allemann, E.; Doelker, E.; Gurny, R. New Approach for the Preparation of Nanoparticles by an Emulsification-Diffusion Method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, *41* (1), 14–18.
- (128) Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Influence of the Stabilizer Coating Layer on the Purification and Freeze-Drying of Poly(D,L-Lactic Acid) Nanoparticles Prepared by an Emulsion-Diffusion Technique. *J. Microencapsul.* **1998**, *15* (1), 107–119.
- (129) Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H. Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique. *Pharm. Res.* **1998**, *15* (7), 1056–1062.
- (130) Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H. A Mechanistic Study of the Formation of Polymer Nanoparticles by the Emulsification-Diffusion Technique. *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275* (7), 640–647.
- (131) Quintanar-Guerrero, D.; Zambrano-Zaragoza, M. de la L.; Gutierrez-Cortez, E.; Mendoza-Munoz, N. Impact of the Emulsification-Diffusion Method on the Development of Pharmaceutical Nanoparticles. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2012**, *6* (3), 184–194.
- (132) Vauthier, C.; Bouchemal, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (5), 1025–1058.
- (133) Galindo-Rodriguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharm. Res.* **2004**, *21* (8), 1428–1439.
- (134) Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Influence of Process and Formulation Parameters on the Formation of Submicron Particles by Solvent Displacement and Emulsification–Diffusion Methods: Critical Comparison. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *163* (2), 90–122.

- (135) Nasir, A.; Kausar, A.; Younus, A. A Review on Preparation, Properties and Applications of Polymeric Nanoparticle-Based Materials. *Polym.-Plast. Technol. Eng.* **2015**, *54* (4), 325–341.
- (136) Moinard-Chécot, D.; Chevalier, Y.; Briançon, S.; Beney, L.; Fessi, H. Mechanism of Nanocapsules Formation by the Emulsion–Diffusion Process. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *317* (2), 458–468.
- (137) Hassou, M.; Couenne, F.; le Gorrec, Y.; Tayakout, M. Modeling and Simulation of Polymeric Nanocapsule Formation by Emulsion Diffusion Method. *AIChE J.* **2009**, *55* (8), 2094–2105.
- (138) Wilke, C. R.; Chang, P. Correlation of Diffusion Coefficients in Dilute Solutions. *AIChE J.* **1955**, *1* (2), 264–270.
- (139) Chae, J.-M.; Mo, S.-M.; Oh, I.-J. Effects of Poloxamer 188 on the Characteristics of Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10* (5), 3224–3227.
- (140) Shin, S.-B.; Cho, H.-Y.; Kim, D.-D.; Choi, H.-G.; Lee, Y.-B. Preparation and Evaluation of Tacrolimus-Loaded Nanoparticles for Lymphatic Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *74* (2), 164–171.
- (141) Song, K. C.; Lee, H. S.; Choung, I. Y.; Cho, K. I.; Ahn, Y.; Choi, E. J. The Effect of Type of Organic Phase Solvents on the Particle Size of Poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *276* (1), 162–167.
- (142) Anais, J. P.; Razzouq, N.; Carvalho, M.; Fernandez, C.; Astier, A.; Paul, M.; Astier, A.; Fessi, H.; Lorino, A. M. Development of α -Tocopherol Acetate Nanoparticles: Influence of Preparative Processes. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35* (2), 216–223.
- (143) Choi, M.-J.; Min, S.-G.; Briançon, S.; Fessi, H. A Novel Preparation of Biodegradable Polymer-Silica Nanocomposites by Two Different Encapsulation Methods. *J. Compos. Mater.* **2009**, *43* (25), 3023–3030.
- (144) Trimaille, T.; Pichot, C.; Elaissari, A.; Fessi, H.; Briançon, S.; Delair, T. Poly(D,L-Lactic Acid) Nanoparticle Preparation and Colloidal Characterization. *Colloid Polym. Sci.* **2003**, *281* (12), 1184–1190.
- (145) Hong, J. S.; Srivastava, D.; Lee, I. Fabrication of Poly(Lactic Acid) Nano- and Microparticles Using a Nanomixer via Nanoprecipitation or Emulsion Diffusion. *J. Appl. Polym. Sci.* **2018**, *135* (18), n/a-n/a.
- (146) Guinebretière, S.; Briançon, S.; Fessi, H.; Teodorescu, V. ; Blanchin, M. . Nanocapsules of Biodegradable Polymers: Preparation and Characterization by Direct High Resolution Electron Microscopy. *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, *21* (1–2), 137–142.
- (147) Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Fessi, H. A Pilot Study of Freeze Drying of Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanocapsules Stabilized by Poly(Vinyl Alcohol): Formulation and Process Optimization. *Int. J. Pharm.* **2006**, *309* (1–2), 178–188.
- (148) Bindschadler, C.; Gurny, R.; Doelker, E. Process for Preparing a Powder of Water-Insoluble Polymer Which Can Be Redispersed in a Liquid Phase, the Resulting Powder and Utilization Thereof, US Patent 4.968.350 .
- (149) Mendoza-Muñoz, N.; Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E. The Impact of the Salting-out Technique on the Preparation of Colloidal Particulate Systems for Pharmaceutical Applications. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2012**, *6* (3), 236–249.
- (150) Zweers, M. L. T.; Grijpma, D. W.; Engbers, G. H. M.; Feijen, J. The Preparation of Monodisperse Biodegradable Polyester Nanoparticles with a Controlled Size. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2003**, *66B* (2), 559–566.
- (151) Su, J.; Kim, C.-J.; Ciftci, K. Characterization of Poly((N-Trimethylammonium) Ethyl Methacrylate)-Based Gene Delivery Systems. *Gene Ther.* **2002**, *9* (15), 1031–1036.
- (152) Perugini, P.; Simeoni, S.; Scalia, S.; Genta, I.; Modena, T.; Conti, B.; Pavanetto, F. Effect of Nanoparticle Encapsulation on the Photostability of the Sunscreen Agent, 2-Ethylhexyl-p-Methoxycinnamate. *Int. J. Pharm.* **2002**, *246* (1), 37–45.
- (153) Konan, Y. N.; Gurny, R.; Allémann, E. Preparation and Characterization of Sterile and Freeze-Dried Sub-200 Nm Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2002**, *233* (1), 239–252.

- (154) Jaeghere, F.; Allemann, E.; Feijen, J.; Kissel, T.; Doelker, E.; Gurny, R. Cellular Uptake of PEO Surface-Modified Nanoparticles: Evaluation of Nanoparticles Made of PLA: PEO Diblock and Triblock Copolymers. *J. Drug Target.* **2000**, 8 (3), 143–153.
- (155) Fan, Y. F.; Wang, Y. N.; Fan, Y. G.; Ma, J. B. Preparation of Insulin Nanoparticles and Their Encapsulation with Biodegradable Polyelectrolytes via the Layer-by-Layer Adsorption. *Int. J. Pharm.* **2006**, 324 (2), 158–167.
- (156) Allémann, E.; Gurny, R.; Doelker, E. Preparation of Aqueous Polymeric Nanodispersions by a Reversible Salting-out Process: Influence of Process Parameters on Particle Size. *Int. J. Pharm.* **1992**, 87 (1), 247–253.
- (157) Jaeghere, F. D.; Allémann, E.; Leroux, J.-C.; Stevels, W.; Feijen, J.; Doelker, E.; Gurny, R. Formulation and Lyoprotection of Poly(Lactic Acid-Co-Ethylene Oxide) Nanoparticles: Influence on Physical Stability and In Vitro Cell Uptake. *Pharm. Res.* **1999**, 16 (6), 859–866.
- (158) Leroux, J.-C.; Allémann, E.; De Jaeghere, F.; Doelker, E.; Gurny, R. Biodegradable Nanoparticles — From Sustained Release Formulations to Improved Site Specific Drug Delivery. *J. Control. Release* **1996**, 39 (2), 339–350.
- (159) Zweers, M. L. T.; Engbers, G. H. M.; Grijpma, D. W.; Feijen, J. Release of Anti-Restenosis Drugs from Poly(Ethylene Oxide)-Poly(DI-Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles. *J. Control. Release* **2006**, 114 (3), 317–324.
- (160) Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, 385 (1), 113–142.
- (161) Lertsutthiwong, P.; Noomun, K.; Jongaroonngamsang, N.; Rojsitthisak, P.; Nimmannit, U. Preparation of Alginate Nanocapsules Containing Turmeric Oil. *Carbohydr. Polym.* **2008**, 74 (2), 209–214.
- (162) Deda, D. K.; Uchoa, A. F.; Carita, E.; Baptista, M. S.; Toma, H. E.; Araki, K. A New Micro/Nanoencapsulated Porphyrin Formulation for PDT Treatment. *Int. J. Pharm.* **2009**, 376 (1–2), 76–83.
- (163) Wang, J. C.; Chen, S. H.; Xu, Z. C. Synthesis and Properties Research on the Nanocapsulated Capsaicin by Simple Coacervation Method. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2008**, 29 (5), 687–695.
- (164) Lertsutthiwong, P.; Rojsitthisak, P.; Nimmannit, U. Preparation of Turmeric Oil-Loaded Chitosan-Alginate Biopolymeric Nanocapsules. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, 29 (3), 856–860.
- (165) Krause, H.-J.; Rohdewald, P. Preparation of Gelatin Nanocapsules and Their Pharmaceutical Characterization. *Pharm. Res.* **1985**, 2 (5), 239–243.
- (166) Lutter, S.; Koetz, J.; Tiersch, B.; Boschetti-de-Fierro, A.; Abetz, V. Formation of Gold Nanoparticles in Triblock Terpolymer-Modified Inverse Microemulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, 329 (3), 169–176.
- (167) Nesterenko, A.; Alric, I.; Silvestre, F.; Durrieu, V. Vegetable Proteins in Microencapsulation: A Review of Recent Interventions and Their Effectiveness. *Ind. Crops Prod.* **2013**, 42(1), 469–479.
- (168) Jeong, Y.-I.; Cho, C.-S.; Kim, S.-H.; Ko, K.-S.; Kim, S.-I.; Shim, Y.-H.; Nah, J.-W. Preparation of Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles without Surfactant. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, 80 (12), 2228–2236.
- (169) Kostag, M.; Köhler, S.; Liebert, T.; Heinze, T. Pure Cellulose Nanoparticles from Trimethylsilyl Cellulose. *Macromol. Symp.* **2010**, 294 (2), 96–106.
- (170) Akagi, T.; Kaneko, T.; Kida, T.; Akashi, M. Preparation and Characterization of Biodegradable Nanoparticles Based on Poly(γ -Glutamic Acid) with L-Phenylalanine as a Protein Carrier. *J. Control. Release* **2005**, 108 (2), 226–236.
- (171) Vu, M.-T.; Jeong, Y.-I.; Choi, C.; Nam, J.-P.; Son, D.-H.; Park, J.-K.; Kim, W.-S.; Kim, M.-Y.; Jang, M.-K.; Nah, J.-W.; et al. Surfactant-free nanoparticles of doxorubicin-conjugated poly(DL-Lactide-co-glycolide). *Macromol. Res.* **2010**, 18 (11), 1115–1120.
- (172) Oh, I.; Lee, K.; Kwon, H.-Y.; Lee, Y.-B.; Shin, S.-C.; Cho, C.-S.; Kim, C.-K. Release of Adriamycin from Poly(γ -Benzyl-L-Glutamate)/Poly(Ethylene Oxide) Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **1999**, 181 (1), 107–115.

- (173) Lee, J.; Cho, E. C.; Cho, K. Incorporation and Release Behavior of Hydrophobic Drug in Functionalized Poly(D,L-Lactide)-Block-Poly(Ethylene Oxide) Micelles. *J. Control. Release* **2004**, *94* (2), 323–335.
- (174) Zhang, Z.; Lee, S. H.; Gan, C. W.; Feng, S.-S. In Vitro and In Vivo Investigation on PLA-TPGS Nanoparticles for Controlled and Sustained Small Molecule Chemotherapy. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (8), 1925–1935.
- (175) Sheikh, F. A.; Barakat, N. A. M.; Kanjwal, M. A.; Aryal, S.; Khil, M. S.; Kim, H.-Y. Novel Self-Assembled Amphiphilic Poly(ϵ -Caprolactone)-Grafted-Poly(Vinyl Alcohol) Nanoparticles: Hydrophobic and Hydrophilic Drugs Carrier Nanoparticles. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**, *20* (3), 821–831.
- (176) Errico, C.; Bartoli, C.; Chiellini, F.; Chiellini, E. Poly(Hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, *2009*, 1–10.
- (177) Ryu, J.-G.; Jeong, Y.-I.; Kim, I.-S.; Lee, J.-H.; Nah, J.-W.; Kim, S.-H. Clonazepam Release from Core-Shell Type Nanoparticles of Poly(ϵ -Caprolactone)/Poly(Ethylene Glycol)/Poly(ϵ -Caprolactone) Triblock Copolymers. *Int. J. Pharm.* **2000**, *200* (2), 231–242.
- (178) Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. A Review of Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. *J. Control. Release* **2008**, *126* (3), 187–204.
- (179) Benoît, J.-P.; Richard, J.; Venier-Julienne, M.-C. Microencapsulation. *Tech. Ing. Cosmétiques Procédés Formul.* **2013**, base documentaire: TIB634DUO. (ref. article: j2210).
- (180) Hofmeister, I.; Landfester, K.; Taden, A. Controlled Formation of Polymer Nanocapsules with High Diffusion-Barrier Properties and Prediction of Encapsulation Efficiency. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2015**, *54* (1), 327–330.
- (181) Trojer, M. A.; Nordstierna, L.; Nordin, M.; Nydén, M.; Holmberg, K. Encapsulation of Actives for Sustained Release. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (41), 17727–17741.
- (182) Siepmann, J.; Siepmann, F. Modeling of Diffusion Controlled Drug Delivery. *J. Control. Release* **2012**, *161* (2), 351–362.
- (183) Crank, J. *The Mathematics of Diffusion*, 2d ed.; Clarendon Press: Oxford, [Eng], 1975.
- (184) Felice, B.; Prabhakaran, M. P.; Rodríguez, A. P.; Ramakrishna, S. Drug Delivery Vehicles on a Nano-Engineering Perspective. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *41*, 178–195.
- (185) Zhang, Y.; Chan, H. F.; Leong, K. W. Advanced Materials and Processing for Drug Delivery: The Past and the Future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 104–120.
- (186) Jhaveri, A.; Deshpande, P.; Torchilin, V. Stimuli-Sensitive Nanopreparations for Combination Cancer Therapy. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 352–370.
- (187) Bennet, D.; Kim, S. Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. pp 257-310. In *Appl. Nanotechnol. Drug Deliv.* Ed A. Demir Sezer, IntechOpen Edition, **2014**.
- (188) Karimi, M.; Ghasemi, A.; Zangabad, P. S.; Rahighi, R.; Basri, S. M. M.; Mirshekari, H.; Amiri, M.; Pishabad, Z. S.; Aslani, A.; Bozorgomid, M.; et al. Smart Micro/Nanoparticles in Stimulus-Responsive Drug/Gene Delivery Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (5), 1457–1501.
- (189) Roy, D.; A. Brooks, W. L.; S. Sumerlin, B. New Directions in Thermoresponsive Polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (17), 7214–7243.
- (190) Klouda, L.; Mikos, A. G. Thermoresponsive Hydrogels in Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68* (1), 34–45.
- (191) Ward, M. A.; Georgiou, T. K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers* **2011**, *3* (3), 1215–1242.
- (192) Fujishige, S.; Kubota, K.; Ando, I. Phase Transition of Aqueous Solutions of Poly(N-Isopropylacrylamide) and Poly(N-Isopropylmethacrylamide). *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (8), 3311–3313.
- (193) Schild, H. G. Poly(N-Isopropylacrylamide): Experiment, Theory and Application. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17* (2), 163–249.
- (194) Moerkerke, R.; Meeussen, F.; Koningsveld, R.; Berghmans, H.; Mondelaers, W.; Schacht, E.; Dušek, K.; Šolc, K. Phase Transitions in Swollen Networks. 3. Swelling Behavior of Radiation Cross-Linked Poly(Vinyl Methyl Ether) in Water. *Macromolecules* **1998**, *31* (7), 2223–2229.

- (195) Makhaeva, E. E.; Tenhu, H.; Khokhlov, A. R. Conformational Changes of Poly(Vinylcaprolactam) Macromolecules and Their Complexes with Ionic Surfactants in Aqueous Solution. *Macromolecules***1998**, *31* (18), 6112–6118.
- (196) Aoki, T.; Kawashima, M.; Katono, H.; Sanui, K.; Ogata, N.; Okano, T.; Sakurai, Y. Temperature-Responsive Interpenetrating Polymer Networks Constructed with Poly(Acrylic Acid) and Poly(N,N-Dimethylacrylamide). *Macromolecules***1994**, *27* (4), 947–952.
- (197) Chang, C.; Wei, H.; Wu, D.-Q.; Yang, B.; Chen, N.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X. Thermo-Responsive Shell Cross-Linked PMMA-b-P(NIPAAm-Co-NAS) Micelles for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.***2011**, *420* (2), 333–340.
- (198) Boustta, M.; Colombo, P.-E.; Lenglet, S.; Poujol, S.; Vert, M. Versatile UCST-Based Thermoresponsive Hydrogels for Loco-Regional Sustained Drug Delivery. *J. Control. Release* **2014**, *174*, 1–6.
- (199) Mody, V. V.; Cox, A.; Shah, S.; Singh, A.; Bevins, W.; Parihar, H. Magnetic Nanoparticle Drug Delivery Systems for Targeting Tumor. *Appl. Nanosci.***2014**, *4* (4), 385–392.
- (200) Chen, F.-H.; Zhang, L.-M.; Chen, Q.-T.; Zhang, Y.; Zhang, Z.-J. Synthesis of a Novel Magnetic Drug Delivery System Composed of Doxorubicin -Conjugated Fe₃O₄ Nanoparticle Cores and a PEG-Functionalized Porous Silica Shell. *Chem. Commun.***2010**, *46* (45), 8633–8635.
- (201) Licciardi, M.; Scialabba, C.; Fiorica, C.; Cavallaro, G.; Cassata, G.; Giammona, G. Polymeric Nanocarriers for Magnetic Targeted Drug Delivery: Preparation, Characterization, and in Vitro and in Vivo Evaluation. *Mol. Pharm.***2013**, *10* (12), 4397–4407.
- (202) Hu, S.-H.; Tsai, C.-H.; Liao, C.-F.; Liu, D.-M.; Chen, S.-Y. Controlled Rupture of Magnetic Polyelectrolyte Microcapsules for Drug Delivery. *Langmuir***2008**, *24* (20), 11811–11818.
- (203) Qiu, Y.; Park, K. Environment-Sensitive Hydrogels for Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.***2001**, *53* (3), 321–339.
- (204) Sato, K.; Yoshida, K.; Takahashi, S.; Anzai, J. PH- and Sugar-Sensitive Layer-by-Layer Films and Microcapsules for Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.***2011**, *63* (9), 809–821.
- (205) Almeida, H.; Amaral, M. H.; Lobão, P. Temperature and PH Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Controlled and Selfregulated Drug Delivery. **2012**.
- (206) Vaupel, P.; Kallinowski, F.; Okunieff, P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Res.***1989**, *49* (23), 6449–6465.
- (207) Engin, K.; Leeper, D. B.; Cater, J. R.; Thistlethwaite, A. J.; Tupchong, L.; McFarlane, J. D. Extracellular PH Distribution in Human Tumours. *Int. J. Hyperthermia***1995**, *11* (2), 211–216.
- (208) Gerweck, L. E. Tumor PH Controls the in Vivo Efficacy of Weak Acid and Base Chemotherapeutics. *Mol. Cancer Ther.***2006**, *5* (5), 1275–1279.
- (209) Mahoney, B. P.; Raghunand, N.; Baggett, B.; Gillies, R. J. Tumor Acidity, Ion Trapping and Chemotherapeutics. I. Acid PH Affects the Distribution of Chemotherapeutic Agents in Vitro. *Biochem. Pharmacol.***2003**, *66* (7), 1207–1218.
- (210) Liu, J.; Huang, Y.; Kumar, A.; Tan, A.; Jin, S.; Mozhi, A.; Liang, X.-J. PH-Sensitive Nano-Systems for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Biotechnol. Adv.***2014**, *32* (4), 693–710.
- (211) Guo, Z.; Chen, X.; Xin, J.; Wu, D.; Li, J.; Xu, C. Effect of Molecular Weight and Arm Number on the Growth and PH-Dependent Morphology of Star Poly[2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate]/Poly(Styrenesulfonate) Multilayer Films. *Macromolecules***2010**, *43* (21), 9087–9093.
- (212) Kim, B.-S.; Gao, H.; Argun, A. A.; Matyjaszewski, K.; Hammond, P. T. All-Star Polymer Multilayers as PH-Responsive Nanofilms. *Macromolecules***2009**, *42* (1), 368–375.
- (213) Gao, X.; He, C.; Xiao, C.; Zhuang, X.; Chen, X. Biodegradable PH-Responsive Polyacrylic Acid Derivative Hydrogels with Tunable Swelling Behavior for Oral Delivery of Insulin. *Polymer***2013**, *54* (7), 1786–1793.
- (214) Wu, D.-Q.; Sun, Y.-X.; Xu, X.-D.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X. Biodegradable and PH-Sensitive Hydrogels for Cell Encapsulation and Controlled Drug Release. *Biomacromolecules***2008**, *9* (4), 1155–1162.

- (215) Tsao, C. T.; Hsiao, M. H.; Zhang, M. Y.; Levensgood, S. L.; Zhang, M. Chitosan-PEG Hydrogel with Sol-Gel Transition Triggerable by Multiple External Stimuli. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36* (3), 332–338.
- (216) Bugnicourt, L.; Ladavière, C. Interests of Chitosan Nanoparticles Ionically Cross-Linked with Tripolyphosphate for Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2016**, *60*, 1–17.
- (217) Nilsen-Nygaard, J.; Strand, S. P.; Vårum, K. M.; Draget, K. I.; Nordgård, C. T. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers* **2015**, *7* (3), 552–579.
- (218) Liu, D.; Jiang, G.; Yu, W.; Li, L.; Tong, Z.; Kong, X.; Yao, J. Oral Delivery of Insulin Using CaCO₃-Based Composite Nanocarriers with Hyaluronic Acid Coatings. *Mater. Lett.* **2017**, *188*, 263–266.
- (219) Zheng Shu, X.; Liu, Y.; Palumbo, F. S.; Luo, Y.; Prestwich, G. D. In Situ Crosslinkable Hyaluronan Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomaterials* **2004**, *25* (7), 1339–1348.
- (220) Ding, J.; He, R.; Zhou, G.; Tang, C.; Yin, C. Multilayered Mucoadhesive Hydrogel Films Based on Thiolated Hyaluronic Acid and Polyvinylalcohol for Insulin Delivery. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (10), 3643–3651.
- (221) Yang, Y. Q.; Zhao, B.; Li, Z. D.; Lin, W. J.; Zhang, C. Y.; Guo, X. D.; Wang, J. F.; Zhang, L. J. PH-Sensitive Micelles Self-Assembled from Multi-Arm Star Triblock Co-Polymers Poly(ϵ -Caprolactone)-b-Poly(2-(Diethylamino)Ethyl Methacrylate)-b-Poly(Poly(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylate) for Controlled Anticancer Drug Delivery. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (8), 7679–7690.
- (222) Du, J.; Fan, L.; Liu, Q. PH-Sensitive Block Copolymer Vesicles with Variable Trigger Points for Drug Delivery. *Macromolecules* **2012**, *45* (20), 8275–8283.
- (223) Cheng, R.; Feng, F.; Meng, F.; Deng, C.; Feijen, J.; Zhong, Z. Glutathione-Responsive Nano-Vehicles as a Promising Platform for Targeted Intracellular Drug and Gene Delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2011**, *152* (1), 2–12.
- (224) Wei, H.; Zhuo, R.-X.; Zhang, X.-Z. Design and Development of Polymeric Micelles with Cleavable Links for Intracellular Drug Delivery. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38* (3), 503–535.
- (225) Meng, F.; Hennink, W. E.; Zhong, Z. Reduction-Sensitive Polymers and Bioconjugates for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2009**, *30* (12), 2180–2198.
- (226) Sun, P.; Zhou, D.; Gan, Z. Novel Reduction-Sensitive Micelles for Triggered Intracellular Drug Release. *J. Control. Release* **2011**, *155* (1), 96–103.
- (227) Li, Y.; Xiao, K.; Zhu, W.; Deng, W.; Lam, K. S. Stimuli-Responsive Cross-Linked Micelles for on-Demand Drug Delivery against Cancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 58–73.
- (228) Zhao, Y. Light-Responsive Block Copolymer Micelles. *Macromolecules* **2012**, *45* (9), 3647–3657.
- (229) Alvarez-Lorenzo, C.; Deshmukh, S.; Bromberg, L.; Hatton, T. A.; Sández-Macho, I.; Concheiro, A. Temperature- and Light-Responsive Blends of Pluronic F127 and Poly(N,N-Dimethylacrylamide-Co-Methacryloyloxyazobenzene). *Langmuir* **2007**, *23* (23), 11475–11481.
- (230) Boissiere, O.; Han, D.; Tremblay, L.; Zhao, Y. Flower Micelles of Poly(N-Isopropylacrylamide) with Azobenzene Moieties Regularly Inserted into the Main Chain. *Soft Matter* **2011**, *7* (19), 9410–9415.
- (231) Irie, M. Diarylethenes for Memories and Switches. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (5), 1685–1716.
- (232) Lee, H.; Wu, W.; Oh, J. K.; Mueller, L.; Sherwood, G.; Peteanu, L.; Kowalewski, T.; Matyjaszewski, K. Light-Induced Reversible Formation of Polymeric Micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (14), 2453–2457.
- (233) Chen, Z.; He, Y.; Wang, Y.; Wang, X. Amphiphilic Diblock Copolymer with Dithienylethene Pendants: Synthesis and Photo-Modulated Self-Assembly. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32* (13), 977–982.
- (234) Menon, S.; Thekkayil, R.; Varghese, S.; Das, S. Photoresponsive Soft Materials: Synthesis and Photophysical Studies of a Stilbene-Based Diblock Copolymer. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2011**, *49* (23), 5063–5073.
- (235) Mynar, J. L.; Goodwin, A. P.; Cohen, J. A.; Ma, Y.; Fleming, G. R.; Fréchet, J. M. J. Two-Photon Degradable Supramolecular Assemblies of Linear-Dendritic Copolymers. *Chem. Commun.* **2007**, *0* (20), 2081–2082.

- (236) Bertrand, O.; Gohy, J.-F. Photo-Responsive Polymers: Synthesis and Applications. *Polym. Chem.* **2017**, *8* (1), 52–73.
- (237) Hartley, G. S. The Cis-Form of Azobenzene. *Nature* **1937**, *140* (3537), 281.
- (238) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1809–1825.
- (239) Wei-Guang Diao, E. A New Trans-to-Cis Photoisomerization Mechanism of Azobenzene on the $S1(n,\pi^*)$ Surface. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108* (6), 950–956.
- (240) Rau, H. Spectroscopic Properties of Organic Azo Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1973**, *12* (3), 224–235.
- (241) Cui, Z.-K.; Phoeung, T.; Rousseau, P.-A.; Rydzek, G.; Zhang, Q.; Bazuin, C. G.; Lafleur, M. Nonphospholipid Fluid Liposomes with Switchable Photocontrolled Release. *Langmuir* **2014**, *30* (36), 10818–10825.
- (242) Zhang, Q.; Bazuin, C. G. Liquid Crystallinity and Other Properties in Complexes of Cationic Azo-Containing Surfactomesogens with Poly(Styrenesulfonate). *Macromolecules* **2009**, *42* (13), 4775–4786.
- (243) Yager, K. G.; Barrett, C. J. Azobenzene Polymers as Photomechanical and Multifunctional Smart Materials. In *Intelligent Materials*; 2007; pp 424–446.
- (244) Ringsdorf, H.; Schmidt, H.-W. Electro-Optical Effects of Azo Dye Containing Liquid Crystalline Copolymers. *Makromol. Chem.* **1984**, *185* (7), 1327–1334.
- (245) Se, K.; Kijima, M.; Fujimoto, T. Photochemical Isomerization of Azobenzene Incorporated in Poly(N,N-Dimethyl-4-Vinylphenethylamine-Block-Styrene) Diblock Copolymer by Cross Linkage. *Polymer* **1997**, *38* (23), 5755–5760.
- (246) Tong, X.; Wang, G.; Soldera, A.; Zhao, Y. How Can Azobenzene Block Copolymer Vesicles Be Dissociated and Reformed by Light? *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (43), 20281–20287.
- (247) Wang, G.; Tong, X.; Zhao, Y. Preparation of Azobenzene-Containing Amphiphilic Diblock Copolymers for Light-Responsive Micellar Aggregates. *Macromolecules* **2004**, *37* (24), 8911–8917.
- (248) Irie, M.; Mohri, M. Thermally Irreversible Photochromic Systems. Reversible Photocyclization of Diarylethene Derivatives. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (4), 803–808.
- (249) Tanio, N.; Irie, M. Photooptical Switching of Polymer Film Waveguide Containing Photochromic Diarylethenes. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1994**, *33*, 1550–1553.
- (250) Fukaminato, T.; Sasaki, T.; Kawai, T.; Tamai, N.; Irie, M. Digital Photoswitching of Fluorescence Based on the Photochromism of Diarylethene Derivatives at a Single-Molecule Level. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (45), 14843–14849.
- (251) Stellacci, F.; Toscano, F.; Gallazzi, M. C.; Zerbi, G. From a Photochromic Diarylethene Monomer to a Dopable Photochromic Polymer: Optical Properties. *Synth. Met.* **1999**, *102* (1), 979–980.
- (252) Nishi, H.; Kobatake, S. Photochromism and Optical Property of Gold Nanoparticles Covered with Low-Polydispersity Diarylethene Polymers. *Macromolecules* **2008**, *41* (11), 3995–4002.
- (253) Gohy, J.-F.; Zhao, Y. Photo-Responsive Block Copolymer Micelles: Design and Behavior. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (17), 7117.
- (254) Hirshberg, Y.; Fischer, E. Photochromism and Reversible Multiple Internal Transitions in Some Spiro Pyrans at Low Temperatures. Part II. *J. Chem. Soc.* **1954**, *0*, 3129–3137.
- (255) Smets, G. Photochromic Behaviour of Polymeric Systems and Related Phenomena. *Pure Appl. Chem.* **2009**, *30* (1–2), 1–24.
- (256) Menon, S.; Ongungal, R. M.; Das, S. Photocleavable Glycopolymer Aggregates. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (3), 623–628.
- (257) Iwamura, M.; Ishikawa, T.; Koyama, Y.; Sakuma, K.; Iwamura, H. 1-Pyrenylmethyl Esters, Photolabile Protecting Groups for Carboxylic-Acids. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (6), 679–682.
- (258) Jiang, J.; Tong, X.; Zhao, Y. A New Design for Light-Breakable Polymer Micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (23), 8290–8291.

- (259) Furuta, T.; Torigai, H.; Sugimoto, M.; Iwamura, M. Photochemical Properties of New Photolabile Camp Derivatives in a Physiological Saline Solution. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (13), 3953–3956.
- (260) Sheehan, J.; Umezawa, K. Phenacyl Photosensitive Blocking Groups. *J. Org. Chem.* **1973**, *38* (21), 3771–3774.
- (261) Pincock, J. A. Photochemistry of Arylmethyl Esters in Nucleophilic Solvents: Radical Pair and Ion Pair Intermediates. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30* (1), 43–49.
- (262) Beecher, J. E.; Cameron, J. F.; Fréchet, J. M. J. Photogeneration of Polymeric Amines: Synthesis, Photocrosslinking and Photoimaging of Copolymers Containing Photoactive Carbamate Pendant Groups. *J. Mater. Chem.* **1992**, *2* (8), 811–816.
- (263) Furuta, T.; Wang, S. S.; Dantzker, J. L.; Dore, T. M.; Bybee, W. J.; Callaway, E. M.; Denk, W.; Tsien, R. Y. Brominated 7-Hydroxycoumarin-4-Ylmethyls: Photolabile Protecting Groups with Biologically Useful Cross-Sections for Two Photon Photolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (4), 1193–1200.
- (264) Aujard, I.; Benbrahim, C.; Gouget, M.; Ruel, O.; Baudin, J.-B.; Neveu, P.; Jullien, L. O-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups with Red-Shifted Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-Sections for One- and Two-Photon Excitation. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12* (26), 6865–6879.
- (265) Barltrop, J.; Plant, P.; Schofield, P. Photosensitive Protective Groups. *Chem. Commun.* **1966**, *0* (22), 822–823.
- (266) Patchornik, A.; Amit, B.; Woodward, R. B. Photosensitive Protecting Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (21), 6333–6335.
- (267) Zhao, H.; Sterner, E. S.; Coughlin, E. B.; Theato, P. O-Nitrobenzyl Alcohol Derivatives: Opportunities in Polymer and Materials Science. *Macromolecules* **2012**, *45* (4), 1723–1736.
- (268) Lee, J.-E.; Ahn, E.; Bak, J. M.; Jung, S.-H.; Park, J. M.; Kim, B.-S.; Lee, H. Polymeric Micelles Based on Photocleavable Linkers Tethered with a Model Drug. *Polymer* **2014**, *55* (6), 1436–1442.
- (269) Jiang, J.; Tong, X.; Morris, D.; Zhao, Y. Toward Photocontrolled Release Using Light-Dissociable Block Copolymer Micelles. *Macromolecules* **2006**, *39* (13), 4633–4640.
- (270) Liu, X.; He, J.; Niu, Y.; Li, Y.; Hu, D.; Xia, X.; Lu, Y.; Xu, W. Photo-Responsive Amphiphilic Poly(α -Hydroxy Acids) with Pendent o-Nitrobenzyl Ester Constructed via Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Polym. Adv. Technol.* **2015**, *26* (5), 449–456.
- (271) Yan, Q.; Xin, Y.; Zhou, R.; Yin, Y.; Yuan, J. Light-Controlled Smart Nanotubes Based on the Orthogonal Assembly of Two Homopolymers. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (34), 9594–9596.
- (272) Kang, M.; Moon, B. Synthesis of Photocleavable Poly(Styrene-Block-Ethylene Oxide) and Its Self-Assembly into Nanoporous Thin Films. *Macromolecules* **2009**, *42* (1), 455–458.
- (273) Cabane, E.; Malinova, V.; Meier, W. Synthesis of Photocleavable Amphiphilic Block Copolymers: Toward the Design of Photosensitive Nanocarriers. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211* (17), 1847–1856.
- (274) Katz, J. S.; Zhong, S.; Ricart, B. G.; Pochan, D. J.; Hammer, D. A.; Burdick, J. A. Modular Synthesis of Biodegradable Diblock Copolymers for Designing Functional Polymersomes. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (11), 3654–3655.
- (275) Cabane, E.; Malinova, V.; Menon, S.; Palivan, C. G.; Meier, W. Photoresponsive Polymersomes as Smart, Triggerable Nanocarriers. *Soft Matter* **2011**, *7* (19), 9167–9176.
- (276) Han, D.; Tong, X.; Zhao, Y. Fast Photodegradable Block Copolymer Micelles for Burst Release. *Macromolecules* **2011**, *44* (3), 437–439.
- (277) Han, D.; Tong, X.; Zhao, Y. Block Copolymer Micelles with a Dual-Stimuli-Responsive Core for Fast or Slow Degradation. *Langmuir* **2012**, *28* (5), 2327–2331.
- (278) Thurmond, K. B.; Kowalewski, T.; Wooley, K. L. Water-Soluble Knedel-like Structures: The Preparation of Shell-Cross-Linked Small Particles. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (30), 7239–7240.
- (279) Guo, A.; Liu, G.; Tao, J. Star Polymers and Nanospheres from Cross-Linkable Diblock Copolymers. *Macromolecules* **1996**, *29* (7), 2487–2493.

- (280) Trenor, S. R.; Shultz, A. R.; Love, B. J.; Long, T. E. Coumarins in Polymers: From Light Harvesting to Photo-Cross-Linkable Tissue Scaffolds. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (6), 3059–3077.
- (281) Jiang, J.; Qi, B.; Lepage, M.; Zhao, Y. Polymer Micelles Stabilization on Demand through Reversible Photo-Cross-Linking. *Macromolecules* **2007**, *40* (4), 790–792.
- (282) Babin, J.; Lepage, M.; Zhao, Y. “Decoration” of Shell Cross-Linked Reverse Polymer Micelles Using ATRP: A New Route to Stimuli-Responsive Nanoparticles. *Macromolecules* **2008**, *41* (4), 1246–1253.
- (283) Ding, J.; Liu, G. Hairy, Semi-Shaved, and Fully Shaved Hollow Nanospheres from Polyisoprene-Block-Poly(2-Cinnamoyl ethyl Methacrylate). *Chem. Mater.* **1998**, *10* (2), 537–542.
- (284) Inoue Masamichi; Noda Kyohei; Yusa Shin-ichi. Hollow Nanoparticles Prepared from PH-responsive Template Polymer Micelles. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2012**, *50* (13), 2596–2603.
- (285) Wang, X.; Liu, G.; Hu, J.; Zhang, G.; Liu, S. Concurrent Block Copolymer Polymersome Stabilization and Bilayer Permeabilization by Stimuli-Regulated “Traceless” Crosslinking. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2014**, *53* (12), 3138–3142.
- (286) Jiang, X.; Lavender, C. A.; Woodcock, J. W.; Zhao, B. Multiple Micellization and Dissociation Transitions of Thermo- and Light-Sensitive Poly(Ethylene Oxide)-b-Poly(Ethoxytri(Ethylene Glycol) Acrylate-Co-o-Nitrobenzyl Acrylate) in Water. *Macromolecules* **2008**, *41* (7), 2632–2643.
- (287) Blasco, E.; J. Schmidt, B. V. K.; Barner-Kowollik, C.; Piñol, M.; Oriol, L. Dual Thermo- and Photo-Responsive Micelles Based on Miktoarm Star Polymers. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (16), 4506–4514.
- (288) Woodcock, J. W.; Wright, R. A. E.; Jiang, X.; O’Lenick, T. G.; Zhao, B. Dually Responsive Aqueous Gels from Thermo- and Light-Sensitive Hydrophilic ABA Triblock Copolymers. *Soft Matter* **2010**, *6* (14), 3325–3336.
- (289) Gaoxiang, P.; Ze, F.; Jia, W.; Yanlei, Y. Synthesis and Self-assembly Behavior of a Thermo/photo-dual Responsive Triblock Copolymer. *Acta Chim. Sin.* **2013**, *71* (5), 733–738.
- (290) Meng, L.; Huang, W.; Wang, D.; Huang, X.; Zhu, X.; Yan, D. Chitosan-Based Nanocarriers with PH and Light Dual Response for Anticancer Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (8), 2601–2610.
- (291) Jin, Q.; Luy, C.; Ji, J.; Agarwal, S. Design and Proof of Reversible Micelle-to-Vesicle Multistimuli-Responsive Morphological Regulations. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2012**, *50* (3), 451–457.
- (292) Wei, J.; Yan, Z.; Lin, L.; Gu, J.; Feng, Z.; Yu, Y. Photo/PH Dual-Responsive Behavior of Azopyridine-Containing Copolymer Vesicles. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73* (8), 1009–1014.
- (293) Lin, L.; Yan, Z.; Gu, J.; Zhang, Y.; Feng, Z.; Yu, Y. UV-Responsive Behavior of Azopyridine-Containing Diblock Copolymeric Vesicles: Photoinduced Fusion, Disintegration and Rearrangement. *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30* (13), 1089–1093.

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

OBJECTIFS ET STRATEGIE DE SYNTHÈSE

OBJECTIFS

L'objectif de ce doctorat consistait à développer des nanoparticules (NPs) photosensibles présentant une morphologie et des propriétés de surface contrôlées (cœur hydrophobe /couronne hydrophile) (Figure 38), puis de les employer comme systèmes de délivrance de principes actifs après injection par voie intraveineuse. Plus précisément, il s'agissait de développer un nouvel outil thérapeutique destiné au traitement du cancer colorectal afin d'améliorer la vectorisation des anticancéreux *in vivo*. Ces NPs photosensibles seront chargées de Doxorubicine (anticancéreux, DOX) dont la libération par simple diffusion hors de ces NPs sera limitée en faveur d'une libération photodéclenchée, contrôlée dans l'espace et dans le temps. Les NPs envisagées dans le cadre de ce doctorat présenteront un diamètre moyen d'environ 150 de nanomètres et seront composées de :

- ***Un cœur hydrophobe et photosensible*** qui permettra l'encapsulation de la DOX et sa libération sous l'effet d'une irradiation localisée. Ainsi, ce PA sera libéré au voisinage des cellules cancéreuses à traiter.
- ***Une couronne externe hydrophile à base d'un dérivé de dextrane*** qui assurera la stabilité colloïdale des nano-objets et minimisera l'adsorption des opsonines (protéines circulant dans le système sanguin) à leur surface, et par conséquent la reconnaissance de ces objets par le système immunitaire. Grâce à cette couronne hydrophile, ces NPs devraient échapper suffisamment longtemps au système immunitaire (furtivité) et présenter des temps de circulation *in vivo* suffisamment longs pour qu'elles puissent s'accumuler au voisinage des tumeurs grâce à l'effet EPR (ciblage passif des cellules cancéreuses).
- ***Un ligand de ciblage*** sera fixé à la surface des NPs pour permettre à celles-ci d'adhérer aux cellules tumorales visées et favoriser alors un ciblage actif de ces cellules.

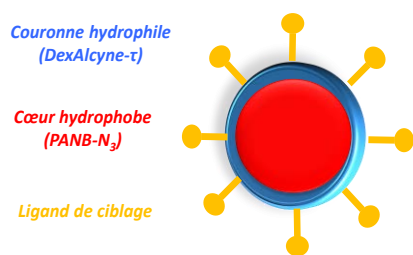


Figure 38: Nanoparticule de PANB recouverte d'une couronne en dextrane et fonctionnalisée en surface

STRATEGIE DE SYNTHÈSE

Le poly(acrylate d'*o*-nitrobenzyle) (PANB) a été choisi comme polymère hydrophobe pour constituer le cœur photosensible des NPs. Ces objets seront recouverts d'une couronne hydrophile dérivée du dextrane (polysaccharide neutre et biodégradable) qui assurera leur stabilité colloïdale. Suite à l'étude bibliographique, nous avons sélectionné deux procédés pour élaborer des NPs ayant des morphologies bien contrôlées : émulsion-évaporation de solvant organique, en effectuant ou non une réaction de chimie Click interfaciale, et la nanoprécipitation de glycopolymères Dex-*g*-PANB préalablement synthétisés.

Dans le cadre du procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique, les NPs ont été élaborées en mettant en œuvre (ou non) une réaction de « chimie Click » interfaciale de type CuAAC (Cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu (I)). Cette réaction est très répandue dans la littérature et a déjà été employée au LCPM en milieu homogène ou hétérogène pour élaborer des NPs¹ ou des nanocapsules (NCs) de PLA recouvertes d'une couronne hydrophile en dextrane². Pour mener cette réaction interfaciale, l'émulsion huile-dans-eau (H/E) est formulée avec un PANB préformé, correctement fonctionnalisé à son extrémité par une fonction azoture (appelé PANB-N₃), dissous dans la phase organique. Cette phase organique doit être volatile et non-miscible à l'eau, aussi le dichlorométhane (DCM) a été sélectionné dans le cadre de ce doctorat. D'autre part, la phase aqueuse de l'émulsion contient du dextrane modifié par des chaînes latérales hydrophobes fonctionnalisées à leur extrémité par des groupements alcyne (appelé DexAlcyne- τ avec τ le nombre de groupements hydrophobes introduits pour 100 unités glucopyranose). La présence des chaînes latérales hydrophobes sur le dextrane permet de stabiliser l'émulsion E/H. La présence des fonctions réactives (alcynes et azotures) permet d'assurer la réaction « Click » entre le PANB-N₃ et le DexAlcyne- τ à l'interface liquide/liquide de l'émulsion. Dans le cadre de ce doctorat, deux catalyseurs de CuAAC ont été évalués : CuBr ou le mélange CuSO₄/Acide ascorbique (AAsc).

Le deuxième procédé que nous avons mis en œuvre pour élaborer des NPs est la nanoprécipitation. C'est un procédé peu énergétique qui repose sur l'utilisation d'un solvant organique miscible à l'eau (dans notre cas le THF) dans lequel est solubilisé un copolymère amphiphile Dex-g-PANB préalablement préparé par réaction Click entre le DexAlcyne- τ et le PANB-N₃. Cette phase organique est ensuite progressivement « nanoprécipitée » dans un grand volume d'eau, sans avoir recours à un tensioactif stabilisateur. En effet, le Dex-g-PANB nanoprécipite et forme les NPs présentant une surface dextrane qui assure leur stabilité colloïdale.

Le premier chapitre de cette partie II est dédié aux synthèses des polymères précurseurs qui seront employés lors des procédés d'élaboration des NPs. Dans le deuxième chapitre, l'élaboration des NPs sera décrite, et les NPs seront caractérisées en termes de taille, taux de recouvrement en dextrane et épaisseur de la couronne surfacique, stabilité colloïdale en milieu salin et en présence d'un tensioactif compétitif ou du milieu de culture des cellules cancéreuses. Le troisième chapitre est quant à lui particulièrement consacré à l'évaluation du potentiel biologique et du caractère photosensible des NPs. Dans le quatrième chapitre, l'encapsulation de la doxorubicine (DOX) sera réalisée au sein des NPs et le suivi de sa libération sera étudié. Enfin, le dernier chapitre abordera la post-fonctionnalisation des NPs avec des ligands et/ou peptides de ciblage.

**CHAPITRE I : SYNTHÈSES ET CARACTÉRISATIONS DES POLYMERES
PRECURSEURS**

Ce chapitre présente la synthèse des polymères précurseurs qui seront employés ultérieurement pour élaborer des NPs par deux procédés : émulsion-évaporation de solvant organique et nanoprécipitation.

I) INTRODUCTION

Dans ces travaux de thèse, les NPs sont à base d'un cœur polymère hydrophobe photosensible dont les chaînes macromoléculaires sont dotées de fonction azoture terminale. La couronne des NPs est constituée de chaînes dérivées de dextrane qui portent des fonctions alcynes conférant au dextrane un caractère tensioactif nécessaire et suffisant pour stabiliser l'interface liquide/liquide ou solide/liquide (selon le procédé employé). Selon une première stratégie, ces précurseurs seront utilisés dans le procédé d'élaboration des NPs par émulsion-évaporation de solvant organique en mettant en œuvre, ou non, une chimie « Click » CuAAC interfaciale. La synthèse des précurseurs qui seront utilisés dans ce procédé et leur caractérisation par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) et par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière multi-angles (SEC-MALLS) seront présentés.

La deuxième stratégie consiste quant à elle à préparer des copolymères Dex-g-PANB avec différentes fractions massiques de PANB. Les copolymères Dex-g-PANB ayant une faible fraction de PANB seront hydrosolubles et pourront être utilisés dans le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique comme tensioactif. Pour cela, nous avons choisi de préparer un copolymère Dex-g-PANB avec peu de greffons courts ($\bar{M}_n = 3700 \text{ g mol}^{-1}$). Les copolymères Dex-g-PANB ayant des fractions massiques de PANB plus importantes, seront employés pour élaborer des NPs par nanoprécipitation.

II) SYNTHÈSE DES DIFFÉRENTS PANB

1) Généralités sur la SET-LRP

Le polymère choisi pour constituer le cœur des NPs est le poly(acrylate d'*o*-nitrobenzyle). C'est un polymère hydrophobe qui présente un caractère photosensible. Afin d'obtenir ce polymère avec une faible dispersité (Đ) et une fonctionnalité contrôlée (un azoture par chaîne) nous avons choisi de polymériser le monomère (ANB) par SET-LRP (Single Electron Transfert-Living Radical Polymerization), selon des travaux déjà réalisées au LCPM. Dans la littérature, l'ANB était considéré avant les années 2010 comme un monomère difficile à polymériser par des techniques de polymérisation radicalaire contrôlée telles que la RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer), l'ATRP (Atom

Transfer Radical Polymerization) ou la NMP (Nitroxide Mediated Polymerization). S. Soliman³ a cependant réussi à polymériser ce monomère de façon contrôlée par SET-LRP.

L'ATRP est une appellation proposée K. Matyjaszewski lors de son étude en 1995⁴. C'est une technique de polymérisation radicalaire par désactivation réversible qui met en jeu une espèce halogénée (R-X, X étant généralement un brome ou un chlore), en présence d'un métal de transition de degré d'oxydation n (M_t^n). Ce métal de transition est lié à un contre-ion Y par une liaison covalente ou ionique ($M_t^n - Y$). En présence d'un ou plusieurs ligands (L) ce dérivé ($M_t^n - Y$) forme un complexe métallique ($M_t^n - Y/L^m$) soluble dans le milieu réactionnel qui réagit sur R-X pour générer une espèce radicalaire active (R^\bullet) et un complexe métallique ($X-M_t^{n+1}-Y/L_m$). Les radicaux libres (R^\bullet) ainsi formés amorcent la polymérisation. Les macroradicaux (P_n^\bullet) formés au fur et à mesure de la polymérisation peuvent subir des réactions de terminaison par couplage ou dismutation ou encore des réactions de transfert. Afin de minimiser ces réactions secondaires, il est nécessaire de diminuer la concentration des radicaux libres (R^\bullet) par l'établissement d'un équilibre entre les macroradicaux (P_m^\bullet) et des chaînes dormantes (P_m-X)⁴⁻⁷ (Figure 39).

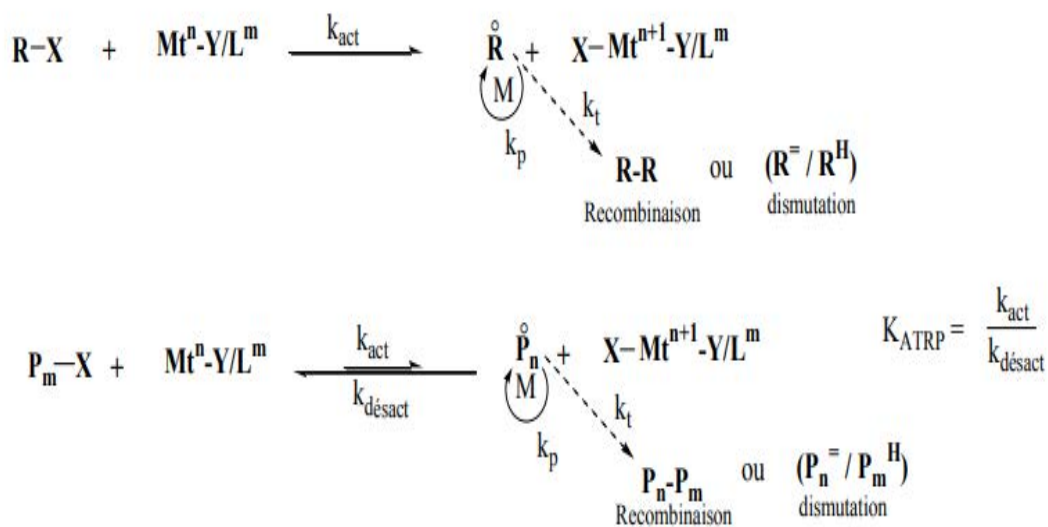


Figure 39 : Mécanisme général de la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP)

Depuis l'ATRP a connu un incroyable essor et permet le contrôle de la polymérisation radicalaire de la majorité des monomères vinyliques (à l'exception des diènes, de l'acide acrylique, de l'acétate de vinyle, mais aussi de certains monomères azotés en raison de leur interaction avec le métal de transition mis en jeu dans l'ATRP). K. Matyjaszewski a ensuite fait évoluer l'ATRP pour limiter la quantité de cuivre utilisée dans ce procédé tout en maintenant le caractère contrôlé de la polymérisation⁸. Parmi ces techniques on peut citer

l'AGET (activateur généré par transfert d'électron), ICAR (amorçeur pour la régénération continue de l'activateur), l'ARGET (activateur régénéré par transfert d'électron) et la SARA (Activateurs supplémentaires et agents de réduction). Toutes ces techniques de polymérisation ont le même mécanisme général (polymérisation ATRP) mais différent dans la façon de générer l'agent réducteur Cu^{I} .

➤ **AGET:**

Dans ce cas, des agents réducteurs (2-éthylhexanoate d'étain⁹, acide ascorbique¹⁰, triéthylamine¹¹) sont ajoutés au milieu, avec du Cu^{II} . Ces agents réduisent les espèces Cu^{II} afin de régénérer *in situ* du Cu^{I} et établir l'équilibre activation/désactivation nécessaire pour contrôler la polymérisation.

➤ **ARGET:**

Les agents réducteurs utilisés dans l'AGET sont également utilisés en ARGET. La différence est l'utilisation de dérivés organiques tels que l'hydrazine ou le phénol, ou inorganiques tels que le Sn^{II} ou le Cu^0 ^{12,13}. Contrairement à l'AGET, l'ARGET peut être réalisée en présence d'air.

➤ **SARA:**

Pour ce type de polymérisation, des métaux de valence zéro tels que Zn^0 , Mg^0 , Fe^0 ¹⁴ et Cu^0 ¹⁵ sont utilisés comme activateurs supplémentaires et comme agent réducteur, qui transforment les halogénures en espèces radicalaires. Ces métaux de valence zéro contribuent également à réduire les espèces $\text{Cu}^{\text{II}}\text{X}_2$ (Figure 40).

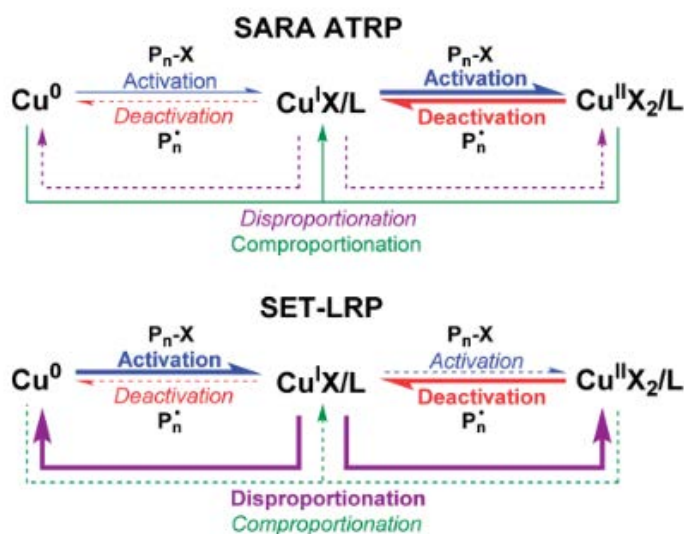


Figure 40 : Comparaison des mécanismes SARA ATRP et SET-LRP¹⁶

La Figure 40 compare les mécanismes SARA ATRP et SET-LRP. Les flèches en gras indiquent les réactions majeures contribuant au processus de polymérisation. Les flèches pleines représentent les autres réactions qui interviennent alors que les flèches en pointillées représentent les réactions négligeables. Les deux mécanismes SARA ATRP et SET-LRP utilisent les mêmes composants et font intervenir les mêmes réactions mais avec des contributions très différentes. Dans le cas de la SARA ATRP, il y a une activation lente du Cu^0 par les halogénures d'alkyle pour obtenir du Cu^{I} . Il s'établit ensuite un équilibre rapide (Activation/Désactivation) entre le Cu^{I} et Cu^{II} . En revanche, la SET-LRP suppose que l'espèce Cu^{I} est rapidement formé par la réaction entre Cu^0 et les halogénures d'alkyle. On observe une dismutation rapide du Cu^{I} en Cu^0 et Cu^{II} . Le Cu^{II} réagit avec les macroradicaux (P_n^\bullet) pour redonner du Cu^{I} et des chaînes mortes ($\text{P}_n\text{-X}$).

➤ **SET-LRP :**

Cette méthode de polymérisation radicalaire contrôlée a été proposée en 2006 par l'équipe de V. Percec¹⁷. Cette polymérisation est basée sur une catalyse hétérogène par le cuivre métallique Cu^{018} et permet la synthèse de polymère, dans les milieux polaires. Le mécanisme de synthèse proposé par V. Percec fait intervenir une réaction de l'espèce dormante $\text{P}_n\text{-X}$ (amorceur ou chaîne dormante) avec les atomes de Cu^0 pour former l'espèce active radicalaire (P_n^\bullet) ainsi que le cuivre au degré d'oxydation (I), ligaté par le ligand (CuX/L). La propagation s'effectue à partir du radical produit (P_n^\bullet) par addition successive de monomères, tandis que le CuX/L se dismute en cuivre (0) et cuivre (II) ligaté (CuX_2/L). L'espèce active (P_n^\bullet) se transforme alors en espèce dormante ($\text{P}_n\text{-X}$) par réaction avec CuX_2/L ce qui conduit à la formation de CuX/L qui se redismute en cuivre (0) et cuivre (II) (CuX_2/L) (Figure 41). A noter que les espèces actives (P_n^\bullet) peuvent également subir les réactions de terminaison (dismutation et couplage direct) et de transfert.

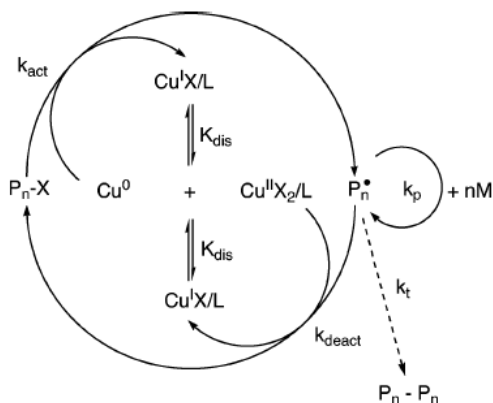


Figure 41 : Mécanisme de polymérisation par SET-LRP¹⁷

Après avoir sélectionné correctement le système amorceur/ catalyseur/ ligand/ solvant, la concentration des espèces radicalaires actives (P_n^*) peut être très faible devant celle des chaînes dormantes ($P_n - X$), ce qui permet de limiter les réactions de transfert et de terminaison et alors de contrôler les masses molaires et la dispersité (\mathcal{D}) du polymère formé. Cette polymérisation (SET-LRP) permet d'atteindre des taux de conversion très élevés (proches de 100 %) tout en gardant la fonctionnalité des bouts de chaîne¹⁹. Elle peut être réalisée en milieu aqueux²⁰ avec des monomères hydrophiles, ou en milieu organique. La différence majeure entre la SET-LRP et l'ATRP réside dans les mécanismes de polymérisation ; l'équilibre entre les espèces actives et dormantes s'établit par un transfert d'électron par sphère externe dans le cas de la SET-LRP^{21,22} et un transfert d'électron par sphère interne pour l'ATRP^{23,24} (Figure 42).

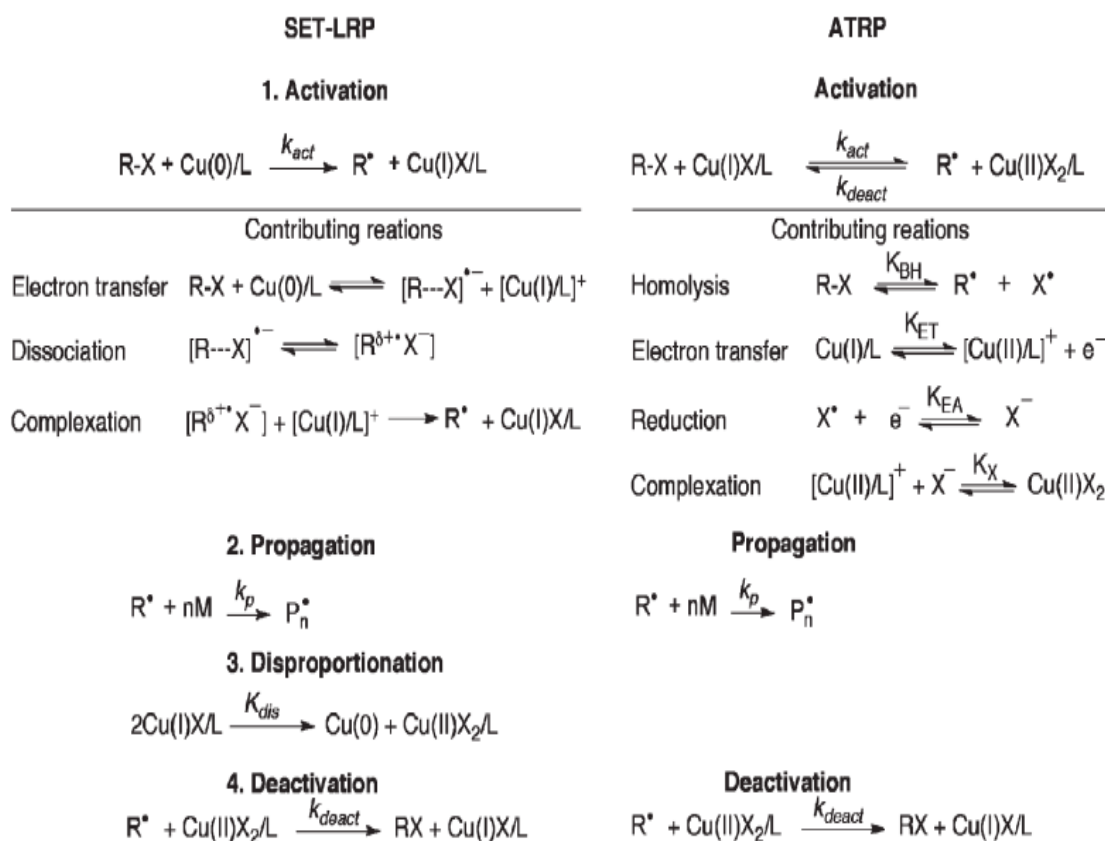


Figure 42 : Réactions impliquées dans le cas des polymérisations SET-LRP et ATRP²⁵

Le contrôle de la SET-LRP repose sur le choix de 5 paramètres :

▪ **Les monomères pour SET-LRP :**

Selon la littérature, un bon nombre de monomères sont polymérisables par SET-LRP tels que les acrylates²⁶⁻³⁰, les méthacrylates³¹⁻³³, les halogénures de vinyle¹⁷, les styréniques^{34,35} et les acrylonitriles³⁶⁻⁴¹ ou les acrylamides²⁷.

▪ **Les amorceurs pour SET-LRP:**

Comme pour l'ATRP, plusieurs amorceurs peuvent être utilisés tels que les α -haloesters⁴²⁻⁴⁴, les hydrocarbures halogénés (à savoir les haloformes : CHCl_3 ^{26,27}, CHBr_3 ^{17,45}, CHI_3 ^{17,45} et CCl_4 ^{38,39}). D'autres types d'amorceurs sont aussi utilisés en SET-LRP tels que le 2-bromopropionitrile^{36,37,40,41}, le *N*-benzyl-2-bromo-2-méthylpropionamide⁴⁶, le *N*-phényl-2-bromo-2-méthylpropionamide, le *N*-chloropyrrolidinone ou encore le 2-cyanoprop-2-yl-1-dithionaphthalate³²; cependant les α -haloesters demeurent les amorceurs les plus utilisés en SET-LRP. La nature (primaire, secondaire ou tertiaire) du carbone attaché à l'halogène est un paramètre qui peut influencer la vitesse d'amorçage, et donc le contrôle de la SET-LRP.

▪ **Les catalyseurs pour SET-LRP:**

Les catalyseurs les plus utilisés sont des métaux de valence zéro. Le cuivre (0) est le catalyseur le plus utilisé⁴⁷⁻⁵¹ et son utilisation sous forme de fil simplifie le montage expérimental et la purification du produit obtenu⁵². Cependant, des sels de cuivre Cu(I)X ($\text{X}=\text{Cl}$, Br ou I)²⁶⁻²⁸ et Cu_2O ³¹ peuvent également être utilisés comme catalyseur. Dans ces derniers cas, l'espèce catalytique Cu^0 et l'espèce modératrice Cu^{II} sont générées *in situ* par dismutation des sels. La cinétique de polymérisation dépend fortement de la distribution de taille et de la stabilisation des particules de Cu^0 naissantes dans le milieu réactionnel.

D'autres métaux de valence zéro ont également été testés tels que : le fer (0)³⁵, le samarium (0)³⁷, l'ytterbium (0)⁵³, l'étain (0)³⁸, le lanthanide (0)³⁹ et le magnésium (0)³⁶. Cependant, dans la suite de ce manuscrit, nous ne nous intéressons qu'à la SET-LRP réalisée en présence de fils de cuivre (0).

Dan et al.⁵⁴ ont étudié l'effet sur la SET-LRP de la quantité initiale de Cu^{II} ajoutée dans le milieu réactionnel. Ainsi, la polymérisation de l'acrylate de *t*-butyle (tBA) dans le DMSO par SET-LRP a été menée en absence et en présence d'une quantité variable de CuBr_2 en utilisant le méthyle 2-bromopropionate (MBP) comme amorceur. Les auteurs ont montré que la polymérisation n'était pas contrôlée en absence de CuBr_2 initial alors qu'elle l'est lorsque du CuBr_2 est rajouté dès le début de la réaction. En présence de CuBr_2 , la vitesse de polymérisation augmente avec la concentration initiale de CuBr_2 . Toutefois, pour des concentrations élevées de CuBr_2 , la k_p^{app} (constante apparente de vitesse de propagation) diminue en raison d'un bon contrôle de la réaction de polymérisation dû à l'augmentation du rapport $[\text{CuBr}_2]_0/[\text{Cu}(0)]_0$. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Haddleton et al.⁵⁵ qui ont étudié la polymérisation par SET-LRP de l'acrylate de méthyle dans le DMSO en utilisant 2-bromoisobutyrate d'éthyle comme amorceur. Ces chercheurs ont alors montré

que l'ajout initial de CuBr_2 permettait d'éviter la formation des chaînes polymère de fortes masses molaires en début de polymérisation produites par polymérisation radicalaire conventionnelle, alors que la vitesse de la SET-LRP est lente à cet instant.

▪ **Les ligands pour la SET-LRP:**

Le mécanisme SET-LRP comporte une étape rapide de dismutation du Cu^{I} en Cu^0 et Cu^{II} . La présence d'un ligand dans le milieu réactionnel entraîne la complexation des espèces Cu^{I} et Cu^{II} , ce qui modifie l'équilibre de dismutation. Ainsi, l'efficacité d'une SET-LRP et sa cinétique dépendent fortement de la nature et la concentration du ligand employé.

Perec et al.⁵⁶ ont étudié par UV-Vis l'effet de la nature du ligand sur l'étape de dismutation du CuBr . Les auteurs ont tout d'abord comparé l'effet de complexation de deux ligands (2,2'-Bipyridine (BPy) et *N-n*-propyl-2-pyridiyl-méthanamine (Pr-PMI) sur le CuBr ou le CuBr_2 dans le DMSO. Ils ont montré que sans ligand, le CuBr dans le DMSO absorbe à 500 nm et le CuBr_2 absorbe vers 1000 nm. Lorsque le BPy ou le Pr-PMI sont ajoutés, une faible absorbance à 400-450 nm, caractéristique de la formation des complexes $\text{Cu}(\text{I})\text{Br}/\text{BPy}$ ou bien $\text{Cu}(\text{I})\text{Br}/\text{Pr-PMI}$ est observée mais aucun pic caractéristique de la formation des complexes $\text{CuBr}_2/\text{ligand}$ n'est observé, ce qui signifie que ces ligands ne complexent pas le CuBr_2 . Dans un deuxième temps, ils ont étudié la complexation de deux autres ligands (Tris[2-(diméthylamino)éthyl]amine (Me_6TREN) et le Tris(2-aminoéthyl)amine (TREN)). Les expériences réalisées en présence de $\text{Cu}(\text{I})\text{Br}$ dans le DMSO mettent en évidence une absorbance caractéristique des complexes $\text{CuBr}_2/\text{Me}_6\text{TREN}$ et $\text{CuBr}_2/\text{TREN}$ à 750-950nm. Ces résultats prouvent que la réaction de dismutation du $\text{Cu}(\text{I})\text{Br}$ en $\text{Cu}(0)$ et CuBr_2 est alors favorisée en présence de Me_6TREN ou de TREN. Outre le Me_6TREN , le TREN, la *N,N,N',N',N''*-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA), la 1,1,4,7,10,10-hexaméthyl-triéthylène-tétraamine (HMTETA) et la polyéthylèneimine (PEI) (Figure 43) ont également été utilisées avec succès dans la SET-LRP, et permettent d'observer des réactions de dismutation rapides^{17,18}.

Le ligand le plus utilisé reste cependant la Me_6TREN ^{29,42-45,57}.

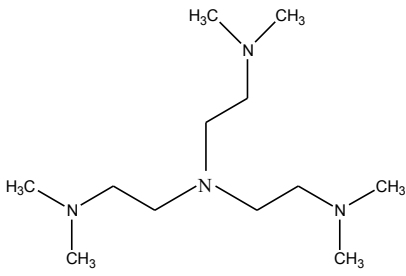
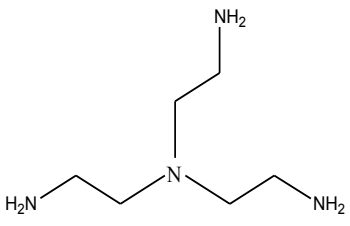
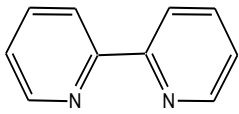
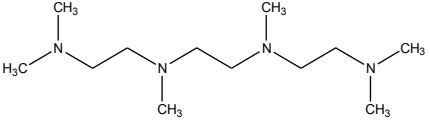
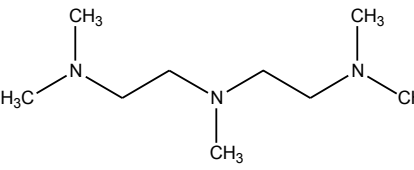
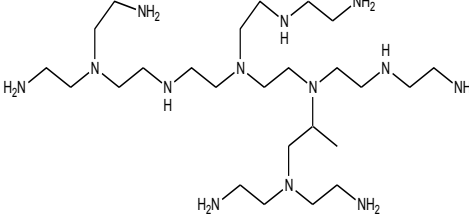
		
<p style="text-align: center;"><i>Tris[2-(diméthylamino)éthyl]amine</i> (<i>Me₆Tren</i>)</p>	<p style="text-align: center;"><i>Tris(2-aminoéthyl)amine</i> (<i>Tren</i>)</p>	<p style="text-align: center;"><i>2,2'-Bipyridine</i> (<i>BPy</i>)</p>
		
<p style="text-align: center;"><i>1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylène tétraamine</i> (<i>HMTETA</i>)</p>	<p style="text-align: center;"><i>N,N,N',N',N''-Pentaméthyl-diéthylène-triamine</i> (<i>PMDETA</i>)</p>	<p style="text-align: center;"><i>Polyéthylèneimine</i> (<i>PEI</i>)</p>

Figure 43 : Formules chimiques des ligands utilisés en SET-LRP

▪ **Les solvants par SET-LRP:**

Un des paramètres clés pour le bon fonctionnement de la SET-LRP est le solvant. Les solvants polaires communs comme le DMSO et l'eau peuvent être utilisés. Cependant le DMSO est le solvant le plus répandu en SET-LRP. C'est un solvant polaire qui permet de solubiliser la plupart des monomères à température ambiante et surtout de stabiliser les espèces Cu^{II} par formation d'un complexe. En présence de ligand comme le $\text{Me}_6\text{-TREN}$, le DMSO favorise alors la dismutation du cuivre (I) en cuivre (0) et cuivre (II)²⁰. Cependant, ce mécanisme a été remis en question par Matyjaszewski et al.⁸ qui avance que le cuivre (0) agirait comme un agent réducteur réagissant avec le cuivre (II) introduit dans le milieu réactionnel pour générer des ions cuivre (I) qui introduisent alors un processus d'ATRP. Quelle que soit la polémique, le DMSO permet une polymérisation rapide et un bon contrôle des masses molaires, et ce jusqu'à forte conversion.

Monge et al.⁵⁸ ont étudié la polymérisation par SET-LRP du MMA en utilisant le *N*-(*n*-propyl)-2-pyridylméthanimine) comme ligand. Ils ont alors comparé l'effet de deux

solvants (DMSO et toluène) sur la SET-LRP⁵⁸ et ont observé que les vitesses de polymérisation sont plus rapides en utilisant le DMSO, démontrant l'effet catalytique du DMSO sur la vitesse de polymérisation. L'augmentation de la polarité du milieu en utilisant le DMSO, par rapport au toluène, entraîne la stabilisation des produits intermédiaires de polymérisation. En effet, les auteurs ont étudié l'absorbance en UV du complexe CuBr/Ligand dans le toluène et observent une bande d'absorbance à 380 nm. En augmentant progressivement la concentration de DMSO dans le milieu réactionnel, ils notent la disparition progressive de cette bande d'absorbance et l'apparition d'une nouvelle bande à 490 nm attribuée à la formation d'un nouveau complexe CuBr/L (DMSO) où le DMSO ligande le complexe CuBr/L.

Perec et al.⁴⁴ ont quant à eux étudié la polymérisation par SET-LRP de l'acrylate de *n*-butyle et de l'acrylate de 2-éthylhexyle dans différents solvants : 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE), DMSO et des mélanges binaires de ces deux solvants. Les auteurs ont observé une valeur de k_p^{app} plus importante dans le cas des mélanges binaires que dans le cas de TFE seul. Ce résultat a là encore été attribué à l'effet catalytique du DMSO qui facilite la dismutation du Cu^I.

D'autres solvants polaires favorisant la dismutation du Cu^I ont également été mis en évidence, tels que le DMF, le diméthylacétamide (DMAC), l'éthylène carbonate (EC), le propylène carbonate (PC), l'éthanol, le méthanol, le méthoxyéthanol, la *N*-méthylpyrrolidone (NMP), l'acétone et leurs mélanges binaires avec H₂O^{29,51,58,59}. Plus récemment, des solvants atypiques comme les fluoroalcools^{33,37} et les liquides ioniques⁴¹ se sont également avérés très efficaces pour la SET-LRP.

Les solvants aprotiques classiques, tels que le THF ou le toluène ne sont pas adaptés pour la SET-LRP car ils stabilisent trop les espèces Cu(I)/N-ligand et limitent alors la dismutation du Cu^I.

2) Polymérisation de l'acrylate d'*o*-nitrobenzyle par SET-LRP

Comme évoqué précédemment, la polymérisation de l'acrylate d'*o*-nitrobenzyle a été réalisée par SET-LRP au cours de cette thèse. Le polymère linéaire obtenu est alors doté d'une extrémité Br (PANB-Br), laquelle peut ensuite être substituée par une fonction azoture, dans le but d'obtenir des chaînes de PANB pouvant être impliquée dans une réaction Click CuAAC (Figure 44).

En se basant sur des résultats du LCPM concernant la SET-LRP de ce monomère, l'amorceur sélectionné est le 2-bromoisobutyrate d'éthyle (EBiB), le ligand est le Me₆TREN,

le cuivre est ajouté au mélange réactionnel sous la forme de fils de Cu^0 préalablement activé par une solution d'hydrazine. Le traitement à l'hydrazine est effectué pour diminuer la période d'induction qui peut être observée et ainsi accroître la vitesse de polymérisation, comme cela a été décrit dans les travaux de Soliman et al. ⁶⁰. Du $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Br}_2$ est ajouté dès le début de la réaction afin d'établir rapidement un équilibre permettant d'observer le contrôle de la polymérisation. La polymérisation est réalisée à 25°C sous azote et dans le DMSO.

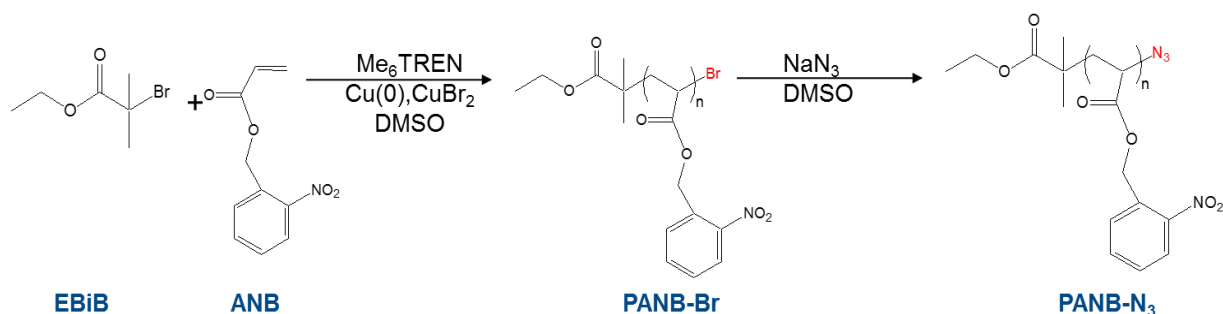


Figure 44 : Polymérisation de l'ANB par SET-LRP et substitution de l'extrémité Br par une fonction azoture

Deux polymères PANB-Br avec des longueurs de chaînes différentes ont été produits en faisant varier les ratios molaires $[\text{ANB}]_0/[\text{EBiB}]_0$. Pour chaque polymérisation, la réaction se déroule à l'abri de la lumière et des prélèvements du brut réactionnel sont régulièrement réalisés pour :

- Déterminer le taux de conversion (X) du monomère par analyse RMN ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ (Voir Partie expérimentale) et le calcul des masses molaires théoriques ($\bar{M}_{n\text{ th}}$) des PANB-Br.
- Estimer les masses molaires moyennes en nombre (\bar{M}_n) et en masse (\bar{M}_w) des polymères produits grâce à des analyses SEC-MALLS dans le THF (voir Partie expérimentale)

Dans un premier temps, une étude cinétique de la polymérisation par SET-LRP de l'ANB a été menée en utilisant deux ratios molaires $[\text{ANB}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{Me}_6\text{Tren}]_0/[\text{CuBr}_2]_0$ différents (26/1/1 /0,1 et 100/1/1 /0,1). Ces ratios ont permis de produire deux PANB-Br de masses molaires différentes. Un PANB-Br de faible masse molaire a été produit pour être utilisé par la suite dans la formation de copolymères Dex-g-PANB amphiphiles solubles dans l'eau, qui seront employés comme tensioactif.

Un deuxième polymère PANB-Br de masse molaire plus importante est obtenu pour être utilisé comme matériau constituant le cœur des NPs, que ce soit lors du procédé émulsion-évaporation de solvant organique (le PANB est alors solubilisé dans la phase organique) ou

du procédé nanopréciipitation (le PANB constitue alors les greffons des copolymères Dex-g-PANB organo-solubles).

Une étude cinétique a donc été réalisée en effectuant des prélèvements du brut réactionnel à différents temps polymérisation. A partir des spectres RMN ^1H des prélèvements effectués (Figure 45), la conversion (X) est calculée en se basant sur la somme des aires (A_1) des pics correspondant aux protons (a, b et c) de la double liaison du monomère et la somme des aires (A_2) des pics des protons aromatiques (e, f, g et h) par l'équation suivante :

$$X = \frac{A_2/4 - A_1/3}{A_2/4}$$

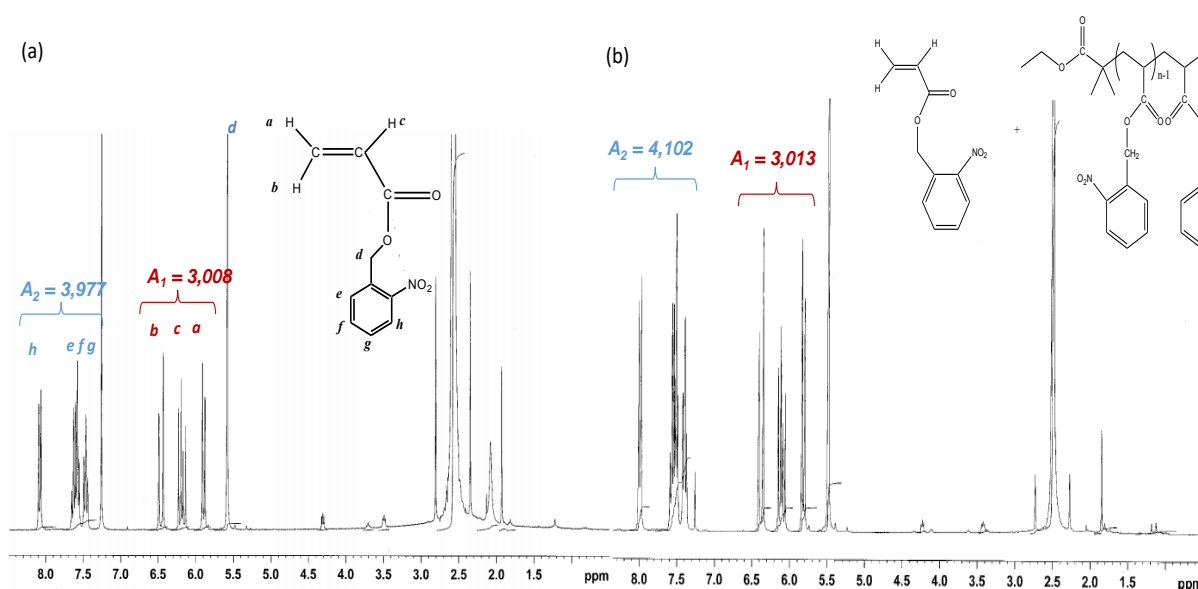


Figure 45 : Spectres RMN ^1H dans CDCl_3 du milieu réactionnel de la polymérisation par SET-LRP de l'ANB avec $[\text{ANB}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{Me}_6\text{Tren}]_0/[\text{CuBr}_2]_0 = 26/1/1/0,1$ dans DMSO à 20°C . (a) à $t=0$ (b) après 1 heure de réaction

L'évolution $\text{Ln}\left(\frac{1}{1-x}\right)$ en fonction du temps (Figure 46) montre bien la présence d'une période d'induction de 10 ou 35 minutes liée à l'activation du Cu^0 depuis le fil métallique, puis une évolution linéaire pendant 4 heures de polymérisation (la conversion alors obtenue est de 89 ou 67 % selon le ratio molaire $[\text{ANB}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{Me}_6\text{Tren}]_0/[\text{CuBr}_2]_0$ employé). Cette évolution linéaire signifie que la concentration en centres actifs reste 'constante' et que la cinétique de polymérisation est bien du premier ordre sur ce laps de temps. Après 4 heures de

polymérisation, une dérive de l'évolution est observée, ce qui témoigne que les centres actifs disparaissent alors progressivement à cause des réactions de terminaison.

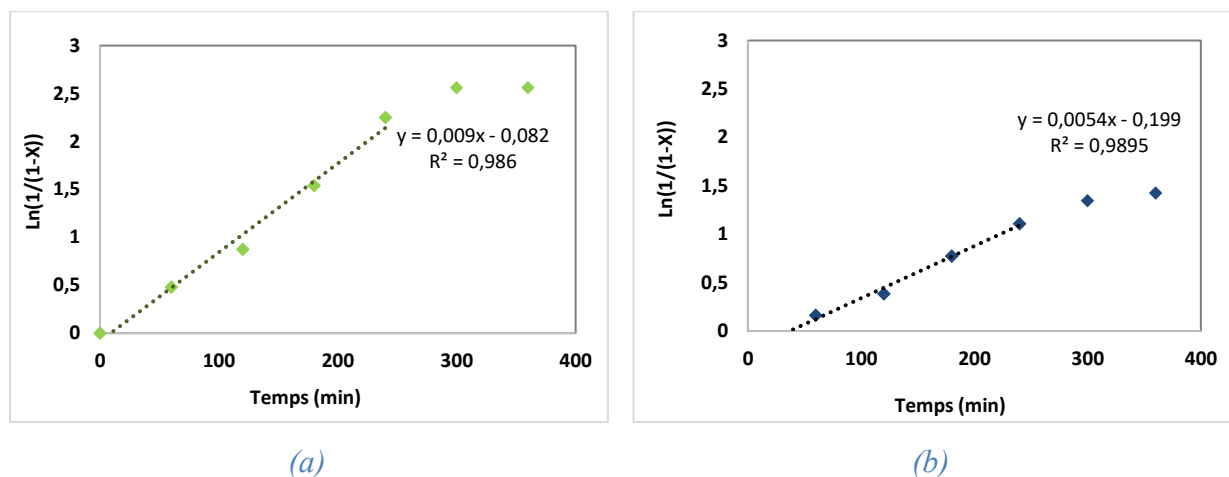


Figure 46 : Evolutions de $\text{Ln}\left(\frac{1}{1-x}\right)$ en fonction de la durée de polymérisation. SET-LRP dans le DMSO à 20°C de l'ANB avec (a) $[\text{ANB}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{Me}_6\text{TREN}]_0/[\text{CuBr}_2]_0 = 26/1/1/0,1$ et (b) $100/1/10,1$

Les chromatogrammes SEC sont visibles dans la Figure 49 (détecteurs LS (Light Scattering) et dRI (Réfractomètre différentiel)). On peut observer que le polymère est élué vers 20 minutes alors que le monomère sort après 26 minutes d'éluion. Ces chromatogrammes indiquent (i) un accroissement du pic du polymère au profit de celui du monomère au cours de la réaction de polymérisation (détection dRI) et (ii) une évolution du pic polymère vers des volumes d'éluion de plus en plus faibles, en accord avec la croissance des chaînes. Chaque chromatogramme révèle la présence d'un pic à distribution massique monomodale et relativement étroite jusqu'à 3 heures de polymérisation. Pour le ratio molaire $[\text{ANB}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{Me}_6\text{Tren}]_0/[\text{CuBr}_2]_0$ égale à 26/1/1/0,1 et à partir de 4 heures de polymérisation, ce qui correspond à environ 89 % de conversion, on peut observer la présence d'un épaulement caractéristique de longues chaînes macromoléculaires produites par terminaison par couplage que l'on peut schématiser par la réaction suivante (Figure 47):

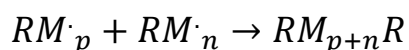


Figure 47 : Réaction de terminaison par couplage

Un autre type de terminaison (par dismutation), peut également se produire mais n'affecte pas les masses molaires (Figure 48) :

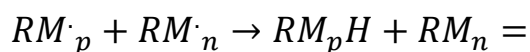


Figure 48 : Réaction de terminaison par dismutation

Après 4 heures de polymérisation, les masses molaires estimées aux volumes d'éluion correspondant aux épaulements sont cependant très supérieures à celles estimées pour le pic principal. Ceci ne peut pas s'expliquer par la seule terminaison par couplage, mais sûrement par un phénomène de transfert au polymère.

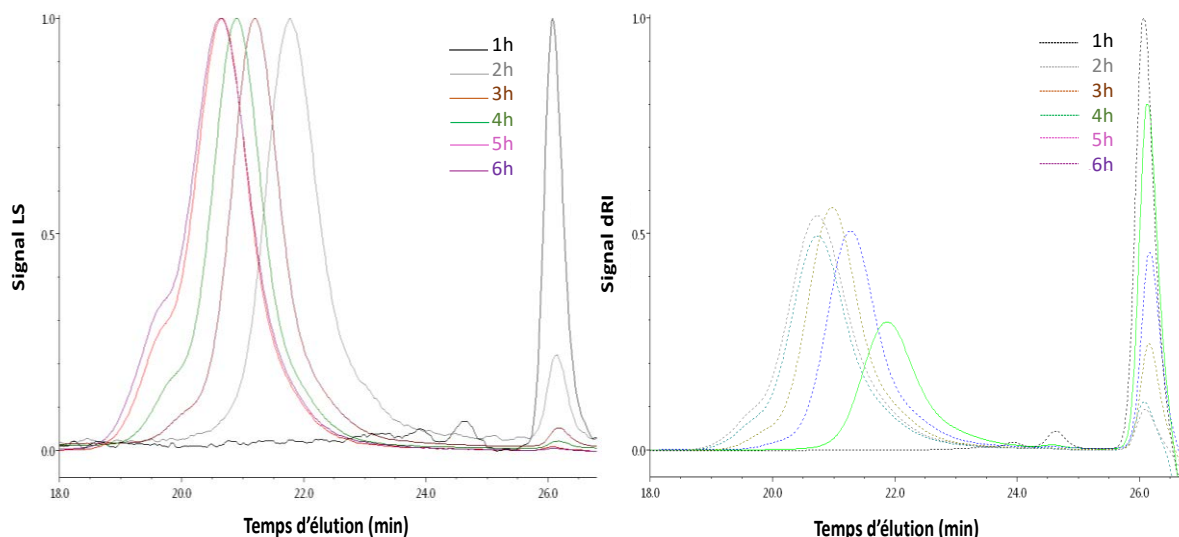


Figure 49 : Evolutions des chromatogrammes SEC (THF).



Ainsi après 89 % de conversion, les réactions de terminaison/ transfert au polymère perturbent les masses molaires, cependant les dispersités qui ne dépassent pas 1,5 à ces conversions (Tableau 11), confirmant le caractère contrôlé de la polymérisation pendant la période étudiée.

La Figure 50 représente l'évolution des \bar{M}_n estimées par SEC et des $\bar{M}_{n,th}$ calculées par RMN ^1H . On peut voir que les $\bar{M}_n(\text{SEC})$ croissent linéairement avec la conversion et qu'elles coïncident parfaitement avec les valeurs théoriques, sauf pour les fortes conversions (réactions de terminaison/transfert).

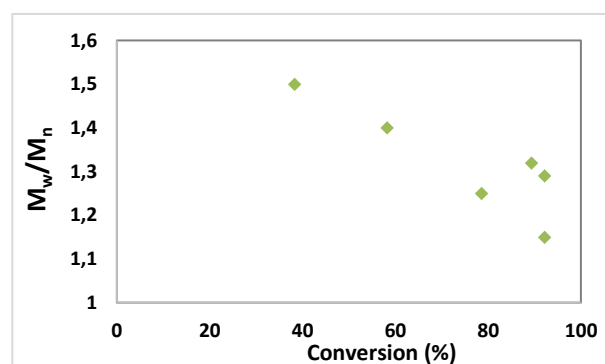
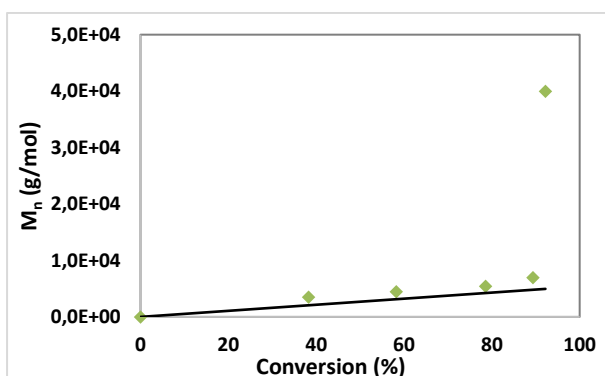
Pour conclure, même si l'acrylate d'*o*-nitrobenzyle (ANB) était considéré jusqu'alors comme un monomère difficile à polymériser par différentes techniques de polymérisations telles que la RAFT, l'ATRP ou la NMP^{61,62}, celui-ci a pu être polymérisé de façon contrôlée par SET-LRP. La polymérisation menée avec des ratios molaires $[\text{ANB}]_0 / [\text{EBiB}]_0 / [\text{Me}_6\text{TREN}]_0 / [\text{CuBr}_2]_0 = 26/1/1/0,1$ est contrôlée jusqu'à 78 % de conversion, alors que dans le cas du ratio $[\text{ANB}]_0 / [\text{EBiB}]_0 / [\text{Me}_6\text{TREN}]_0 / [\text{CuBr}_2]_0 = 100/1/1/0,1$ l'évolution de la masse molaire est linéaire jusqu'à 67 % de conversion. En se basant sur ces cinétiques, deux PANB-Br de masses molaires différentes (Tableau 12) ont pu être produits. Ils possèdent des $\bar{M}_{n(\text{SEC})}$ de 3700 et 10300 g/mol.

Tableau 11 : Résultats de la polymérisation déterminés par SEC (THF).

$$[ANB]_0/[EBiB]_0/[Me_6TREN]_0/[CuBr_2]_0 = 26/1/1/0,1$$

Temps (h)	Conversion (X)	Dispersité (Đ)	$\bar{M}_n(SEC)$ (g/mol)
0	0	0	0
1	38,3	1,5	3520
2	58,3	1,4	4500
3	78,6	1,25	5430
4	89,4	1,32	7000
5	92,2	1,29	4 10 ⁴
6	93,1	1,15	2,5 10 ⁴

(a)



(b)

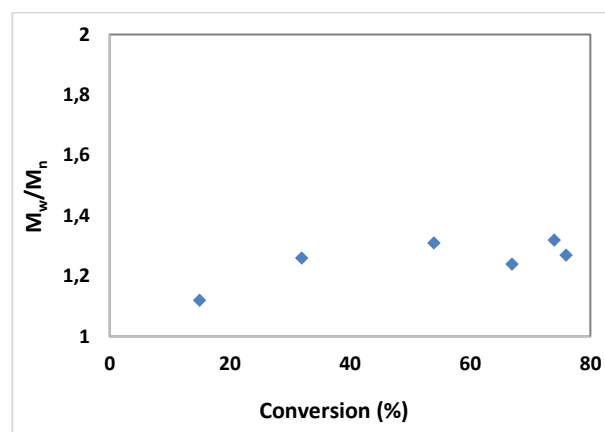
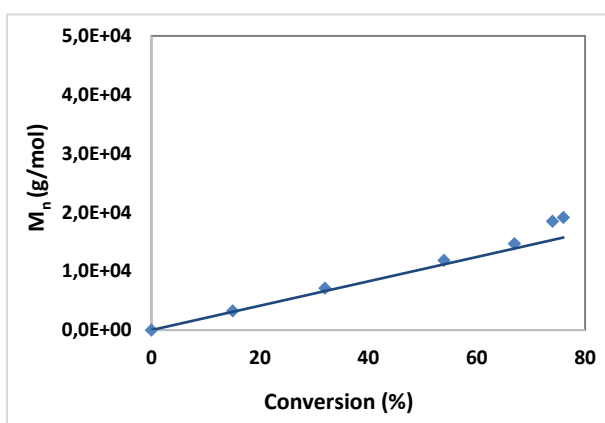


Figure 50 : Polymérisation par SET-LRP de l'ANB dans le DMSO à 20°C. Evolutions de \bar{M}_n en fonction du taux de conversion (Les droites correspondent à l'évolution des \bar{M}_n th) et évolutions de la dispersité en fonction du taux de conversion. (a) pour $[ANB]_0/[EBiB]_0/[Me_6TREN]_0/[CuBr_2]_0 = 26/1/1/0,1$ et (b) pour $[ANB]_0/[EBiB]_0/[Me_6TREN]_0/[CuBr_2]_0 = 100/1/1/0,1$

Tableau 12 : Polymérisation du ANB par SET-LRP

	$[ANB]_0/[EBiB]_0$ $/[Me_6TREN]_0/[CuBr_2]_0$	Temps (min)	Conversion (%) ^a	$\bar{M}_{n\ th}$ (g.mol ⁻¹) ^b	$\bar{M}_{n\ RMN}$ (g.mol ⁻¹) ^c	$\bar{M}_{n\ SEC}$ (g.mol ⁻¹) ^d	\bar{D}^d
1	26/1/1/0,1	180	78	4230	3519	3700	1,54
2	100/1/1/0,1	240	67	13800	12800	10300	1,24

a) Estimée à partir du spectre RMN ¹H du milieu réactionnel.

b) $\bar{M}_{n\ th} = M_{EBiB} + (\text{conversion} \times ([ANB]_0/[EBiB]_0) \times M_{ANB})$ avec M_{EBiB} et M_{ANB} les masses molaires de l'amorceur et de l'unité monomère égales respectivement à 195 et 207 g.mol⁻¹.

c) Estimée à partir du spectre RMN ¹H du PANB purifié.

d) Evaluée à partir de la SEC dans le THF du PANB purifié.

3) Modification chimique de l'extrémité du PANB-Br

Après avoir synthétisé des PANB-Br de différentes masses molaires, nous avons procédé à la substitution de leur extrémité de chaînes par une fonction azoture (Figure 44). Cette réaction de substitution nucléophile a été menée avec l'azoture de sodium dans le DMSO. Le PANB-N₃ obtenu est purifié par précipitation dans le méthanol, puis caractérisé dans un premier temps par RMN ¹H dans le CDCl₃ (Figure 51). Ce spectre permet de confirmer la disparition du pic correspondant au CH-Br (4,3 ppm). Le CH-N₃ résonne quant à lui à 4 ppm, au même déplacement chimique que les protons méthylène de l'amorceur. Ceci nous confirme que la substitution du Br par le N₃ a bien été quantitative. D'après les spectres RMN ¹H, le \bar{X}_n du PANB-Br était égal à 17 et celui du PANB-N₃ à 16,6. On peut alors conclure que cette substitution n'entraîne pas de dégradation notable des chaînes PANB.

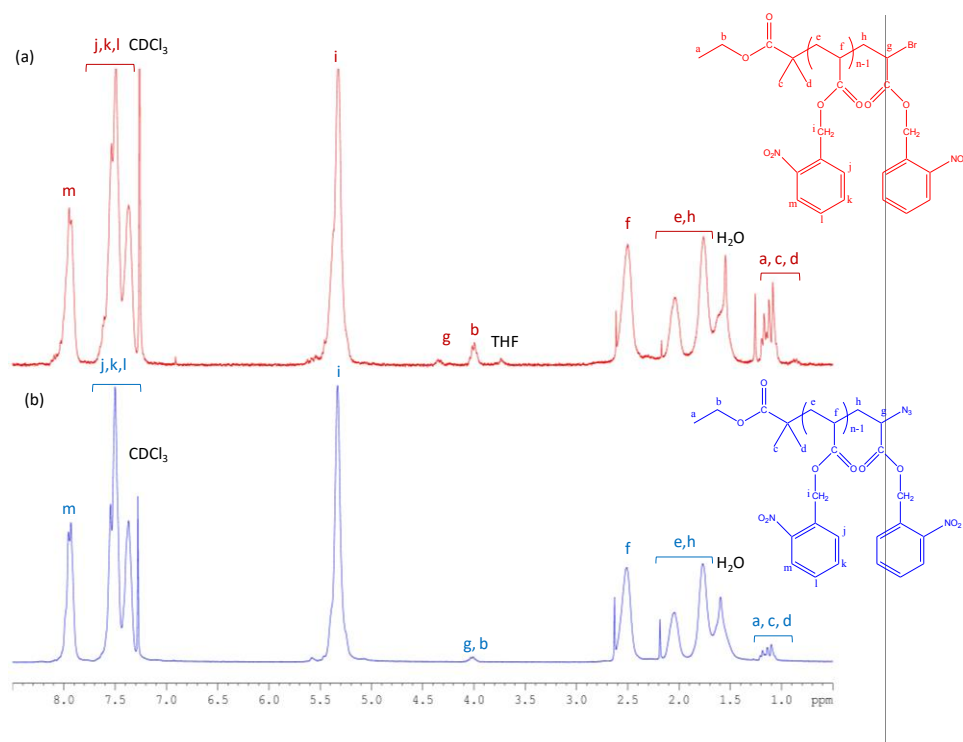


Figure 51 : Spectres RMN 1H (a) du PANB-Br ($\bar{M}_{n\ th} = 3500\ \text{g mol}^{-1}$) (b) du PANB- N_3 ($\bar{M}_{n\ th} = 3440\ \text{g mol}^{-1}$) dans le $CDCl_3$

Le PANB-Br initial et le PANB- N_3 obtenu ont été caractérisés par SEC dans le DMSO (Figure 52). Les chromatogrammes obtenus sont quasiment identiques, ce qui confirme que cette substitution n'est pas dégradante.

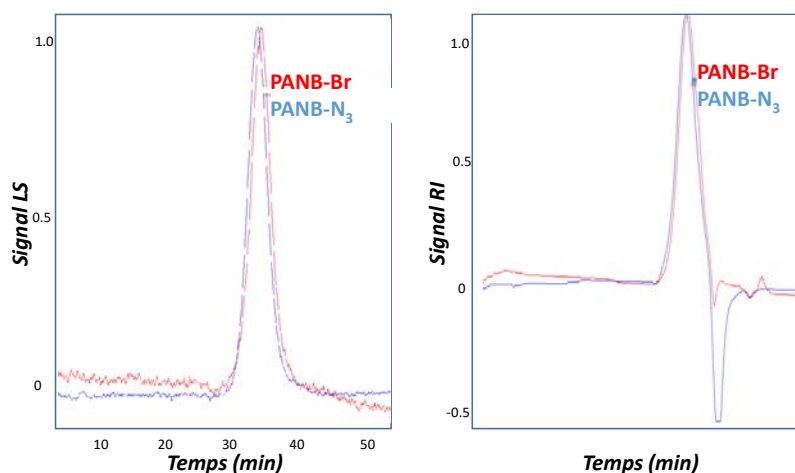
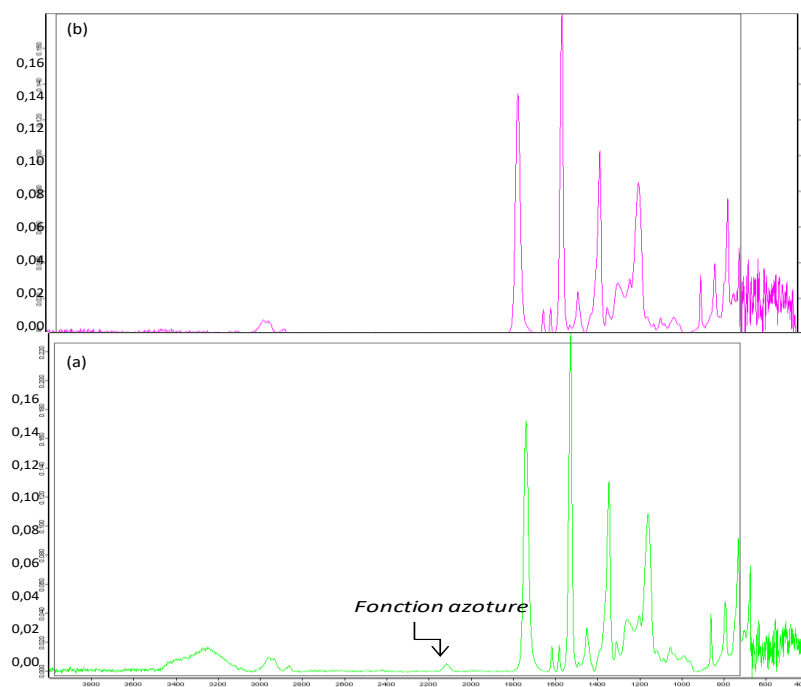


Figure 52 : SEC dans le $DMSO-NaNO_3$ du PANB-Br ($\bar{M}_{n\ th} = 3500\ \text{g mol}^{-1}$) et du PANB- N_3 ($\bar{M}_{n\ th} = 3440\ \text{g mol}^{-1}$) en détection LS et dRI

Une analyse par IR du PANB-Br et du PANB- N_3 (Figure 53) montre bien la présence des bandes caractéristiques du groupement NO_2 à 1350 et $1580\ \text{cm}^{-1}$. On note aussi la présence d'une bande caractéristique du groupement ester vers $1750\ \text{cm}^{-1}$ et d'une bande

caractéristique de la fonction azoture vers 2100 cm^{-1} dans le cas du PANB- N_3 . Toutes ces caractérisations montrent que la substitution n'entraîne pas de dégradation des chaînes PANB.



(a)
Figure 53 : Spectre IR (a) du PANB-Br ($\bar{M}_{n\ th} = 3500\text{ gmol}^{-1}$) et (b) du PANB- N_3 ($\bar{M}_{n\ th} = 3440\text{ gmol}^{-1}$)

III) SYNTHÈSE DU DÉRIVÉ DU DEXTRANE

1) Généralités sur le dextrane

Le dextrane est un homopolysaccharide produit par un grand nombre de microorganismes à partir du saccharose, majoritairement issu de la fermentation de sucres. Sa structure peut varier selon le type des bactéries lactiques utilisées. À l'échelle industrielle, la bactérie *Leuconostocmesenteroides* (souche B512-F) est souvent employée. La dextransucrose (enzyme présente dans ces organismes) transforme alors le saccharose en fructose et en dextrane dit « natif »⁶³. La masse molaire de celui-ci est élevée (plusieurs millions de g/mol) et la distribution de masses molaires large. Ce dextrane est constitué majoritairement par l'enchaînement d'unités α -D-glucopyranose liées en $\alpha(1\rightarrow6)$, avec un nombre variable de liaisons $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$ (Figure 54)⁶⁴.

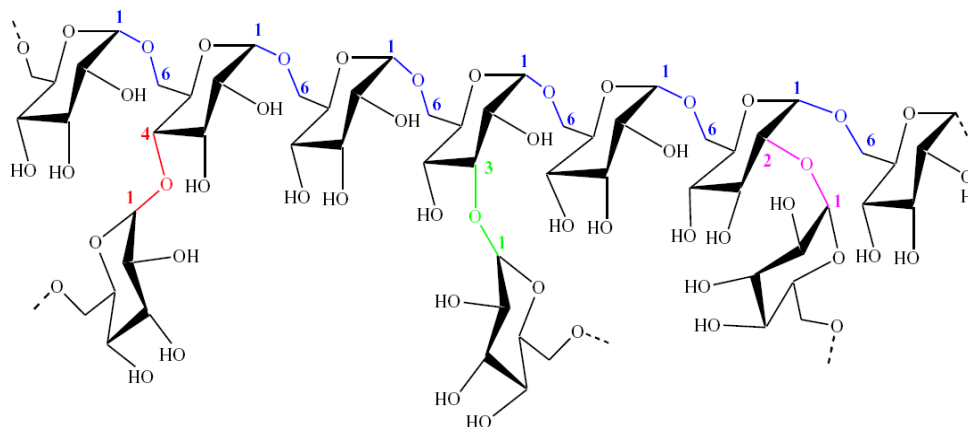


Figure 54 : Structure chimique du dextrane natif. Les unités α -D-glucopyranoses sont essentiellement liées par des liaisons α (1 \rightarrow 6). La présence des chaînes latérales en α (1 \rightarrow 2), α (1 \rightarrow 3) et α (1 \rightarrow 4) est représentée.

Ce dextrane « natif » est ensuite soumis à une hydrolyse partielle en milieu acide, suivie d'un fractionnement par l'éthanol ou le méthanol. Ceci conduit à des chaînes de dextrane plus courtes et essentiellement linéaires. Cette structure linéaire va être favorisée dans ces travaux.

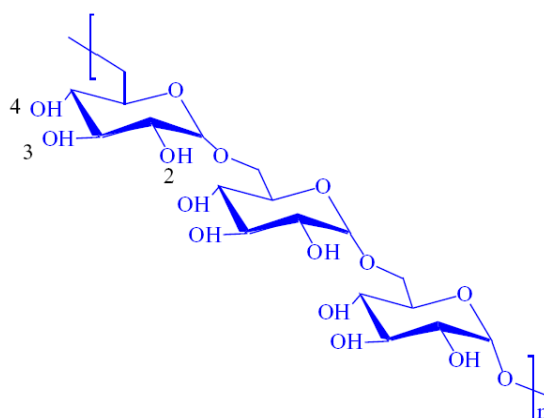


Figure 55 : Structure linéaire du dextrane

Le dextrane est un polysaccharide non ionique hydrophile, soluble dans l'eau et dans certains solvants organiques tels que le DMSO, le formamide, l'éthylène glycol et le glycérol. La présence des fonctions hydroxyle secondaires (OH en position 2, 3 ou 4 noté OH₂, OH₃ et OH₄) sur les unités glucosidiques (Figure 55) permettant le greffage de plusieurs groupements latéraux par l'intermédiaire de liaisons éther, ester ou amide⁶⁵. Le dextrane peut être utilisé dans plusieurs domaines, notamment dans les domaines thérapeutique et médical grâce à sa biodégradabilité et biocompatibilité. L'utilisation du dextrane et de ses dérivés dans le domaine de la vectorisation de médicaments a connu un grand essor ces

dernières années le LCPM a contribué depuis plusieurs années l'utilisation des dérivés amphiphiles du dextrane pour formuler des NPs^{1,66,67} dans ce but.

Nous nous sommes inspirés des travaux réalisés au LCPM³ afin d'obtenir des dérivés hydrophobisés du dextrane pouvant jouer le rôle de tensioactifs lors des processus d'élaboration des NPs. Ces dérivés nommés DexAlcyne- τ (Figure 56) présentent des fonctions alcyne terminales qui permettront par la suite la fixation des PANB-N₃ par chimie Click pour obtenir des copolymères Dex-g-PANB. Le bras espaceur situé entre le dextrane et l'alcyne est constitué par une chaîne hydrophobe sélectionnée pour préserver la réactivité de la fonction alcyne et apporter un caractère amphiphile au dérivé de dextrane. Cette synthèse a été effectuée selon un protocole déjà établi au laboratoire. Brièvement, un acide hex-5-ynoïque activé (synthétisé à partir de l'acide hex-5-ynoïque commercial) réagit sur le dextrane dans le DMSO à 60°C pendant 48h (Figure 56). Les dérivés ainsi obtenus sont nommés DexAlcyne- τ .

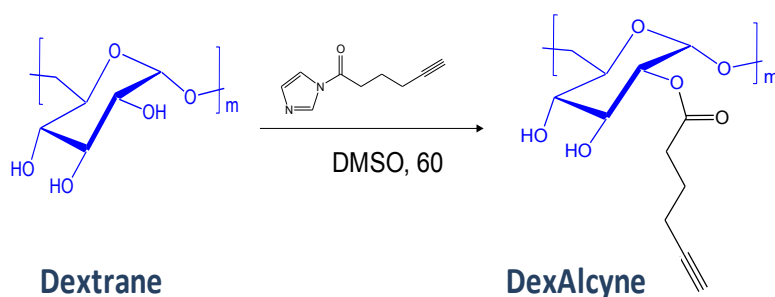


Figure 56: Réaction de synthèse du DexAlcyne- τ

Le taux de modification des DexAlcyne- τ obtenus a été déterminé par analyse RMN ¹H dans le DMSO-d₆ (Figure 57) et en se basant sur des différents pics caractéristiques :

- Les protons des trois fonctions hydroxyle (OH) et le proton anomère (1) de chaque unité glucopyranose résonnent entre 4,4 ppm et 5,1 ppm.
- Les protons méthyléniques de la chaîne alkyle greffée (notés 7, 8 et 9) sortent entre 1,7 ppm et 2,5 ppm. Le proton 8 est particulièrement bien défini. Le proton éthylénique (10) sort à 2,7 ppm.
- Un massif entre 3,0 ppm et 4,0 ppm correspondant aux 6 protons glucosidiques (2, 3, 4, 5, 6 et 6').

Pour obtenir des DexAlcyne- τ hydrosolubles, le taux τ est volontairement choisi égal à 15 %.

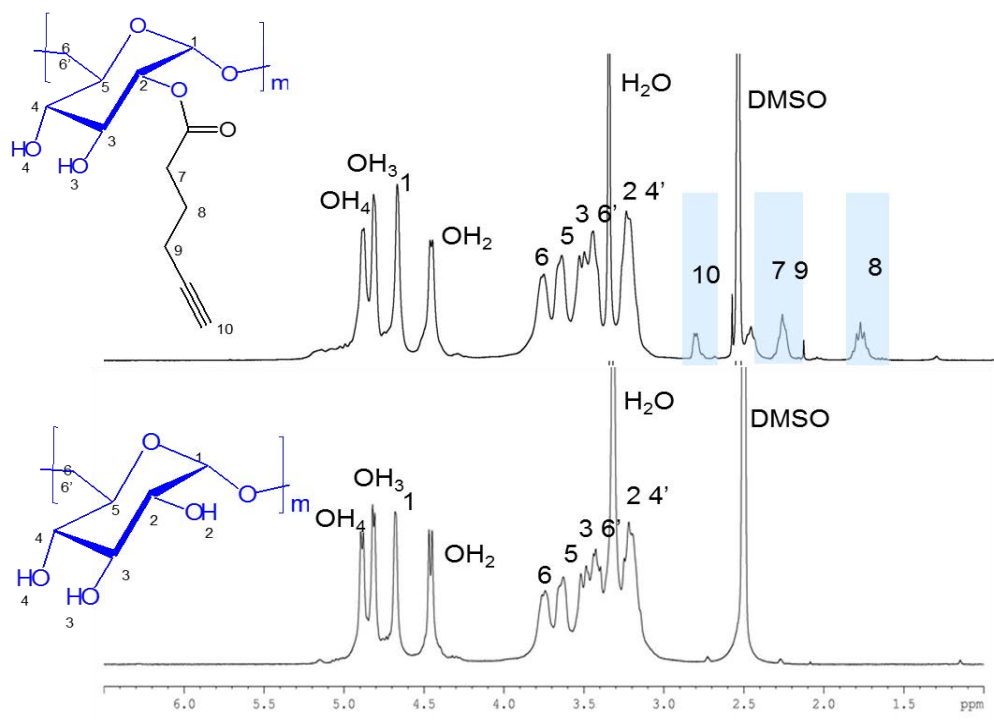


Figure 57 : Spectres RMN ^1H dans le DMSO- d_6 (a) du Dextrane et (b) du DexAlcyne- τ

2) Caractérisation par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

Le dérivé amphiphile DexAlcyne-15 obtenu a été caractérisé par SEC-MALLS dans le DMSO contenant 0,1 M NaNO_3 . L'ajout de ce sel facilite la solubilisation des chaînes amphiphiles analysées et permet d'écranter les interactions hydrophobes qui peuvent exister entre elles. L'incrément d'indice de réfraction (dn/dC) du dérivé dans cet éluant a été déterminé égal à 0,07.

Le chromatogramme du DexAlcyne- τ a été comparé à celui du dextrane natif (Figure 58) et on peut voir que les deux produits présentent le même temps d'éluion, ce qui témoigne que l'introduction de la chaîne alkyle n'entraîne pas une augmentation significative du volume hydrodynamique, ni de la masse molaire des dérivés (Tableau 13). Grâce aux courbes SEC et aux valeurs de \bar{M}_n estimées, on peut avancer que la modification chimique du dextrane n'entraîne pas un changement de la solubilité de la chaîne dextrane dans le DMSO/ NaNO_3 , ni de dégradation du polysaccharide.

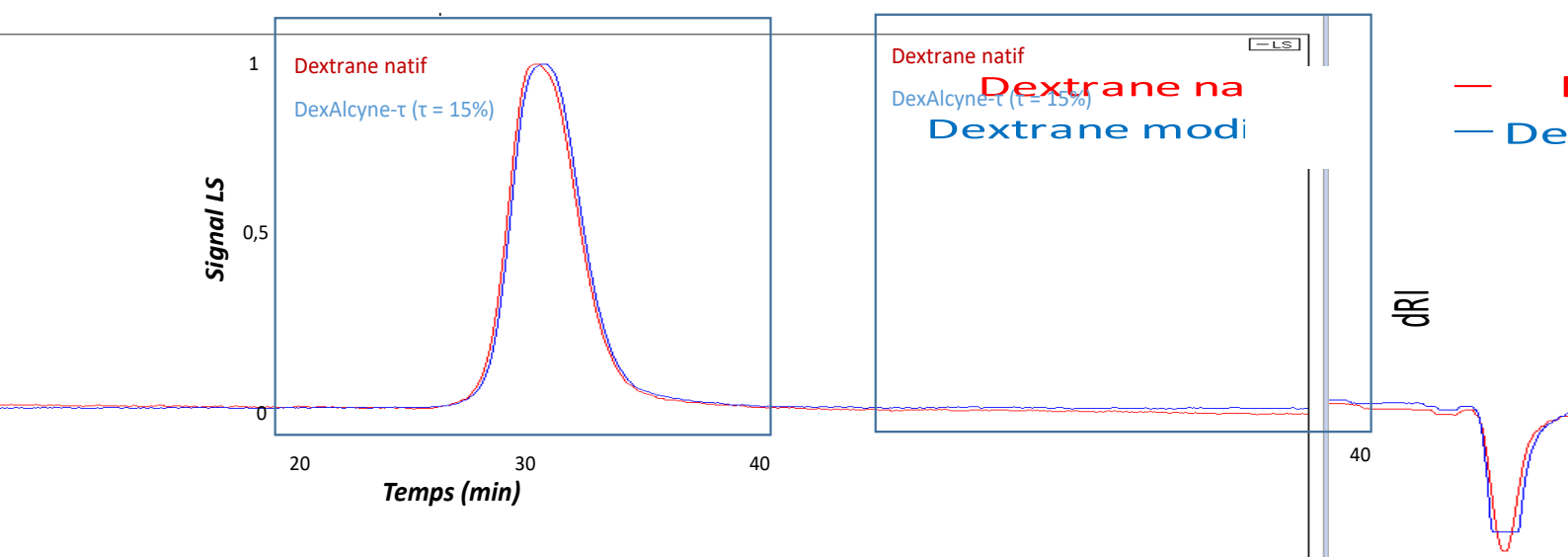


Figure 58 : SEC dans le DMSO- NaNO_3 du dextrane natif et du DexAlcyne- τ (avec $\tau = 15\%$) en détection LS et en détection dRI

Tableau 13 : Caractéristiques du dextrane et du DexAlcyne- τ

	$\bar{M}_n_{SEC}(\text{g mol}^{-1})$	$\bar{M}_w(\text{g mol}^{-1})$	Dispersité \mathcal{D}
<i>Dextrane natif</i>	26 000	35 700	1,37
<i>DexAlcyne-15</i>	27 550	37 100	1,35

3) Etude des propriétés tensioactives du DexAlcyne-15

Les propriétés tensioactives ont été évaluées par suivi de la tension superficielle des solutions aqueuses du DexAlcyne-15, en utilisant la méthode de l'anneau Du Noüy. Les valeurs de tension superficielle sont ensuite tracées en fonction de la concentration en chaîne hydrophobe, ce qui donne l'isotherme de Gibbs (Figure 59). Ces dérivés (DexAlcyne-15) vont être soit utilisés comme stabilisants lors des procédés d'élaboration des NPs (il est donc nécessaire de vérifier qu'ils présentent bien des propriétés tensioactives suffisantes), soit pour produire des copolymères Dex-g-PANB (voir chapitre suivant). Le caractère tensioactif d'une molécule traduit sa capacité à diminuer la tension superficielle air/eau ou la tension interfaciale entre une phase aqueuse et un solvant organique.

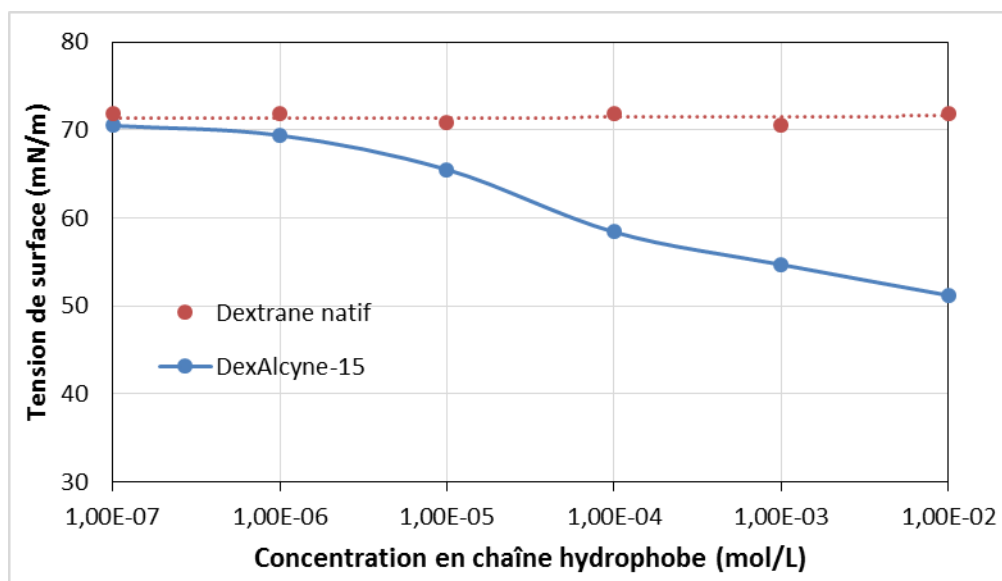


Figure 59 : Evolution de la tension superficielle des solutions aqueuses de dextrane et de DexAlcyne-15 en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes dans la phase aqueuse

Le dextrane natif ne possède aucune propriété tensioactive pour abaisser la tension superficielle de la phase aqueuse. Au contraire, les tensions superficielles des solutions aqueuses des DexAlcyne-15 diminuent au-delà d'une certaine concentration en chaîne hydrophobe. Ceci montre que la fonctionnalisation du dextrane par des chaînes alkyles hydrophobes entraîne une diminution de la tension de surface qui est de plus en plus marquée lorsque la concentration en chaînes alkyles est importante. Pour les faibles concentrations, la tension de surface diminue lentement car les chaînes amphiphiles DexAlcyne-15 ne sont pas assez nombreuses pour saturer complètement l'interface air/liquide. Ensuite, plus la concentration en chaînes hydrophobes augmente, plus la tension de surface diminue.

Ces résultats montrent que les dérivés amphiphiles DexAlcyne-15 synthétisés présentent bien des propriétés tensioactives qui permettront leur utilisation future comme stabilisants lors des procédés d'élaboration des NPs.

IV) SYNTHÈSE DES GLYCOPOLYMERES DEX-g-PANB

Ces glycopolymères sont obtenus par une approche développée récemment au LCPM. Plus précisément, dans le cadre de ce doctorat, les glycopolymères synthétisés sont composés de deux parties : une partie hydrophile composée d'un dextrane doté de fonctions alcyne et une partie hydrophobe PANB. Les glycopolymères sont formés par une réaction de chimie Click en utilisant une cycloaddition de Huisgen azide-alcyne catalysée par le cuivre (I) (CuAAC) qui nous permet d'avoir un bon contrôle des ratios PANB/dextrane dans le glycopolymère final. Selon leur fraction de PANB, ces glycopolymères seront par la suite

utilisés pour élaborer des NPs soit comme tensioactif hydrosoluble dans le procédé d'Emulsion/ Evaporation de solvant organique (pour les faibles fractions massiques de PANB), soit comme constituant du cœur des NPs dans le procédé de nanopréciipitation (pour les fractions massiques de PANB plus importantes). Les glycopolymères Dextrane-g-poly(acrylate d'*o*-nitrobenzyle) ont été élaborés par la méthode « Grafting onto » décrite dans la Figure 60 et seront abrégés Dex(15)-g-XPANB_Y où :

15 est le taux de substitution du DexAlcyne-15

X est le nombre moyen de greffons PANB pour 100 unités glucopyranose, présentant chacun une \bar{M}_n notée Y.

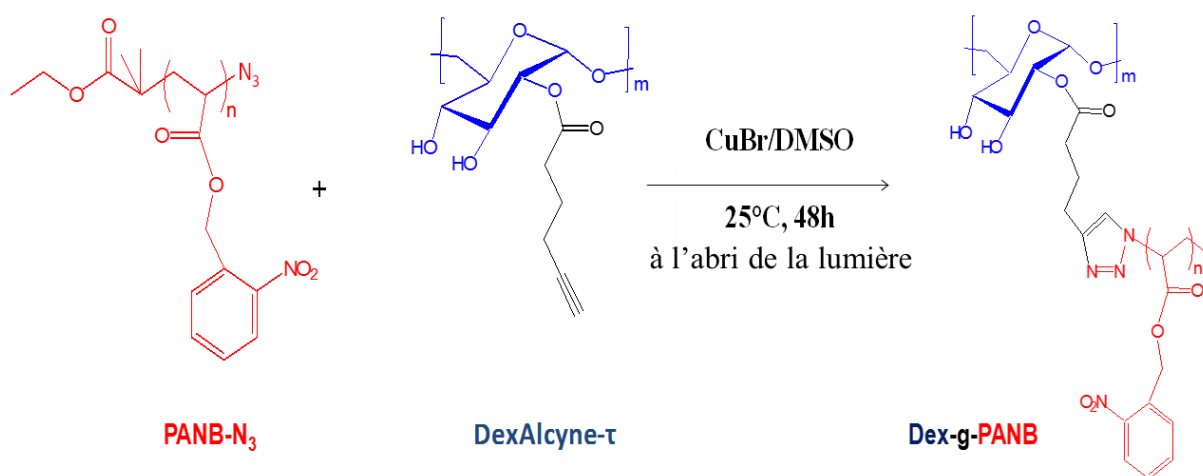


Figure 60 : Synthèse du glycopolymère Dex-g-PANB

La réaction CuAAC⁶⁸⁻⁷⁰ a été réalisée en utilisant le CuBr dans le DMSO, avec différents ratios entre le PANB-N₃ et DexAlcyne-15. Le glycopolymère obtenu est purifié par extraction du PANB-N₃ résiduel en utilisant un mélange Acétone/Diéthyléther (8/2, v/v). Le produit est séché sous vide dynamique pendant une nuit à température ambiante puis caractérisé. Une première vérification du couplage entre le PANB-N₃ et le DexAlcyne-15 a été effectuée par IR (Figure 61). En comparant les spectres IR du PANB-N₃, du DexAlcyne-15 et du Dex-g-PANB, on observe la disparition de la bande de la fonction azoture (2100 cm⁻¹) et la présence d'une large bande entre 3000 et 3500 cm⁻¹ caractéristique des fonctions alcool du dextrane. Ceci montre que la réaction de chimie Click a bien eu lieu entre la fonction azoture du PANB et l'alcyne du dérivé du dextrane.

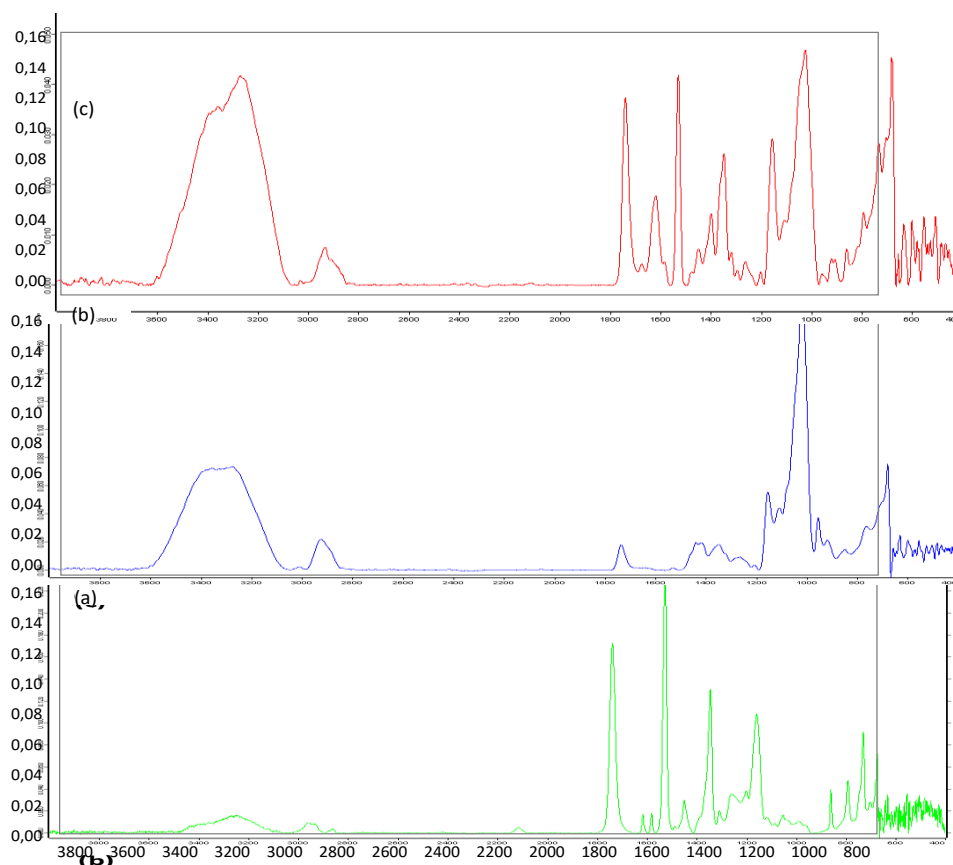


Figure 61: Spectres IR (a) du PANB₃₇₀₀-N₃, (b) du DexAlcyne-15 et (c) du Dex(15)-g-IPANB₃₇₀₀

Le Dex-g-PANB purifié a aussi été analysé par RMN ¹H (Figure 62) dans le DMSO-*d*₆. Ce spectre montre bien la présence des signaux typiques des protons aromatiques du PANB (entre 7,3 et 8,1 ppm) du PANB, des protons des unités glucopyranosiques (entre 3 et 5 ppm) et du proton anomérique (à 4,65 ppm) du dextrane.

Les fractions massiques de PANB (F_{PANB} en %) de chaque Dex-g-PANB produit ont été calculées (voir Partie expérimentale) et sont regroupées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Fractions massiques de PANB pour les différents glycopolymères

<i>Polymère</i>	<i>PANB</i>	<i>DexAlcyne-15</i>	<i>Dex(15)-g-0,5PANB₃₇₀₀</i>	<i>Dex(15)-g-1PANB₃₇₀₀</i>	<i>Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀</i>	<i>Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀</i>
$F_{\text{PANB}} \%$	100	0	10	22	40	80

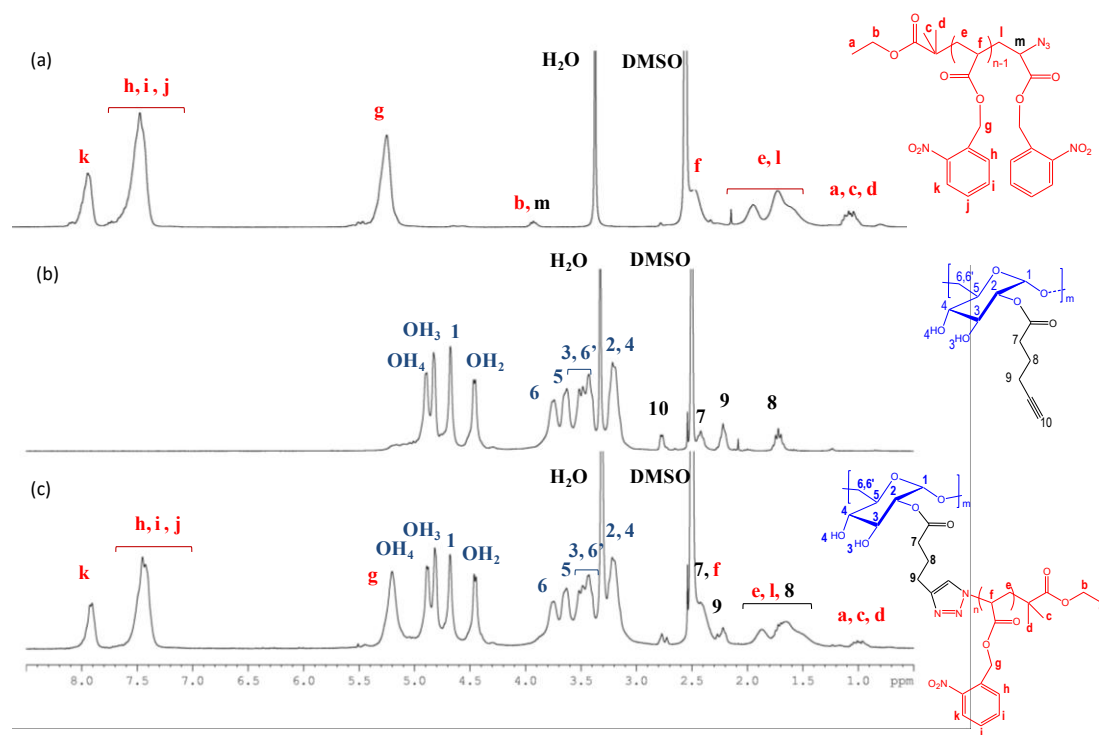


Figure 62 : Spectres RMN ^1H dans le DMSO- d_6 (a) du PANB- N_3 , (b) du DexAlcyne- τ et (c) du Dex(15)-g-IPANB3700

En revanche, le spectre RMN ^1H des Dex-g-PANB ne permet pas de mettre en évidence la formation des cycles triazole produit par réaction entre l'azoture et l'alcyne, dont le proton triazole résonne généralement vers 8,1 ppm, c'est-à-dire au même déplacement chimique que les protons aromatiques. Une étude DOSY⁶⁰ a néanmoins prouvé le lien covalent entre la dorsale dextrane et des greffons PANB.

Les glycopolymères ont également été caractérisés par SEC-MALLS. Par exemple, le chromatogramme de Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀ indique clairement un décalage de la distribution de des masses molaires comparées avec celles des deux produits de départ (PANB- N_3 et DexAlcyne-15) mais prouve aussi l'absence des pics résiduels de PANB- N_3 « non Clickés » (Figure 63).

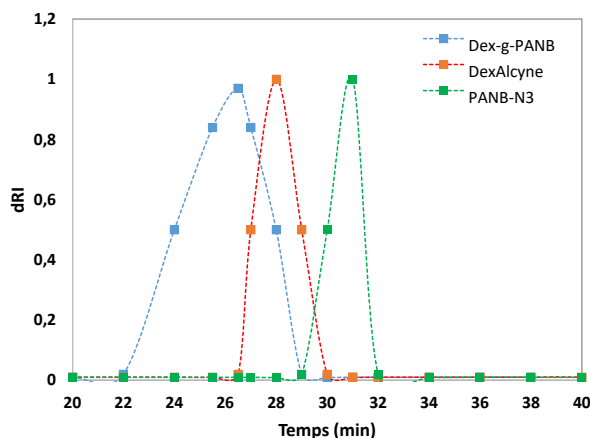


Figure 63 : SEC dans le DMSO- NaNO_3 du DexAlcyne-15, du PANB- N_3 et du Dex(15)-g-3PANB $_{3700}$ en détection dRI

Pour le copolymère Dex(15)-g-0,5PANB $_{3700}$ qui présente une faible fraction massique de PANB ($F_{\text{PANB}} = 10\%$), nous avons également vérifié sa capacité à abaisser la tension superficielle des solutions aqueuses, dans le but de l'utiliser par la suite comme tensioactif hydrosoluble lors de l'élaboration des NPs. La Figure 64 montre que ce copolymère possède bien des propriétés tensioactives.

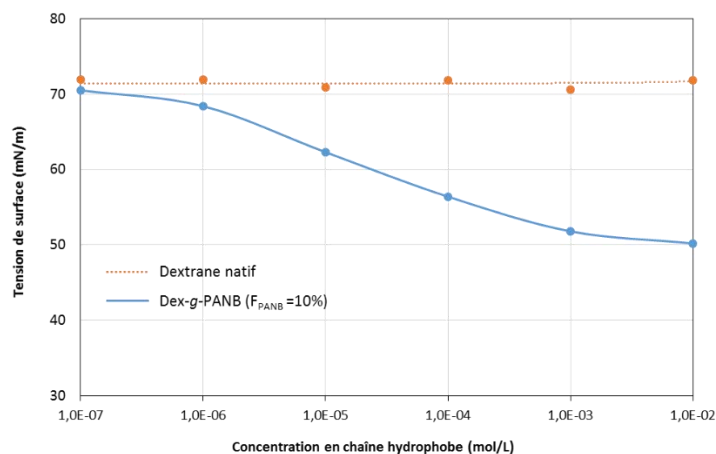


Figure 64 : Evolution de la tension superficielle des solutions aqueuses du Dex-g-PANB ($F_{\text{PANB}} = 10\%$) et du Dextrane natif en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes dans la phase aqueuse

V) CONCLUSION

Ce chapitre était consacré à la synthèse des polymères précurseurs aux paramètres macromoléculaires contrôlés, qui seront utilisés dans le prochain chapitre portant sur l'élaboration des NPs.

Dans la première partie de ce chapitre, la synthèse des polymères PANB avec une extrémité fonctionnalisée a été présentée. La polymérisation de l'ANB a été réalisée par SET-

LRP à 25°C dans le DMSO, en utilisant le 2-bromoisobutyrate d'éthyle (EBiB) comme amorceur, le Me₆TREN comme ligand, du cuivre sous la forme de Cu⁰ et du Cu^{II}Br₂. Le polymère obtenu (PANB-Br) a été produit avec succès grâce au contrôle maîtrisé de la SET-LRP de ce monomère, alors que la littérature montrait que ce monomère était difficilement polymérisable de façon contrôlée. Par la suite, le brome a été substitué par un azoture dans le but d'obtenir des chaînes de PANB (PANB-N₃) susceptibles de réagir par chimie Click.

La deuxième partie de ce chapitre a été consacrée à l'obtention de DexAlcyne-15 par modification chimique du dextrane. Nous avons volontairement choisi un taux de substitution de 15 % afin d'obtenir un dérivé amphiphile hydrosoluble du dextrane. Ce dérivé a été obtenu par estérification des fonctions hydroxyle du dextrane natif et a montré une capacité à abaisser la tension superficielle air/solution aqueuse. Son caractère tensioactif permettra à ce composé de stabiliser des émulsions huile-dans-eau lors de la préparation des NPs.

Par la suite, ces polymères PANB-N₃ et le DexAlcyne-15 pourront être couplés par chimie « Click » CuAAC pour former des cycles triazoles à l'interface liquide/liquide d'une émulsion o/w, directement lors de la préparation des NPs (voir page suivante).

Dans la troisième partie de ce chapitre, la synthèse des copolymères Dex-g-PANB avec différentes fractions massiques de PANB a été décrite par une stratégie « grafting onto » en mettant en œuvre une réaction de chimie Click entre la fonction azoture du PANB-N₃ et les fonctions alcyne du DexAlcyne-15. Ces glycopolymères ont été caractérisés par différentes techniques :

- La fraction massique de PANB dans les glycopolymères a été estimée par analyse RMN ¹H.
- Par IR, la disparition de la bande caractéristique de la fonction azoture a été observée, preuve du bon déroulement de la réaction de chimie ClickCuAAC.
- Les analyses SEC-MALLS des glycopolymères et purifiés ont prouvé qu'ils ne contenaient aucun produit de départ et nous ont permis d'estimer la masse molaire des glycopolymères formés.

VI) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Laville, M. Nanoparticules Polymères de Deuxième et Troisième Générations Pour Des Applications Thérapeutiques Anti-Cancer et Anti-HIV, Université de Lorraine, 2013.
- (2) Poltorak, K. Conception de Nanocapsules Biodégradables Recouvertes de Dextrane Par Réaction “Click” Interfaciale, Université de Lorraine, 2015.
- (3) Soliman, S. M. A. From Photosensitive Glycopolymers to Smart Drug Delivery Systems, Université de Lorraine, 2014.
- (4) Wang, J.-S.; Matyjaszewski, K. Controlled/"living" Radical Polymerization. Atom Transfer Radical Polymerization in the Presence of Transition-Metal Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (20), 5614–5615.
- (5) Matyjaszewski, K.; Xia, J. Atom Transfer Radical Polymerization. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (9), 2921–2990.
- (6) Greszta, D.; Mardare, D.; Matyjaszewski, K. “Living” Radical Polymerization. 1. Possibilities and Limitations. *Macromolecules* **1994**, *27* (3), 638–644.
- (7) Nishikawa, T.; Ando, T.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M. Evidence for Living Radical Polymerization of Methyl Methacrylate with Ruthenium Complex: Effects of Protic and Radical Compounds and Reinitiation from the Recovered Polymers. *Macromolecules* **1997**, *30* (8), 2244–2248.
- (8) Matyjaszewski, K.; Tsarevsky, N. V.; Braunecker, W. A.; Dong, H.; Huang, J.; Jakubowski, W.; Kwak, Y.; Nicolay, R.; Tang, W.; Yoon, J. A. Role of Cu⁰ in Controlled/“Living” Radical Polymerization. *Macromolecules* **2007**, *40* (22), 7795–7806.
- (9) Jakubowski, W.; Matyjaszewski, K. Activator Generated by Electron Transfer for Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2005**, *38* (10), 4139–4146.
- (10) Min, K.; Gao, H.; Matyjaszewski, K. Preparation of Homopolymers and Block Copolymers in Miniemulsion by ATRP Using Activators Generated by Electron Transfer (AGET). *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 3825–3830.
- (11) Tang, H.; Radosz, M.; Shen, Y. CuBr₂/N,N,N',N'-Tetra[(2-Pyridyl)methyl]ethylenediamine/Tertiary Amine as a Highly Active and Versatile Catalyst for Atom-Transfer Radical Polymerization via Activator Generated by Electron Transfer. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27* (14), 1127–1131.
- (12) Simakova, A.; Averick, S. E.; Konkolewicz, D.; Matyjaszewski, K. Aqueous ARGET ATRP. *Macromolecules* **2012**, *45* (16), 6371–6379.
- (13) Dong, H.; Matyjaszewski, K. ARGET ATRP of 2-(Dimethylamino)ethyl Methacrylate as an Intrinsic Reducing Agent. *Macromolecules* **2008**, *41* (19), 6868–6870.
- (14) Zhang, Y.; Wang, Y.; Matyjaszewski, K. ATRP of Methyl Acrylate with Metallic Zinc, Magnesium, and Iron as Reducing Agents and Supplemental Activators. *Macromolecules* **2011**, *44* (4), 683–685.
- (15) Zhang, Y.; Wang, Y.; Peng, C.; Zhong, M.; Zhu, W.; Konkolewicz, D.; Matyjaszewski, K. Copper-Mediated CRP of Methyl Acrylate in the Presence of Metallic Copper: Effect of Ligand Structure on Reaction Kinetics. *Macromolecules* **2012**, *45* (1), 78–86.
- (16) Konkolewicz, D.; Wang, Y.; Kryszewski, P.; Zhong, M.; A. Isse, A.; Gennaro, A.; Matyjaszewski, K. SARA ATRP or SET-LRP. End of Controversy? *Polym. Chem.* **2014**, *5* (15), 4396–4417.
- (17) Percec, V.; Guliashvili, T.; Ladislav, J. S.; Wistrand, A.; Stjern Dahl, A.; Sienkowska, M. J.; Monteiro, M. J.; Sahoo, S. Ultrafast Synthesis of Ultrahigh Molar Mass Polymers by Metal-Catalyzed Living Radical Polymerization of Acrylates, Methacrylates, and Vinyl Chloride Mediated by SET at 25 Degrees C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (43), 14156–14165.
- (18) Rosen, B. M.; Percec, V. Single-Electron Transfer and Single-Electron Transfer Degenerative Chain Transfer Living Radical Polymerization. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (11), 5069–5119.
- (19) Hirschbiel, A. F.; Konrad, W.; Schulze-Sünninghausen, D.; Wiedmann, S.; Luy, B.; Schmidt, B. V. K. J.; Barner-Kowollik, C. Access to Multiblock Copolymers via Supramolecular Host-Guest Chemistry and Photochemical Ligation. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*.
- (20) Nguyen, N. H.; Levere, M. E.; Percec, V. TREN versus Me₆-TREN as Ligands in SET-LRP of Methyl Acrylate. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2012**, *50* (1), 35–46.

- (21) Guliashvili, T.; Percec, V. A Comparative Computational Study of the Homolytic and Heterolytic Bond Dissociation Energies Involved in the Activation Step of ATRP and SET-LRP of Vinyl Monomers. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2007**, *45* (9), 1607–1618.
- (22) Rosen, B. M.; Percec, V. Implications of Monomer and Initiator Structure on the Dissociative Electron-transfer Step of SET-LRP. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (16), 5663–5697.
- (23) Lee, G. M.; Weinreb, S. M. Transition Metal Catalyzed Intramolecular Cyclizations of (Trichloromethyl)Alkenes. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (4), 1281–1285.
- (24) Nagashima, H.; Seki, K.; Ozaki, N.; Wakamatsu, H.; Itoh, K.; Tomo, Y.; Tsuji, J. Transition-Metal-Catalyzed Radical Cyclization: Copper-Catalyzed Cyclization of Allyl Trichloroacetates to Trichlorinated γ -Lactones. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (3), 985–990.
- (25) Nguyen, N. H.; Percec, V. Disproportionating versus Nondisproportionating Solvent Effect in the SET-LRP of Methyl Acrylate during Catalysis with Nonactivated and Activated Cu(0) Wire. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2011**, *49* (19), 4227–4240.
- (26) Feng, C.; Shen, Z.; Gu, L.; Zhang, S.; Li, L.; Lu, G.; Huang, X. Synthesis and Characterization of PNIPAM-b-(PEA-g-PDEA) Double Hydrophilic Graft Copolymer. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (16), 5638–5651.
- (27) Feng, C.; Shen, Z.; Li, Y.; Gu, L.; Zhang, Y.; Lu, G.; Huang, X. PNIPAM-b-(PEA-g-PDMAEA) Double-Hydrophilic Graft Copolymer: Synthesis and Its Application for Preparation of Gold Nanoparticles in Aqueous Media. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2009**, *47* (7), 1811–1824.
- (28) Gu, L.; Shen, Z.; Feng, C.; Li, Y.; Lu, G.; Huang, X. Synthesis of Double Hydrophilic Graft Copolymer Containing Poly(Ethylene Glycol) and Poly(Methacrylic Acid) Side Chains via Successive ATRP. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (12), 4056–4069.
- (29) Nguyen, N. H.; Rosen, B. M.; Jiang, X.; Fleischmann, S.; Percec, V. New Efficient Reaction Media for SET-LRP Produced from Binary Mixtures of Organic Solvents and H₂O. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2009**, *47* (21), 5577–5590.
- (30) Whittaker, M. R.; Urbani, C. N.; Monteiro, M. J. Synthesis of Linear and 4-Arm Star Block Copolymers of Poly(Methyl Acrylate-b-Solketal Acrylate) by SET-LRP at 25 °C. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (18), 6346–6357.
- (31) Percec, V.; Grigoras, C. Catalytic Effect of Ionic Liquids in the Cu₂O/2,2'-bipyridine Catalyzed Living Radical Polymerization of Methyl Methacrylate Initiated with Arenesulfonyl Chlorides. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2005**, *43* (22), 5609–5619.
- (32) Zhang, Z.; Wang, W.; Xia, H.; Zhu, J.; Zhang, W.; Zhu, X. Single-Electron Transfer Living Radical Polymerization (SET-LRP) of Methyl Methacrylate (MMA) with a Typical RAFT Agent as an Initiator. *Macromolecules* **2009**, *42* (19), 7360–7366.
- (33) Wang, W.; Zhang, Z.; Zhu, J.; Zhou, N.; Zhu, X. Single Electron Transfer-living Radical Polymerization of Methyl Methacrylate in Fluoroalcohol: Dual Control over Molecular Weight and Tacticity. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2009**, *47* (22), 6316–6327.
- (34) Wang, G. Copolymerization of Styrene and Methyl Methacrylate Mediated by Copper (0)/2,2'-Bipyridine in the Presence and Absence of Phenol. *J. Macromol. Sci. Part A* **2012**, *49* (1), 55–59.
- (35) Wang, G.; Lu, M. Fe-Mediated SET-LRP of MMA and St in the Presence of Air. *Polym. Int.* **2012**, *61* (8), 1279–1283.
- (36) Chen, H.; Lv, G.; Liang, Y.; Sun, J. Synthesis of High Performance Polyacrylonitrile by RASA SET-LRP in the Presence of Mg Powder. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2013**, *51* (16), 3328–3332.
- (37) Chen, H.; Zong, G.; Chen, L.; Zhang, M.; Wang, C.; Qu, R. Samarium Powder as Catalyst for SET-LRP of Acrylonitrile in 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-Propanol for Control of Molecular Weight and Tacticity. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2011**, *49* (13), 2924–2930.
- (38) Hao, Z.; Chen, H.; Liu, D.; Fan, L. SET-LRP of Acrylonitrile Catalyzed by Tin Powder. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2012**, *50* (24), 4995–4999.
- (39) Hao, Z.; Zhang, J.; Chen, H.; Liu, D.; Wang, D.; Qu, H.; Lang, J. Preparation of Polyacrylonitrile via SET-LRP Catalyzed by Lanthanum Powder in the Presence of VC. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2013**, *51* (19), 4088–4094.

- (40) Liu, X.-H.; Zhang, G.-B.; Li, B.-X.; Bai, Y.-G.; Li, Y.-S. Copper(0)-Mediated Living Radical Polymerization of Acrylonitrile: SET-LRP or AGET-ATRP. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48* (23), 5439–5445.
- (41) Ma, J.; Chen, H.; Zhang, M.; Yu, M. SET-LRP of Acrylonitrile in Ionic Liquids without Any Ligand. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2012**, *50* (3), 609–613.
- (42) Samanta, S. R.; Anastasaki, A.; Waldron, C.; Haddleton, D. M.; Percec, V. SET-LRP of Hydrophobic and Hydrophilic Acrylates in Tetrafluoropropanol. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (22), 5555–5562.
- (43) Samanta, S. R.; Levere, M. E.; Percec, V. SET-LRP of Hydrophobic and Hydrophilic Acrylates in Trifluoroethanol. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (11), 3212–3224.
- (44) Samanta, S. R.; Percec, V. Synthesis of High Molar Mass Poly(n-Butyl Acrylate) and Poly(2-Ethylhexyl Acrylate) by SET-LRP in Mixtures of Fluorinated Alcohols with DMSO. *Polym. Chem.* **2013**, *5* (1), 169–174.
- (45) Lligadas, G.; Percec, V. A Comparative Analysis of SET-LRP of MA in Solvents Mediating Different Degrees of Disproportionation of Cu(I)Br. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (20), 6880–6895.
- (46) Wright, P. M.; Mantovani, G.; Haddleton, D. M. Polymerization of Methyl Acrylate Mediated by Copper(0)/Me₆-TREN in Hydrophobic Media Enhanced by Phenols; Single Electron Transfer-Living Radical Polymerization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (22), 7376–7385.
- (47) Fleischmann, S.; Percec, V. Copolymerization of Methacrylic Acid with Methyl Methacrylate by SET-LRP. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48* (21), 4884–4888.
- (48) Haridharan, N.; Ponnusamy, K.; Dhamodharan, R. Controlled Polymerization of Methacrylates at Ambient Temperature Using Trithiocarbonate Chain Transfer Agents via SET-RAFT–Cyclohexyl Methacrylate: A Model Study. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48* (23), 5329–5338.
- (49) Hatano, T.; Rosen, B. M.; Percec, V. SET-LRP of Vinyl Chloride Initiated with CHBr₃ and Catalyzed by Cu(0)-wire/TREN in DMSO at 25 °C. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2009**, *48* (1), 164–172.
- (50) Voepel, J.; Edlund, U.; Albertsson, A.-C. A Versatile Single-Electron-Transfer Mediated Living Radical Polymerization Route to Galactoglucomannan Graft-Copolymers with Tunable Hydrophilicity. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2011**, *49* (11), 2366–2372.
- (51) Nguyen, N. H.; Rosen, B. M.; Percec, V. SET-LRP of N,N-Dimethylacrylamide and of N-Isopropylacrylamide at 25 °C in Protic and in Dipolar Aprotic Solvents. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48* (8), 1752–1763.
- (52) Nguyen, N. H.; Rosen, B. M.; Lligadas, G.; Percec, V. Surface-Dependent Kinetics of Cu(0)-Wire-Catalyzed Single-Electron Transfer Living Radical Polymerization of Methyl Acrylate in DMSO at 25 °C. *Macromolecules* **2009**, *42* (7), 2379–2386.
- (53) Liu, D.; Ma, J.; Chen, H.; Yin, P.; Ji, N.; Zong, G. Single Electron Transfer-Living Radical Polymerization of Methyl Methacrylate Catalyzed by Ytterbium Powder. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2011**, *49* (23), 5109–5115.
- (54) Ren, W.; Jiang, L.; Wang, W.; Dan, Y. The Application of Copper(II) Deactivator on the Single-Electron Transfer Living Radical Polymerization of Tert-Butyl Acrylate. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48* (13), 2793–2797.
- (55) Levere, M. E.; Willoughby, I.; O'Donohue, S.; Cuendias, A. de; Grice, A. J.; Fidge, C.; Becer, C. R.; Haddleton, D. M. Assessment of SET-LRP in DMSO Using Online Monitoring and Rapid GPC. *Polym. Chem.* **2010**, *1* (7), 1086–1094.
- (56) Rosen, B. M.; Percec, V. A Density Functional Theory Computational Study of the Role of Ligand on the Stability of CuI and CuII Species Associated with ATRP and SET-LRP. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2007**, *45* (21), 4950–4964.
- (57) Lligadas, G.; Percec, V. Alkyl Chloride Initiators for SET-LRP of Methyl Acrylate. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (14), 4917–4926.
- (58) Monge, S.; Darcos, V.; Haddleton, D. M. Effect of DMSO Used as Solvent in Copper Mediated Living Radical Polymerization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2004**, *42* (24), 6299–6308.

- (59) Nguyen, N. H.; Rodriguez-Emmenegger, C.; Brynda, E.; Sedlakova, Z.; Percec, V. SET-LRP of N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide in H₂O. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (8), 2424–2427.
- (60) Soliman, S. M. A.; Nouvel, C.; Babin, J.; Six, J.-L. O-Nitrobenzyl Acrylate Is Polymerizable by Single Electron Transfer-Living Radical Polymerization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2014**, *52* (15), 2192–2201.
- (61) Schumers, J.-M.; Fustin, C.-A.; Can, A.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S.; Gohy, J.-F. Are O-Nitrobenzyl (Meth)Acrylate Monomers Polymerizable by Controlled-Radical Polymerization? *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2009**, *47* (23), 6504–6513.
- (62) Hammond, G. S.; Bartlett, P. D. Polymerization of Allyl Compounds. V. Inhibition by Nitro Compounds. *J. Polym. Sci.* **1951**, *6* (5), 617–624.
- (63) Khalikova, E.; Susi, P.; Korpela, T. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2005**, *69* (2), 306–325.
- (64) Monsan, P.; Bozonnet, S.; Albenne, C.; Joucla, G.; Willemot, R.-M.; Remaud-Siméon, M. Homopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy J.* **2001**, *11* (9), 675–685.
- (65) Durand, A.; Canselier, J.-P. *Procédés et formulation au service de la santé*; EDP Sciences,: Les Ulis, France, 2012.
- (66) Ferji, K. Synthèse Contrôlée et Auto-Organisation de Glycopolymères Amphiphiles à Greffons Polymères Mésogènes, Destinés à La Vectorisation de Principes Actifs, Université de lorraine, 2013.
- (67) Rouzes, C. Nanosphères à Cœur de Poly(Acide Lactique) et Couronne de Dextrane : Élaboration, Propriétés et Applications Biomédicales, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL, 2001.
- (68) Laville, M.; Babin, J.; Londono, I.; Legros, M.; Nouvel, C.; Durand, A.; Vanderesse, R.; Leonard, M.; Six, J.-L. Polysaccharide-Covered Nanoparticles with Improved Shell Stability Using Click-Chemistry Strategies. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93* (2), 537–546.
- (69) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.
- (70) Binder, W. H.; Sachsenhofer, R. ‘Click’ Chemistry in Polymer and Materials Science. *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *28* (1), 15–54.

CHAPITRE II : ELABORATION ET CARATERISATIONS DES NANOPARTICULES

I) INTRODUCTION

Après avoir réalisé la synthèse des polymères précurseurs (DexAlcyne-15, PANB-N₃) et des glycopolymères Dex-g-PANB présentant diverses fractions massiques de PANB, ce chapitre est consacré à l'élaboration des NPs photosensibles par deux procédés : émulsion-évaporation de solvant organique et nanopréciptation. Avant de mettre en œuvre ces procédés, un test de solubilité des glycopolymères Dex-g-PANB a été effectué dans différents solvants ou mélange de solvant (Tableau 15) pour sélectionner ceux qui pourront être utilisés par la suite. Alors que tous les Dex-g-PANB obtenus sont solubles dans le DMSO, seul le Dex-g-PANB avec une fraction massique égale à 10 % est soluble dans l'eau. En effet, les copolymères Dex-g-PANB avec des fractions massiques de PANB supérieures ou égales à 22 % sont insolubles dans l'eau pure. Les mélanges Acétone/eau, mélanges communs utilisés pour la nanopréciptation ne solubilisent aucun des glycopolymères obtenues. Aussi, nous nous sommes orientés vers les mélanges THF/eau. Le Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀ (F_{PANB} = 80 %) est soluble dans un mélange de THF/H₂O (95/5, v/v) et le Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀ (F_{PANB} % = 40 %) dans un mélange THF/H₂O (75/25, v/v).

Pour le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique, la phase organique sera composée de PANB-N₃ ($\overline{M}_n = 10300 \text{ g mol}^{-1}$) solubilisé dans le DCM, alors que la phase aqueuse (eau Milli-Q saturée par du DCM) contiendra le stabilisant qui est le DexAlcyne-15.

Tableau 15: Solubilités des Dex-g-PANB dans différents solvants ou mélange de solvants

<i>Polymère</i>	<i>F_{PANB}%</i>	<i>DMSO</i>	<i>H₂O</i>	<i>Acétone/H₂O</i> <i>(Différents ratios)</i>	<i>THF/H₂O</i> <i>(95/5)</i>	<i>THF/H₂O</i> <i>(75/25)</i>
<i>PANB</i>	100	+	-	-	+	+
<i>DexAlcyne- 15</i>	0	+	+	-	-	-
<i>Dex(15)-g-0,5PANB₃₇₀₀</i>	10 %	+	+	-	-	-
<i>Dex(15)-g-1PANB₃₇₀₀</i>	22 %	+	-	-	-	-
<i>Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀</i>	40 %	+	-	-	-	+
<i>Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀</i>	80 %	+	-	-	+	-

Dans ce chapitre, l'élaboration des NPs sera donc réalisée par les deux méthodes :

- ✓ Nanoprécipitation des glycopolymères présentant une fraction massique de PANB supérieure ou égale à 40 % (Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀ et Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀).
- ✓ Emulsion/évaporation de solvant organique en menant ou non une chimie ClickCuAAC. Cette réaction aura lieu à l'interface liquide/liquide entre le PANB-N₃ et le DexAlcyne-15.

La caractérisation des NPs sera réalisée par la mesure de taille et par des mesures de potentiel Zêta. Grâce aux techniques employées, l'épaisseur de la couronne polysaccharide en surface des NPs sera estimée. Puis la stabilité colloïdale des NPs sera étudiée en fonction de la force ionique puis en présence d'un tensioactif compétitif et en présence du milieu de culture des cellules Caco-2 (DMEM). Enfin, le caractère photosensible des NPs sera évalué.

II) ELABORATION DES NANOPARTICULES

1) Nanoprécipitation

L'élaboration des NPs par le procédé de nanoprécipitation a été effectuée à partir des copolymères Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀ ($F_{\text{PANB}} = 80\%$) et Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀ ($F_{\text{PANB}} = 40\%$). Le Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀ ($F_{\text{PANB}} = 80\%$) est solubilisé dans un mélange de THF/H₂O (95/5, v/v) alors qu'un mélange de THF/H₂O (75/25, v/v) est utilisé pour solubiliser le copolymère avec une fraction massique en PANB égale à 40 %. Chacune de ces solutions organiques est versée dans la phase continue (eau Milli-Q saturée en THF) à 0,1 mL/minute, sous faible agitation (100 tr/min). Après addition totale de la phase organique, 10 mL d'eau Milli-Q sont rapidement ajoutés pour figer le cœur des NPs. Le THF est ensuite éliminé par centrifugation. Il est important de noter que toutes les NPs obtenues restent stables au cours des lavages. La distribution de taille est déterminée avant et après lavages. Dans le cas de NPs produites à partir de Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀ ($F_{\text{PANB}} = 80\%$), les distributions de taille sont données dans la Figure 65. Pour la suite, nous ne donnerons que les distributions de taille des NPs après lavages. Comme on peut le voir sur la Figure 65, le procédé de nanoprécipitation permet d'obtenir des NPs de 125 à 165 nanomètres de diamètres moyens, avec une distribution relativement étroite.

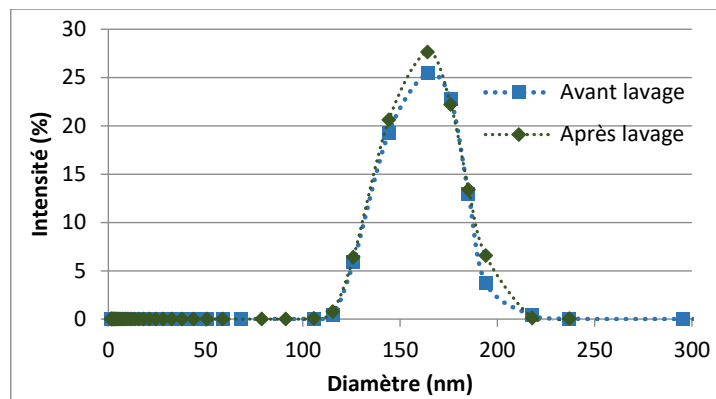


Figure 65 : Distribution de taille des NPs préparées par nanopréciipitation du Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀ ($F_{PANB} = 80\%$), avant et après lavages

Idéalement, la valeur de l'indice de polydispersité devrait être la plus petite possible, proche de 0. Cependant, des valeurs de Pdi inférieure à 0,2 reflètent une distribution de tailles relativement étroite. Le diamètre moyen des NPs à base de Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀ est plus important que celui des NPs formulées à partir du Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀ (Figure 66). Ceci est probablement dû à la longueur des greffons PANB dans le copolymère. Les résultats présentés dans le Tableau 16 sont d'ailleurs analogues à ceux obtenus précédemment au LCPM avec d'autres Dex-g-PANB¹. Ceci montre la possibilité des deux copolymères (Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀ et Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀) à s'auto-organiser en phase aqueuse pour donner des NPs avec une distribution de taille étroite (Tableau 16).

Tableau 16 : Caractéristiques des NPs préparées par nanopréciipitation

<i>Copolymères</i>	<i>F_{PANB} %^(a)</i>	<i>Taille moyenne (nm)^(b)</i>	<i>Pdi^(b)</i>
Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀	40 %	126±3	0,216
Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀	80 %	165±1	0,15

- Fraction massique de PANB dans le copolymère Dex-g-PANB.
- Taille moyenne des NPs et l'indice de polydispersité Pdi, déterminés par HPPS.

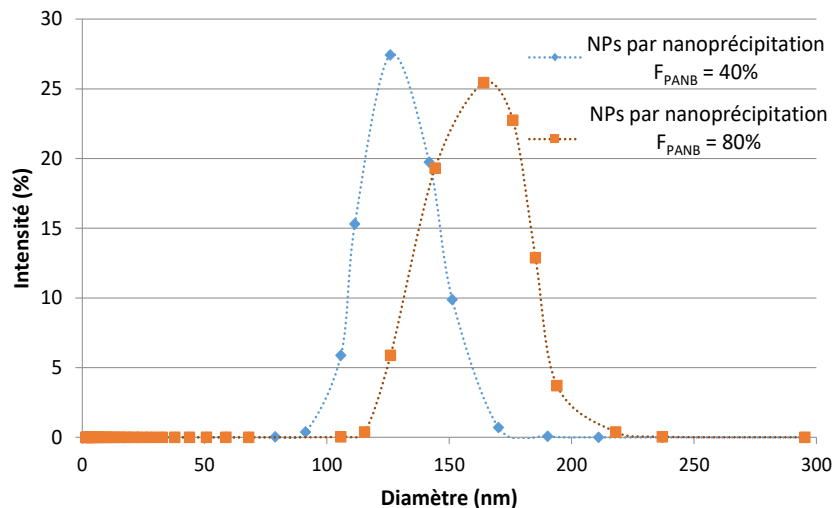


Figure 66 : Distributions de taille des NPs préparées par nanoprécipitation à partir de divers Dex-g-PANB

2) Emulsion/évaporation de solvant organique

L'émulsion-évaporation de solvant organique est une méthode très courante pour la préparation des NPs avec un faible indice de polydispersité. Dans le cadre de ce doctorat, les NPs obtenues par ce procédé ont été élaborées en menant ou non une réaction chimie « Click » CuAAC interfaciale. Cette réaction CuAAC interfaciale a d'ailleurs déjà été étudiée au LCPM^{1,2}. Dans notre cas, le cœur des NPs sera composé du polymère photosensible (PANB-N₃), alors que leur couronne sera constituée du dérivé amphiphile DexAlcyne-15. Ce tensioactif assure la stabilité colloïdale des NPs, mais en présence d'un catalyseur approprié, une réaction de couplage « Click » pourra avoir lieu entre les fonctionnalités complémentaires du PANB-N₃ et du DexAlcyne-15, directement à l'interface liquide/liquide des nano-gouttelettes produites lors du procédé. Cette réaction CuAAC interfaciale aura donc lieu *insitu* lors de l'élaboration des NPs. Le PANB-N₃ qui constituera *in fine* le cœur des NPs est initialement solubilisé dans le solvant organique (DCM) alors que le tensioactif est dissout dans la phase aqueuse. L'émulsification de ces deux phases non-miscibles est produite grâce à l'énergie fournie par des ultrasons, ce qui permet d'obtenir d'une dispersion monodisperse de nanogouttelettes stabilisées par le tensioactif. Par la suite, l'évaporation du solvant volatil conduit aux NPs de PANB recouvertes d'une couronne à base de dextrane. Les NPs ainsi préparées sont par la suite lavées par centrifugation pour enlever l'excès de DexAlcyne-15 n'ayant pas servi à la stabilisation des NPs puis lyophilisées et caractérisées (Tableau 17).

Dans le cas où la chimie CuAAC interfaciale a lieu, le protocole est similaire au précédent. Deux types de catalyseur à base de cuivre ont cependant été testés : le CuSO₄ et le

système CuBr/Acide ascorbique. Dans ce cas, les NPs obtenues seront nommées « NPs Clickées ». L'influence d'une atmosphère inerte (N_2) lors de ce procédé d'élaboration a également été étudiée. Les NPs formées sont lavées par centrifugation, puis mises en contact avec une solution aqueuse d'EDTA (Ethylenediaminetétraacétique) (5 équivalents par équivalent de cuivre) pendant une nuit, sous agitation et à température ambiante, afin d'éliminer le cuivre résiduel. Les NPs sont à nouveau lavées par centrifugation puis caractérisées. Comme on peut le voir sur la Figure 67, ainsi que dans le Tableau 17, le procédé d'émulsion-évaporation de solvant permet d'obtenir des NPs avec une distribution relativement étroite, que la réaction « Click » interfaciale ait ou non lieu. La CuAAC interfaciale augmentent légèrement le diamètre moyen des NPs, sans doute par la formation de Dex-g-PANB organosolubles qui migrent alors en phase organique ; alors que d'autres Dex-g-PANB produits demeurent hydrosolubles et localisés à l'interface liquide/liquide, assurant la stabilité colloïdale des nanogoutellettes puis des NPs finales. Les valeurs de Pdi sont inférieures à 0,165, ce qui reflète une distribution de tailles relativement étroite. De plus, comme on peut le voir sur la Figure 67, les NPs « Clickées » élaborées sous atmosphère d'azote ou non ont sensiblement les mêmes diamètres moyens, signe que la présence d'azote n'est pas obligatoire pour mener cette Click interfaciale. Ces résultats montrent l'efficacité de la CuAAC et l'efficacité du DexAlcyne-15 à stabiliser la nano-émulsion initiale, liée aux propriétés tensioactives de ce composé (voir Chapitre I).

Tableau 17 : Caractéristiques des NPs préparées par émulsion-évaporation de solvant en utilisant le PANB- N_3 ($\bar{M}_n = 10300 \text{ g mol}^{-1}$) et le DexAlcyne-15

<i>Catalyseur</i>	<i>Milieu inerte (N_2)</i>	<i>Taille moyenne (nm)</i>	<i>Pdi</i>
<i>Sans catalyseur</i>		128±1	0,090
<i>CuBr</i>	-	165±1	0,050
<i>CuBr</i>	+	171±1	0,075
<i>CuSO₄/AAsc</i>	-	160±3	0,124
<i>CuSO₄/AAsc</i>	+	153±2	0,091

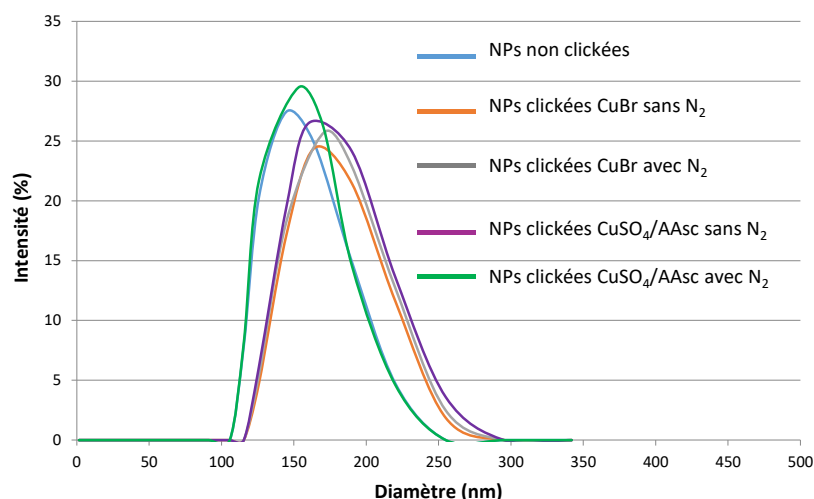


Figure 67 : Distribution de tailles des NPs élaborées par émulsion-évaporation de solvant

III) CARACTERISATION DE LA COUCHE EXTERNE HYDROPHILE

La présence d'une couronne hydrophile et neutre à la surface des NPs permet d'assurer leur stabilité colloïdale et limite l'adsorption de molécules indésirables à leur surface. Ceci a d'ailleurs déjà été observé dans d'autres travaux menés au LCPM, sur l'élaboration de NPs « non Clickées »³ ou « Clickées »⁴. Dans le cas des applications biomédicales, cette couronne permet ainsi d'empêcher l'adsorption de certaines protéines (opsonines) à la surface des NPs, ce qui permet de diminuer la reconnaissance des NPs par le système immunitaire^{5,6}, leur élimination prématurée et d'accroître leurs temps de séjour dans le flux sanguin afin d'accéder au voisinage des cellules à traiter par l'effet EPR.

Dans notre étude, le tensioactif choisi lors de la formation des NPs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique ou de nanoprecipitation est un dérivé du dextrane. Grâce à ses propriétés tensioactives provenant des chaînes latérales hydrophobes, le DexAlcyne-15 s'adsorbe à l'interface liquide/liquide et stabilise les nano-gouttelettes formées, puis demeure à l'interface solide/liquide de la suspension de NPs. Pour rappel, l'ajout de catalyseur approprié (CuBr ou CuSO₄/AAAsc) dans la formulation permet de lier le DexAlcyne-15 au PANB-N₃ de façon covalente par chimie « Click » interfaciale lors du procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique. Cependant, sachant que les fonctions alcyne du DexAlcyne-15 sont utilisées en large excès molaire par rapport aux fonctions azoture du PANB-N₃, toutes les fonctions alcyne ne réagissent pas avec les azotures pour

former un cycle triazole. De plus, comme cela a été montré dans des travaux réalisés précédemment au LCPM², l'efficacité de cette réaction CuAAC n'atteint jamais 100 % ce qui signifie que des chaînes de PANB ne sont pas attachées au dextrane de façon covalente, ou encore qu'il peut rester des alcynes n'ayant pas réagi et qui sont donc disponibles à la surface des NPs pour leur post-modification.

Dans le cas du procédé nanoprécipitation employé dans le cas des copolymères Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀ et Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀, la partie dextrane se retrouve également en surface comme cela sera prouvé ci-dessous. Là encore, la présence des alcynes résiduels disponibles en surface des NPs permet d'envisager leur post-modification (3 ou 7 greffons PANB sont fixés pour 100 unités glucosidique qui présentaient initialement 15 alcynes).

1) Mise en évidence du recouvrement hydrophile

Afin de mettre en évidence la présence de la couche hydrophile en surface de NPs, quel que soit le procédé de formulation employé, la mobilité électrophorétique de ces objets dispersés dans des solutions de NaCl de concentrations variables (de 10^{-6} à 10^{-2} M) a été étudiée. Les valeurs de potentiel Zêta (ζ) ont été calculées à partir de ces mesures de mobilités électrophorétiques, à l'aide de l'équation modifiée de Booth (pour plus de détails voir partie expérimentale). La Figure 68 rassemble les résultats obtenus pour des NPs élaborées avec les deux procédés testés.

Ces NPs ont été comparées à des NPs de PANB dites « NPs nues », préparées en utilisant du SDS (3 g/L) comme tensioactif lors du procédé émulsion/évaporation de solvant organique en lieu et place du DexAlcyne-15, puis lavées. Un spectre RMN ¹H de ces « NPs nues » après lyophilisation a permis de confirmer qu'elles ne contenaient plus de tensioactif. Dans ce cas, on observe la présence des charges négatives à la surface des NPs qui sont probablement dues à la présence des fonctions ester des chaînes PANB se transformant en acides carboxyliques ionisés en surface des NPs lors de la sonication, comme cela a été montré dans le cas des NPs à base de PLA⁴. Ces charges négatives demeurent dans le cas des NPs nues mais sont écrantées plus efficacement par la présence de NaCl dans le cas des NPs recouvertes par la couronne polysaccharide. Ceci met en évidence de façon indirecte la présence d'une couche neutre (dextrane) en surface des objets qui permet d'atténuer la charge négative du cœur PANB. Cet effet a souvent déjà été rapporté dans le cas des NPs composées d'un cœur de PLA et d'une couronne de dextrane⁴.

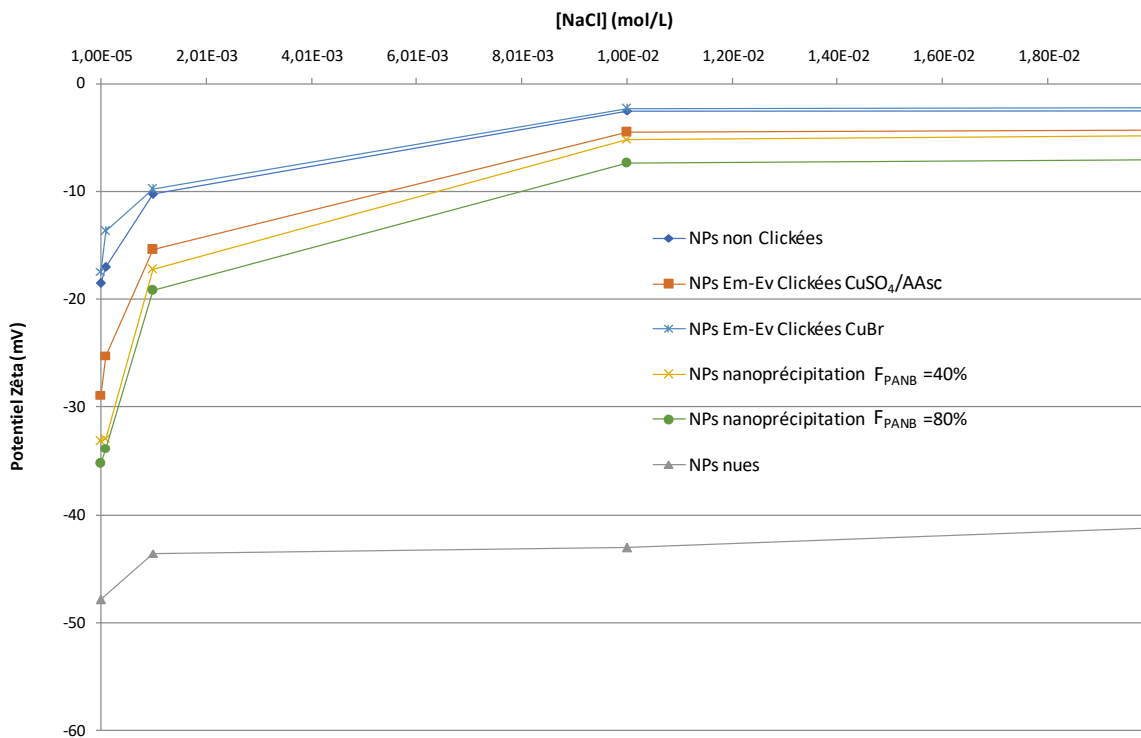


Figure 68 : Evolution du potentiel Zêta de NPs Clickées ou non, dispersées dans une phase aqueuse de NaCl de 10^{-6} à 10^{-2} mol/L.

Cas des NPs préparées par nanoprécipitation ou émulsion-évaporation de solvant organique en utilisant le DexAlcyne-15 comme stabilisant (sauf dans le cas des NPs nues)

2) Détermination de l'épaisseur de la couche externe

Afin de caractériser plus en détails ce recouvrement polysaccharide, son épaisseur (Δ_{PZ}) peut tout d'abord être estimée. Pour cela, l'évolution du potentiel Zêta ζ en fonction de k_H (longueur de Debye-Hückel liée à la force ionique, voir partie expérimentale) aux faibles concentrations en NaCl peut être approximée par l'équation d'Eversole et de Boardman (pour plus de détails voir partie expérimentale). La valeur absolue de la pente, dans cette partie de la courbe, correspond à l'épaisseur Δ_{PZ} . Ainsi, dans le cas des NPs élaborées par nanoprécipitation, le Δ_{PZ} varie de 4 à 10 nm selon le glycopolymère utilisé (Tableau 18), alors que le Δ_{PZ} est égal à 8nm dans le cas des NPs « non Clickées » élaborées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique. Ce Δ_{PZ} évolue logiquement dans le cas du procédé nanoprécipitation et est en accord avec le caractère hydrophobe plus prononcé du Dex(15)-g-7PANB₁₀₃₀₀, ce qui limite l'expansion de ce composé dans la phase aqueuse lorsque celui-ci se retrouve en surface des NPs. Par analogie, on peut alors penser que l'efficacité de la chimie Click interfaciale catalysée par le CuBr est supérieure à celle

catlysée par le système CuSO₄/AAsc, « plaquant » alors la couronne polysaccharide à la surface des NPs ($\Delta_{PZ} = 4$ ou 7nm selon le catalyseur employé).

Tableau 18 : Epaisseur Δ_{PZ} des NPs élaborées par différents procédés

<i>Procédé d'élaboration des NPs</i>	<i>Conditions d'élaboration des NPs</i>	Δ_{PZ} (nm)
<i>Nanoprécipitation</i>	Dex(15)-g-3PANB ₃₇₀₀ (F _{PANB} = 40 %)	10
	Dex(15)-g-7PANB ₁₀₃₀₀ (F _{PANB} = 80 %)	4
<i>Emulsion-évaporation de solvant (Sonication sans courant d'azote)</i>	Non Clickées	8
	CuBr	4
	CuSO ₄ /AAsc	7

3) Détermination du taux de recouvrement en dextrane

Les NPs lyophilisées sont par la suite dissoutes dans du DMSO-d₆ pour être analysées par RMN ¹H dans le but de quantifier la quantité de dextrane par rapport à la quantité de PANB présente dans la particule selon l'équation suivante. La masse du dextrane par gramme de PANB déterminée par RMN ¹H et calculée selon l'équation suivante :

$$M_{Dex}(g/g \text{ PANB}) = \left(\frac{A_{Ha}}{A_{\frac{CH_2}{2}(PANB-N_3)}} \right) \times \left(\frac{M_{Dextrane}}{M_{PANB}} \right)$$

Avec :

A_{Ha} : Aire du proton anomérique des unités glucosidique (4,7 ppm)

$A_{\frac{CH_2}{2}(PANB-N_3)}$: Aire d'un proton méthylène de l'unité monomère du PANB (5,2 ppm)

M_{PANB} : Masse molaire de l'unité monomère du PANB égale à 207 g/mol

$M_{Dextrane}$: Masse molaire de l'unité monomère du dextrane égale à 162 g/mol.

L'estimation de la quantité de dextrane est réalisée en se basant sur le pic du proton anomérique (H_a) de l'unité glucosidique du dextrane et le pic des protons méthyléniques (CH₂) de l'unité monomère du PANB (Figure 69). A noter que pour ce calcul, on suppose que le cœur des NPs est composé seulement de PANB et que le dérivé dextrane n'est localisé que dans la couronne. Cela a été d'ailleurs montré par microscopie confocale ⁷ pour des microparticules élaborées par émulsion-évaporation de solvant organique en employant un

tensioactif fluorescent. Par contre aucune preuve n'a encore été apportée pour le procédé nanopréciipitation. On rappelle, comme expliqué dans le chapitre précédent, qu'il nous a été impossible de mettre en évidence la formation directe des cycles triazole par RMN ^1H .

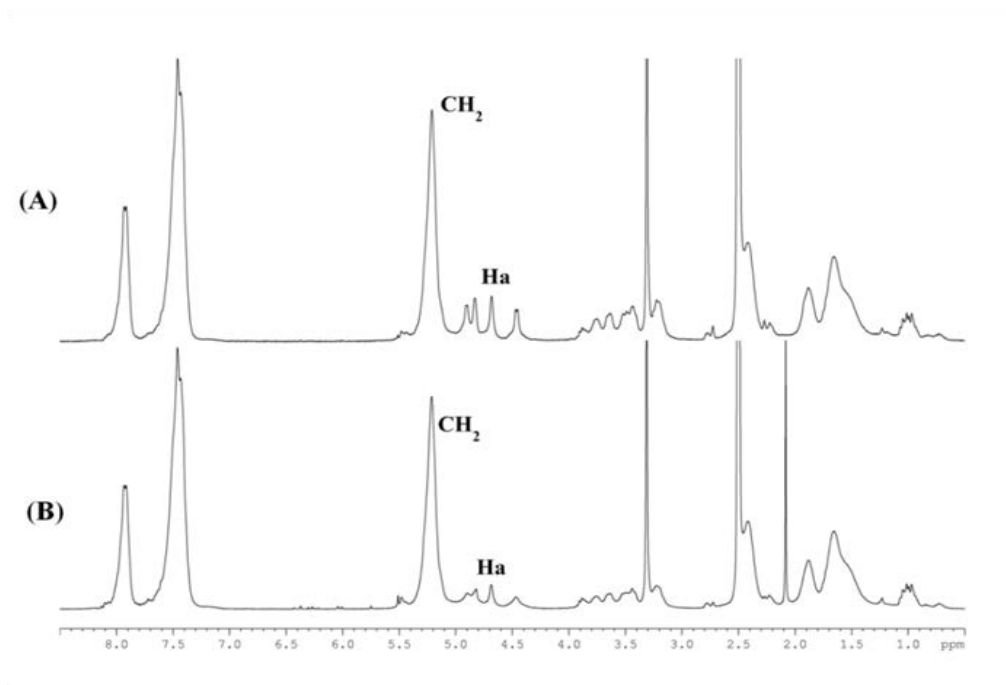


Figure 69: Spectres RMN ^1H des NPs préparées par émulsion-évaporation de solvant organique dans le DMSO- d_6 avec (A) et sans (B) chimie ClickCuAAC, en utilisant le CuBr comme catalyseur.

Dans le cas des NPs élaborées par nanopréciipitation, l'augmentation de la fraction massique de PANB dans le glycopolymère utilisé (F_{PANB}) entraîne une diminution de la masse du dextrane par gramme de PANB. En effet, l'augmentation de la F_{PANB} entraîne une augmentation de l'hydrophobicité du copolymère et mène à une faible épaisseur de la couche de dextrane (Tableau 19).

Dans le cas des NPs élaborées par émulsion-évaporation de solvant organique, on observe une augmentation significative de la masse de dextrane par gramme de PANB lorsque la CuAAC interfaciale est réalisée, par rapport aux NPs « non Clickées »: de 109 mg de dextrane /g de PANB dans le cas des NPs non Clickées est plus de 174 mg de dextrane par g de PANB dans le cas des NPs Clickées. Ces valeurs plus importantes dans le cas des NPs Clickées sont certainement dues à l'immobilisation covalente du dérivé dextrane en surface des objets. Cet ancrage chimique par les cycles triazoles empêche alors la désorption du dérivé dextrane et des étapes de lavage des NPs lors de l'évaporation du DCM, c'est-à-dire quand les nano-gouttelettes se contractent par diminution du volume comme ça a

était expliqué dans des travaux précédents réalisés au LCPM ². La formation du recouvrement hydrophile en dextrane en surface des NPs se déroule comme suit : pendant l'étape de sonication, la phase organique est dispersée sous forme de nano-gouttelettes recouvertes par une couche de tensioactif. L'évaporation du DCM induit la contraction volumique des nano-gouttelettes, ce qui résulte en un encombrement stérique des chaînes de tensioactif présentes en surface des gouttelettes. Dans le cas des NPs non Clickées, cette contraction volumique entraîne la désorption de chaînes de DexAlcyne-15 faiblement adsorbées et/ou des DexAlcyne-15 simplement enchevêtrés dans la couche superficielle. Dans le cas de NPs « Clickées », grâce à la formation des liaisons covalentes entre les fonctions azoture du PANB et les alcynes du tensioactif, les chaînes du polysaccharide restent irréversiblement immobilisées à la surface des NPs. Cet ancrage chimique limite leur désorption lors de l'évaporation du DCM, même lorsque le volume de NPs se contracte. Ainsi la densité superficielle augmente, ce qui est confirmé par le taux de recouvrement plus élevé que dans le cas des NPs « non Clickées ».

Dans les cas où la réaction de chimie « Click » interfaciale est menée sous azote, la quantité de dextrane présente à la surface des NPs est supérieure à celle sans azote. Ceci traduit une meilleure stabilité de la couche de dextrane et une meilleure efficacité de la réaction de chimie « Click » sous azote. Si on compare les valeurs des potentiels Zêta, de Δ_{PZ} et de lamasse de dextrane/g de PANB pour les différents NPs, on peut alors penser que la couche polysaccharide en surface des NPs produites par émulsion-évaporation de solvant organique en présence de CuBr est plus dense, comme le démontre les valeurs de densité de la couche surfacique (Tableau 19).

IV) STABILITE COLLOÏDALE DES NANOPARTICULES

La stabilité colloïdale d'une dispersion de NPs en phase aqueuse, c'est-à-dire leur résistance contre l'agrégation, est un paramètre crucial à prendre en compte pour l'application envisagée c'est-à-dire l'injection intraveineuse des NPs. Cette stabilité est fortement liée à la surface des particules, ainsi qu'à la concentration en électrolyte dans le milieu. Elle résulte d'un équilibre délicat entre des attractions de Van Der Waals et des forces répulsives (soit stériques, soit électrostatiques) entre les particules ⁸. Les forces répulsives doivent être suffisamment fortes pour assurer une bonne stabilité du système colloïdal. La présence d'un recouvrement hydrophile et neutre peut permettre d'assurer cette stabilité colloïdale, et dans certains cas de protéger les NPs contre l'adsorption en surface de

molécules indésirables comme certaines protéines (opsonines) présentes dans le flux sanguin^{5,6}.

Tableau 19 : Masse du dextrane (mg/g PANB) déterminées par RMN ¹H des NPs élaborées par différents procédés

<i>Procédé d'élaboration des NPs</i>	<i>Conditions d'élaboration des NPs</i>	<i>Masse du dextrane (mg/g PANB)</i>
<i>Nanoprécipitation</i>	Dex(15)-g-3PANB ₃₇₀₀ (F _{PANB} = 40 %)	916
	Dex(15)-g-7PANB ₁₀₃₀₀ (F _{PANB} = 80 %)	167
<i>Emulsion/évaporation de solvant</i>	Non Clickées	109
	CuBr/ Sans N ₂	186
	CuBr/ Avec N ₂	215
	CuSO ₄ /AAsc/ Sans N ₂	174
	CuSO ₄ /AAsc/ Avec N ₂	191

1) Stabilité colloïdale en fonction de la force ionique

Dans notre étude, nous avons choisi la turbidimétrie comme méthode d'évaluation de la stabilité colloïdale des NPs en fonction de la force ionique. Grâce à cette technique, la variation de la taille des NPs étudiées, et éventuellement leur agrégation, peut être évaluée en mesurant la densité optique (DO) des dispersions colloïdales par spectroscopie UV-Visible (entre 450 nm et 600 nm)⁹ (voir partie expérimentale). La DO des dispersions a donc été suivie en fonction de la force ionique du milieu (10⁻⁴ – 1 M de NaCl) après 1 heure de mise en contact à température ambiante. Cette étude permet d'obtenir le paramètre $|n|$ (valeur absolue de la pente de la courbe $\log(\text{DO})$ vs $\log(\lambda)$) qui permet de détecter une variation de la taille des particules et de mettre en évidence leur floculation. Ce paramètre est représentatif de la DO des suspensions et est inversement proportionnel à l'évolution de la taille des NPs : plus la taille des objets est grande, plus la valeur de $|n|$ est faible. Cette étude a souvent été réalisée au LCPM dans le cas des NPs de PLA recouvertes de dextrane et dans le cadre de ce doctorat, nous nous sommes intéressés aux NPs à base de PANB recouvertes de dextrane préparées par émulsion-évaporation de solvant, avec ou sans réaction de chimie « Click » interfaciale, ou bien par nanoprécipitation des copolymères Dex-g-PANB déjà préformés. La

Figure 70 montre l'évolution du paramètre $|\zeta|$ en fonction de la concentration saline des suspensions pour les différents types de NPs. Quelles que soient les NPs élaborées (par nanoprécipitation, NPs « Clickées » ou « non Clickées »), les suspensions sont stables ($|\zeta|$ demeure constant) et aucune floculation n'est observée après 1h de mise en suspension dans ces milieux salins. La présence d'une couche hydrophile polysaccharide neutre à la surface des objets permet de maintenir leur stabilité colloïdale en assurant une répulsion stérique des NPs. En revanche, dans le cas des NPs nues, une chute de $|\zeta|$ est observée pour des concentrations en NaCl supérieures à 10^{-2} mol/L ce qui correspond à une augmentation de la turbidité et donc à une floculation de ces objets. La déstabilisation de ce dernier système est liée au fait que les charges négatives présentes à la surface des NPs, non-recouvertes de dextrane, sont écrantées par l'addition de l'électrolyte NaCl. Ce comportement a déjà été observé dans des études réalisées sur des NPs ou nanocapsules de PLA ^{2,4}. Ces résultats prouvent la présence d'une couronne polysaccharide hydrophile et neutre à la surface des NPs, mais surtout que celles-ci pourraient être injectées dans le sang, dont la force ionique avoisine 0,15.

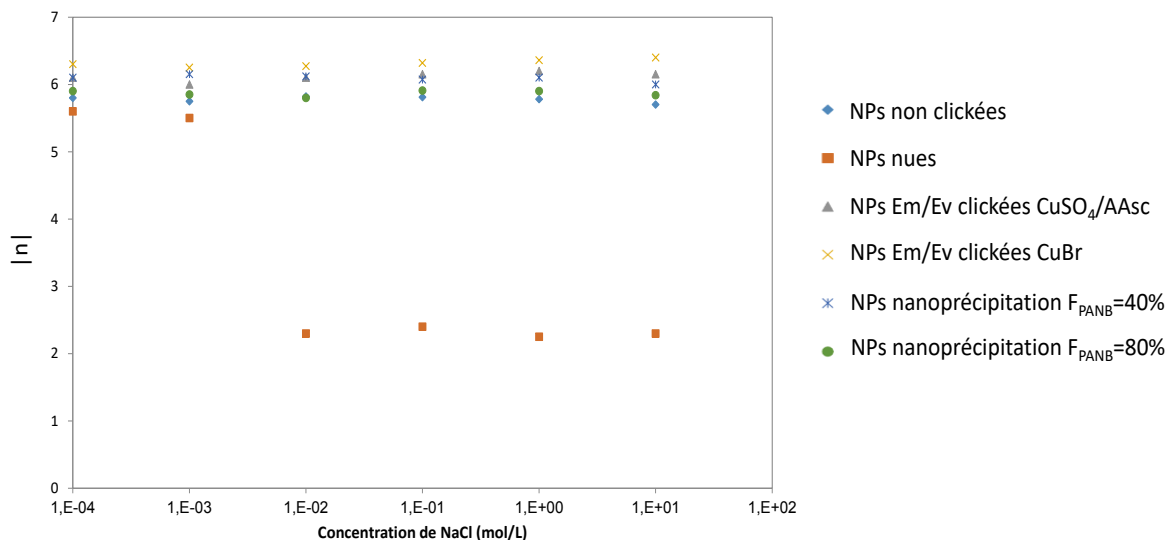


Figure 70 : Stabilité colloïdale de NPs en présence de NaCl

2) Stabilité du recouvrement en dextrane en présence d'un tensioactif compétitif

La stabilité du recouvrement polysaccharidique à la surface des NPs a également été étudiée en présence d'un tensioactif compétitif. Cette étude a pour objectif de vérifier que les chaînes du dextrane modifiées, Clickées ou non, sont vraiment ancrées de façon irréversible à la surface des NPs et de s'assurer de la stabilité de ce recouvrement vis-à-vis d'un tensioactif

compétitif. Ce tensioactif nous permettrait de mimer indirectement la stabilité de nos NPs dans des milieux comme le sang ou le milieu de culture des NPs.

Dans un premier temps, le tensioactif choisi dans cette étude est le SDS qui est un tensioactif ionique. La désorption des couches polymère en présence SDS a déjà été étudiée au LCPM² et dans la littérature^{10,11}. Après élaboration et lavage des NPs, 1 % massique de SDS a été ajouté aux suspensions aqueuses des NPs. Les suspensions ont été ensuite laissées 24 heures sous agitation, puis lavées et lyophilisées. La quantité de dérivé dextrane demeurant en surface des NPs est alors estimée par la méthode décrite plus haut et permet de vérifier si la couronne polysaccharide demeure intacte ou si elle a été désorbée par le traitement au SDS. Des exemples de spectres RMN ¹H dans le DMSO-*d*₆ des NPs « Clickées » à l'aide de CuBr, ou « non Clickées », avant et après contact avec SDS, sont présentés dans la Figure 71.

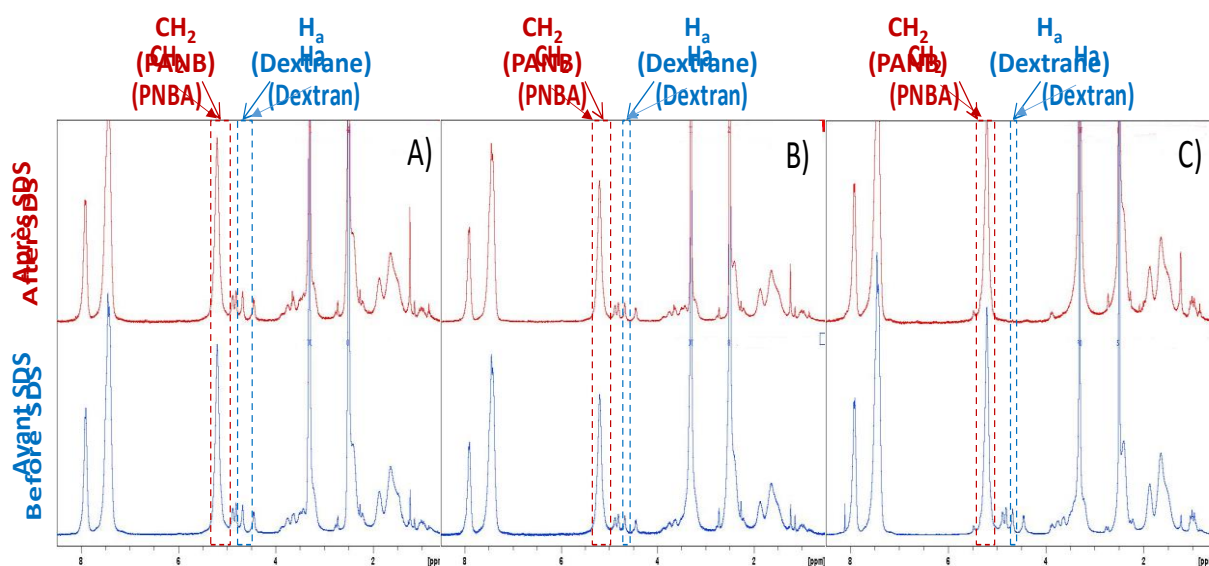


Figure 71 : Spectres RMN ¹H des NPs produites par émulsion-évaporation de solvant dans le DMSO-*d*₆ avec (A, B) ou sans (C) Click in situ CuAAC (CuBr). La chimie Click a été réalisée sous (A) ou sans (B) flux d'¹⁸N₂. Les spectres sont donnés avant et après contact avec SDS.

Les résultats de la désorption de la couche de dextrane en surface des NPs en présence de SDS sont regroupés dans le Tableau 20. Dans le cas des NPs élaborées par nanoprécipitation, on constate, quel que soit le glycopolymère utilisé (Dex(15)-*g*-3PANB₃₇₀₀ et Dex(15)-*g*-7PANB₁₀₃₀₀) que la couche de dextrane est assez stable puisque plus de 87 % de la couche surfacique demeure même après 24 heures de contact avec le SDS.

Dans le cas des NPs préparées par émulsion-évaporation de solvant organique sans chimie Click interfaciale, on constate que la couche de DexAlcyne-15 à la surface de ces NPs est instable en présence de SDS, puisque la totalité de ce tensioactif se désorbe après 24 heures de contact avec le SDS. Le SDS en raison de son affinité par la surface hydrophobe du PANB

déplace les chaînes de DexAlcyne-15 par adsorption compétitive. Ceci montre que la simple énergie de la sonication ne suffit donc pas à réaliser la réaction de chimie « Click » CuAAC interfaciale. Ceci est en accord avec des travaux du LCPM sur des NPs PLA recouvertes de différentes couronnes (DexC₆, DexN₃-τ) ³qui montraient que la totalité des couronnes se désorbait en présence de SDS. Par contre, dans le cas des NPs élaborées par émulsion-évaporation de solvant organique en effectuant une réaction de chimie Click interfaciale, le recouvrement polysaccharide est beaucoup plus stable puisque plus de 85 % de la couche surfacique demeure, même après 24h de contact avec le SDS. En utilisant le catalyseur CuBr et sans travailler sous azote, 15 % du dérivé dextrane initialement présent à la surface des objets se désorbe en présence de SDS contre seulement 7 % si l'étape de sonication est réalisée sous atmosphère contrôlée d'azote. Ceci peut s'expliquer par une meilleure efficacité de la réaction de chimie Click interfaciale sous atmosphère contrôlée comme nous l'avons déjà mentionné. Dans ces deux cas, une grande proportion de dextrane est fixée de façon covalente et irréversible au cœur des NPs. Cependant, les quelques chaînes DexAlcyne-15 éliminées peuvent être des chaînes adsorbées de façon physique à la surface des NPs (n'ayant pas réagi) ou encore enchevêtrées dans la couronne surfacique ². Dans le cas des NPsClickées en utilisant le système CuSO₄/AAAsc comme catalyseur, le pourcentage de dextrane résiduel après contact avec le SDS est là encore supérieur à 90 % et on peut encore une fois observer l'effet de l'azote. Ces résultats sont une preuve du bon fonctionnement de la réaction CuAAC interfaciale pour la fabrication de NPs ayant une couronne hydrophile en polysaccharide fixée de façon permanente à leur surface. En effet, la fixation covalente de la couronne permet d'assurer sa stabilité et aussi la stabilisation des NPs pour leur injection par voie intraveineuse. De plus, la couronne de dextrane devrait constituer une barrière stérique stable en milieu physiologique, capable d'empêcher l'adsorption de protéines. Ceci sera vérifié dans la partie suivante en étudiant la stabilité du recouvrement des différentes NPs en présence du milieu de culture des cellules qui contiennent de multiples protéines.

3) Stabilité du recouvrement en présence du milieu de culture des cellules

Caco-2

Les tests biologiques qui seront présentés plus loin dans ce manuscrit seront réalisés dans le milieu de culture des cellules Caco-2 qui est le DMEM (pH = 7,2), aussi il nous est apparu important de vérifier la stabilité des NPs dans ce milieu jusqu'à 72h d'incubation à 37°C. Le protocole expérimental est identique à celui employé dans le cas du SDS.

La quantité de dextrane désorbée par ce milieu de culture a été déterminée par RMN ^1H des particules solubilisées dans le DMSO- d_6 , après lavage. Les pourcentages de dextrane résiduel présent à la surface des NPs après contact avec DMEM sont regroupés dans le Tableau 21. A noter que cette expérience a été seulement réalisée sur les NPs qui seront par la suite testées sur les cellules Caco-2, c'est-à-dire les NPs élaborées par émulsion-évaporation de solvant organique.

Tableau 20 : Détermination de la masse du dextrane en surface des NPs avant et après contact avec SDS

<i>Procédé d'élaboration des NPs</i>	<i>Conditions d'élaboration des NPs</i>	<i>Masse du dextrane (mg/g PANB)</i>		<i>% du dextrane résiduel</i>
		<i>Avant SDS</i>	<i>Après SDS</i>	
<i>Nanoprécipitation</i>	Dex(15)-g-3PANB ₃₇₀₀ (F _{PANB} = 40 %)	916	794	87 %
	Dex(15)-g-7PANB ₁₀₃₀₀ (F _{PANB} = 80 %)	167	161	96 %
<i>Emulsion/évaporation de solvant</i>	Non Clickées	109	0	0
	CuBr/ Sans N ₂	186	158	85 %
	CuBr/ Avec N ₂	215	201	93 %
	CuSO ₄ /AAsc/ Sans N ₂	174	160	92 %
	CuSO ₄ /AAsc/Avec N ₂	191	183	96 %

On constate que dans le cas des NPs non Clickées, la couche de DexAlcyne-15 à la surface de ces NPs est instable en présence de DMEM puisque 66 % de ce stabilisant se désorbe après 24 heures d'incubation et que la totalité de cette couche se désorbe après 72h de contact avec le DMEM. Ceci montre que la présence de différentes protéines dans ce milieu de culture lui confère un certain caractère tensioactif qui pouvait indirectement être mimé par le SDS. Au contraire, dans le cas de NPsClickées, quel que soit le type du catalyseur utilisé (CuBr ou CuSO₄/AAsc), le recouvrement est beaucoup plus stable.

Dans le cas des NPsClickées en utilisant le CuBr, seulement 17 % du dextrane initialement présent à la surface des NPs sont désorbés après 72h de contact avec le DMEM. Les résultats sont similaires dans le cas de NPsClickées en utilisant le CuSO₄/AAsc où on observe une

désorption égale à 15 % ce qui permet de conclure que le catalyseur employé pour mener la CuAAC interfaciale ne semble pas influencé par la stabilité des NPs vis-à-vis du milieu de culture cellulaire. Ceci témoigne que seules les chaînes du DexAlcyne-15 physiquement adsorbées ou enchevêtrées à la surface ont été éliminées. En revanche, celles accrochées chimiquement (grâce à une réaction « Click ») restent immobilisées en surface de NPs. Ces résultats semblent être prometteurs en termes de stabilité de la couche surfacique lorsque cette dernière est liée de façon covalente à la surface de NPs par rapport à une simple adsorption physique. A noter que ces résultats sont parfaitement comparables aux résultats décrits lorsque le SDS est employé.

Tableau 21 : Détermination de la masse du dextrane (mg dextrane / g PANB) en surface des NPs élaborés par émulsion-évaporation de solvant avant et après contact avec DMEM

	<i>Type de NPs</i>	<i>NPs non Clickées</i>	<i>NPsClickéesCuBr</i>	<i>NPsClickées CuSO₄/AAsc</i>
24 h <i>d'incubation</i>	<i>Avant DMEM</i>	99	176	164
	<i>Après DMEM</i>	34	158	154
	<i>% du dextrane résiduel</i>	34 %	90 %	94 %
72h <i>d'incubation</i>	<i>Avant DMEM</i>	99	176	164
	<i>Après DMEM</i>	0	146	139
	<i>% du dextrane résiduel</i>	0 %	83 %	85 %

V) CONSERVATION DES NPS

Après les étapes de lavage par centrifugation, les NPs sont souvent conservées sous forme lyophilisée pour plusieurs raisons :

- La conservation à long terme des suspensions aqueuses de nano-objets contenant un PA est difficilement envisageable. En effet, un des risques principaux est la diffusion du PA hors des nano-objets dans la phase externe.
- La prolifération bactérienne dans l'eau est également un risque à éviter.

Cependant, pour conserver des NPs recouvertes d'une couronne de dextrane sous forme lyophilisée, il est nécessaire d'ajouter un cryoprotecteur tel que le tréhalose (10 mg/mL) pour éviter l'agrégation des NPs durant l'étape de sublimation. Ce cryoprotecteur permet alors une

bonne redispersion des NPs après leur lyophilisation (Figure 72) et ne représente pas d'inconvénient pour l'utilisation finale des objets. Lorsqu'aucun cryoprotecteur n'est pas rajouté à la suspension, on peut voir l'apparition d'agrégats après lyophilisation. Le tréhalose utilisé dans cette étude peut également être remplacé par du glucose ou un autre type de cryoprotecteur, comme cela a été démontré dans la littérature ¹².

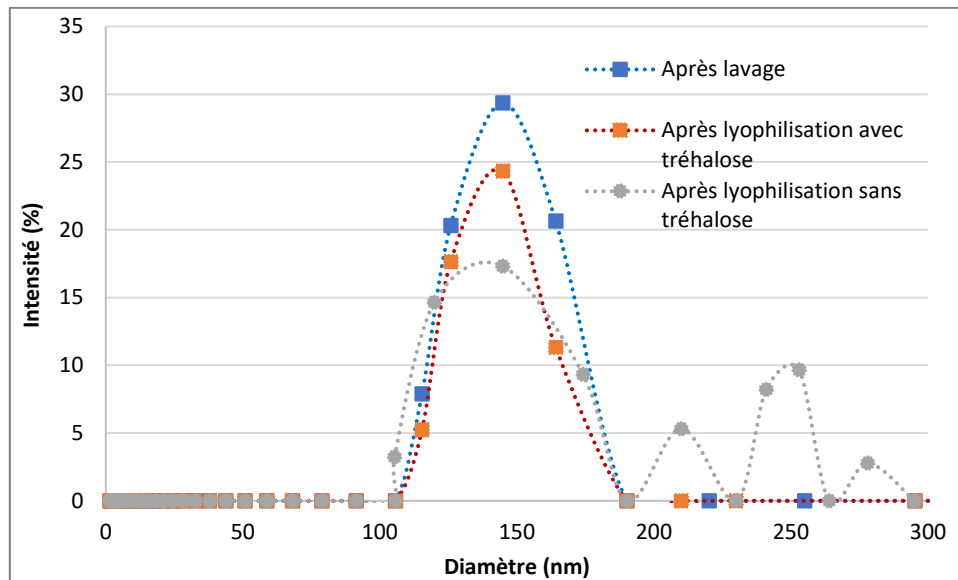


Figure 72 : Distribution de tailles des NPs après lavages et après leur lyophilisation en présence et en absence de tréhalose (cas des NPs obtenues par émulsion-évaporation de solvant sans Click)

VI) DETERMINATION DE LA QUANTITE DU CUIVRE RESIDUEL

La réaction de chimie Click CuAAC interfaciale qui a été menée lors du procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique a été réalisée en utilisant un catalyseur à base de cuivre. Cependant la présence de cuivre résiduel dans les produits finaux peut entraîner une cytotoxicité des NPs et limiter leur l'emploi dans le cadre de certaines applications, notamment dans le domaine pharmaceutique. C'est pourquoi, nous avons décidé d'éliminer le maximum de cuivre des NPs ainsi produites en ajoutant environ 5 équivalents d'EDTA par Cu dans la suspension aqueuse des NPs non-lavées (c'est-à-dire après l'étape d'évaporation du DCM). L'EDTA est en effet connu pour ces propriétés chélatantes, notamment du cuivre. La suspension des NPs est laissée sous agitation, à température ambiante, pendant une nuit puis la quantité de cuivre résiduel dans la suspension a été déterminée par Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP) (voir Partie expérimentale). La quantité de cuivre résiduelle a été estimée entre 0,76 et 1,89 mg par kg de NPs (c'est-à-dire entre 0,76 et 1,89 ppm). Or, selon l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), la dose journalière

admissible (DJA¹) du cuivre, est de 0,15 mg Cu/kg poids corporel /j. Ainsi, en se basant sur un poids corporel d'un adulte d'environ 70kg, la DJA est égale à 10,5 mg Cu/jour et en tenant compte de la quantité de cuivre résiduel dans lesdites NPs après purification par de l'EDTA, il faudrait alors injecter 13,8 kg de NPs par jour au patient pour atteindre ces valeurs de DJA, ce qui est inconcevable (Tableau 22).

Dans notre cas, les deux catalyseurs CuBr et CuSO₄ semble être facilement éliminable avec les lavages avec l'EDTA et les quantités du cuivre résiduel sont très faibles dans les deux cas.

Tableau 22 : Détermination de la quantité du cuivre résiduel dans les NPs par méthode d'ICAP-OES

<i>Système Catalytique utilisé</i>	<i>Quantité du cuivre résiduel dans les NPs [ppm] ^(a)</i>	<i>Fraction massique du cuivre éliminé [%] ^(b)</i>
<i>CuBr</i>	<i>1,89</i>	<i>95,3</i>
<i>CuSO₄/AAsc</i>	<i>0,76</i>	<i>99,1</i>

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

(b) Déterminé par rapport à la quantité de cuivre initialement introduite lors de l'élaboration des NPs.

VII) CARACTERE PHOTSENSIBLE DES NPS

Selon la littérature, la photolyse des esters nitrobenzylique présents dans les chaînes PANB produit des acides carboxyliques et du 2-nitrosobenzaldéhyde. Dans le cas des glycopolymères Dex-g-PANB, les produits de photolyse totale seront alors des glycopolymères Dex-g-PAA (PAA = poly(acide acrylique)), comme indiqué dans la Figure 73. Si la photolyse n'est pas totale, alors les Dex-g-PAA se transforment en Dex-g-(PANB-co-PAA) avec des greffons qui deviendront progressivement hydrophiles. Nous avons donc étudié l'effet de la lumière sur nos systèmes. Pour cela, des suspensions de NPs dans le PBS avec une concentration égale à 114 µg/mL (cette concentration sera sélectionnée pour l'étude biologique menée sur les cellules Caco-2) ont été préparées, puis irradiées en utilisant une

¹La dose journalière admissible (DJA) d'un produit chimique est une estimation de la quantité du produit présente dans les aliments ou l'eau de boisson qui peut être ingérée tous les jours, pendant la vie entière, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation. Elle est exprimée en milligrammes de produit par kilogramme de poids corporel (OMS, 1997).

lampe UV avec différentes puissances (de 50 mW/cm² à 1010 mW/cm²). Pour chaque puissance, différentes durées d'irradiation ont été effectuées. Après chaque irradiation, des analyses de l'intensité diffusée des suspensions ont été réalisées.

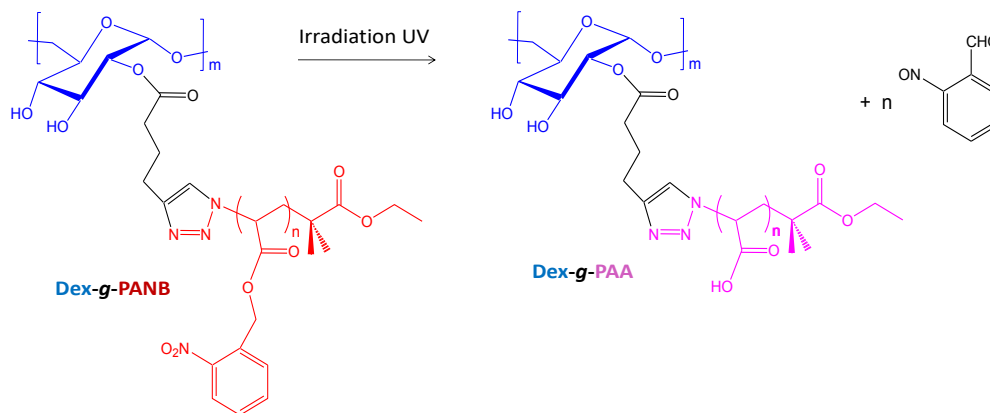


Figure 73 : Effet de l'irradiation UV sur les glycopolymères Dex-g-PANB

L'évolution de l'intensité diffusée par la suspension des NPs irradiée, en fonction de la durée d'irradiation et pour les différentes puissances, est présentée dans la Figure 74. On observe que plus la puissance d'irradiation augmente plus la chute de l'intensité diffusée est prononcée, ce qui s'explique par la disparition de plus en plus rapide des NPs. Ceci confirme que ces NPs photosensibles sont progressivement détruites par la lumière et que cette destruction est proportionnelle à la durée et la puissance d'irradiation. Cette destruction correspond à la formation progressive des Dex-g-PAA qui se solubilisent alors dans le PBS, d'où la solubilisation des NPs.

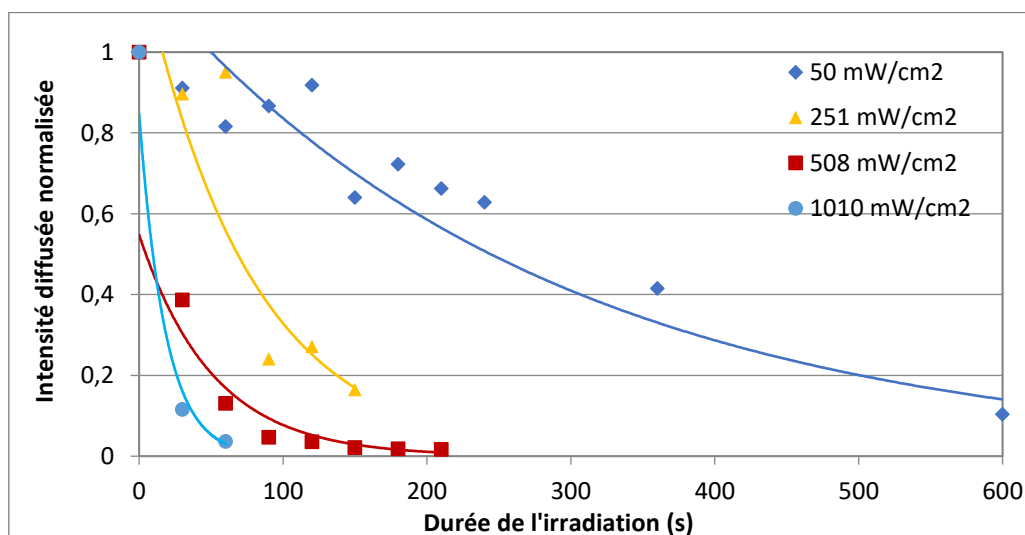


Figure 74 : Evolution de l'intensité diffusée en fonction de la durée d'irradiation

Un deuxième suivi de la dissolution des NPs au cours de l'irradiation a été réalisé par RMN ¹H et ceci par dosage des unités ANB restantes après irradiation. Après irradiation, les NPs

sont alors lavées, centrifugées, lyophilisées puis dissoutes dans du DMSO- d_6 . La Figure 75 montre l'évolution des unités ANB restantes au cours de l'irradiation, en appliquant une puissance égale à 54 mW/cm². Le pourcentage des unités de ANB restantes après irradiation est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ de ANB restante} = \left(\left(\frac{A_{CH_2/2}}{A_{Ha}} \right)_t / \left(\frac{A_{CH_2/2}}{A_{Ha}} \right)_{t=0} \right) \times 100$$

Avec A_{CH_2} et A_{Ha} correspondant respectivement aux aires des pics caractéristiques des protons CH_2 de l'unité monomère ANB et du proton anomérique des unités glucopyranosique du dextrane.

On constate que plus la durée d'irradiation est importante, plus le pourcentage des unités ANB encore présentes dans les greffons des glycopolymères diminue. Après seulement 30 secondes d'irradiation à 54 mW/cm², il y a disparition de 70 % des unités ANB. A ce stade, les PANB ne sont donc pas totalement transformés en PAA et les NPs ne sont donc pas encore totalement dissoutes dans la phase aqueuse comme on peut le voir par l'intensité diffusée de la suspension (Figure 74). Néanmoins, ce temps d'irradiation suffira à libérer l'anticancéreux que nous encapsulerons dans les NPs (pages suivantes).

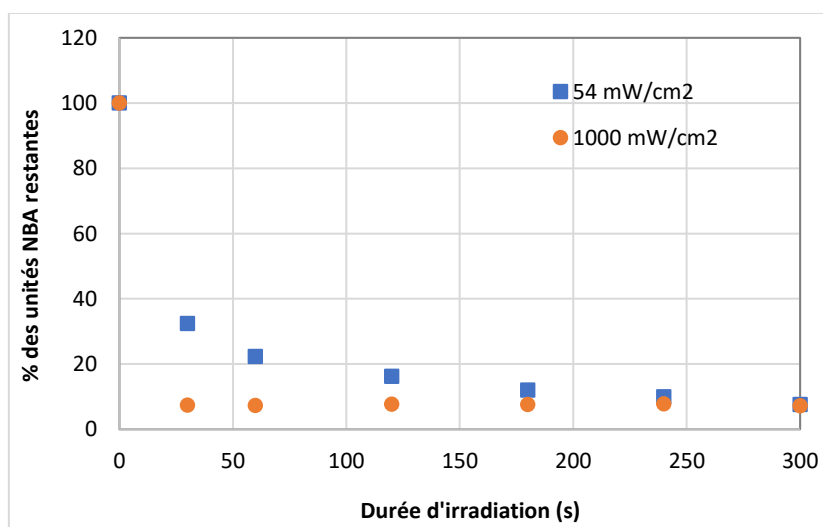


Figure 75 : Suivi de l'irradiation (54 mW/cm²) du glycopolymère Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀ (F_{PANB} = 40 %) par RMN ¹H dans le DMSO- d_6

VIII) CONCLUSION DU CHAPITRE

Dans ce chapitre, l'élaboration des NPs de PANB stabilisées par des dérivés de dextrane a été décrite avant d'étudier l'encapsulation de l'anti-cancéreux dans ces nanovecteurs matriciels.

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à l'élaboration des NPs aussi bien par un procédé peu énergétique, la nanoprécipitation, que par un procédé très énergétique, l'émulsion-évaporation de solvant organique. Nous avons également montré dans ce chapitre qu'il est possible de réaliser une réaction de chimie « Click » CuAAC *in situ* entre le PANB-N₃ et le DexAlcyne-15 pendant l'élaboration des NPs par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant. Cette réaction a lieu à l'interface des deux solvants non miscibles (le DCM et l'eau) et a été catalysée par deux types de catalyseurs : le CuBr et le CuSO₄ associé à l'acide ascorbique (AAsc). En parallèle, l'élaboration des NPs par le procédé de nanoprécipitation a été effectuée à partir des Dex-g-PANB préformés par réaction de chimie Click entre le PANB-N₃ et le DexAlcyne-15.

Les différentes caractéristiques des NPs ont été présentées et les conclusions sont les suivantes :

- A partir des résultats de potentiel Zéta ζ , il a été possible de calculer l'épaisseur du recouvrement en dextrane des NPs élaborées par nanoprécipitation (entre 4 et 10 nm) ou bien par émulsion-évaporation de solvant organique (entre 4 et 8 nm). La couronne de dextrane a été également caractérisée en termes de taux de recouvrement grâce par RMN ¹H en solubilisant la totalité des NPs dans le DMSO-*d*₆. Dans le cas du procédé nanoprécipitation, les taux de recouvrement varient entre 167 et 916 mg de dextrane/g de PANB selon la fraction de PANB dans le glycopolymère. Aussi dans le cas du procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique, cette grandeur varie entre 109 et 215 mg de dextrane/g de PANB selon les conditions d'élaboration de NPs (avec et sans chimie Click, sous courant d'azote ou non).
- La présence d'une couronne polysaccharide hydrophile à la surface des NPs a été indirectement mise en évidence par l'amélioration de la stabilité colloïdale des NPs en milieu salin avec différentes forces ioniques (10⁻⁴ – 4 M).
- La stabilité du recouvrement en surface de NPs a été étudiée en présence de tensioactifs compétitifs. Ainsi dans le cas des NPs non Clickées, une désorption totale du DexAlcyne-15 a été observée après 24h de contact avec le SDS ou après 72 h de contact avec le DMEM (milieu de culture des cellules Caco-2). Dans le cas de NPs préparées par émulsion-évaporation de solvant organique et « Clickées » à l'aide de CuBr ou CuSO₄/AAsc, cette désorption est nettement réduite puisque seuls 4 à 15 % du dextrane est désorbé après 24h de contact avec le SDS ; contre 15 % de désorption après 72h de contact avec le DMEM. Ces résultats montrent l'avantage d'une immobilisation covalente de la couronne polysaccharide à la surface des NPs

(par rapport à une simple adsorption physique) grâce aux cycles triazole créés par CuAAC ; toutefois l'effet du diazote pendant la Click interfaciale est difficilement quantifiable.

- Les NPs ont pu être lyophilisées en présence d'un cryoprotecteur et stockées sous forme de poudre. Leur redispersion s'effectue alors par simple sonication sans changement de distribution de taille des nano-objets.
- Le dosage du cuivre résiduel dans le cas des NPs Clickées élaborées par émulsion-évaporation de solvant organique montre que la quasi-totalité du cuivre est éliminée après lavages à l'EDTA des NPs et la quantité résiduelle de cuivre ne posera pas de problème pour l'application envisagée.
- Le caractère photosensible des NPs a été mis en évidence par le suivi de l'intensité diffusée de la suspension en fonction de la durée et de la puissance d'irradiation. On a constaté que plus la durée ou la puissance d'irradiation augmente, plus l'intensité diffusée diminue, confirmant que ces NPs photosensibles sont progressivement « détruites » par la lumière. Un deuxième suivi de la dissolution des NPs au cours de l'irradiation a été réalisé par RMN ^1H et nous a permis d'estimer le taux d'unités ANB résiduelles après irradiation.

Les NPs décrites dans ce chapitre remplissent un grand nombre des conditions nécessaires à leur administration par voie intraveineuse. Elles sont en effet stables en milieu salin, dans un grand domaine de concentrations. Leur surface est peu chargée à force ionique du sang et leur taille de l'ordre d'une centaine de nanomètres est suffisamment faible. La couronne polysaccharide, ancrée de façon covalente à leur surface, est stable en présence de molécules tensioactives telles que le SDS ou les protéines présentes dans le milieu de culture des cellules Caco-2. Ces NPs possèdent des fonctions alcyne résiduelles en surface qui seront disponibles pour le greffage ultérieur de différentes molécules (post-modification de la surface des NPs). Dans le chapitre suivant, nous allons étudier le potentiel biologique de ces NPs.

IX) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Soliman, S. M. A. From Photosensitive Glycopolymers to Smart Drug Delivery Systems, Université de Lorraine, 2014.
- (2) Poltorak, K.; Durand, A.; Leonard, M.; Six, J.-L.; Nouvel, C. Interfacial Click Chemistry for Improving Both Dextran Shell Density and Stability of Biocompatible Nanocapsules. *Colloids Surf. -Physicochem. Eng. Asp.***2015**, *483*, 8–17.
- (3) Rouzes, C.; Leonard, M.; Durand, A.; Dellacherie, E. Influence of Polymeric Surfactants on the Properties of Drug-Loaded PLA Nanospheres. *Colloids Surf. B Biointerfaces***2003**, *32* (2), 125–135.
- (4) Laville, M.; Babin, J.; Londono, I.; Legros, M.; Nouvel, C.; Durand, A.; Vanderesse, R.; Leonard, M.; Six, J.-L. Polysaccharide-Covered Nanoparticles with Improved Shell Stability Using Click-Chemistry Strategies. *Carbohydr. Polym.***2013**, *93* (2).
- (5) Österberg, E.; Bergström, K.; Holmberg, K.; Riggs, J. A.; Van Alstine, J. M.; Schuman, T. P.; Burns, N. L.; Harris, J. M. Comparison of Polysaccharide and Poly(Ethylene Glycol) Coatings for Reduction of Protein Adsorption on Polystyrene Surfaces. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.***1993**, *77* (2), 159–169.
- (6) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.***2002**, *54* (5), 631–651.
- (7) Roy, A.; Valderrama, M. A. M.; Daujat, V.; Ferji, K.; Léonard, M.; Durand, A.; Babin, J.; Six, J.-L. Stability of a Biodegradable Microcarrier Surface: Physically Adsorbed versus Chemically Linked Shells. *J. Mater. Chem. B***2018**, *6* (31), 5130–5143.
- (8) Tadros, T. Interparticle Interactions in Concentrated Suspensions and Their Bulk (Rheological) Properties. *Adv. Colloid Interface Sci.***2011**, *168* (1), 263–277.
- (9) Long, J. A.; Osmond, D. W. J.; Vincent, B. The Equilibrium Aspects of Weak Flocculation. *J. Colloid Interface Sci.***1973**, *42* (3), 545–553.
- (10) Blokhuis, A. M.; Djurhuus, K. Adsorption of Poly(Styrene Sulfonate) of Different Molecular Weights on α -Alumina: Effect of Added Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Colloid Interface Sci.***2006**, *296* (1), 64–70.
- (11) Cattoz, B.; Cosgrove, T.; Crossman, M.; Prescott, S. W. Surfactant-Mediated Desorption of Polymer from the Nanoparticle Interface. *Langmuir***2012**, *28* (5), 2485–2492.
- (12) Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Stainmesse, S.; Fessi, H. Freeze-Drying of Nanoparticles: Formulation, Process and Storage Considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.***2006**, *58* (15), 1688–1713.

**CHAPITRE III : ENCAPSULATION ET LIBERATION PHOTO-PROVOQUEE
D'UNE SUBSTANCE ACTIVE A PARTIR DES NANOPARTICULES**

I) INTRODUCTION

Cette thèse portait sur le développement de nanoparticules (NPs) photosensibles destinées à être employées comme systèmes de délivrance de principes actifs (PA) après injection intraveineuse. Ainsi, l'objectif fixé était de délivrer de façon contrôlée dans le temps et dans l'espace ce PA, et le délivrer qu'au voisinage des cellules cancéreuses à traiter pour minimiser les effets secondaires liés à cet anticancéreux. Une fois les conditions optimales de préparation et de stockage des particules « vides » définies, l'encapsulation d'un PA au sein desdites NPs, puis l'étude de sa libération par simple diffusion et sous l'effet de l'irradiation ont été étudiées. La doxorubicine (DOX) a été choisie comme PA modèle pour cette étude puisque c'est un anticancéreux classiquement utilisé pour le traitement du cancer colorectal (Tableau 1, étude bibliographique).

Nous avons montré dans les chapitres précédents qu'il était possible de préparer des NPs à cœur photosensible (PANB) et recouvertes d'une couronne dérivée du dextrane par (i) un procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique couplé à une réaction de chimie « Click » réalisée *in situ* à l'interface huile/eau de l'émulsion et (ii) par nanoprécipitation de copolymères Dex-g-PANB préformés. Même si les NPs ont pu être produites par les deux procédés précités, celles élaborées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique ont été choisies comme objets de référence pour mener cette étude d'encapsulation/libération de PA.

Dans la première partie de ce chapitre, quelques généralités sur la DOX et sur ses mécanismes d'action seront évoquées. Puis, dans un second temps, l'encapsulation de la DOX dans les NPs sera menée. Cette encapsulation a été réalisée à l'intérieur des NPs ayant subi ou non la réaction de chimie « Click » CuAAC interfaciale lors du procédé d'élaboration des NPs. Les NPs « non Clickées » ou « Clickées » chargées de DOX ont ensuite été caractérisées en termes de distribution de taille, de quantité de DOX encapsulée et d'efficacité de l'encapsulation. Les résultats obtenus seront commentés au regard des résultats décrits dans la littérature pour l'encapsulation de la DOX dans diverses NPs. Enfin les cinétiques de libération de la DOX hors des NPs seront présentées par simple diffusion ou après irradiation. Pour ces deux mécanismes, la libération sera étudiée dans deux milieux sélectionnés : le PBS et le DMEM qui est le milieu de culture des cellules Caco-2.

II) LA DOXORUBICINE

La doxorubicine (Figure 76) est un PA anticancéreux utilisé dans le cadre de nombreuses chimiothérapies anticancéreuses. Cette molécule, produite naturellement par

Streptomyces peucetius, peut exercer ses effets anticancéreux et toxiques selon plusieurs mécanismes, dont l'inhibition de la topo-isomérase II, l'intercalation avec les polymérase de l'ADN (acide désoxyribonucléique) et de l'ARN (acide ribonucléique), la formation de radicaux libres et la fixation sur les membranes cellulaires¹. Le mécanisme exact de l'activité antitumorale de la doxorubicine n'est donc pas encore très bien connu mais des chercheurs pensent que l'inhibition de l'ADN, de l'ARN et de la synthèse protéique sont les principaux effets cytotoxiques de cette molécule. Après encapsulation dans des liposomes, la doxorubicine a été commercialisée sous le nom de DOXIL, MYOCET ou CAELYX.

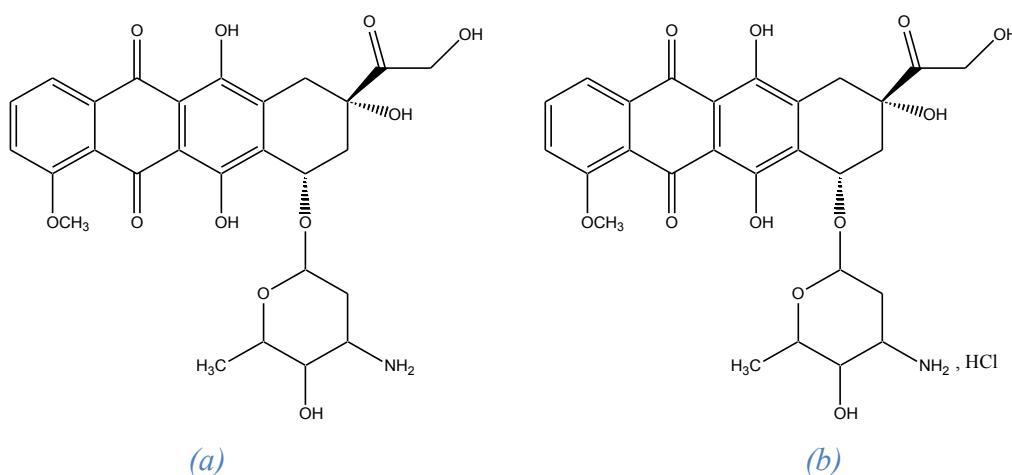


Figure 76 : Formules chimiques (a) de la Doxorubicine et (b) de la Doxorubicine chlorhydrate

Comme tout anticancéreux, la DOX présente plusieurs effets indésirables (elle est notamment cardiotoxique), et son emploi n'est donc pas recommandé pour les patients ayant des antécédents cardiaques². La vectorisation de cette molécule dans les NPs à libération contrôlée permettrait sans doute de diminuer cet effet indésirable, tout en réduisant la concentration de la DOX au niveau des cellules cardiaques. La DOX est une molécule faiblement hydrophile présentant une solubilité dans l'eau de 0,271 g.L⁻¹ pour un pH compris entre 6,0 et 7,5. Sous sa forme chlorhydrate commerciale (notée DOX,HCl par la suite, Figure 76), sa solubilité en phase aqueuse augmente jusqu'à 0,98 g.L⁻¹, en accord avec la protonation de son amine primaire (pK_a=8,2)⁴.

III) ENCAPSULATION DE LA DOX DANS LES NANOPARTICULES PHOTOSENSIBLES

La doxorubicine est commercialisée sous sa forme chlorhydrate. Aussi, dans un premier temps, une étude de solubilité de la DOX dans différents milieux de libération a été

réalisée. Puis une étude comparative de l'encapsulation de la DOX sous sa forme chlorhydrate (DOX,HCl) ou sa forme neutralisée DOX (en rajoutant 5 équivalents de triéthylamine par DOX,HCl) a été menée dans les différents types de NPs (sans chimie Click, avec chimie « Click » interfaciale catalysée par CuBr ou CuSO₄/AAsc). Finalement, le taux de charge et l'efficacité d'encapsulation de la DOX seront évalués pour chaque type de NPs.

1) Encapsulation de la DOX dans les NPs

a) Test de solubilité dans le solvant organique

Afin de pouvoir élaborer des NPs de PANB contenant la DOX par émulsion-évaporation de solvant organique, la solubilité de la DOX (neutralisée) dans le solvant organique utilisé dans ce procédé (DCM) a été évaluée visuellement (Tableau 23). Pour cela, des solutions de DOX à différentes concentrations ont été préparées.

Tableau 23 : Évaluation rapide de la solubilité de la DOX dans le DCM à température ambiante

<i>[DOX] (mg/mL)</i>	<i>5</i>	<i>10</i>	<i>15</i>	<i>20</i>	<i>30</i>
<i>Solubilité</i>	+	+	+	+	+

+ : Obtention d'un liquide limpide instantanément

Comme le montre les données rassemblées dans le Tableau 23, la DOX est soluble dans le DCM sur une large gamme de concentration allant de 5 jusqu'à 30 mg/mL ce qui augure une encapsulation aisée de la DOX dans les NPs préparées par émulsion-évaporation de solvant organique.

b) Stabilité de la DOX encapsulée dans le PANB

Avant de débiter les essais concernant l'optimisation de l'encapsulation de la DOX dans les NPs à cœur PANB, nous avons tout d'abord vérifié que la DOX ne se dégradait pas lors de sa neutralisation avec la triéthylamine ou encore au cours du processus d'élaboration par émulsion-évaporation de solvant organique.

Pour ce faire, 1mL de DCM contenant 10 mg de DOX,HCl neutralisée par 5 équivalents de triéthylamine a été laissé sous agitation toute une nuit à température ambiante et à l'abri de la lumière. Une extraction liquide/liquide est ensuite réalisée, puis la phase organique est

récupérée et séchée sous vide. L'analyse HPLC de la DOX récupérée montre alors la présence d'un seul pic, signe d'une dégradation de la DOX.

De la même façon, une solution de DOX neutralisée dans le DCM a été émulsionnée par sonication dans 10 mL d'une solution aqueuse de DexAlcyne-15, selon le protocole décrit dans la partie expérimentale. Après sonication, la DOX est récupérée par extraction liquide/liquide puis analysée par HPLC. L'analyse HPLC montre encore une fois que la DOX n'est pas dégradée, ce qui confirme que le procédé sélectionné est adapté pour l'encapsulation de la DOX dans les NPs de PANB.

c) Etude de l'encapsulation de la DOX dans les NPs

Le protocole de préparation des NPs contenant la DOX par émulsion-évaporation de solvant organique est identique à celui utilisé pour la préparation de NPs vides. La DOX à encapsuler est alors dissoute avec le PANB dans la phase organique. Les objectifs de cette étude sont plus précisément :

- D'obtenir des NPs de PANB/DOX de taille nanométriques avec une distribution de taille monomodale assez étroite.
- Optimiser les rendements (efficacités) d'encapsulation et les taux de charge en DOX.

Pour cela trois paramètres ont été étudiés : la neutralisation ou non de la DOX par la triéthylamine, le rapport massique DOX/PANB dans la phase organique et la réalisation ou non de réaction de chimie « Click » interfaciale au cours de l'émulsification par sonication.

(i) Influence de la neutralisation de la DOX avec la triéthylamine

L'encapsulation de la DOX dans les NPs a été évaluée en calculant l'efficacité d'encapsulation (EE) et le taux de charge (τ_{charge}) (voir partie expérimentale) qui sont déterminés soit par dosage direct de la DOX encapsulée dans les NPs (solubilisation des NPs dans le DMSO- d_6 , puis dosage de la DOX par RMN 1H (Figure 77), ou par dosage indirect (dosage par HPLC de la DOX non encapsulée présente dans les eaux de lavage lors de la centrifugation). Afin d'augmenter l'efficacité d'encapsulation, la DOX, HCl a parfois été traitée par 5 équivalents de triéthylamine avant sa solubilisation en phase organique. Ceci permet de la rendre moins hydrophile et devrait favoriser ses interactions hydrophobes avec le cœur de PANB et améliorer son encapsulation.

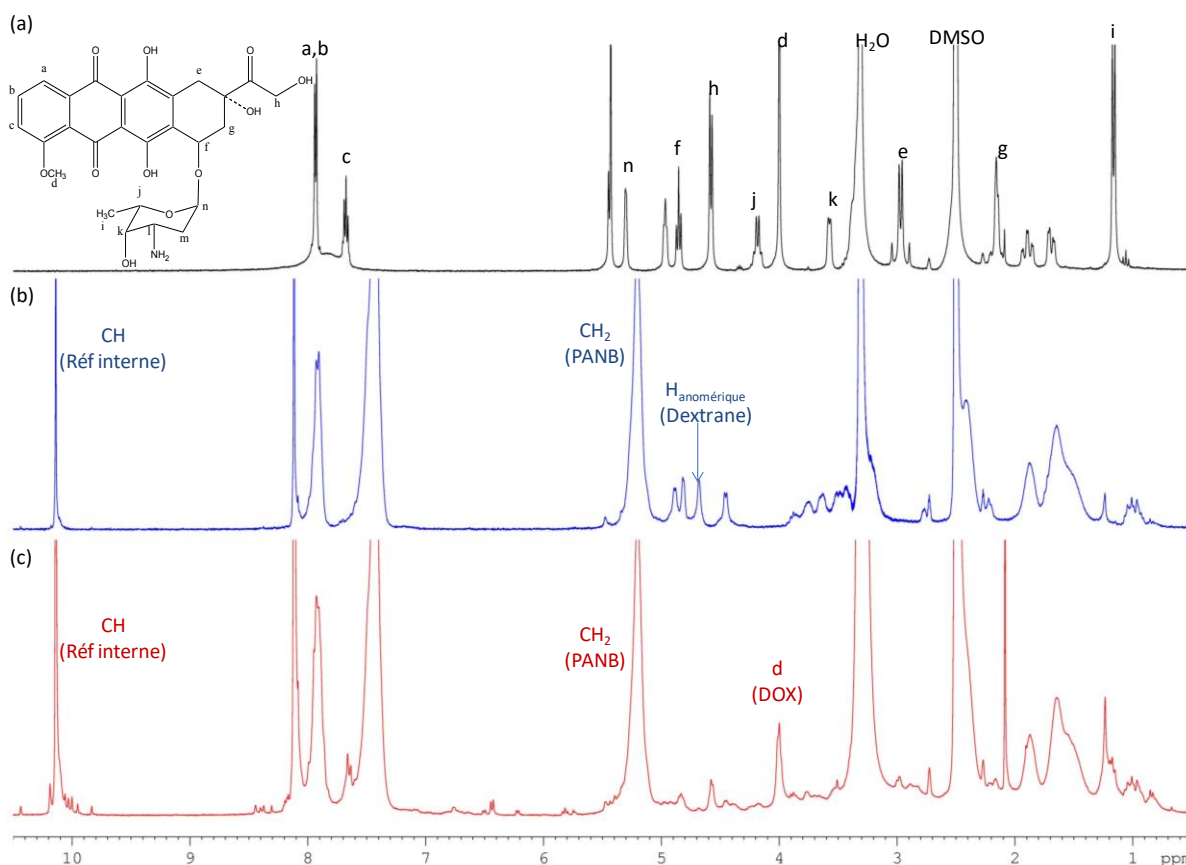


Figure 77 : Spectres RMN ¹H dans le DMSO-d₆(a) de la Doxorubicine, (b) des nanoparticules vides et (c) des nanoparticules chargées de Doxorubicine en présence de la référence interne (Téréphthalaldéhyde, benzène-1,4-dicarboxaldéhyde)

Pour mener ce comparatif, nous avons arbitrairement choisi de solubiliser 15 mg de DOX,HCl traitée ou non avec la triéthylamine et 25 mg de PANB dans 1 mL de DCM. La fraction massique initiale de DOX est alors égale à 35,89 %. Comme on peut le voir dans le Tableau 24, l'encapsulation de la DOX sous sa forme chlorhydrate (DOX.HCl) est limitée : le taux de charge est égal à 10 % et l'efficacité d'encapsulation égal à 18,5 %. En revanche, quand la DOX est encapsulée sous sa forme neutralisée avec la triéthylamine, le taux de charge passe à 33 % et l'efficacité d'encapsulation à 87,6 % (Tableau 24). Cela permet de confirmer que la neutralisation de la DOX avec la triéthylamine permet d'hydrophobiser la DOX et de favoriser ses interactions hydrophobes avec le cœur PANB des NPs. Notons ici que les NPs contenant de la DOX,HCl présentent un diamètre moyen légèrement plus faible (159 nm) que celles contenant la DOX neutralisée (275 nm) (Tableau 24). Ceci est probablement dû à la quantité supérieure de DOX encapsulée dans les NPs comme nous le mentionnerons dans les pages suivantes.

Tableau 24 : Effet de la neutralisation de la DOX sur le diamètre moyen et l'indice de polydispersité, le taux de charge et l'efficacité d'encapsulation des NPs de PANB/DOX sans chimie « Click »

	<i>Masse (mg)</i>	<i>Taille moyenne (nm)^a</i>	<i>Pdi^a</i>	<i>Taux de charge (%)^b</i>	<i>Efficacité d'encapsulation (%)^c</i>
DOX.HCl	15	159	0,121	10	18,5
DOX	14,056	275	0,117	33	87,6

a : Taille moyenne et indice de polydispersité déterminés par HPPS, après les étapes de lavage.

b : Taux de charge, représente la fraction massique de la DOX encapsulée dans les NPs (voir partie expérimentale).

c : Efficacité d'encapsulation, représente la masse de la DOX encapsulée par rapport à la masse initialement introduite de DOX (voir partie expérimentale).

Par la suite, le rapport massique initial DOX/PANB a été optimisé pour atteindre une meilleure encapsulation de la DOX, tout en se fixant un diamètre moyen maximum de 300 nm des NPs et une distribution étroite.

(ii) Influence du rapport massique DOX/PANB dans la phase organique

Les fractions massiques initiales en DOX dans la phase organique testées évoluent de 0 à 50 %, tout en maintenant une concentration totale de la phase organique égale à 39 mg de DOX.HCl+PANB/1 mL de DCM (Tableau 25).

Tableau 25 : Influence du rapport massique DOX/PANB sur le diamètre moyen, l'indice de polydispersité, le taux de charge et l'efficacité d'encapsulation des NPs de PANB/DOX « non Clickées »

<i>DOX.HCl/PA NB (mg/mg)</i>	<i>m_{DOX}^a (mg)</i>	<i>W_{box} initiale^a (%)</i>	<i>Taille moyenne (nm)^b</i>	<i>Pdi^b</i>	<i>Taux de charge (%)^c</i>	<i>Efficacité d'encapsulation (%)^d</i>
0/40		0	128	0,09	-	-
5/35	4,685	11,81	177	0,074	9	73,9
10/30	9,371	23,80	225	0,089	18	70,3
15/25	14,056	35,89	275	0,117	33	87,6
20/20	18,741	48,37	923	0,431	41	74,1

a : Fraction massique de DOX introduite initialement dans la phase organique.

Avec :

$$m_{DOX} = m_{DOX.HCl} \times \frac{543,48}{579,98}$$

b : Taille moyenne et indice de polydispersité déterminés par HPPS, après les étapes de lavage.

c : Taux de charge, représente la fraction massique de la DOX encapsulée dans les NPs (voir partie expérimentale).

d : Efficacité d'encapsulation, représente la masse de la DOX encapsulée par rapport à la masse initialement introduite de DOX (voir partie expérimentale).

Lorsque la fraction massique initiale de DOX est comprise entre 11,81% et 35,89%, l'augmentation de cette fraction conduit à un accroissement raisonné du diamètre moyen des NPs et de la distribution de taille (Tableau 25). En effet, les NPs ont des tailles comprises entre 177 nm et 275 nm après lavages. Elles se redispersent parfaitement et présentent des distributions de taille étroites (Pdi compris entre 0,074 et 0,117). Par contre, lorsque la fraction massique initiale de DOX est égale à 48,37 %, les particules obtenues s'agrègent et présentent une distribution de taille multimodale (plusieurs populations) après les étapes de lavage. Ceci se traduit par un Pdi élevé (0,431) et une taille moyenne élevée (923 nm).

En comparant les NPs chargées ou non de DOX, on remarque que l'encapsulation de DOX au sein des NPs augmente la taille de celles-ci de 128 nm à 177 nm pour une fraction initiale de DOX égale à 11,81%. Cette augmentation du diamètre moyen des NPs lors de l'encapsulation d'un PA a souvent été évoquée dans la littérature⁵⁻⁷. Le PA encapsulé dans le cœur hydrophobe de la nanoparticule vient gonfler celui-ci, ce qui provoque l'augmentation du diamètre moyen des NPs.

Comme on peut le voir dans le Tableau 25, l'augmentation de la fraction massique initiale en DOX (jusqu'à 35,89%wt) permet d'accroître significativement la quantité de DOX encapsulée dans les NPs, ce qui se traduit par une augmentation du taux de charge. L'efficacité d'encapsulation de la DOX à l'intérieur de NPs se situe alors entre 70,3 et 87,6 % (Tableau 25).

D'après ces résultats, la fraction massique initiale de DOX neutralisée dans la phase organique égale à 35,89 % lors de leur élaboration ont été produites et caractérisées. Ces NPs sont appelées « non Clickées » et « Clickées ». Cette concentration nous permet de formuler des NPs d'un diamètre moyen égal à 275 nm et d'un faible indice de polydispersité, tout en atteignant un taux de charge de 33 % et une efficacité d'encapsulation de 87,6 %.

(iii) Encapsulation de la DOX couplée à une réaction de chimie « Click »**CuAAC**

Différents types de NPs chargées de DOX produites en menant ou non une chimie Click CuAAC interfaciale lors de leur élaboration ont été produites et caractérisées. Ces NPs sont appelées « non Clickées » et « Clickées ». Pour les NPs « Clickées », deux types de catalyseur à base de cuivre (CuBr et le mélange CuSO₄/AAsc) ont été comparés (Tableau 26). Pour toutes ces expériences, la fraction massique initiale de la DOX est maintenue à 35,89 %. Dans tous les cas étudiés, des NPs avec une distribution en taille monomodale inférieures à 300 nm sont obtenues après lavages. Pour les NPs Clickées en utilisant le CuBr, le taux de charge et les efficacités d'encapsulation sont très proches de ceux obtenus dans le cas des NPs non Clickées. Ceci montre que l'utilisation du CuBr comme catalyseur n'a pas d'influence significative sur l'efficacité d'encapsulation de la DOX dans les NPs. En revanche, le système catalyseur CuSO₄/AAsc limite fortement l'encapsulation de la DOX par rapport aux NPs non Clickées et réduit d'un tiers la quantité de DOX encapsulée. Ceci est probablement dû à l'utilisation de l'acide ascorbique qui rend le pH de l'émulsion acide (pH= 3,5), entraînant une dégradation de la DOX et réduisant son encapsulation à l'intérieur des NPs. Cette dégradation transforme la doxorubicine en doxorubicinone et en daunosamine comme ça été décrit dans la littérature^{8,9}.

Tableau 26 : Effet de la CuAAC interfaciale sur l'évolution du diamètre moyen, de l'indice de polydispersité, du taux de charge et de l'efficacité d'encapsulation des NPs de PANB/DOX

	Taille moyenne (nm)	Pdi	Taux de charge (%)	Efficacité d'encapsulation (%)
Sans Click	275	0,117	33	87,6
ClickCuBr	243	0,127	29	72,6
Click CuSO₄/AAsc	149	0,09	11	21,9

IV) LIBERATION DE LA DOX

La libération contrôlée d'une molécule est définie comme un mécanisme permettant de délivrer cette molécule avec une vitesse contrôlée, et pendant un temps relativement long (12 heures). Il existe deux mécanismes fondamentaux de libération d'une molécule à partir des particules : la simple diffusion et la libération provoquée par un ou plusieurs stimuli.

La cinétique de libération d'une molécule est influencée par plusieurs paramètres tels que la distribution de taille des particules, la nature du polymère utilisé pour formuler les NPs, sa masse molaire et la solubilité de la molécule dans le milieu de libération...

Dans cette partie, la solubilité maximale de la DOX dans les deux milieux de libération sélectionnés pour cette étude (PBS et DMEM) sera tout d'abord estimée. Ensuite, les profils de libération de la DOX à partir des NPs cœur PANB/couronne DexAlcyne-15 seront examinés par deux mécanismes de libération : la libération par simple diffusion et la libération provoquée sous l'effet de l'irradiation UV.

Pour cette étude, nous avons exclu l'hypothèse de l'adsorption de la DOX à la surface des NPs. En effet, s'il tel était le cas, les étapes successives de lavage désorberaient cette DOX et il s'en suivrait une réduction de l'intensité des pics relatifs de la DOX sur les spectres RMN des NPs chargées. Or, dans notre cas précis, les spectres RMN des NPs chargées restent inchangés.

La libération de la DOX a été étudiée sur des NPs obtenues par émulsion-évaporation de solvant organique, couplée ou non avec une réaction CuAAC interfaciale. Pour chaque type de libération (par diffusion ou provoquée par UV), nous avons étudié l'influence du milieu de libération (PBS ou DMEM) et de la CuAAC interfaciale. Les suivis de la libération ont été réalisés par méthode directe en estimant par HPLC la quantité de DOX libérée dans le milieu de libération. Les conditions expérimentales de suivi de libération sont décrites dans la Partie expérimentale.

1) Solubilité de la DOX dans les milieux de libération

Dans le but d'étudier la libération de la DOX dans les conditions les plus favorables, il est recommandé de travailler dans des conditions « Sink ». Ces conditions ne sont vérifiées que si la concentration du PA dans le milieu de libération est inférieure au dixième de sa solubilité maximale. Une évaluation de la solubilité de la DOX dans le PBS et dans le DMEM a donc été effectuée. Les valeurs des solubilités de la DOX ont été estimées expérimentalement en suivant une procédure détaillée dans la partie expérimentale. Une augmentation de la solubilité de la DOX dans le PBS est observée par rapport à celle dans le DMEM (Tableau 27), sans doute liée à la composition très complexe du milieu de culture DMEM alors que ces deux milieux présentent le même pH (7,4).

Tableau 27 : Solubilités maximales de la DOX neutralisée dans le PBS et dans le DMEM à 37°C

<i>DMEM</i>		<i>PBS</i>	
<i>Solubilité (mg/mL)</i>	<i>Solubilité (μM)</i>	<i>Solubilité (mg/mL)</i>	<i>Solubilité (μM)</i>
0,101	186	0,579	1066

2) Libération par simple diffusion

Pour évaluer la cinétique de libération de la DOX hors des NPs (réalisée à 37°C) par simple diffusion, la concentration de la suspension des NPs dans le milieu de libération (PBS ou DMEM) a été limitée afin que les conditions « Sink » soient bien vérifiées. Pour cela, nous avons considéré que si la libération de la DOX était totale, la concentration de la DOX dans le milieu de libération devait toujours être inférieure au dixième de sa solubilité maximale dans ce milieu. Rappelons que les NPs « non Clickées » et celles « Clickées » en utilisant le CuBr comme catalyseur, présentent des taux de charge en DOX similaires (Tableau 26) alors que les NPs « Clickées » en utilisant le système CuSO₄/AAsc comme catalyseur présentent un taux de charge inférieur. L'effet du taux de charge sur les profils de libération sera certainement visible. Les profils expérimentaux de libération de la DOX dans le PBS et dans le DMEM à 37°C (Figures 78 et 79) montrent l'absence d'un effet « Burst ». Au contraire, la libération de la DOX se fait de façon progressive, ce qui renforce l'hypothèse d'une répartition uniforme de la DOX dans le cœur des NPs et l'absence d'une adsorption significative de la DOX en périphérie du cœur, voire en surface des NPs. On note aussi que dans le cas des NPs « non Clickées » et « Clickées » avec le CuBr, 18,6 % (11,7 μM) et 17,5 % (11 μM) de la DOX initialement encapsulée est respectivement libérée dans le PBS au bout de 48h (Figure 78), alors que seuls 16 % (10 μM) et 10 % (6,25 μM) sont libérés dans le DMEM sur la même période (Figure 79), en accord avec la solubilité réduite de la DOX dans ce dernier milieu. La cinétique de libération de la DOX hors des NPs Clickées en utilisant le système CuSO₄/AAsc est plus lente, malgré un diamètre moyen plus faible (149 nm contre 243 nm pour les NPs « Clickées » avec CuBr). Ceci provient vraisemblablement du taux de charge initial de la DOX dans les NPs. Ainsi, en admettant que la concentration initiale de la DOX dans la particule soit le facteur limitant de sa diffusion un taux de charge plus faible explique une cinétique de libération plus lente.

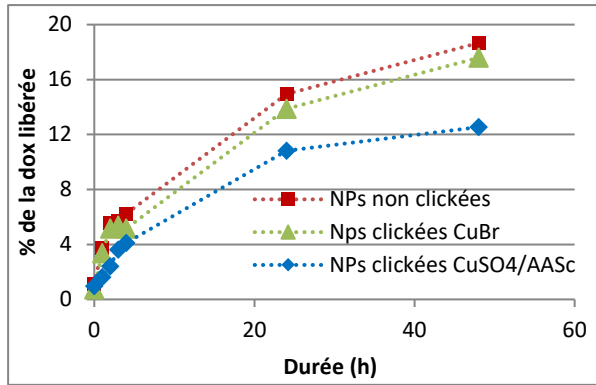


Figure 78 : Profils de libération de la DOX encapsulée dans les NPs de PANB dans le PBS à 37°C

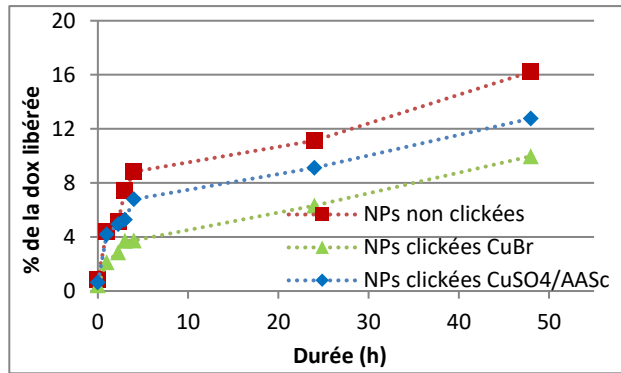


Figure 79 : Profils de libération de la DOX encapsulée dans les NPs de PANB dans le DMEM à 37°C

Dans la partie bibliographique, un modèle utilisé dans la littérature pour décrire la diffusion d'un PA à travers une matrice polymère de morphologie sphérique avait été exposé. Les équations décrites (voir ci-dessous) supposent que le coefficient de diffusion de la molécule encapsulée dans le milieu environnant reste inchangé au cours du processus de diffusion. Nous avons donc appliqué ce modèle de libération pour estimer les coefficients de diffusion (D) de la DOX à travers la matrice PANB des diverses NPs testées.

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

Avec :

M_t : quantité de PA libérée à un temps t [g]

M_∞ : quantité de PA totale encapsulée [g]

D : coefficient de diffusion du PA dans le polymère constituant l'objet [m^2/s]

R : rayon de la particule [m]

t : temps [s]

Les valeurs des coefficients de diffusion (D) ont alors pu être estimées (Tableau 28) en tenant compte des rayons moyens respectifs des NPs testées et en se limitant à des libérations inférieures à 90 %.

Tableau 28 : Coefficients de diffusion (D) de la DOX hors des différents types de NPs

<i>Types de NPs</i>	<i>Sans Click</i>	<i>ClickCuBr</i>	<i>Click CuSO₄/AAsc</i>
<i>D (m²/s) dans le PBS</i>	1,346 10 ⁻²¹	9,378 10 ⁻²²	1,877 10 ⁻²²
<i>D (m²/s) dans le DMEM</i>	9,371 10 ⁻²²	2,746 10 ⁻²²	1,565 10 ⁻²²

Comme on peut le voir dans le Tableau 28, les valeurs D trouvées pour les NPs « non Clickées » sont similaires, quel que soit le milieu de libération. Dans le cas des NPs « Clickées » avec CuBr le coefficient D est similaire à celui des particules « non Clickées » dans le PBS, alors qu'il est 3 fois plus faible dans le DMEM (à ce jour nous n'avons pas d'explication). D'une manière générale, les coefficients de diffusion des NPs « Clickées » avec CuSO₄/AAsc sont 6 fois plus faibles que les autres et sont donc reliés à la quantité initiale de DOX dans le cœur des NPs. Plus le taux de charge est important, plus la diffusion du PA hors des NPs est rapide. Dans la littérature ¹⁰ le coefficient de diffusion dans le PBS de la DOX hors de NPs composées d'un cœur de Poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) et de diamètre compris entre 100 et 300nm a été estimé à 3 10⁻²¹ m²/s, ce qui est comparable aux valeurs que nous avons déterminées.

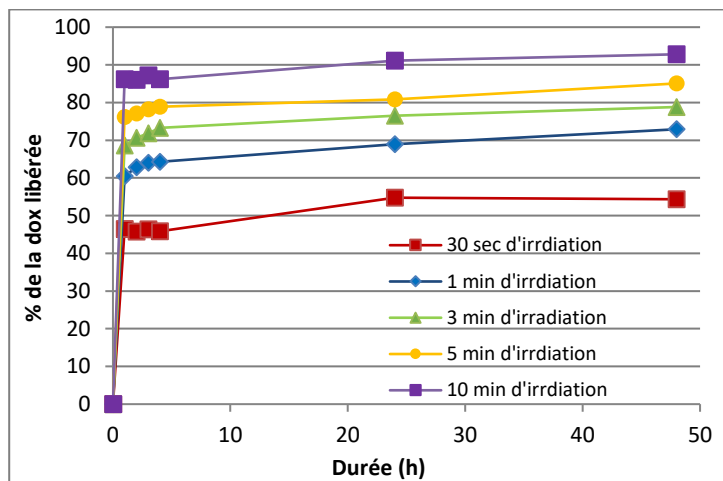
Actuellement, sauf omission de notre part, aucune étude des profils de libération d'un autre PA encapsulé dans le cœur PANB de NPs n'est disponible dans la littérature. Au cours de ces travaux nous n'avons pas évalué la possible porosité des NPs élaborées par ce procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique mais des NPs à cœur PLA élaborées par le même procédé au LCPM n'ont jamais montré de porosité significative.

3) Libération provoquée par irradiation UV

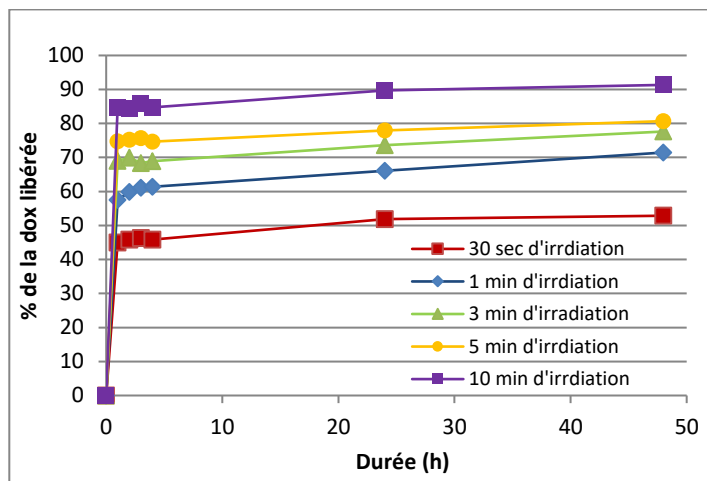
La libération provoquée de la DOX encapsulée dans les NPs à cœur PANB a été étudiée sous l'effet de l'irradiation UV. Le polymère constituant le cœur des NPs (PANB) est en effet connu pour être photosensible. Ainsi, sous l'effet de l'irradiation, les NPs se photolysent et se « dissolvent » progressivement dans le milieu ce qui contribue à la libération de la DOX.

Pour cette expérience, une seule puissance d'irradiation a été utilisée (54 mW/cm²). Cette puissance d'irradiation a été sélectionnée lors des tests biologiques réalisés sur les cellules Caco-2 et qui seront présentés dans le chapitre suivant. En appliquant cette puissance d'irradiation, nous avons montré qu'il y a très peu de mort cellulaire (aucune mort cellulaire

après 30 secondes d'irradiation à cette puissance par exemple). Les profils de libération photo-induite de la DOX hors des différents types de NPs (NPs « non Clickées », NPs « Clickées » CuBr et NPs « Clickées » CuSO₄/AAsc) sont présentés dans la Figure 80. La durée d'irradiation est variable (30 s à 10 min) et la quantité de DOX libérée est estimée immédiatement après l'irradiation, puis pendant plus de 48 heures (Figures 81 et 82).

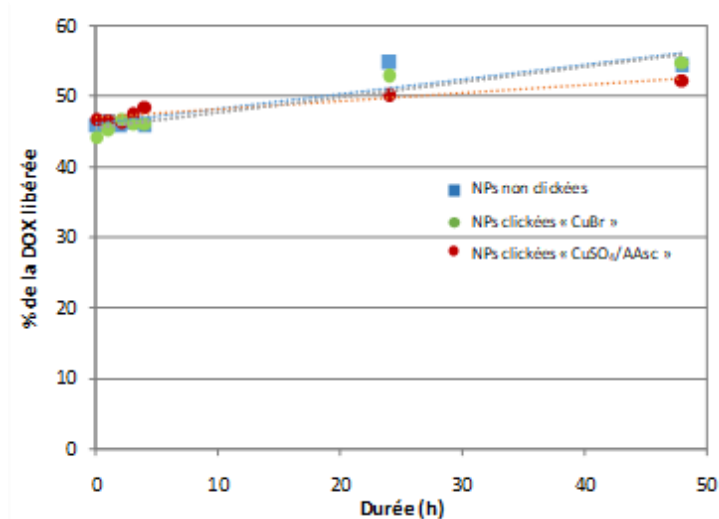


(a)

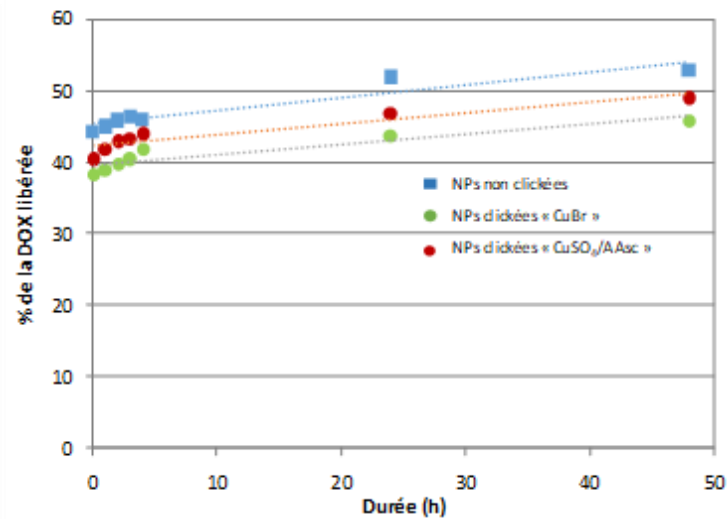


(b)

Figure 80 : Profils de libération de la DOX hors des NPs « non Clickées » à 37°C sous l'effet de l'irradiation à 54mW/cm² pour différents temps d'irradiation (a) dans le PBS et (b) dans le DMEM



(a)



(b)

Figure 81 : Profils de libération de la DOX hors des NPs « non Clickées », des NPs « Clickées » CuBr et des NPs « Clickées » CuSO₄/AAsc après 30 secondes d'irradiation à 54 mW/cm² à 37°C (a) dans le PBS et (b) dans le DMEM

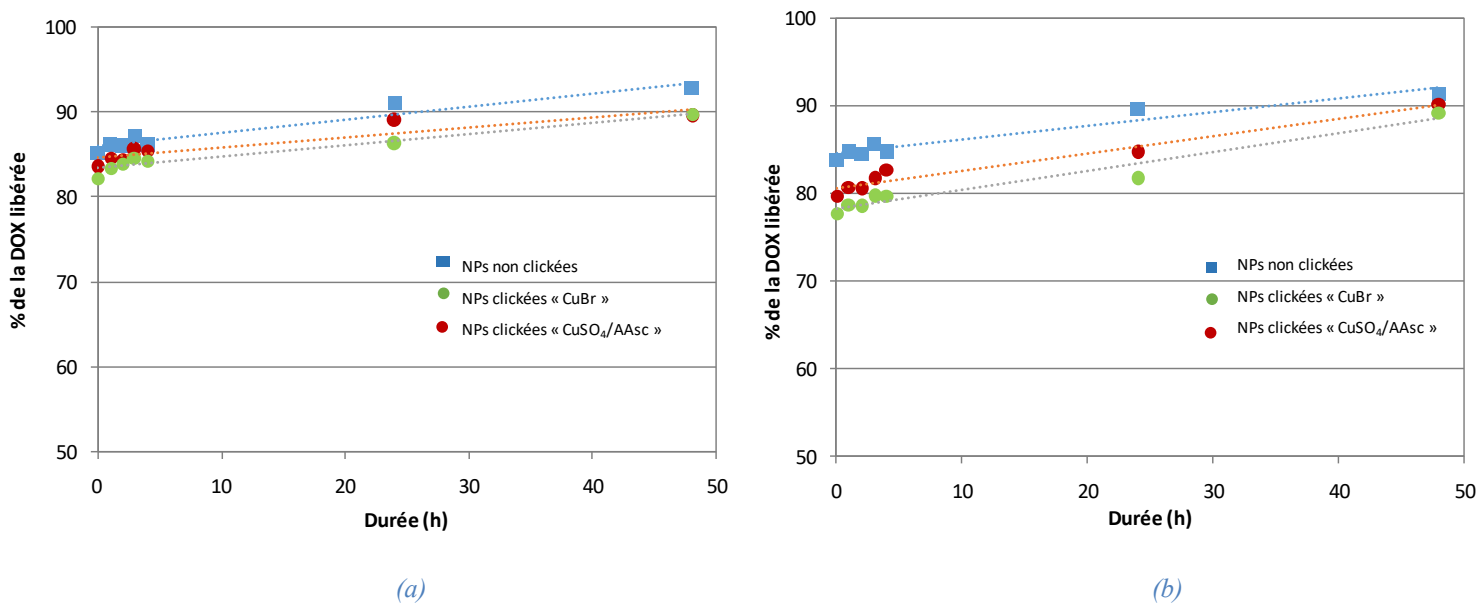


Figure 82: Profils de libération de la DOX hors des NPs « non Clickées », des NPs « Clickées » CuBr et des NPs Clickées CuSO₄/AAsc après 10 minutes d'irradiation à 54 mW/cm² à 37°C (a) dans le PBS et (b) dans le DMEM

Dans le cas des NPs « non Clickées », une irradiation de 30 secondes à 54 mW/cm² permet de libérer immédiatement 44 % (27,6 μM) de la DOX initialement encapsulée dans le cœur PANB des NPs que le milieu de libération soit le PBS ou le DMEM (Figure 80). Un suivi de la libération progressive de la DOX hors des NPs irradiées 30 secondes a été réalisé et on peut voir que la DOX continue à diffuser lentement hors des NPs pour atteindre 53 % (33,3 μM) de DOX libérée après 48h (Figure 80). Cette libération progressive après irradiation a été observée quelle que soit la durée d'irradiation de ces NPs « non Clickées ». Plus la durée initiale d'irradiation est importante, plus la quantité de DOX libérée est élevée, en accord avec le caractère photosensible du PANB. En effet nous avons montré que plus la durée de l'irradiation était importante, plus l'hydrolyse des chaînes PANB était rapide ¹¹. Par conséquent, plus l'irradiation est longue, plus la destruction des NPs est rapide d'où une libération rapide de la DOX. Ainsi, après 10 minutes d'irradiation initiale, la quantité de DOX libérée sur 48 heures est de 84 % (52,9 μM) (Figure 80). Cependant, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, cette dernière durée d'irradiation n'est pas envisageable pour le traitement du cancer colorectal.

Pour chaque type de NPs (« non Clickées », « Clickées » CuBr ou CuSO₄/AAsc), les profils de libération de la DOX dans le PBS ou dans le DMEM sont très similaires (Figures 81 et 82). Ceci montre que la libération de la DOX ne dépend essentiellement que de la durée

d'irradiation UV et que la présence de la CuAAC interfaciale ne semble pas altérer la photolibération de la DOX. Rappelons que la quantité de DOX libérée par irradiation reste toujours inférieure à ses solubilités maximales dans les deux milieux de libération.

V) CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Dans ce chapitre, l'encapsulation d'un anticancéreux modèle (doxorubicine, DOX) au sein des NPs à cœur PANB, puis sa libération, ont été étudiées. Ces NPs ont été préparées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique, couplé ou non à une réaction de chimie « Click » CuAAC interfaciale.

Dans la première partie de ce chapitre, la solubilité de la DOX dans le solvant organique (DCM) utilisé dans le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique a été tout d'abord évaluée. Puis la stabilité de la DOX sous les conditions d'élaboration des NPs a été vérifiée. Au final, une étude paramétrique de l'encapsulation de la DOX dans les NPs a été menée. Concernant l'encapsulation de la DOX, un certain nombre de points peuvent être mentionnés :

- En conservant les rapports volumiques eau/DCM et une concentration (PANB+DOX) constante dans la phase organique, l'augmentation de la fraction massique en DOX dans la phase organique employée lors de la formulation des NPs entraîne une augmentation du diamètre moyen de NPs et du taux de charge dans celles-ci. En revanche, pour conserver des NPs dont le diamètre moyen ne dépasse pas les 300 nm, il ne faut dépasser une fraction massique initiale de DOX dans la phase organique supérieure à 35,89 %. Pour une fraction massique initiale de DOX dans la phase organique égale à 50 % par exemple le diamètre moyen des NPs est supérieur à 900 nm
- L'encapsulation de la DOX sous sa forme neutralisée (préalablement traitée avec de la triéthylamine) améliore nettement le taux de charge de ce PA dans les NPs.
- L'encapsulation de la DOX n'est enfin pas influencée par la réaction de chimie « Click » CuAAC interfaciale en utilisant le CuBr comme catalyseur. En revanche, l'utilisation du système CuSO₄/AAsc comme catalyseur de cette CuAAC entraîne une diminution de la quantité de DOX encapsulée dans les NPs, probablement lié à l'acide ascorbique qui acidifie l'émulsion et dégrade la DOX.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, la libération de la DOX hors des NPs a été suivie par deux mécanismes : la libération par simple diffusion et la libération déclenchée par

irradiation UV. Pour ces expériences, deux milieux de libération ont été retenus (le PBS et le DMEM) afin d'étudier l'influence du milieu de libération sur la cinétique de libération de la DOX. Diverses NPs ont alors été étudiées, les NPs « non Clickées » et « Clickées » en utilisant CuBr ou CuSO₄/AAsc comme catalyseur de CuAAC. Nous avons observé que quelles que soit la libération par simple diffusion était plus rapide dans le PBS que dans le DMEM, en accord avec la solubilité limitée de la DOX dans ce milieu de culture. Cependant, mais que la quantité de DOX libérée restait inférieure à 20 % après 48 h de diffusion. En utilisant les modèles théoriques de libération d'un PA à partir d'objets polymères, les coefficients de diffusion (D) de la DOX hors du cœur PANB des NPs ont pu être estimés. Le D estimé pour les NPs « non Clickées » et « Clickées » avec CuBr sont du même ordre de grandeur dans le PBS ($\sim 1.10^{-21}$ m²/s), mais est plus faible dans le cas des NPs « Clickées » avec CuSO₄/AAsc, en relation avec la faible quantité de DOX encapsulée dans les NPs sous ces conditions opératoires.

Enfin, lorsque la libération de la DOX est déclenchée sous irradiation UV, un certain nombre de points peuvent être mentionnés :

- Pour une même puissance d'irradiation la libération de la doxorubicine est accélérée avec l'augmentation de la durée d'irradiation : plus on augmente la durée de l'irradiation plus la libération de la DOX est prononcée.
- La présence de la chimie Click interfaciale lors du procédé d'élaboration des NPs n'affecte pas le profil de libération de la DOX.
- Une diffusion lente mais maintenue de la DOX est observée après l'irradiation des NPs, quel que soit le type de NPs étudiées.
- Le milieu de libération ne semble pas affecter le profil et la cinétique de libération de la DOX.

Ainsi, après seulement 30 secondes d'irradiation à 54 mW/cm², plus de 40 % (25,2 μM) de la DOX initialement encapsulée dans le cœur PANB des NPs est libérée immédiatement, alors que cette quantité n'était même pas atteinte après 48 h d'incubation par simple diffusion.

Ces observations confirment le caractère photosensible des particules à cœur PANB qui se solubilisent et se dégradent sous irradiation UV, entraînant une libération photodéclenchée de la DOX encapsulée.

VI) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Mohan, P.; Rapoport, N. Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking. *Mol. Pharm.***2010**, *7* (6), 1959–1973.
- (2) Chen, C.-T.; Wang, Z.-H.; Hsu, C.-C.; Lin, H.-H.; Chen, J.-H. In Vivo Protective Effects of Diosgenin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Nutrients***2015**, *7* (6), 4938–4954.
- (3) Mayer, L. D.; Tai, L. C.; Bally, M. B.; Mitilenes, G. N.; Ginsberg, R. S.; Cullis, P. R. Characterization of Liposomal Systems Containing Doxorubicin Entrapped in Response to PH Gradients. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.***1990**, *1025* (2), 143–151.
- (4) Gerweck, L. E. Tumor PH Controls the in Vivo Efficacy of Weak Acid and Base Chemotherapeutics. *Mol. Cancer Ther.***2006**, *5* (5), 1275–1279.
- (5) Duan, J.; Mansour, H. M.; Zhang, Y.; Deng, X.; Chen, Y.; Wang, J.; Pan, Y.; Zhao, J. Reversion of Multidrug Resistance by Co-Encapsulation of Doxorubicin and Curcumin in Chitosan/Poly(Butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Int. J. Pharm.***2012**, *426* (1–2), 193–201.
- (6) Barichello, J. M.; Morishita, M.; Takayama, K.; Nagai, T. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Dev. Ind. Pharm.***1999**, *25* (4), 471–476.
- (7) TıǧlıAydın, R. S.; Pulat, M. 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for PH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics. *J. Nanomater.***2012**, *2012*, 1–10.
- (8) Sakai-Kato, K.; Saito, E.; Ishikura, K.; Kawanishi, T. Analysis of Intracellular Doxorubicin and Its Metabolites by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B***2010**, *878* (19), 1466–1470.
- (9) Minotti, G.; Licata, S.; Saponiero, A.; Menna, P.; Calafiore, A. M.; Di Giammarco, G.; Liberi, G.; Animati, F.; Cipollone, A.; Manzini, S.; et al. Anthracycline Metabolism and Toxicity in Human Myocardium: Comparisons between Doxorubicin, Epirubicin, and a Novel Disaccharide Analogue with a Reduced Level of Formation and [4Fe-4S] Reactivity of Its Secondary Alcohol Metabolite. *Chem. Res. Toxicol.***2000**, *13* (12), 1336–1341.
- (10) Chouhan, R.; Bajpai, A. Real Time in Vitro Studies of Doxorubicin Release from PHEMA Nanoparticles. *J. Nanobiotechnology***2009**, *7*, 5.
- (11) Soliman, S. M. A. From Photosensitive Glycopolymers to Smart Drug Delivery Systems, Université de Lorraine, 2014.

**CHAPITRE IV : POTENTIEL BIOLOGIQUE DES NANOPARTICULES
PHOTOSENSIBLES**

I) INTRODUCTION

Comme démontré dans le chapitre précédent, il est possible de préparer des NPs composées d'un cœur photosensible PANB et d'une couronne hydrophile à base d'un dérivé de dextrane et d'y encapsuler un médicament anticancéreux (DOX) qu'il est ensuite possible de libérer de façon contrôlée sous l'effet d'une irradiation UV. Cependant, il est nécessaire de vérifier le potentiel biologique de ces NPs chargées ou non en DOX. Tous les essais biologiques qui seront présentés par la suite ont été réalisés en collaboration avec l'équipe BIOPROMO du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP) à Nancy.

L'un des objectifs de ce doctorat était de faire évoluer la plateforme de NPs développées au LCPM vers la fabrication de nano-objets stimulables permettant notamment d'améliorer le traitement des cellules Caco-2, lignée cancéreuse humaine de côlon.

Pour cela, la stratégie adoptée dans cette étude a reposé sur :

- L'utilisation d'un polymère photosensible PANB pour constituer le cœur des NPs et de tirer profit du caractère photosensible de ce polymère pour libérer le médicament anticancéreux encapsulé sous simple irradiation.
- La possibilité de post-fonctionnaliser la surface des NPs via les fonctions azoture résiduelles, présentes en périphérie des NPs. Pour cela, des ligands ou peptide de reconnaissance spécifique aux cellules Caco-2 ont été évalués.

Ces nouvelles NPs élaborées devraient permettre de réaliser deux types de vectorisation :

- Une vectorisation passive des médicaments anticancéreux. Grâce à l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) (voir partie bibliographique), ces NPs peuvent traverser les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux et ainsi s'accumuler près de la tumeur, pour y libérer le médicament.
- Une vectorisation ciblée des cellules, plus spécifique en décorant la surface des nano-objets avec des ligands ou peptide ciblant les cellules Caco-2.

Dans la première partie de ce chapitre, la biocompatibilité des NPs vis-à-vis des cellules Caco-2 sera évaluée en étudiant différents types de NPs formulées (« non Clickées », « Clickées » CuBr ou CuSO₄/AAsc).

La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée à l'évaluation de la résistance à l'irradiation des cellules Caco-2. Pour cela, différentes puissances et durées d'irradiation seront testées, en renouvelant le milieu de culture afin de mimer le drainage naturel du côlon.

Après avoir déterminé l'IC₅₀ de la DOX sur les cellules Caco-2, l'étude de la libération *in vitro* de la DOX encapsulée au sein des diverses NPs a fait l'objet de la troisième partie de ce chapitre.

La dernière partie de ce chapitre sera enfin dédiée à la post-fonctionnalisation des NPs avec des ligands ou peptides de ciblage. Pour cela, la synthèse d'un peptide de ciblage et l'introduction en surface des NPs, de ce peptide ou de divers ligands (acide folique (AF) et mannose (Man)) seront décrites. Des essais de libération *in vitro* de la DOX hors des NPs post-fonctionnalisées seront présentés.

II) ÉVALUATION DE LA BIOCOMPATIBILITÉ DES NANOPARTICULES

1) Effet du tréhalose

Afin de stocker les NPs sous leur forme solide par lyophilisation, il est nécessaire de recourir à la présence d'un cryoprotecteur (tréhalose) qui évite l'agrégation des NPs recouvertes de dextrane. L'effet du tréhalose sur la viabilité des cellules Caco-2 a donc logiquement été étudié avec des concentrations variables de tréhalose de 62,5 jusqu'à 2000 µg/mL.

L'évaluation de cette viabilité cellulaire a été réalisée par test Méthylthiazoltétrazolium (MTT) normalisé par comptage des cellules dans les différents puits rapportés aux conditions témoins (qui correspondent à 100 % d'activité mitochondriale, voir partie expérimentale).

Les résultats présentés dans la Figure 83 correspondent aux valeurs obtenues après exposition des cellules Caco-2 au tréhalose pendant 24 et 48 h. Ces résultats montrent que l'activité mitochondriale (test MTT) des cellules Caco-2 est indépendante de la concentration en tréhalose et donc que le tréhalose n'a aucun effet cytotoxique sur les cellules Caco-2. Au contraire, après 48 h d'incubation et dès 500 µg/mL de tréhalose, une viabilité cellulaire dépassant 120%, a été observée, indiquant que les cellules peuvent utiliser le tréhalose comme source de carbone.

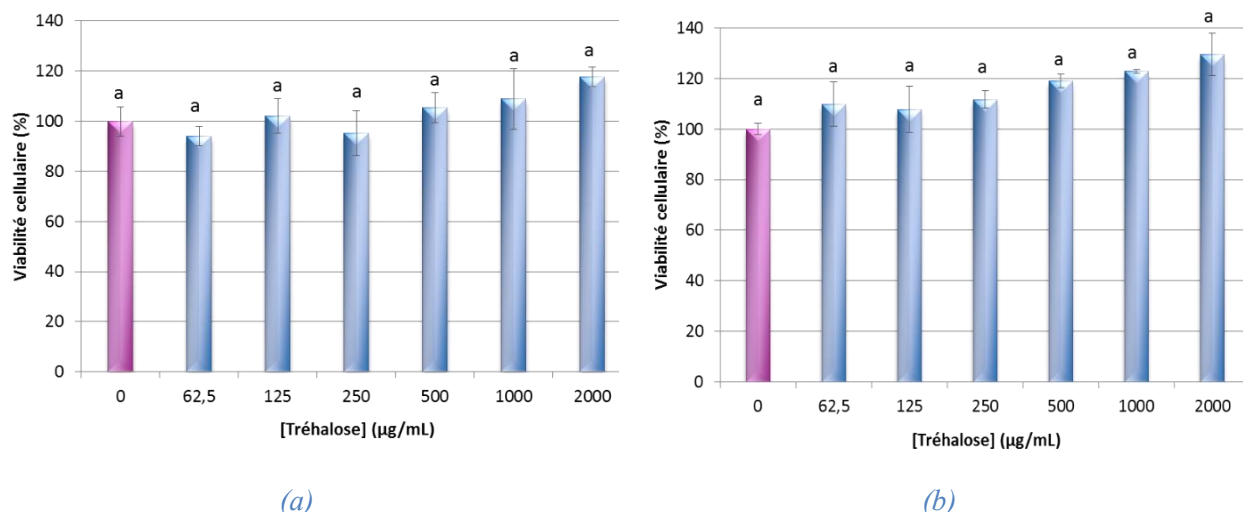


Figure 83 : Etude de la viabilité des cellules Caco-2 en présence de différentes concentrations de tréhalose, dosage MTT après (a) 24 h et (b) 48 h. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative ($n=3$).

2) Evaluation de la cytotoxicité des nanoparticules vides

La première expérience réalisée sur les cellules Caco-2 a consisté à étudier la cytotoxicité des NPs vides en incubant différentes concentrations de NPs (jusqu'à 227 µg/mL) pendant 24 h ou 48 h au contact de ces cellules (densité cellulaire 10^4 cellules/puits).

Pour chaque lot de NPs (NPs « non Clickées », NPs « Clickées » CuBr ou CuSO₄/AAAsc), ces tests de cytocompatibilité ont permis de déterminer la concentration maximale en NPs pouvant par la suite être employée. Les résultats présentés dans les Figures 84 et 85 correspondent respectivement aux valeurs obtenues après 24 et 48 h d'incubations, respectivement. Les résultats obtenus sont les suivants :

- Quel que soit le type de NPs et la concentration testée, aucun effet cytotoxique important n'a été observé après 24 et 48 h d'incubation. Plus précisément, aucune cytotoxicité n'a été observée pour des concentrations en NPs allant jusqu'à 114 µg/mL, quel que soit le type de NPs. Ceci montre que l'utilisation d'un catalyseur à base de cuivre ne perturbe pas la viabilité des cellules Caco-2. Rappelons que le taux de cuivre résiduel que nous avons déterminé par ICP dans les NPs « Clickées » purifiées étaient respectivement de 0,76 ppm dans le cas du système CuSO₄/AAAsc et 1,89 ppm dans le cas de CuBr soit bien inférieur à la dose journalière admissible (DJA)(voir plus de détails dans le chapitre II). Cependant, une légère diminution de la viabilité cellulaire a été observée pour la concentration la plus élevée des NPs « Clickées ». Toutefois, ces résultats sont encore parfaitement acceptables, puisque supérieurs à 80 % de viabilité.

À la vue de ces résultats, la concentration des NPs sélectionnée pour mener les futures expériences réalisées sur les cellules Caco-2 a été fixée à 114 $\mu\text{g/mL}$.

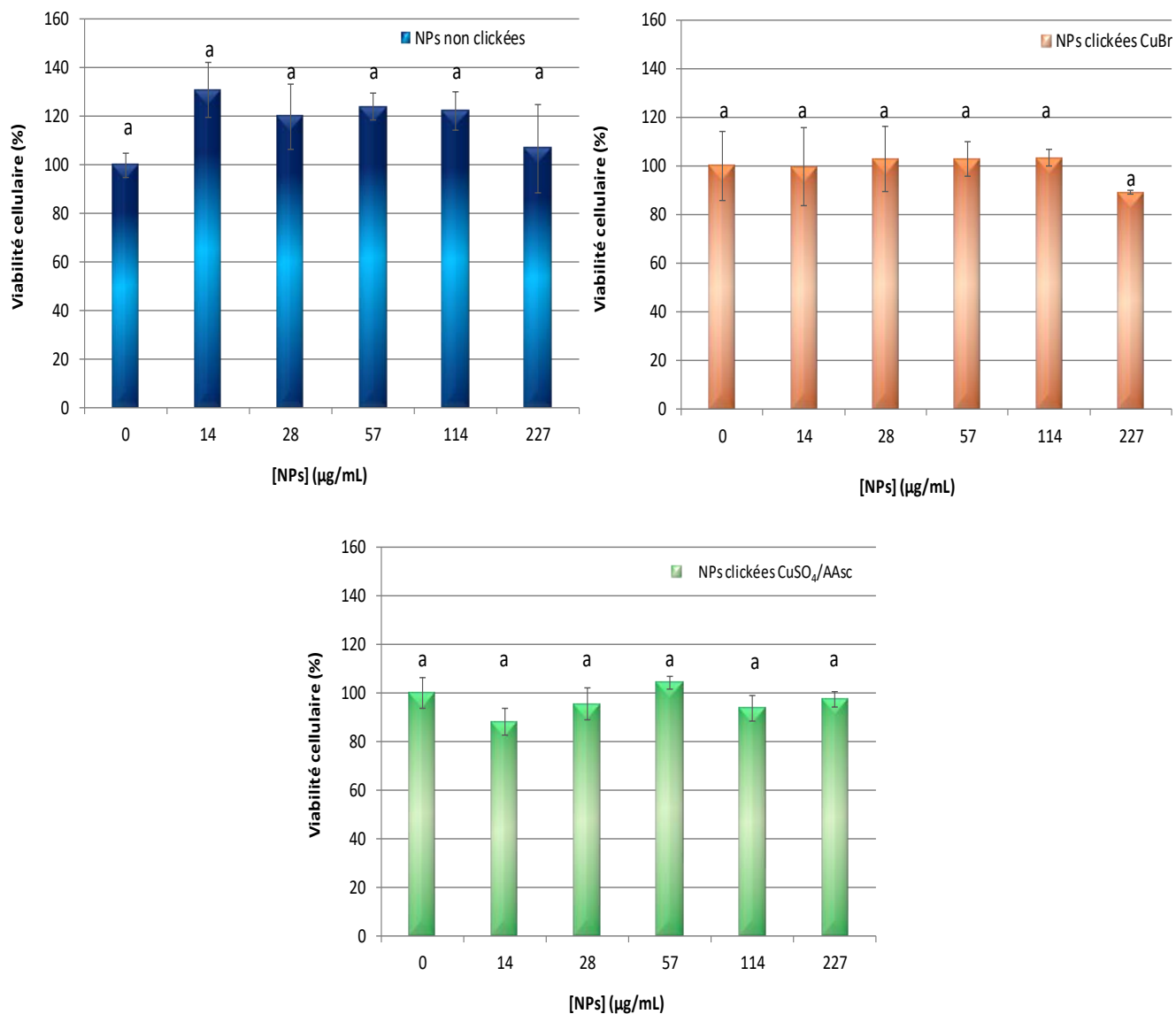


Figure 84 : Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence de différentes concentrations en NPs (« non Clickées », « Clickées » CuBr et « Clickées » CuSO₄/AAc) après 24 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative ($n=3$).

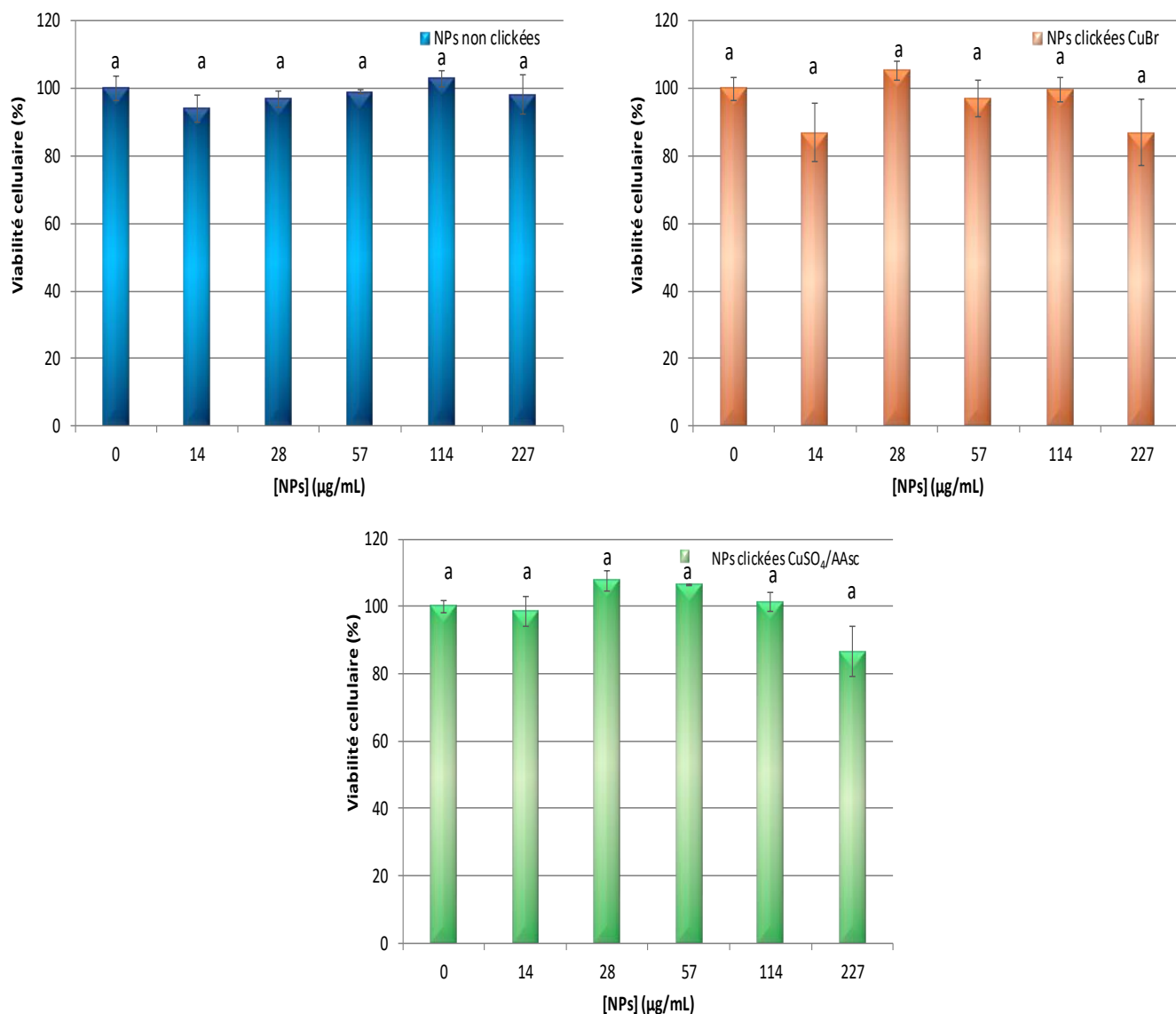


Figure 85 : Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence de différentes concentrations en NPs (« non Clickées », « Clickées » CuBr et « Clickées » CuSO₄/AAsc) après 48 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative ($n=3$).

III) ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE DES CELLULES CACO-2 A L'IRRADIATION

1) Irradiation des cellules Caco-2 seules

Comme les NPs décrites dans ce manuscrit possèdent un caractère photosensible et peuvent être photolysées par irradiation, il nous a semblé opportun d'évaluer la résistance des cellules Caco-2 face à l'irradiation UV. Pour cela la lampe UV utilisée délivre une lumière dans la gamme 320-390 nm, avec une puissance et une durée d'irradiation variables (voir partie expérimentale). Ainsi, pour chaque puissance, les cellules Caco-2 ont été exposées à

différentes durées d'irradiation, puis incubées à 37°C sous atmosphère contrôlée pendant 24 et 48 h avant de réaliser les tests MTT. La Figure 86 montre l'évolution de la viabilité des cellules Caco-2 après irradiation et après 24 et 48h d'incubation. Les données obtenues à partir de ces résultats sont les suivantes :

- Pour la plus faible puissance d'irradiation (54 mW/cm²) et des durées d'irradiation inférieures à 3 minutes, la viabilité des cellules Caco-2 après 24 h d'incubation reste supérieure à 80 % par rapport aux cellules non irradiées (témoins). Cependant, cette viabilité chute à 60 % après 5 minutes d'irradiation à cette même puissance. En revanche, après 48 h d'incubation, l'activité mitochondriale des cellules Caco-2 irradiées chute sévèrement dès lors que la durée d'irradiation est supérieure à 30 secondes. Ainsi, la viabilité des cellules Caco-2 irradiées 30 secondes à 54 mW/cm² est encore de 100 % après 48 h d'incubation mais chute à 40 % seulement si l'irradiation initiale dure 60 secondes, même à cette faible puissance.
- Pour une puissance d'irradiation intermédiaire (245 mW/cm²) et après 24 h d'incubation, on observe une diminution progressive de la viabilité cellulaire avec la durée d'irradiation. En revanche après 48 h d'incubation et quelle que soit la durée d'irradiation, cette puissance est néfaste puisque la viabilité cellulaire chute de 40 % à 20 %.
- Pour une puissance plus élevée (500 mW/cm²), la baisse de l'activité mitochondriale des cellules Caco-2 est visible dès 24 h d'incubation, quelle que soit la durée d'irradiation.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que les cellules Caco-2 résistent jusqu'à 3 minutes sous faible puissance d'irradiation (54 mW/cm²) puisque la viabilité cellulaire déterminée après 24 h d'incubation est égale à 80 %. Cependant, après 48 h d'incubation, seules 30 secondes d'irradiation à cette même puissance restent acceptables en termes de viabilité cellulaire. Aussi, la puissance d'irradiation retenue pour mener les futures expériences est fixée à 54 mW/cm².

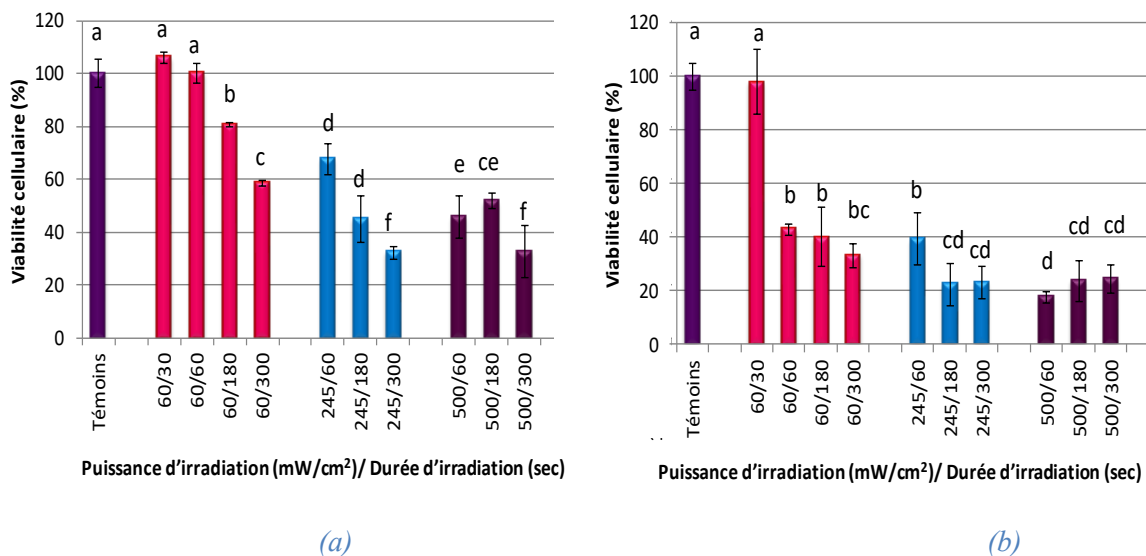


Figure 86 : Etude de la viabilité des cellules Caco-2 irradiées avec différentes puissances et durées d'irradiation. Dosage MTT effectué après (a) 24 h et (b) 48 h. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative ($n=3$).

2) Effet du changement du milieu de culture

Pour mimer le drainage naturel du côlon, nous avons étudié le renouvellement du milieu de culture. Pour cela les cellules Caco-2 sont irradiées à 54 mW/cm² pendant différentes durées, puis incubées pendant 4 h sous atmosphère contrôlée à 37°C. Après ces 4 h, le milieu de culture est renouvelé puis l'incubation des cellules Caco-2 est menée pendant 24 ou 48 h avant d'effectuer les tests MTT.

L'influence de ce changement de milieu de culture sur la viabilité cellulaire des Caco-2 irradiées est présentée dans la Figure 87.

Après 24 h d'incubation, 30 secondes ou 1 minute d'irradiation n'ont aucun effet sur la viabilité cellulaire. Dans le cas d'une irradiation de 3 minutes, ce renouvellement du milieu de culture est bénéfique puisque la viabilité cellulaire passe de 80 à 90%. Cette amélioration de la viabilité cellulaire est encore plus flagrante si les cellules Caco-2 sont irradiées pendant 5 minutes (gain de 20% par rapport aux témoins, c'est-à-dire sans changement du milieu de culture).

Lorsque le dosage MTT est réalisé après 48 h d'incubation, ce renouvellement du milieu de culture permet de gagner plus de 50% de viabilité cellulaire dans certains cas, quelle que soit la durée d'irradiation, et d'observer alors une viabilité cellulaire entre 85 et 100%.

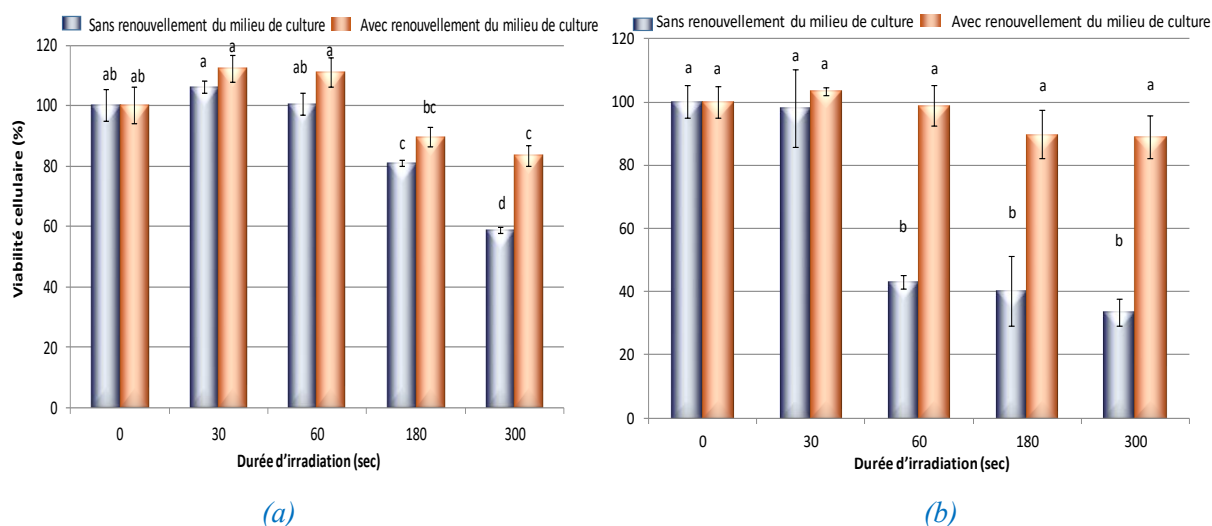


Figure 87 : Effet du changement du milieu de culture 4 h après l'irradiation (54 mW/cm²). Dosage MTT (a) après 24 h et (b) après 48 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative ($n=3$).

3) Irradiation des cellules Caco-2 en présence des NPs

Les expériences précédentes ont été réitérées en présence de NPs « non Clickées » élaborées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant. La concentration des NPs dans chaque puit de culture est alors égale à 114 $\mu\text{g/mL}$ et le milieu de culture est comme précédemment renouvelé 4 h après irradiation. Dans ce cas, les « témoins » correspondent à des cellules Caco-2 incubées en présence des NPs. Les résultats sont présentés dans la Figure 88. Après 24 h d'incubation on peut remarquer que la présence des NPs et le renouvellement du milieu de culture permet de maintenir 100 % de viabilité cellulaire, même après 3 minutes d'irradiation à 54 mW/cm². En revanche, après 5 minutes d'irradiation des cellules Caco-2 en présence des NPs, le renouvellement du milieu de culture n'est pas suffisant pour assurer une viabilité cellulaire qui chute alors à 40 %. Après 48 h d'incubation, l'amélioration de la viabilité cellulaire est nette pour les courtes durées d'irradiation (30 secondes et 1 minute). Ainsi, dans ces deux cas, le renouvellement du milieu de culture permet d'accroître la viabilité cellulaire d'environ 40-50 % à 100 %. Cependant, pour des durées d'irradiation plus longues, ce changement du milieu de culture ne permet pas de maintenir une viabilité cellulaire suffisante. À la vue de ces résultats, il est possible de conclure que le renouvellement du milieu de culture 4 h après irradiation des cellules Caco-2 en présence des NPs, améliore la viabilité pour des courtes durées d'irradiation. Ainsi, après 24 h d'incubation, les cellules Caco-2 peuvent supporter jusqu'à 3 minutes d'irradiation en présence des NPs et après 48 h d'incubation jusqu'à 1 minute d'irradiation.

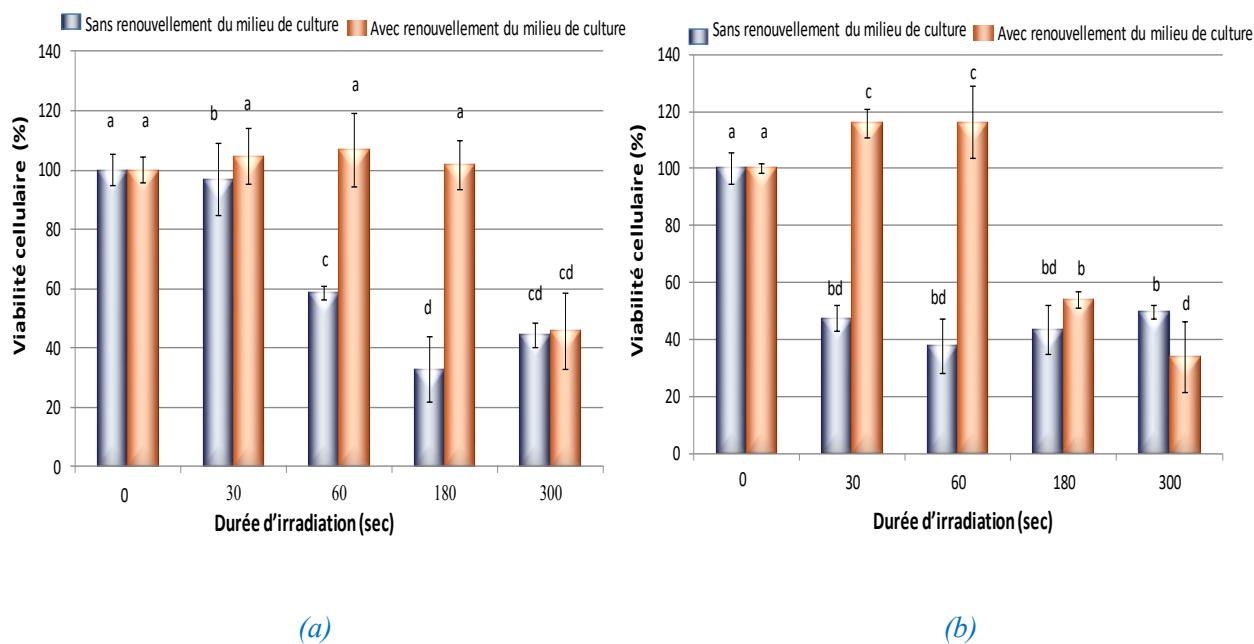


Figure 88 : Effet du changement du milieu de culture 4 h après l'irradiation (54 mW/cm^2) des cellules Caco-2 en présence des NPs « non Clickées ». Dosage MTT (a) après 24 h et (b) après 48 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative ($n=3$).

IV) LIBÉRATION *IN VITRO* DE LA DOXORUBICINE AU CONTACT DES CELLULES CACO-2

Dans le chapitre précédent, la formulation et les caractérisations de NPs « Clickées » ou non, contenant la DOX ont été exposées. La libération de la DOX hors des NPs par simple diffusion ou provoquée par l'irradiation UV a également été exposée. Dans la continuité des expériences réalisées sur les cellules Caco-2, nous avons étudié la libération de la DOX *in vitro*.

1) Détermination de l'IC₅₀ de la DOX sur les cellules Caco-2

Avant d'étudier la libération *in vitro* de la DOX sur les cellules Caco-2, la cytotoxicité de la DOX sur ces cellules a été évaluée. Les cellules Caco-2 sont ainsi traitées avec de la DOX (DOX, HCl préalablement neutralisé avec de la triéthylamine) et ayant subi les différentes conditions d'émulsification. Puis, différentes concentrations de DOX ont été incubées avec les cellules Caco-2 pendant 4 h, avant d'effectuer un renouvellement du milieu de culture afin de mimer le drainage naturel du côlon. Les cellules Caco-2 sont ensuite à nouveau incubées pendant 24 h avant de réaliser le test MTT. Les résultats de cette expérience sont regroupés dans la Figure 89 et montrent clairement que plus la concentration de DOX augmente plus la viabilité cellulaire diminue, en accord avec l'effet anticancéreux de

cette molécule. Ainsi, lorsque les cellules Caco-2 sont traitées avec 26 μM de DOX, que le milieu de culture est renouvelé 4 h après contact avec la DOX puis incubation de 24 h, leur viabilité cellulaire chute de près de 50 %. Selon la Figure 89, l' IC_{50} correspond à la concentration inhibitrice médiane (quantité d'un médicament nécessaire pour inhiber à moitié un processus biologique donné) peut être estimée plus précisément à 33 μM .

Cette valeur de l' IC_{50} déterminée expérimentalement pour des cellules Caco-2, à un passage égal à 55 et une densité cellulaire de $2 \cdot 10^4$ cellules/mL par puits, est du même ordre de grandeur que les résultats trouvés dans la littérature. Ainsi, certains auteurs ont rapporté une IC_{50} de 78 μM ¹ après 4 h d'incubation de la DOX avec les cellules Caco-2 et d'autres travaux ont montré que l' IC_{50} varie entre 3 μM et 16 μM après 24 h d'incubation avec de la DOX²⁻⁴.

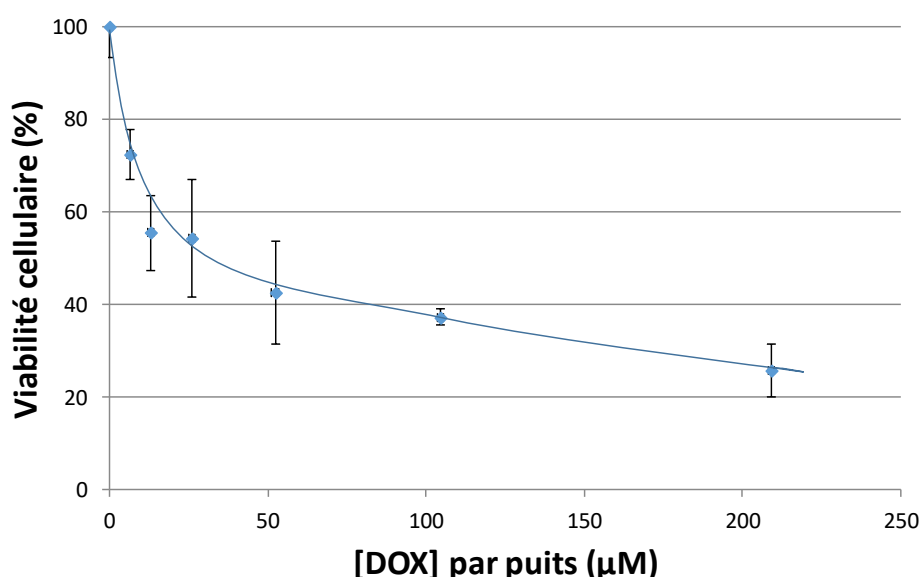


Figure 89 : Détermination de la viabilité des cellules Caco-2 après traitement avec de la DOX neutralisée et après renouvellement du milieu de culture 4 h après le traitement. Dosage MTT après 24 h d'incubation ($n=3$).

2) Etude des différents types de NPs et de libération

Après avoir déterminé expérimentalement l' IC_{50} de la DOX sur les cellules Caco-2, une étude de libération *in vitro* de la DOX à partir de différents types de NPs a été menée en fonction de la durée d'irradiation. Pour cette expérience, la densité cellulaire, la concentration des NPs et la puissance d'irradiation sont les mêmes que les expériences précédentes. Le milieu de culture a été renouvelé 4 h après l'irradiation des NPs, comme précédemment. Les taux de charge des différentes NPs sont les suivants : 33 % dans le cas des NPs « non Clickées », 29 % dans le cas des NPs « Clickées » CuBr et 11 % dans le cas des

NPs « Clickées » CuSO₄/AAsc. Après irradiation et renouvellement du milieu de culture, les cellules Caco-2 sont incubées 24 h ou 48 h à 37°C et sous atmosphère contrôlée. Les résultats de la libération *in vitro* de la DOX par simple diffusion (irradiation = 0 seconde) ou photodéclenchée par irradiation UV sont regroupés dans les Figures 90 et 91. Ces résultats montrent tout d'abord que dans le cas des NPs « non Clickées » et n'ayant pas été irradiées, une mortalité cellulaire d'environ 20 % est observée après 24 h d'incubation. Ceci correspond à la libération de la DOX hors de ces NPs par simple diffusion pendant 24 h soit une concentration de 7 µM (voir chapitre III). Ces résultats sont sensiblement les mêmes quel que soit le type de NPs testé, en accord avec les résultats que nous avons pu observer quant à la diffusion simple de la DOX hors des différentes NPs. L'irradiation des NPs « non Clickées » pendant 30 secondes et 1 minute à une puissance de 54 mW/cm² entraîne une chute de la viabilité cellulaire d'environ 50 % après 24 h d'incubation (Figure 90). Ceci est en accord avec la libération photo-déclenchée de la DOX (31 µM après 30 secondes d'irradiation et 41 µM après 1 minute d'irradiation). Pour des durées d'irradiation plus élevée (3 minutes et 5 minutes), la viabilité cellulaire ne dépasse pas 30%. Ceci montre bien l'effet de la libération de la DOX provoquée par irradiation des NPs. La concentration en DOX dans les puits de culture est alors égale à 46 et 49 µM après 3 et 5 minutes d'irradiation, respectivement.

Pour les NPs « Clickées » CuBr, l'effet de la libération de la DOX provoquée par l'irradiation est comparable à celle des NPs « non Clickées ». Ceci est probablement dû au fait que ces deux types de NPs présentent des taux de charge similaires et que la CuAAC interfaciale n'influence pas la libération de la DOX. En revanche, l'effet de la libération photodéclenchée de la DOX hors des NPs « Clickées » CuSO₄/AAsc est moins visible que dans les deux cas précédents, probablement dû au taux de charge plus faible de la DOX dans ce type de NPs.

Après 48 h d'incubation (Figure 91), la libération de la DOX hors des NPs « non Clickées » par simple diffusion est certes un peu plus importante qu'après 24 h d'incubation d'où une viabilité cellulaire inférieure à 80 % (valeur observée après 24 h d'incubation).

De ces expériences, nous pouvons conclure que les NPs composées d'un cœur photosensible PANB et d'une couronne à base de dextrane, formulées avec ou sans chimie Click interfaciale lors du procédé d'élaboration, peuvent être employées comme systèmes de délivrance d'un anticancéreux (DOX). La libération de la DOX dépend non seulement de la durée d'irradiation mais aussi du taux de charge initial de ce PA dans les NPs. Ainsi, pour des NPs présentant un taux de charge d'environ 30 % en DOX, une irradiation de 30 secondes à 54 mW/cm² suffit pour libérer suffisamment de DOX pour éradiquer environ 50 % des

cellules cancéreuses. Ces résultats sont en accord avec les profils de libération de la DOX déclenchée par l'irradiation qui donnaient une libération de 31 μM de DOX après cette durée d'irradiation, valeur proche de l' IC_{50} que nous avons pu déterminer. La simple diffusion de la DOX hors des NPs ne permet pas d'atteindre un tel résultat, même après 48 h d'incubation, comme le montre la Figure 91. En effet, après 48 h d'incubation, la concentration de DOX libérée par simple diffusion est alors de 10 μM pour les NPs « non Clickées » (voir chapitre précédent) ce qui conduit à une perte de viabilité cellulaire d'environ 30 % seulement.

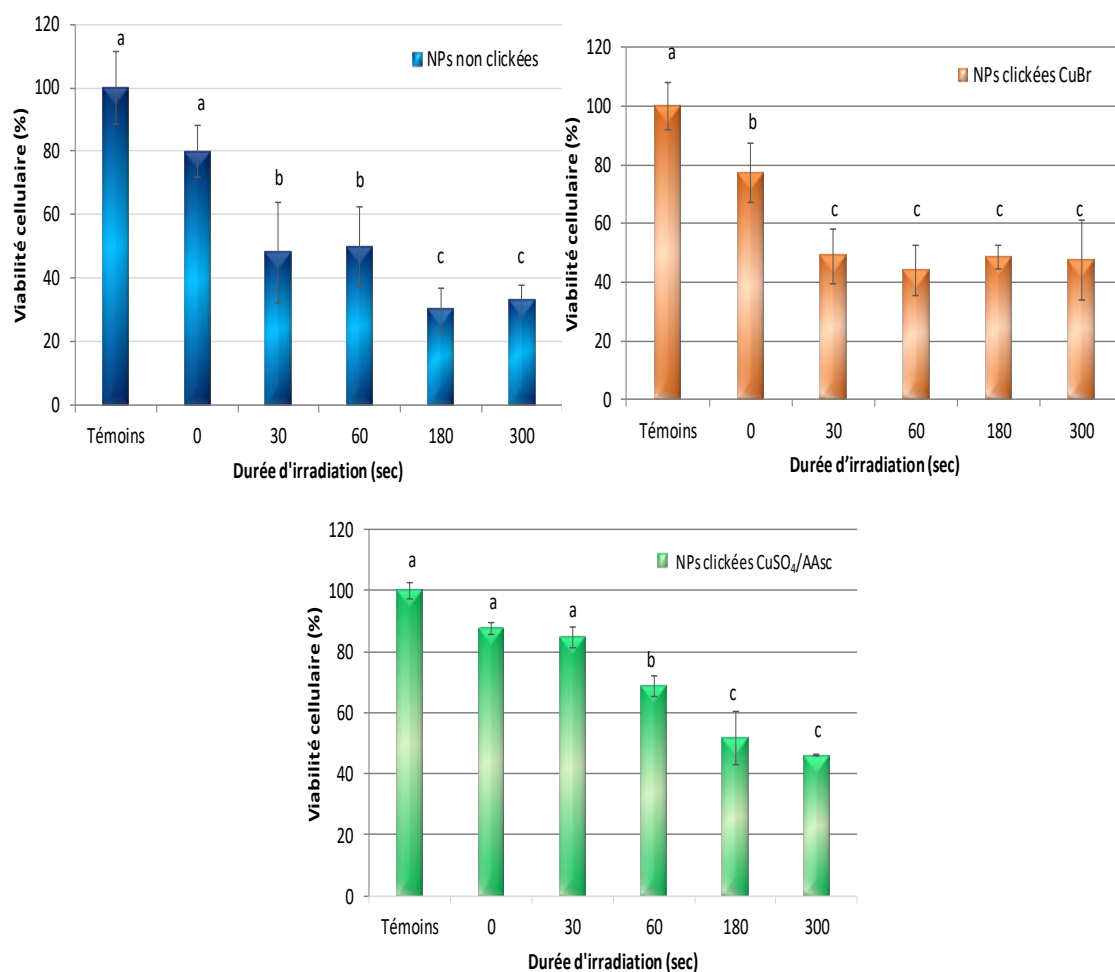


Figure 90 : Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence des différentes NPs (« non Clickées », « Clickées » CuBr et « Clickées » CuSO₄/AAsc) chargées de DOX. Etude de la durée d'irradiation (54 mW/cm²). Dosage MTT après 24 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative ($n=3$).

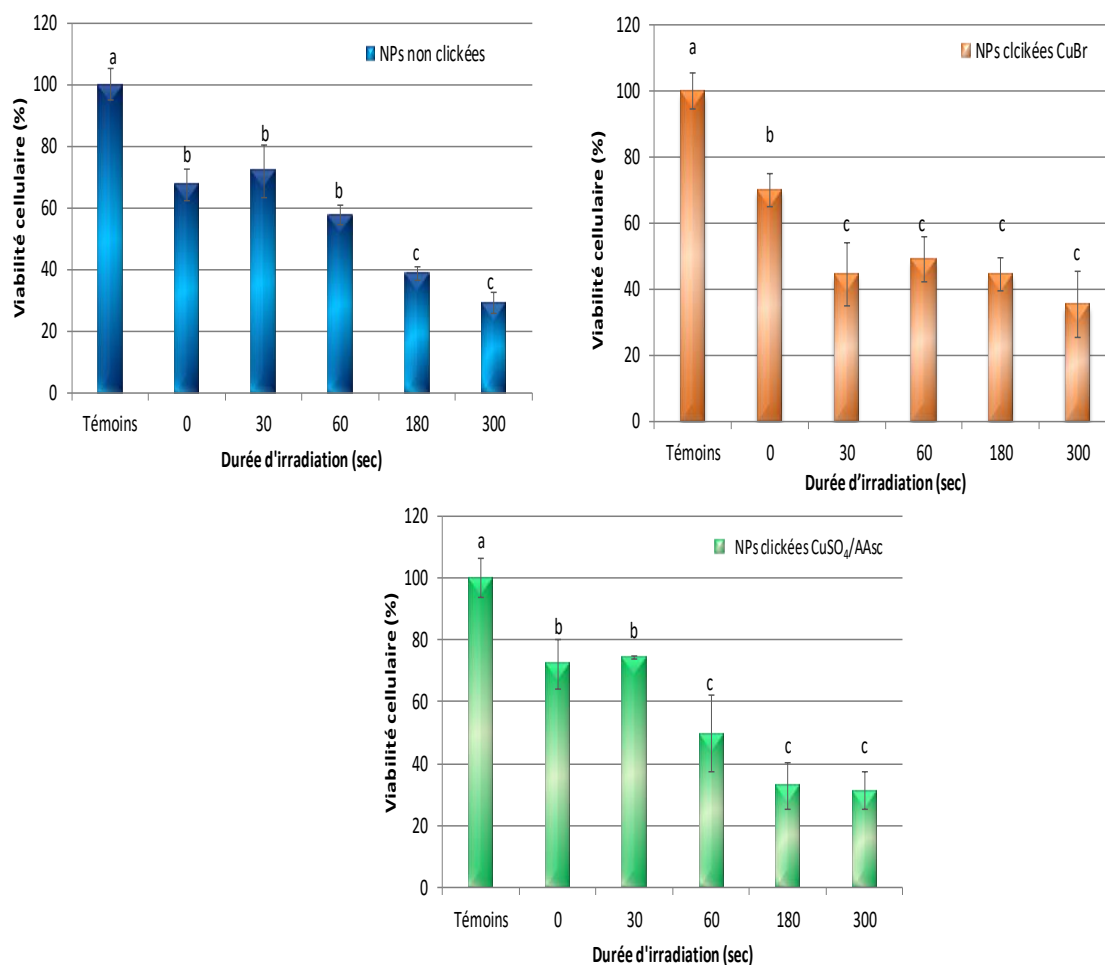


Figure 91 : Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence des différentes NPs (« non Clickées », « Clickées » CuBr et « Clickées » CuSO₄/AAsc) chargées de DOX. Etude de la durée d'irradiation (54 mW/cm²). Dosage MTT après 48 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).

V) POST-FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES EN SURFACE

Après avoir démontré la stabilité colloïdale renforcée des NPs composées d'un cœur photosensible PANB et d'une couche surfacique à base de dextrane fixée de manière covalente au cœur vis-à-vis d'un milieu salin ou en présence de tensioactifs anioniques tels que le SDS ou des protéines présentes dans le milieu de culture DMEM, le dernier objectif fixé lors de cette thèse était de produire des NPs aptes à cibler spécifiquement les cellules Caco-2. De telles NPs peuvent alors être considérées comme des particules de 3^{ème} génération. Pour cela, l'étude décrite dans ces dernières pages consiste à fixer un ligand ou un peptide ciblant les cellules cancéreuses et d'évaluer les performances biologiques des NPs chargées de DOX et ainsi post-fonctionnalisées. Les expériences décrites dans les pages qui

suivent ont été réalisées avec des NPs « Clickées » obtenues par un procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique.

1) Post-fonctionnalisation avec des ligands

Dans un premier temps, la post-fonctionnalisation des NPs a été menée avec deux molécules connues pour cibler spécifiquement des cellules cancéreuses : l'acide folique (AF) et le mannose (Man). Les cellules cancéreuses ont effectivement la particularité d'avoir des récepteurs d'acide folique et de mannose à leur surface ce qui leur permet de reconnaître spécifiquement les NPs ainsi décorées et d'améliorer l'adhésion/internalisation des NPs par les cellules, d'où un traitement plus efficace. D'une façon générale, le récepteur alpha du folate est une cible antitumorale prometteuse car il est surexprimé par 40% des cellules cancéreuses et absent sur la plupart des cellules saines⁵. La post-fonctionnalisation de la surface des NPs a été réalisée en mettant en œuvre une réaction de chimie Click entre le DexAlcyne-15 présent à la surface des NPs, et plus précisément grâce aux groupements alcyne résiduels et une fonction azoture fixée sur AF ou Man. En effet, quelques groupes alcyne demeurent intacts en surface des NPs puisque n'ayant pas réagi lors du procédé d'élaboration des NPs. Les synthèses de AF-N₃ et Man-N₃ sont décrites dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

De plus, afin de vérifier le bon déroulement des réactions de post-fonctionnalisation et compte tenu que les ligands ne sont pas juste adsorbés mais bien fixés de façon covalente à la surface des NPs par un cycle triazole produit par la réaction de chimie Click, deux expériences ont été réalisées : la 1^{ère} avec le système CuSO₄/AAsc comme catalyseur de chimie ClickCuAAC et la 2^{ème} sans ajout de CuSO₄/AAsc. Le greffage effectif de AF-N₃ ou Man-N₃ à la surface des NPs a été validé par RMN ¹H (voir Partie expérimentale). En effet, lorsque les tentatives de post-fonctionnalisation sont réalisées sans ajout de CuSO₄/AAsc, les spectres RMN ¹H ne présentent aucun pic caractéristique de AF-N₃ ou Man-N₃. A l'inverse, lorsque la post-modification est effectuée par chimie Click (ajout de CuSO₄/AAsc), on observe dans le cas de l'utilisation de AF-N₃, une quantité d'AF fixée à la surface des NPs estimée à 0,159 mg/mg de PANB (0,36 μmol d'AF/mg de PANB). Dans le cas de l'utilisation de Man-N₃, la quantité de Man fixée à la surface des NP est de 0,078 mg/mg de PANB soit 0,433 μmol de Man/mg de PANB.

Après avoir prouvé et déterminé quantitativement le taux de post-fonctionnalisation des NPs, il nous semblait important de réaliser une mesure de taille pour vérifier que la suspension conservait bien ses principales caractéristiques. Comme on peut le voir dans le

Tableau 29, le diamètre moyen des NPs après post-fonctionnalisation est tout à fait comparable à celui de la suspension initiale. On peut alors conclure que le greffage des ligands à la surface des NPs ne modifie donc pas significativement leur diamètre.

Après avoir prouvé et déterminé quantitativement le taux de post-fonctionnalisation des particules, il nous semblait important d'évaluer le diamètre des NPs pour vérifier que la suspension conservait bien ses principales caractéristiques. Comme on peut le voir dans le Tableau 29, le diamètre moyen des NPs après post-fonctionnalisation est tout à fait comparable à celui de la suspension initiale. On peut alors conclure que le greffage des ligands à la surface des NPs ne modifie donc pas significativement leur diamètre.

Tableau 29 : Caractéristiques des nanoparticules post-fonctionnalisées avec AF-N₃ ou Man-N₃, en présence ou non de CuSO₄/AAsc comme système catalytique

<i>Ligands</i>	<i>Catalyseur CuSO₄/AAsc</i>	<i>Taille moyenne (nm)</i>	<i>Pdi</i>
<i>Sans ligand</i>	-	171±1	0,075
<i>AF-N₃</i>	-	165±3	0,115
	+	176±2	0,127
<i>Man-N₃</i>	-	168±3	0,091
	+	173±3	0,132

La post-fonctionnalisation ayant été validée pour ces deux ligands, celle-ci a été testée avec un peptide de ciblage des cellules Caco-2.

2) Post-fonctionnalisation avec un peptide de ciblage

Dans la littérature ⁶, un peptide ciblant les cellules Caco-2 a été présenté ; il s'agit du dodécapeptide LETTCASLCYPS. Plusieurs tentatives de synthèse sur phase solide (résine 2-chlorotrityl) de ce peptide ont été réalisées, mais à chaque fois le rendement de la synthèse peptidique était très faible. Ceci est probablement dû aux réactions secondaires (formation de dikétopypérazine) qui peuvent avoir lieu entre les deux acides aminés P (Proline) et S (Sérine)C-terminaux. Pour contourner ce problème rencontré, la synthèse peptidique de l'undécapeptide LETTCASLCYP (sans sérine en C-terminal) a été menée à bien et sa synthèse décrite dans la partie expérimentale. Ce peptide synthétisé avec succès est ensuite modifié de manière à pouvoir in fine réagir avec les fonctions alcyne présentes dans la

surface hydrophile des NPs. Ainsi, le peptide LETTCASLCYP précédent est modifié sur son extrémité C-terminale par introduction d'une chaîne alkyle dotée d'une fonction azoture pour obtenir le peptide azidohexyl-LETTCASLCYP noté par la suite Peptide-N₃.

Après post-fonctionnalisation par CuAAC des NPs recouvertes de DexAlcyne-15 (NPs « Clickées ») par ce Peptide-N₃ et lavage à l'EDTA pour éliminer le système CuSO₄/AAsc employé, les NPs sont ensuite lavées et centrifugées. Cependant, après dissolution dans le DMSO-*d*₆, les NPs post-fonctionnalisées avec le peptide n'ont malheureusement pas pu être étudiées par RMN ¹H car il était impossible de distinguer les pics caractéristiques du peptide des pics relatifs aux constituants (PANB et DexAlcyne-15) des NPs. Pour cette raison, nous avons tenté de quantifier le peptide présent à la surface des NPs par UV. Mais là encore, nous avons été confrontés à une difficulté. Le PANB qui constitue le cœur des NPs absorbe en UV entre 200 nm et 300 nm, avec un maximum d'absorption à 265 nm. Or le Peptide-N₃ employé contient une tyrosine (Tyr, T) qui absorbe également à 280 nm. Cette absorption, sur laquelle nous pensions nous baser pour nos calculs, est alors faussée par la présence de chaînes de PANB dans le cœur des NPs. Pour contourner cette difficulté, nous avons finalement opté pour une quantification à l'aide de NPs à cœur PLA qui n'absorbe pas en UV et considéré que le même taux de modification serait obtenu quelle que soit la nature chimique du cœur des NPs.

Afin de quantifier *in fine* le peptide fixé à la surface des NPs, nous avons tout d'abord réalisé une courbe de calibration de ce Peptide-N₃ dans le DMSO (voir Partie expérimentale). Connaissant la valeur de l'absorbance pour une solution de NPs post-fonctionnalisées de concentration connue (mg/mL), la concentration du Peptide-N₃ présent en surface des NPs a pu être estimée (mg/mL). Nous avons réalisé cette analyse avec trois suspensions de NPs élaborées par émulsion-évaporation de solvant organique avec des conditions expérimentales différentes :

- NPs « Clickées » composées d'un cœur de PLA et d'une couronne de DexAlcyne-15.
- NPs « Clickées » composées d'un cœur de PLA et d'une couronne de DexAlcyne-15, lavées puis post-fonctionnalisées avec l'azidohexyl-LETTCASLCYP en utilisant le système CuSO₄/AAsc comme catalyseur (fonctionnalisation après l'élaboration des NPs).
- NPs « Clickées », lavées puis post-fonctionnalisées avec l'azidohexyl-LETTCASLCYP sans utilisation du catalyseur CuSO₄/AAsc.

Lorsque les NPs à cœur PLA sont mises en contact avec le Peptide-N₃ sans addition de CuSO₄/AAsc, aucune réaction de chimie Click ne se produit et aucune trace du peptide n'est

visible par UV après lavage des particules (Figure 92). Cependant, une absorption UV caractéristique du peptide (la tyrosine absorbe à 280 nm) est visible lorsque la post-fonctionnalisation des NPs avec le Peptide-N₃ est réalisée en présence de CuSO₄/AAsc. Cette expérience nous permet de prétendre que le peptide a bien été fixé de manière covalente à la surface des NPs.

Connaissant l'intensité de ce pic d'absorbance UV caractéristique du peptide, nous avons pu quantifier la quantité de peptide greffé à la surface des NPs grâce à la précédente courbe de calibration. Dans le cas des NPs post-fonctionnalisées avec le peptide, (utilisation de CuSO₄/AAsc comme système catalytique), la concentration relative en peptide dans la solution est égale à 0,0527 mg/mL, ce qui équivaut à une quantité de 0,0325 mg de peptide par mg de NPs (0,024 μmol peptide / mg de NPs).

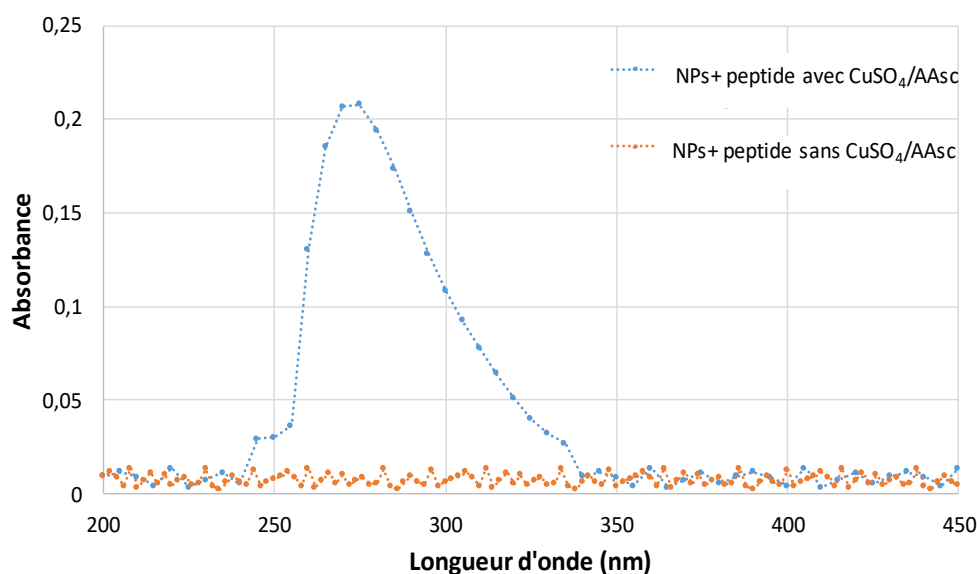


Figure 92 : Spectres UV des solutions de nanoparticules cœur PLA/couronne DexAlcyne-15 dans le DMSO (a) fonctionnalisées par le peptide en utilisant CuSO₄/AAsc et (b) non fonctionnalisées par le peptide en absence de CuSO₄/AAsc

Après avoir déterminé la quantité du peptide présent à la surface des NPs, une mesure de taille des NPs post-fonctionnalisées a été réalisée. Encore une fois, le diamètre moyen des NPs est tout à fait comparable avant et après fonctionnalisation (Tableau 30).

Tableau 30 : Caractéristiques des nanoparticules post-fonctionnalisées avec le Peptide- N_3 en utilisant $CuSO_4/AAsc$ et non fonctionnalisées par le peptide en absence de $CuSO_4/AAsc$

Peptide	Catalyseur $CuSO_4/AAsc$	Taille moyenne (nm)	Pdi
Sans peptide	-	171±1	0,075
Peptide- N_3	-	176±2	0,116
	+	164±3	0,124

3) Evaluation de la cytotoxicité des ligands et du peptide de ciblage

Après avoir réalisé la post-fonctionnalisation des NPs par les ligands et le peptide de ciblage, nous avons étudié la cytotoxicité de ces derniers sur les cellules Caco-2. Pour cela, des solutions PBS de différentes concentrations (14 à 227 $\mu\text{g/mL}$) en ligand (AF ou Man) ou peptide ont été incubées avec les cellules Caco-2 (densité cellulaire 10^4 cellules/puits). Les résultats présentés dans les Figures 93 et 94 correspondent respectivement aux valeurs obtenues après incubation pendant 24 et 48 h. Ces résultats montrent que les ligands et le peptide n'ont aucun effet cytotoxique sur la viabilité cellulaire des Caco-2 dans les gammes de concentration et de durée d'incubation étudiées.

4) Libération *in vitro* de la DOX hors des NPs post-fonctionnalisées

Lors de cette étude, et afin de prouver l'intérêt de recouvrir les NPs avec des ligands ou un peptide de reconnaissance, des NPs « Clickées CuBr » chargées de DOX et post-fonctionnalisées ont été formulées en employant les protocoles décrits précédemment. Dans un premier temps, nous avons mis en contact une suspension de NPs « Clickées CuBr » et chargées de DOX (taux de charge = 30%), post-fonctionnalisées ou non, avec les cellules Caco-2 dans les puits de culture (densité cellulaire égale à 2×10^4 cellules/mL). Une irradiation UV a ensuite été appliquée à une puissance égale à 54 mW/cm^2 pendant différentes durées. Le renouvellement du milieu de culture a été effectué 4 h après l'irradiation et le dosage MTT après 24 et 48 h d'incubation. Les résultats de la viabilité cellulaire sont présentés dans les Figures 95 et 96. Ces résultats nous permettent de conclure qu'aucune influence significative de la post-fonctionnalisation des NPs n'est observée sur la libération de la DOX. En effet, pour 30 secondes ou 1 minute d'irradiation par exemple, la viabilité cellulaire mesurée est sensiblement la même quel que soit le lot de NPs.

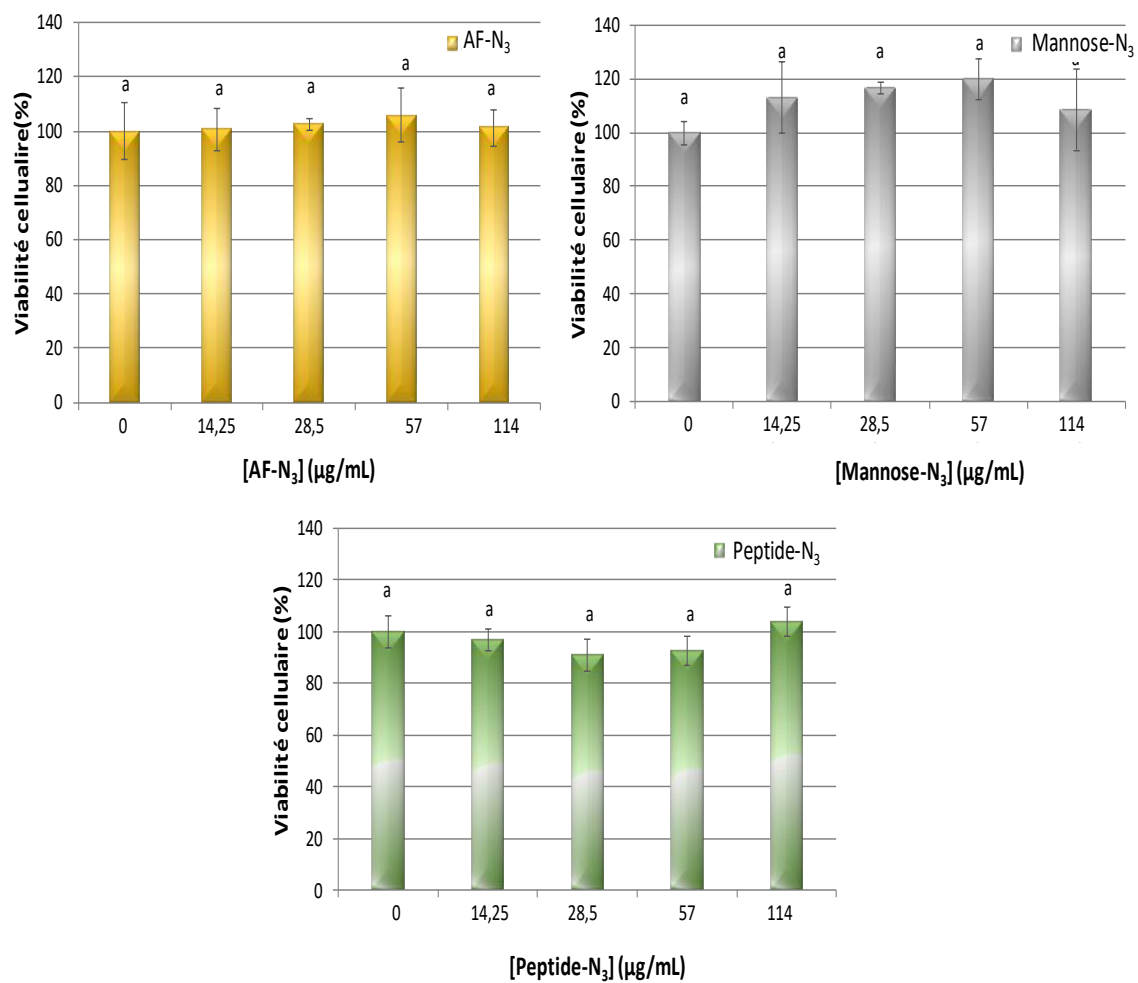


Figure 93 : Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence de différentes concentrations en ligands (AF-N₃ ou Man-N₃) ou en Peptide-N₃. Dosage MTT après 24 h. Selon le test de Duncan (α=0,05), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).

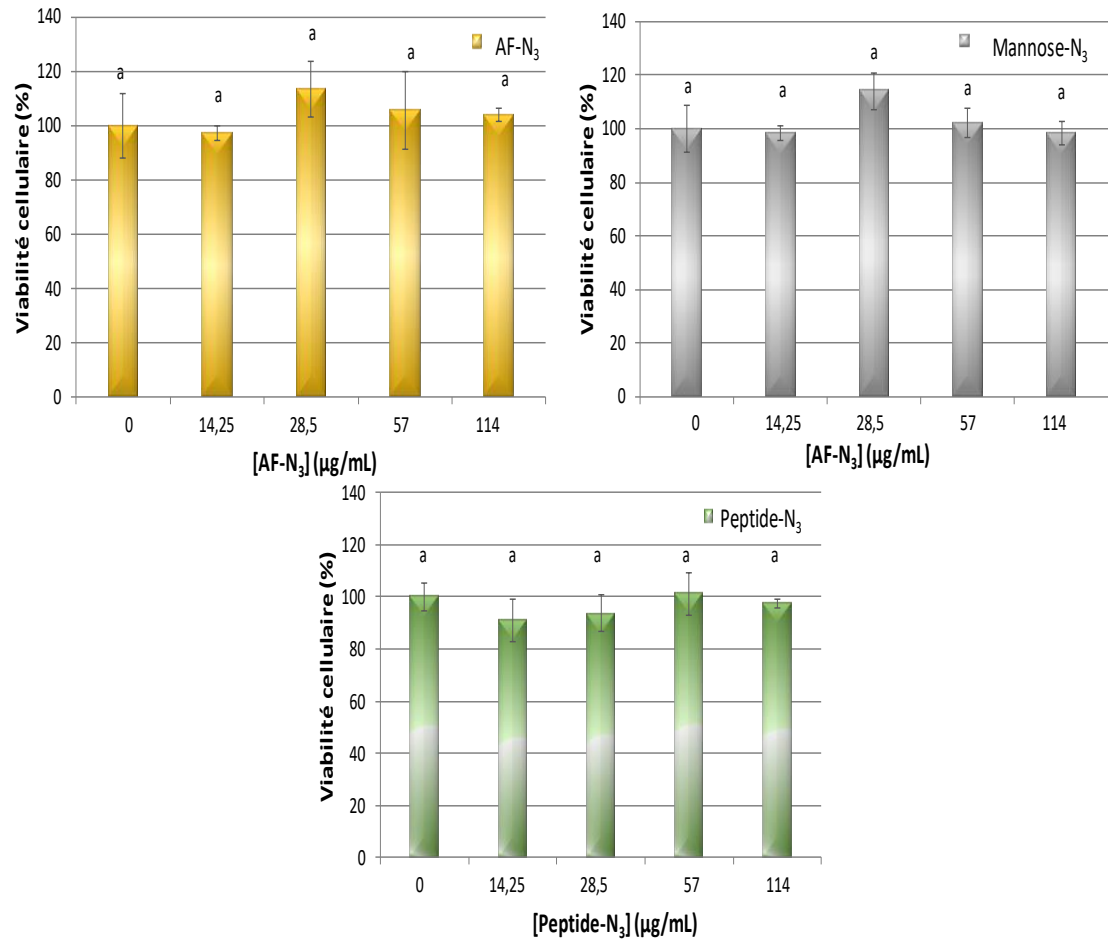


Figure 94 : Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence de différentes concentrations en ligands (AF-N₃ ou Man-N₃) ou en Peptide-N₃. Dosage MTT après 48 h. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative ($n=3$).

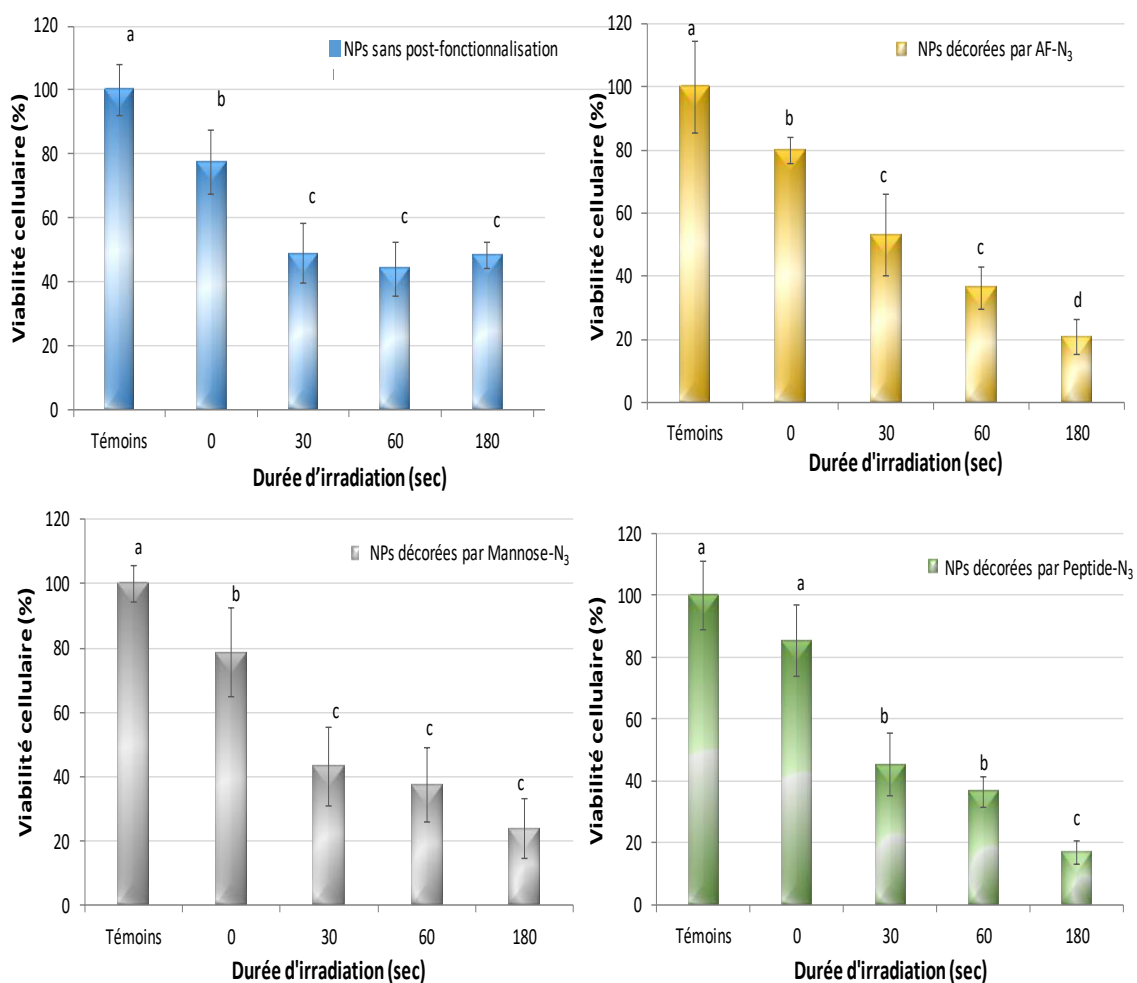


Figure 95 : Evolution de la viabilité cellulaire des Caco-2 en présence des NPs « Clickées » CuBr et chargées de DOX sans post-fonctionnalisation et post-fonctionnalisées avec AF, Man et Peptide. Renouvellement du milieu de culture 4 h après irradiation puis dosage MTT réalisé après 24 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative ($n=3$).

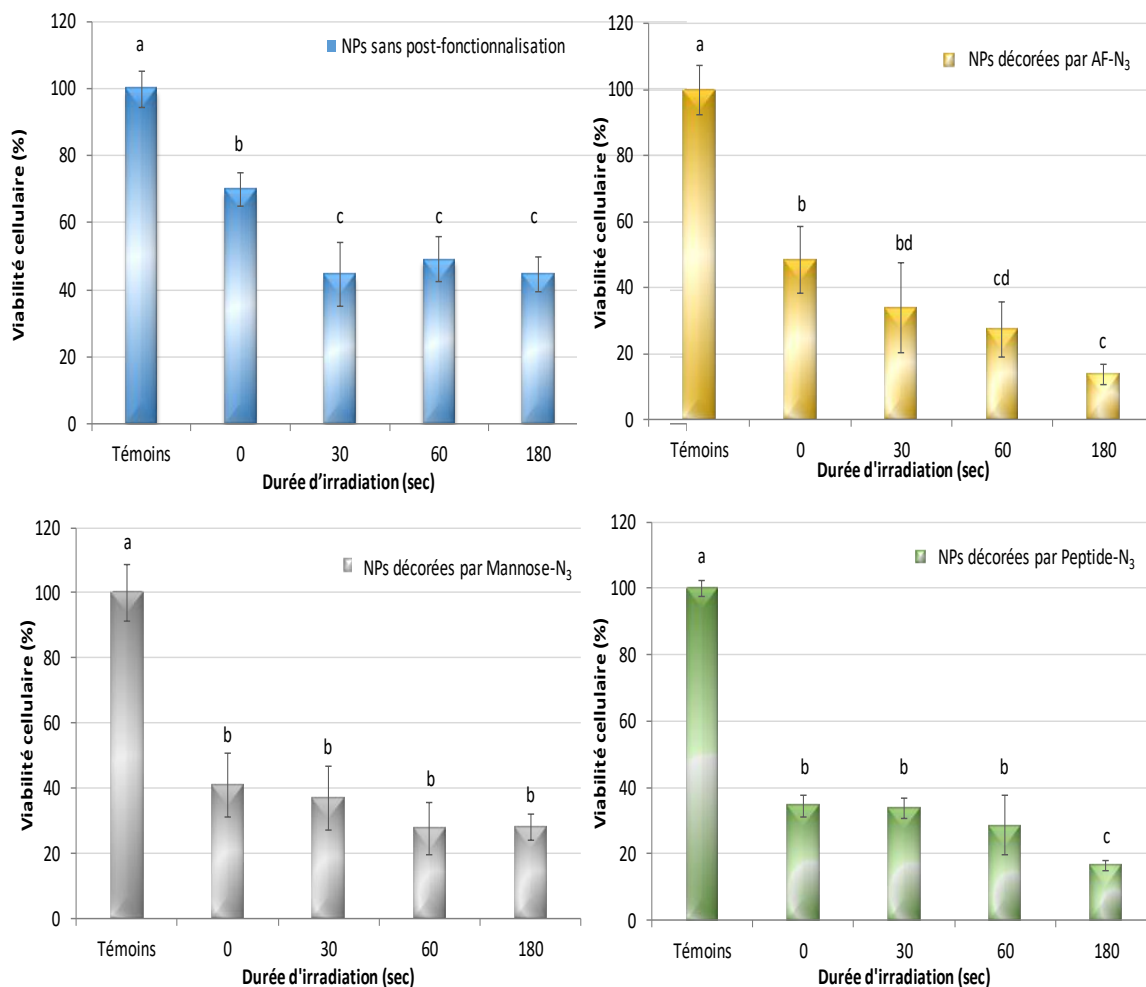


Figure 96 : Evolution de la viabilité cellulaire des Caco-2 en présence des NPs « Clickées » CuBr et chargées de DOX sans post-fonctionnalisation et post-fonctionnalisées avec AF, Man et Peptide₃. Renouvellement du milieu de culture 4 h après irradiation puis dosage MTT réalisé après 48 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative ($n=3$).

Une expérience complémentaire a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (concentration, taux de charge en DOX, irradiation, renouvellement du milieu de culture, temps d'incubation) mais en laissant incuber les NPs post-fonctionnalisées 24 h avec les cellules Caco-2 avant de réaliser l'expérience.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans les Figures 97 et 98. A noter que les résultats concernant les NPs non post-fonctionnalisées présentés dans ces figures sont différents de ceux exposés précédemment (Figures 90 et 91). En effet, les NPs sont ici incubées pendant 24 h avant l'irradiation, ce qui permet à la DOX de se libérer par simple diffusion hors des NPs et entraîne un effet supplémentaire sur la viabilité des cellules Caco-2. En revanche, aucun effet significatif dû à la post-fonctionnalisation des NPs n'est visible sur la viabilité cellulaire puisque les valeurs sont similaires quel que soit le lot de NPs testé. Pour

conclure, l'effet de la post-fonctionnalisation des NPs sur la viabilité des cellules Caco-2 n'est pas flagrant et des expériences complémentaires doivent être menées pour avoir plus de données telles que l'étude de l'adhésion des NPs post-fonctionnalisées à la surface des cellules Caco-2.

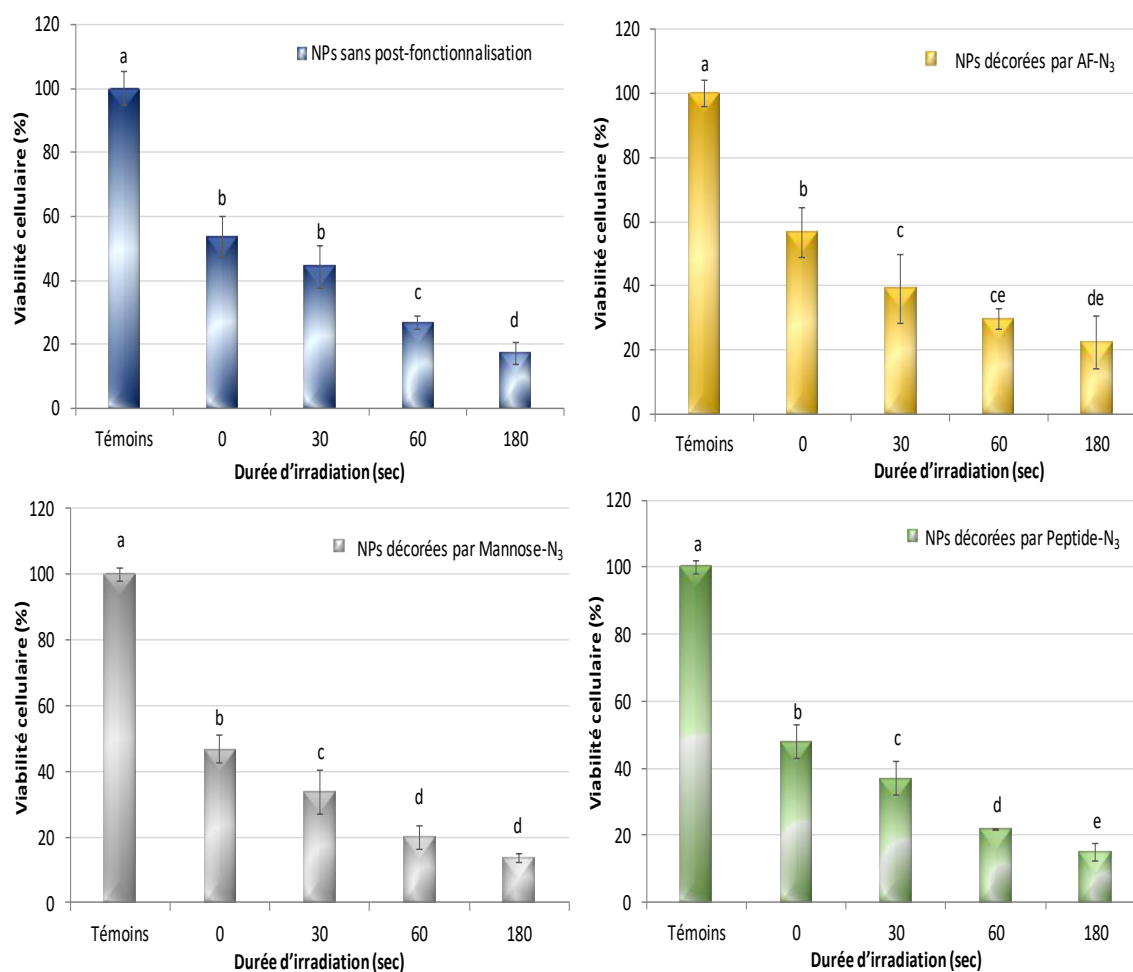


Figure 97 : Evolution de la viabilité cellulaire des Caco-2 en présence des NPs chargées de DOX sans post-fonctionnalisation et post-fonctionnalisées avec AF, Man et Peptide. Incubation 24 h des NPs avant l'irradiation, renouvellement du milieu de culture 4 h après irradiation puis dosage MTT après 24 h d'incubation. (Les valeurs non suivies de la même lettre sont significativement différentes selon un test de Duncan ($\alpha=0,05$))(n=3).

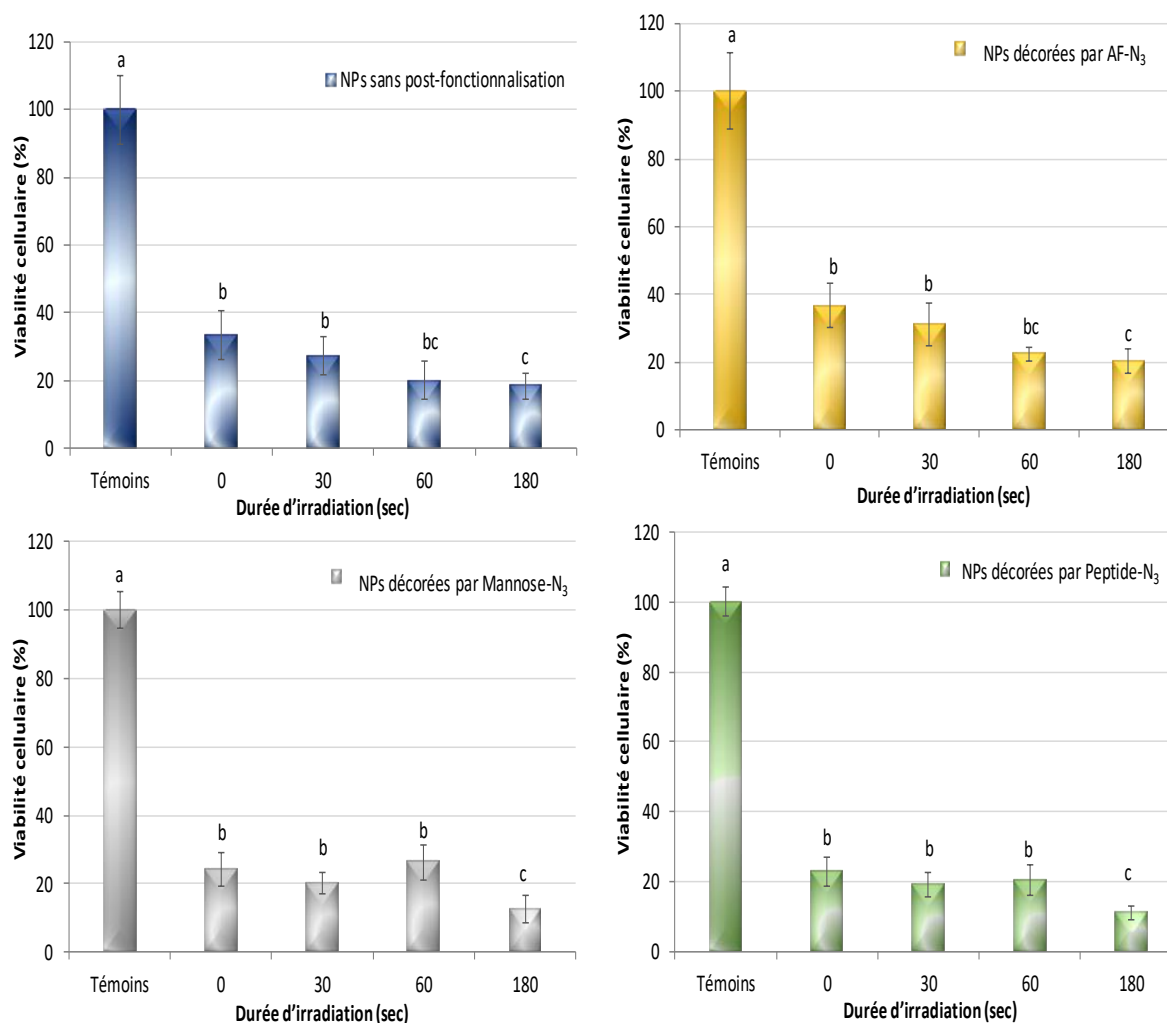


Figure 98 : Evolution de la viabilité cellulaire des Caco-2 en présence des NPs chargées de DOX sans post-fonctionnalisation et post-fonctionnalisées avec AF, Man et Peptide. Incubation 24 h des NPs avant l'irradiation, renouvellement du milieu de culture 4 h après irradiation puis dosage MTT après 48 h d'incubation. (Les valeurs non suivies de la même lettre sont significativement différentes selon un test de Duncan ($\alpha=0,05$))($n=3$)).

VI) CONCLUSION DU CHAPITRE

Ce chapitre portait sur l'évaluation du potentiel biologique des NPs élaborées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique, contenant de la DOX et destinées à être employées comme systèmes de délivrance photo-déclenchée de médicament. Dans un premier temps, la biocompatibilité des NPs au contact des cellules Caco-2 a été vérifiée. Les NPs élaborées avec ou sans chimie Click interfaciale peuvent toutes être utilisées *in vitro* sans présenter de toxicité avérée, même à des concentrations allant jusqu'à 114 $\mu\text{g/mL}$ et jusqu'à 48 h d'incubation. Ces premiers résultats ont permis de fixer la concentration des NPs utilisée dans toutes les expériences suivantes (114 $\mu\text{g/mL}$). Dans un deuxième temps, la résistance à

l'irradiation des cellules Caco-2 seules et en présence des NPs a été étudiée. Nous avons alors montré que le renouvellement du milieu de culture 4 h après l'irradiation, afin de mimer le drainage naturel du côlon, était bénéfique sur la viabilité cellulaire. Ainsi une irradiation d'une minute à une puissance de 54 mW/cm² peut être menée sans affecter la croissance cellulaire. Enfin, ces premiers travaux ont été complétés par l'étude de la libération de la DOX *in vitro* par simple diffusion ou provoquée par l'irradiation. Nous avons alors montré que 30 secondes d'irradiation à cette puissance suffisent pour libérer une quantité de DOX conduisant à l'éradication d'environ 50 % des cellules Caco-2 (cas de NPs présentant un taux de charge de DOX égal à 30 %), ce qui n'est pas obtenu même après 48 h de diffusion lente de la DOX hors des NPs (sans irradiation UV).

La dernière partie de ce chapitre portait sur une étude préliminaire de la post-fonctionnalisation des NPs pour un ciblage spécifique des cellules Caco-2. Des ligands (AF et Man) et un peptide de ciblage (LETTCASLCYP) ont été fixés avec succès à la surface des NPs en réalisant une chimie Click CuAAC après formulation des NPs. Ces ligands/peptide se sont révélés non cytotoxiques et les tests préliminaires de libération de la DOX hors des NPs post-fonctionnalisées montrent que cette libération n'est en rien influencée par la post-fonctionnalisation à la surface des NPs. Des expériences complémentaires doivent être réalisées pour pouvoir conclure sur l'adhésion de ces NPs post-fonctionnalisées à la surface des cellules Caco-2 et sur le ciblage actif efficace de ces dernières.

VII) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Beaumont, P. O.; Moore, M. J.; Ahmad, K.; Payne, M. M.; Lee, C.; Riddick, D. S. Role of Glutathione S-Transferases in the Resistance of Human Colon Cancer Cell Lines to Doxorubicin. *Cancer Res.* **1998**, *58* (5), 947–955.
- (2) El-Readi, M. Z.; Hamdan, D.; Farrag, N.; El-Shazly, A.; Wink, M. Inhibition of P-Glycoprotein Activity by Limonin and Other Secondary Metabolites from Citrus Species in Human Colon and Leukaemia Cell Lines. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *626* (2–3), 139–145.
- (3) Malthum, S.; Polkam, N.; Allaka, T. R.; Chepuri, K.; Anireddy, J. S. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Purine Nucleoside Analogues. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58* (44), 4166–4168.
- (4) Eid, S. Y.; El-Readi, M. Z.; Wink, M. Synergism of Three-Drug Combinations of Sanguinarine and Other Plant Secondary Metabolites with Digitonin and Doxorubicin in Multi-Drug Resistant Cancer Cells. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2012**, *19* (14), 1288–1297.
- (5) Ross, J. F.; Chaudhuri, P. K.; Ratnam, M. Differential Regulation of Folate Receptor Isoforms in Normal and Malignant Tissues in Vivo and in Established Cell Lines. *Physiologic and Clinical Implications. Cancer* **1994**, *73* (9), 2432–2443.
- (6) Higgins, L. M.; Lambkin, I.; Donnelly, G.; Byrne, D.; Wilson, C.; Dee, J.; Smith, M.; O'mahony, D. J. In Vivo Phage Display to Identify M Cell-Targeting Ligands. *Pharm. Res.* **2004**, *21* (4), 695–705.

PARTIE III : Matériels et méthodes

I) OBTENTION DES DIFFERENTS PANB

1) Synthèse du monomère (Acrylate d'*o*-nitrobenzyle)

L'alcool *o*-nitrobenzylique (97 %), la 4,4-diméthylamino pyridine (DMAP, 99 %) et le chlorure d'acryloyle (97 %) proviennent de Sigma-Aldrich et sont utilisés sans purification préalable. La triéthylamine (Et₃N) est stockée sur tamis moléculaire après ouverture. Le THF « sec » est prélevé au bar à solvant sous courant d'azote, puis séché sur tamis moléculaire avant utilisation.

10 g d'alcool *o*-nitrobenzylique ($65,31 \cdot 10^{-3}$ mol), 13,2 g de triéthylamine ($130,63 \cdot 10^{-3}$ mol, 2 équivalents) et 0,4 g de 4,4-diméthylaminopyridine ($3,34 \cdot 10^{-3}$ mol, 0,05 équivalents) sont introduits dans un bicol et dissous dans 70 mL de THF. Le milieu réactionnel est inerté (N₂) et refroidi à 0°C. 7,1 g de chlorure d'acryloyle ($78,40 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 équivalents) dissous dans 30 mL de THF sec sont ajoutés au mélange réactionnel. La réaction est menée à température ambiante sous azote statique pendant 4,5 h (Figure 99). Son avancement est suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant le dichlorométhane (DCM) comme éluant. Le milieu réactionnel final est une suspension orange. Après filtration sur fritté, le filtrat orange est tout d'abord concentré par évaporation sous pression réduite à 30°C, puis resolubilisé dans du DCM (100mL). La purification du produit est réalisée par extraction liquide/liquide en ajoutant 100 mL d'eau légèrement basique (pH=7,5). La phase organique est ensuite lavée 2 fois avec 100 mL d'eau acidifiée par HCl (pH=4,5) puis par une solution neutre d'eau distillée. Finalement, la phase organique est séchée avec du Sulfate de magnésium (MgSO₄), filtrée et le DCM est évaporé sous pression réduite à 25°C. Le produit est enfin purifié sur une colonne chromatographique en utilisant un mélange d'éluant (Ether de pétrole / Acétate d'éthyle) (8/2, v/v). Le monomère est séché de nouveau à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le rendement massique de récupération est égal à 80 %.

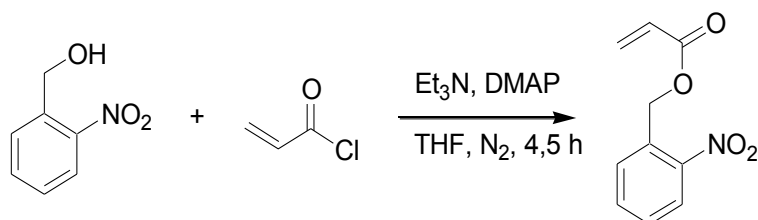


Figure 99: Estérification de l'alcool d'*o*-nitrobenzylique par le chlorure d'acryloyle

Après purification, le produit synthétisé est caractérisé par RMN ^1H et RMN ^{13}C (Figures 100 et 101).

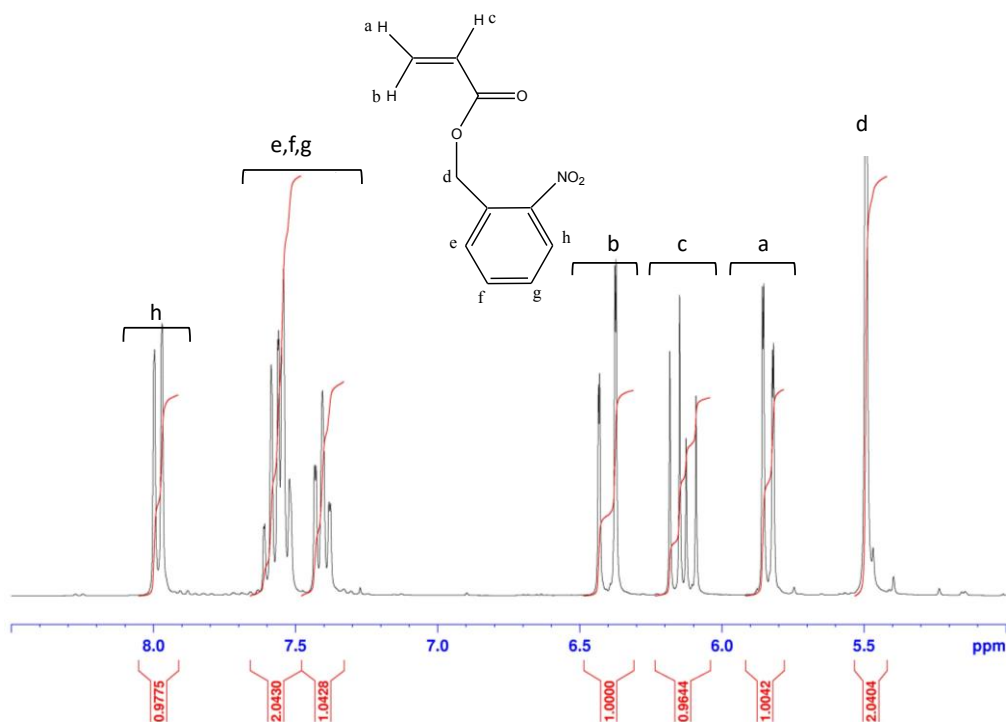


Figure 100 : Spectre RMN ^1H dans le CDCl_3 de l'acrylate d'o-nitrobenzyle

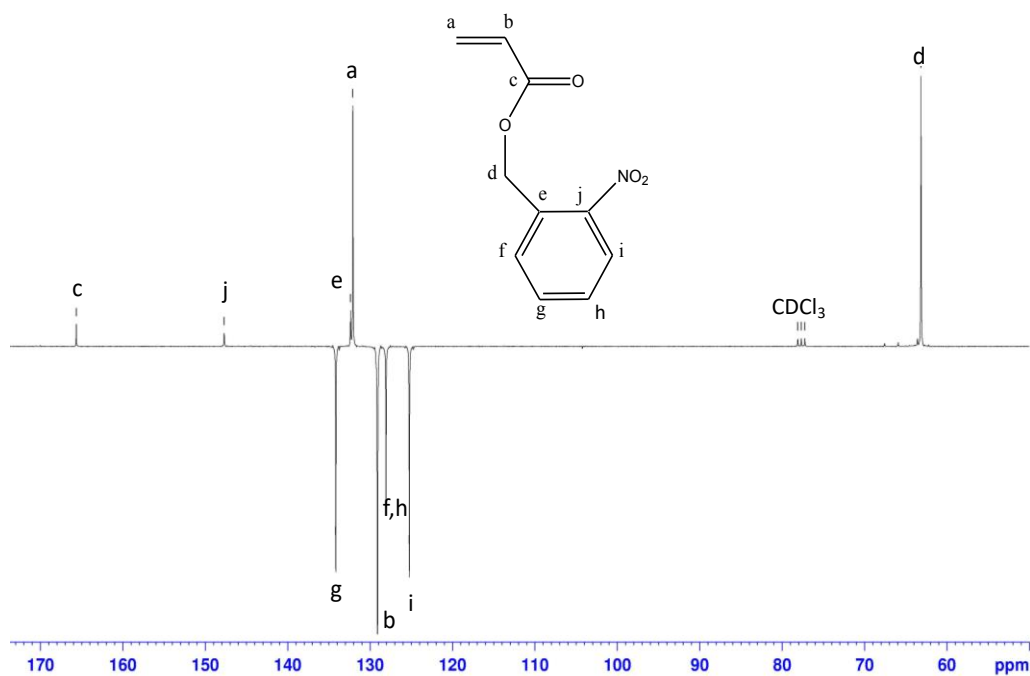


Figure 101 : Spectre RMN ^{13}C dans le CDCl_3 de l'Acrylate d'o-nitrobenzyle

2) Polymérisation de l'acrylate d'*o*-nitrobenzyle par SET-LRP

Le 2-bromoisobutyrate d'éthyle (EBiB, 98 %, Sigma-Aldrich), la tris-[2-(diméthylamino)éthyl]amine (Me₆TREN, 99 %, ABCR) et le bromure de cuivre II (CuBr₂, Riedel de Haen) sont utilisés sans purification préalable. Le diméthyl sulfoxyde (DMSO) est stocké sous azote et sur tamis moléculaire après ouverture de la bouteille.

La polymérisation de l'acrylate d'*o*-nitrobenzyle (ANB) a été réalisée par SET-LRP (Single-Electron Transfer Living Radical Polymerization) (Figure 102).

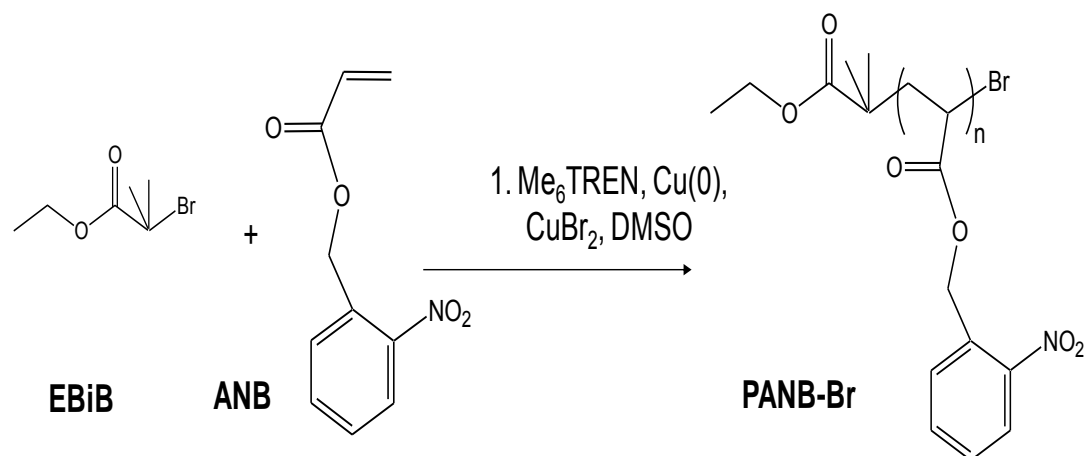


Figure 102: Polymérisation de l'acrylate d'*o*-nitrobenzyle par SET-LRP

Au préalable, une solution de Me₆TREN/CuBr₂ dans du DMSO « sec » est préparée en ajoutant les quantités adéquates pour *in fine* obtenir une concentration en CuBr₂ et de Me₆TREN égale à 0,110 mol/L. Le fil de cuivre Cu⁰ est préalablement activé à l'aide d'une solution d'hydrazine monohydrate (98 %, Sigma-Aldrich) concentrée (1 mL dans 10 mL d'eau milli-Q) pendant toute une nuit. Il est ensuite rapidement lavé à l'éthanol (96 %), séché et introduit sous azote à l'instant voulu dans le schlenk de réaction.

10 g d'acrylate d'*o*-nitrobenzyle ($48,31 \cdot 10^{-3}$ mol, soit 100 équivalents par amorceur EBiB) sont introduits dans un schlenk muni d'un robinet trois voies et plongé dans un bain d'huile à 25°C. Le fil de cuivre est entouré autour du barreau magnétique et maintenu en haut du schlenk par un aimant. Le milieu réactionnel est soumis à 3 cycles de vide/flux de N₂, puis laissé sous N₂ statique. 71 µL d'EBiB ($48,31 \cdot 10^{-5}$ mol, 1 équivalent), 116 µL de Me₆TREN ($43,48 \cdot 10^{-5}$ mol, 0,9 équivalents), 433 µL de la solution Me₆TREN/CuBr₂ ($47,82 \cdot 10^{-6}$ mol de Me₆TREN et $47,41 \cdot 10^{-6}$ mol de CuBr₂, 0,1 équivalent) et 10 mL de DMSO « sec » sont ajoutés au milieu sous flux de N₂. On retire l'aimant pour laisser tomber le fil de cuivre et le barreau magnétique, ce qui déclenche la polymérisation (t_0). La polymérisation se déroule à

l'abri de la lumière et des prélèvements du brut réactionnel sont régulièrement réalisés pour suivre la conversion de l'ANB par RMN ^1H (Figure 103) et par SEC. A la fin de la polymérisation, le PANB est précipité deux fois par du méthanol froid, puis séché sous vide à température ambiante pendant une nuit et à l'abri de la lumière. Les conditions de polymérisation des deux polymères avec des longueurs de chaînes différentes sont regroupées dans le Tableau 31.

Tableau 31 : Polymérisation du ANB par SET-LRP

$[\text{ANB}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{Me}_6\text{TREN}]_0/[\text{CuBr}_2]_0$	Durée (min)	Conversion (%) ^a	$\overline{M}_{n(\text{SEC})}$ (g mol^{-1}) ^b	Dispersité \overline{D} ^b
(100/1/10,1)	280	48	10300	1,33
(26/1/1/0,1)	210	57	3700	1,21

a : Déterminée expérimentalement à partir des spectres RMN ^1H du brut réactionnel (Figure 103) par l'équation suivante :

$$X = \frac{[M]_0 - [M]_t}{[M]_0} = \frac{A_2/4 - A_1/3}{A_2/4}$$

Avec :

A_1 : Somme des aires des pics correspondant aux protons (a, b et c) des doubles liaisons

A_2 : Somme des aires des pics des protons aromatiques (e, f, g et h).

b : Déterminées expérimentalement par SEC.

3) Modifications chimiques du PANB-Br

a) 1ère stratégie : Modification du groupement bromure par le groupement azoture

La modification du PANB-Br préparé précédemment par SET-LRP en PANB-N₃ (Figure 104) est réalisée par substitution nucléophile de l'extrémité bromure (1 équivalent) par un groupement azoture en utilisant 5 équivalents d'azoture de sodium (NaN₃). L'azoture de sodium a été acheté chez Sigma-Aldrich et utilisé sans purification.

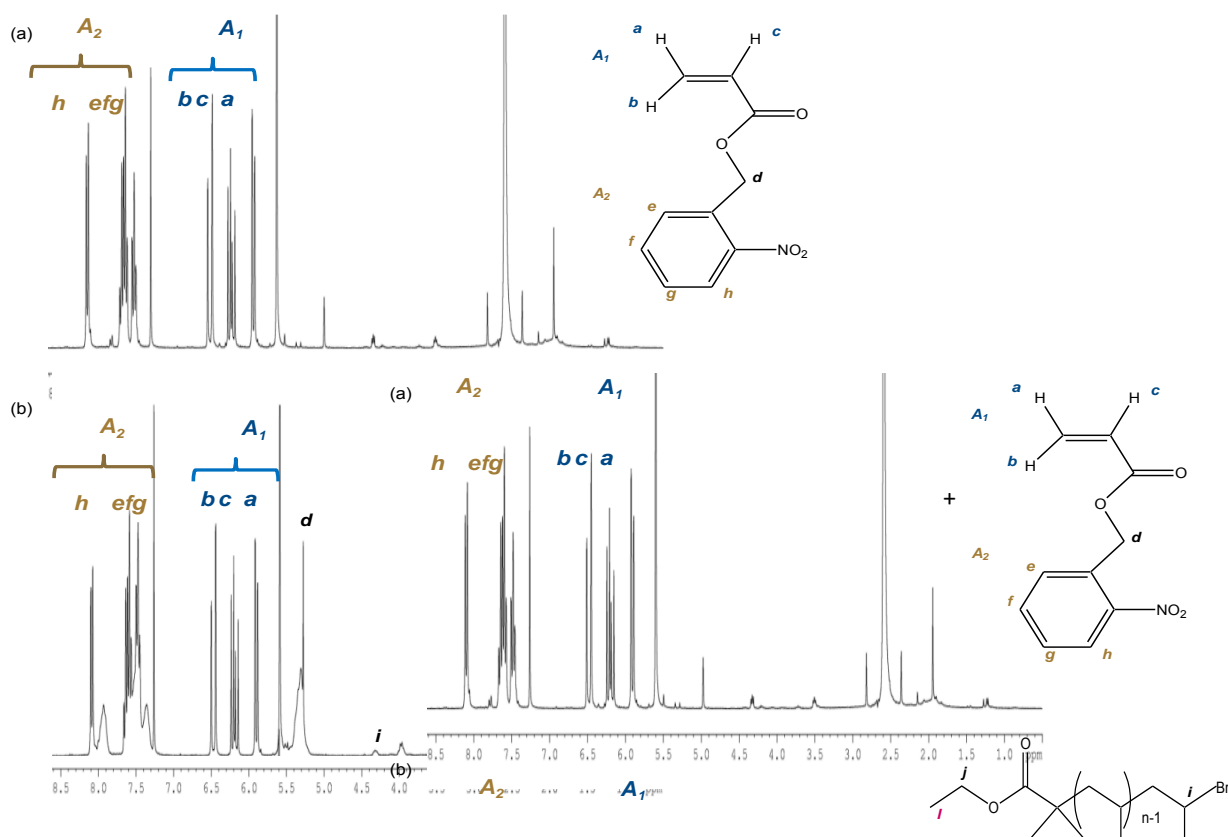


Figure 103 : Spectres RMN¹H dans le DMSO-d₆ du (a) monomère ANB et (b) du PANB-Br

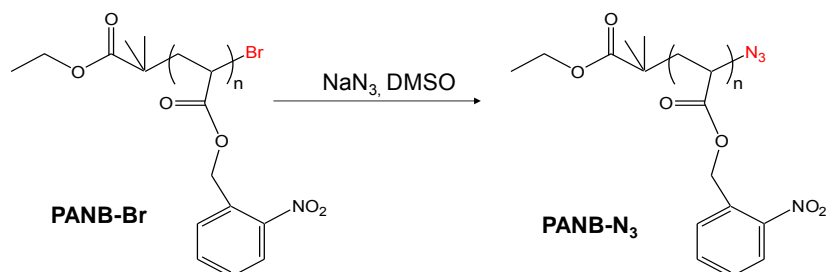


Figure 104 : Réaction de modification du PANB-Br en PANB-N₃ avec l'azoture de sodium

1,5 g de PANB-Br ($\overline{M}_n = 10300$ g/mol) ($1,46 \cdot 10^{-4}$ mol) sont solubilisés dans 10 mL de DMSO « sec » sous agitation à 25°C. 48 mg de NaN₃ ($7,4 \cdot 10^{-4}$ mol, 5 équivalents) sont introduits dans le milieu réactionnel et la réaction est maintenue à l'abri de la lumière pendant 48 h. Le PANB-N₃ est précipité deux fois par du méthanol froid, filtré puis séché sous vide pendant une nuit à 30°C. Le spectre RMN¹H dans le CDCl₃ est donné dans la Figure 105.

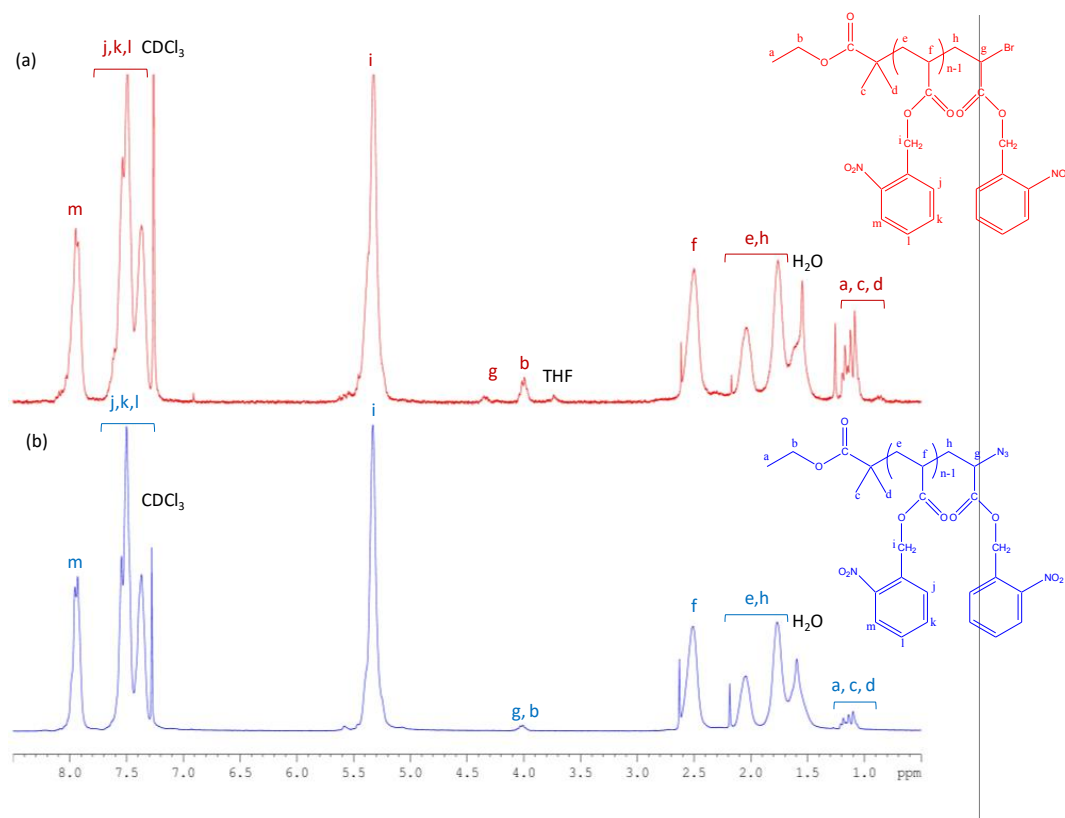


Figure 105 : Spectres RMN ^1H dans le CDCl_3 (a) du PANB-Br et (b) du PANB- N_3

b) 2ème stratégie : Modification du groupement bromure par la propargylamine

Dans une deuxième stratégie, nous avons envisagé de modifier l'extrémité bromure du PANB-Br par substitution nucléophile avec la propargylamine (Figure 106).

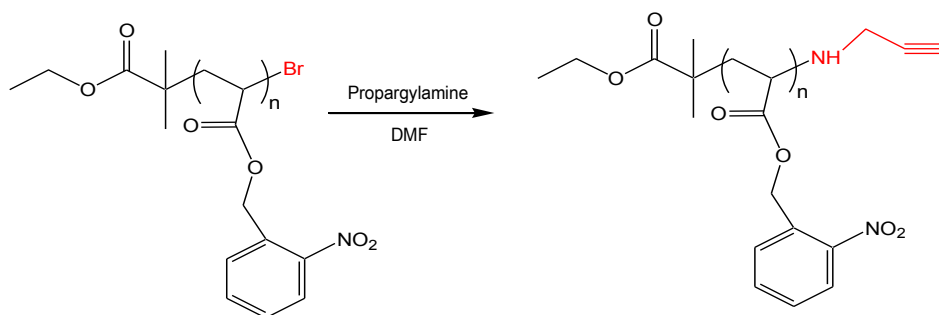


Figure 106 : Réaction de modification du PANB-Br par la propargylamine

La substitution a été tentée dans le DMF (*N,N*-diméthylformamide) en utilisant 5 équivalents de propargylamine sous différentes conditions expérimentales :

- 20°C pendant 21 jours
- 25°C en utilisant 5 minutes de microondes (Cem-Discover, puissance= 1,2W)

- 25°C en présence de 2,6-lutidine (nucléophile faiblement basique) pendant 21 jours. Cependant, quelles que soient les conditions expérimentales, aucune modification du brome n'a été observée par RMN et cette voie a été abandonnée.

II) MODIFICATIONS CHIMIQUES DU DEXTRANE

Le dextrane T40 (produit par la bactérie *Leuconostoc mesenteroides*) est fourni par Sigma-Aldrich. L'analyse de sa distribution massique par chromatographie d'exclusion stérique couplée à une diffusion de lumière multi-angle (SEC-MALLS) (éluant = DMSO + 0,1 M NaNO₃) donne une masse molaire moyenne en nombre (\overline{M}_n) d'environ 26 000 g/mol et une dispersité (\mathcal{D}) égale à 1,4. Avant modification, il est séché pendant une nuit sous vide dynamique à 100°C, directement dans le ballon réactionnel.

1) 1ère stratégie : Synthèse du dérivé du dextrane « DexAlcyne- τ »

La synthèse d'un dextrane fonctionnalisé par une chaîne linéaire hydrophobe à 6 carbones dotée d'une fonction alcyne terminale a été adaptée des travaux précédents effectués au LCPM¹. Ce dérivé est noté DexAlcyne- τ , τ est le taux de modification qui représente le nombre de fonctions alcyne sur 100 cycles glucopyranosique. La chaîne hydrophobe est greffée sur le dextrane sur certaines fonctions hydroxyle *via* une réaction d'estérification par un acide activé (Figure 107). Cette synthèse nécessite tout d'abord la synthèse dudit « acide activé ». La formule du DexAlcyne- τ représentée dans la Figure 107 est une formule volontairement simplifiée. La chaîne hydrophobe peut en effet être fixée sur le OH₂, OH₃ ou OH₄. Il peut a priori y avoir également plusieurs chaînes hydrophobes sur une même unité glucopyranosique. Toutefois, il avait été vérifié que le OH₂ est de loin le plus réactif vis-à-vis d'une réaction d'estérification².

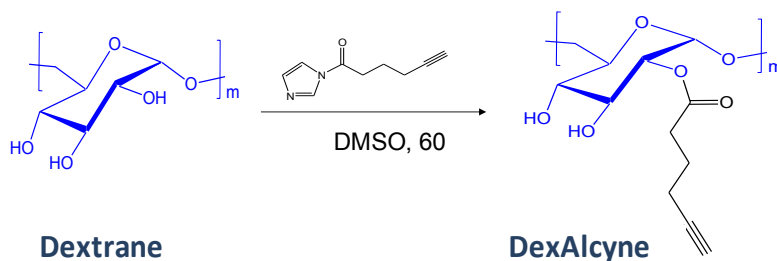


Figure 107 : Réaction de synthèse du DexAlcyne- τ

➤ **Synthèse de l'acide hex-5-ynoïque activé :**

La synthèse de l'acide hex-5-ynoïque activé est réalisée suivant le schéma suivant :

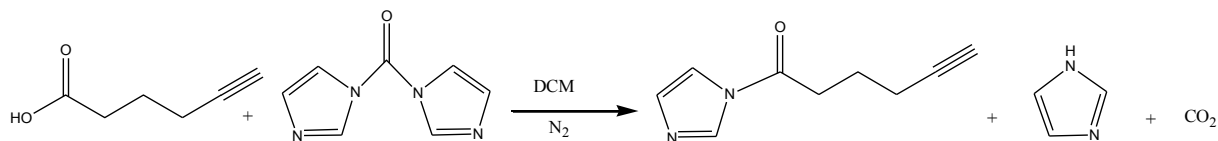


Figure 108: Réaction d'activation de l'acide 5-hexynoïque par le carbonyldiimidazole (CDI)

Les réactifs employés sont l'acide hex-5-ynoïque (97 %) et le carbonyldiimidazole (CDI). Le solvant est le dichlorométhane (DCM). Tous les réactifs sont fournis par Sigma-Aldrich et utilisés sans purification préalable. 10 g d'acide hex-5-ynoïque ($89,18 \cdot 10^{-3}$ moles) sont dissous dans 20 mL de DCM à température ambiante sous N₂. En parallèle, 16,87 g de CDI ($107,02 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 équivalents) sont mis en suspension dans 80 mL de DCM. La solution d'acide est alors ajoutée à la suspension de CDI en goutte-à-goutte lent *via* une ampoule d'addition sous azote. L'avancement de la réaction est suivie par CCM (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole (6/4, v/v), RF acide activé = 0,18). Après 2 h, 50 mL d'eau sont ajoutés au milieu. Après décantation, la phase organique est récupérée et lavée avec 2 fois 50 mL d'eau, séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite à 40°C. Le produit orange obtenu est séché sous vide à température ambiante pendant une nuit puis analysé par RMN ¹H (Figure 109).

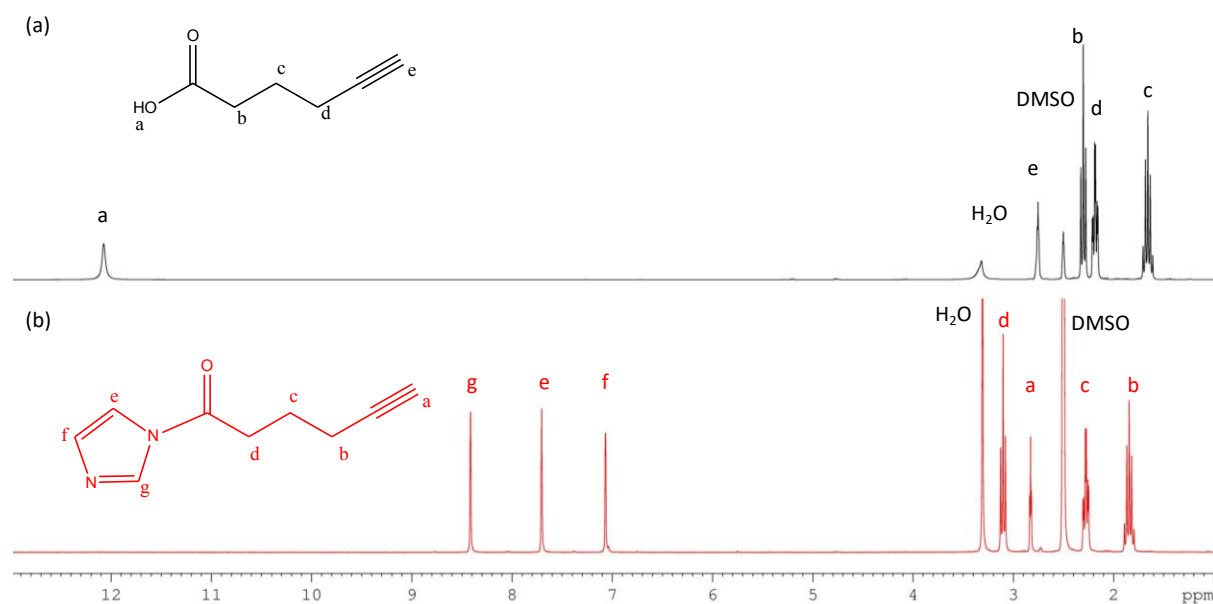


Figure 109 : Spectres RMN ¹H dans le DMSO-d₆ (a) de l'acide hex-5-ynoïque et (b) de l'acide hex-5-ynoïque activé

➤ **Synthèse du « DexAlcyne- τ »**

10 g de dextrane ($61,73 \cdot 10^{-3}$ moles d'unités glucopyranosique) séchés pendant une nuit sous vide à 100°C sont solubilisés dans 100 mL de DMSO sec à 60°C . 1,49 g d'acide hex-5-ynoïque activé ($9,24 \cdot 10^{-3}$ mol, 0,15 équivalents) sont introduits dans le milieu sous courant d'azote. Le milieu réactionnel est maintenu à 60°C pendant 48 h. Le polymère est précipité deux fois par de l'éthanol froid, filtré puis séché sous vide à température ambiante pendant une nuit. Le DexAlcyne- τ est ensuite caractérisé par RMN ^1H (Figure 110) et RMN ^{13}C (Figure 111) dans le DMSO- d_6 .

On calcule τ par l'équation suivante :

$$\tau = \frac{\sum \text{Aire } (7 + 8 + 9 + 10)/7}{\sum \text{Aire } (1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6 + 6')/7} \times 100$$

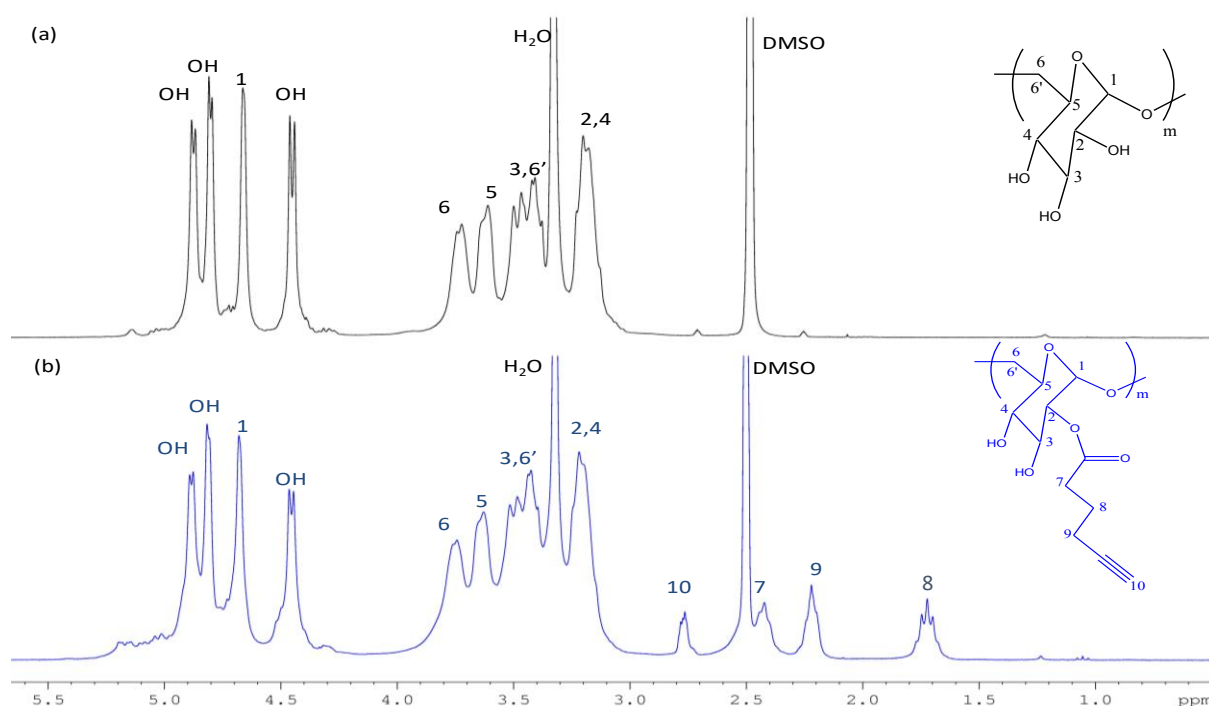


Figure 110 : Spectres RMN ^1H dans le DMSO- d_6 (a) du Dextrane et(b) du DexAlcyne- τ

2) 2ème stratégie : Synthèse du dérivé « DexN $_3$ - τ »

Dans le but de synthétiser un DexN $_3$ - τ avec un taux de modification de l'ordre de 15 %, une procédure adaptée des travaux effectués précédemment au LCPM ³ a été suivie. Selon cette première stratégie, le dextrane est fonctionnalisé par une chaîne linéaire hydrophobe à 6 carbones dotée d'une fonction azoture terminale. Cette synthèse se fait en 3 étapes :

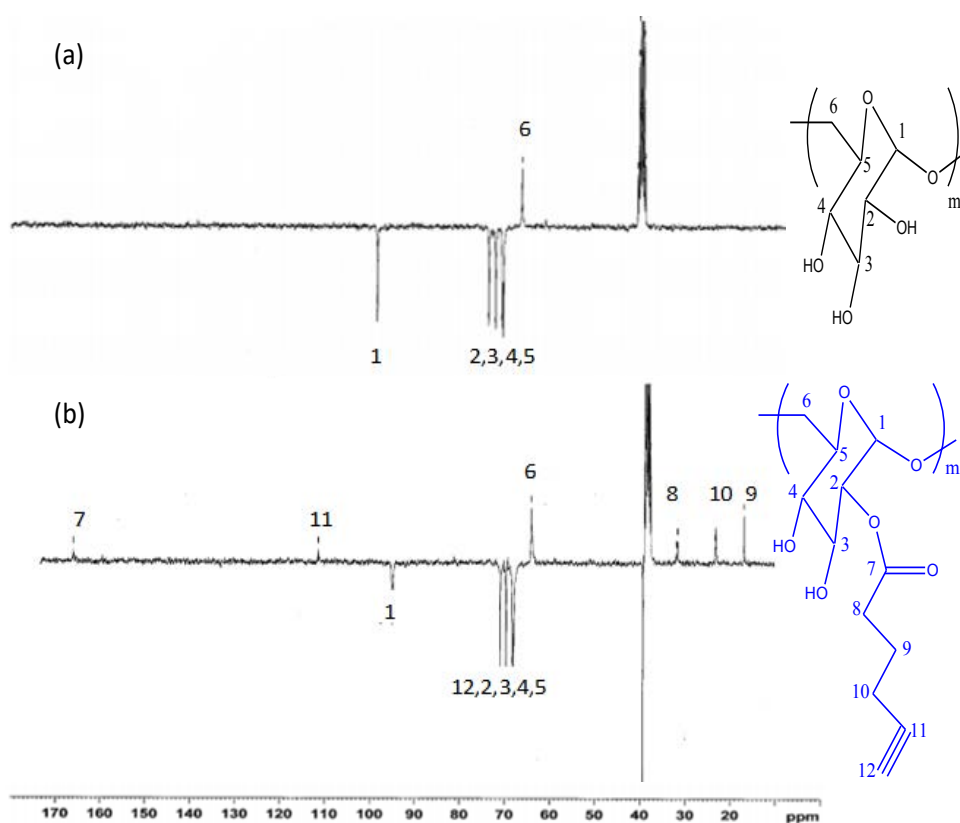


Figure 111 : Spectres RMN¹³C dans le DMSO-d₆ (a) du Dextrane et (b) du DexAlcyne-τ

a) Synthèse de l'acide 6-azidohexanoïque :

8,18 g d'azoture de sodium (NaN₃, 0,126 mol, 1,2 équivalents par acide 6-bromohexanoïque) sont solubilisés dans 250 mL de DMSO à 40°C pendant 3 h. 20,0 g d'acide 6-bromohexanoïque (0,103 mol) y sont ajoutés progressivement et la réaction est arrêtée après 4 h (Figure 112).

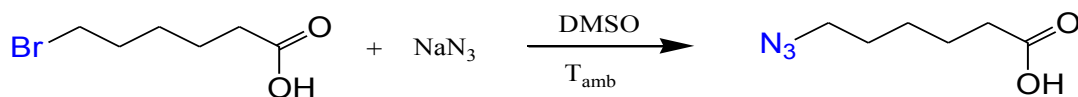


Figure 112 : Réaction de synthèse de l'acide 6-azidohexanoïque

On ajoute ensuite 250 mL d'eau acidifiée (pH=3) pour éviter de perdre la forme carboxylate du produit désiré lors de l'extraction liquide/liquide. Le produit est extrait deux fois avec 200 mL de DCM, puis la phase organique est lavée deux fois avec de l'eau acidifiée (pH= 3). La phase organique est ensuite séchée avec du MgSO₄. Après filtration, les solvants organiques sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Le produit obtenu est alors séché sous

vide dynamique à température ambiante pendant une nuit et ensuite analysé par RMN ^1H (Figure 114b).

b) Activation de l'acide 6-azidohexanoïque :

Cette deuxième étape de synthèse consiste à activer l'acide 6-azidohexanoïque par du carbonyldiimidazole (CDI) selon la réaction suivante (Figure 113):

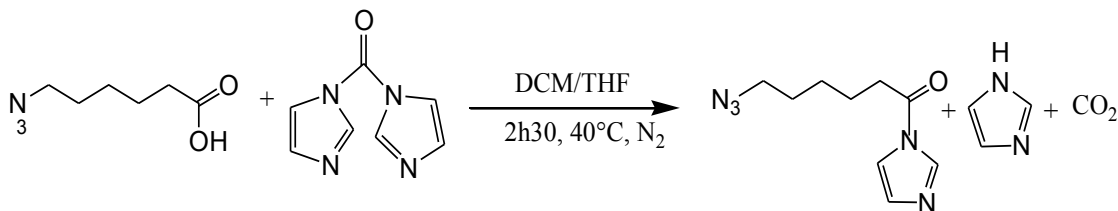


Figure 113: Réaction de synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohexanoïque

19,02 g de 1,1'-carbonyldiimidazole (0,120 mol, 1,3 éq./COOH) sont mis en suspension dans 250 mL d'un mélange THF/DCM(1/1, v/v) anhydre sous azote. 14,0 g d'acide 6-azidohexanoïque sont solubilisés dans 36 mL du mélange THF/DCM anhydres puis introduits goutte-à-goutte dans le mélange réactionnel sous N₂. La réaction se poursuit pendant 2h30 sous agitation et sous flux d'azote à 40°C. Le milieu réactionnel est concentré par évaporation sous pression réduite, le produit est solubilisé dans 100 mL de DCM. La phase organique est extraite 2 fois (2 * 100 mL) avec de l'eau Milli-Q, séchée avec du MgSO₄ et filtrée sur du papier filtre. Le solvant organique est évaporé sous pression réduite et le produit final est séché à température ambiante sous vide dynamique. Une caractérisation RMN ^1H a été réalisée (Figure 114c).

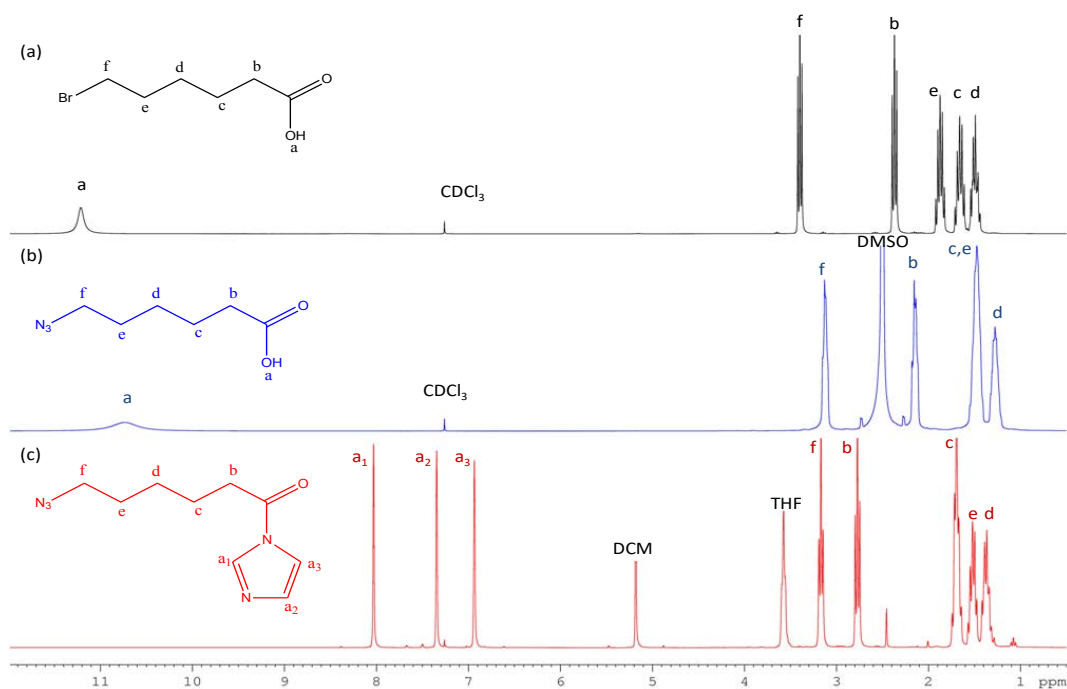


Figure 114 : Spectres RMN 1H dans le $CDCl_3$ de (a) l'acide 6-bromohexanoïque, (b) de l'acide 6-azidohexanoïque et (c) de l'acide 6-azidohexanoïque activé

➤ **Réaction du dextrane avec l'acide 6-azidohexanoïque activé :**

La réaction de modification chimique du dextrane avec l'acide 6-azidohexanoïque activé est réalisée selon la Figure 115:

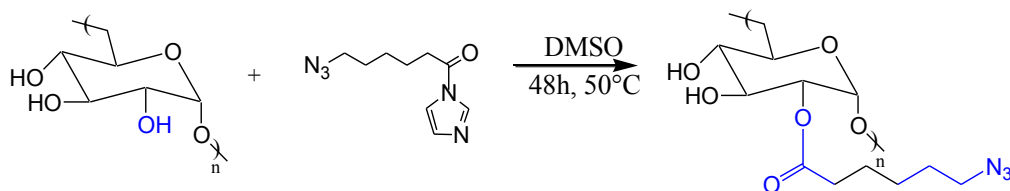


Figure 115 : Synthèse du $DexN_3-\tau$

La quantité d'acide activé à introduire est estimée par l'équation suivante :

$$X = \frac{DS}{Eff}$$

Avec :

DS : Nombre théorique de chaînes fixées pour 100 unités glucopyranosique (DS=15).

Eff : Efficacité de la réaction, basée sur les expériences précédentes et égale à 62 %.

X : Nombre de moles d'acide activé à introduire pour obtenir le $DexN_3-\tau$ avec le degré de substitution visé. Dans notre cas, X est égal à 24 chaînes pour 100 unités glucopyranosique.

10 g de dextrane sec ($61,67 \cdot 10^{-3}$ mol d'unités glucopyranosique) sont dissous dans 100mL de DMSO « sec ». Le mélange réactionnel est maintenu à 50°C puis 3,03 g d'acide 6-azidohexanoïque activé ($14,69 \cdot 10^{-3}$ mol, 0,24 équivalents) sont introduits dans le ballon réactionnel sous azote. La réaction est arrêtée après 48h à 50°C. Le mélange réactionnel est purifié par deux précipitation 2 fois par l'éthanol froid. Le dérivé du dextrane est filtré, séché sous vide dynamique à 40°C, puis analysé par RMN ^1H et RMN ^{13}C dans le DMSO- d_6 (Figures 116 et 117).

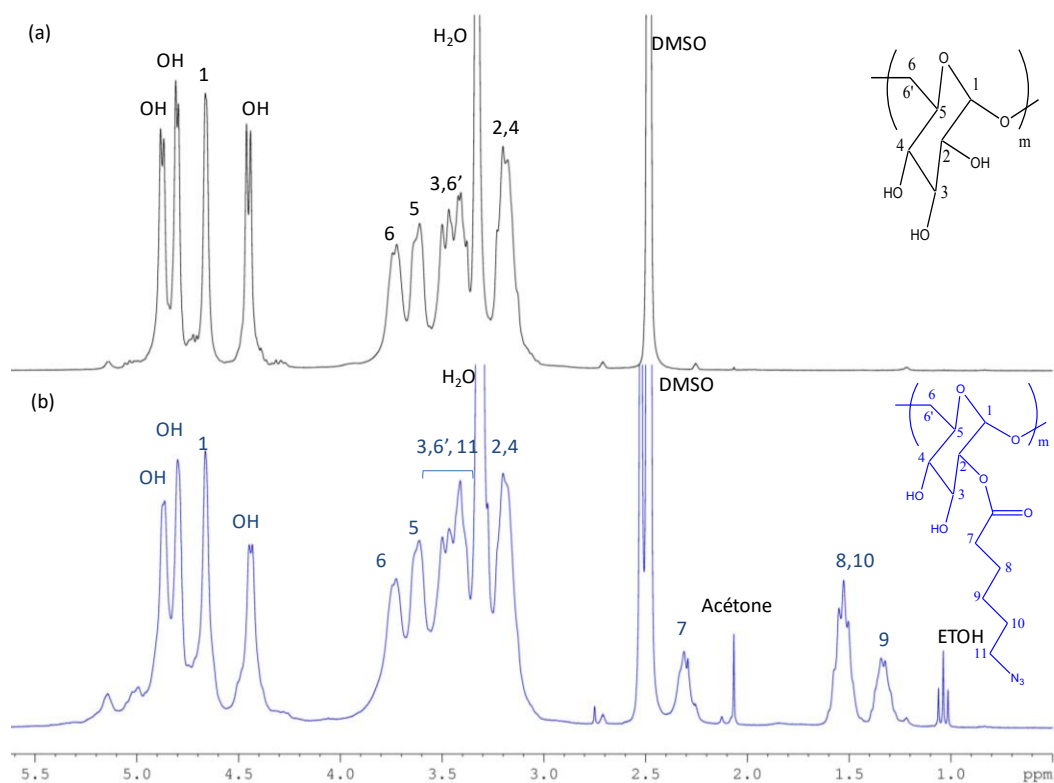


Figure 116 : Spectres RMN ^1H dans le DMSO- d_6 (a) du Dextrane et (b) du DexN₃- τ

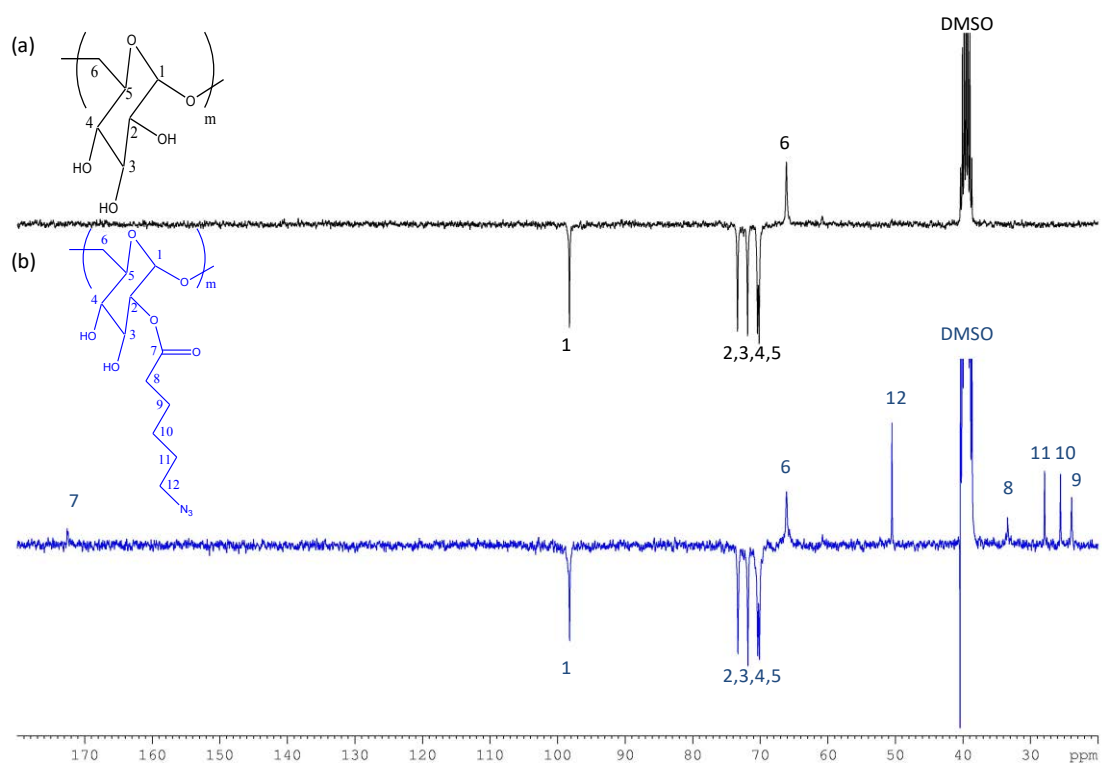


Figure 117 : Spectres RMN ^{13}C dans le DMSO- d_6 du (a) Dextrane et du (b) DexN $_3$ - τ

III) SYNTHÈSE DES GLYCOPOLYMERES DEX-G-PANB

Le bromure de cuivre (CuBr, 99,9 %) et l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) sont achetés chez Sigma-Aldrich et utilisés sans purification. Pour cette expérience, le PANB-N $_3$ et le DexAlcyne- τ ont été dissouts dans du DMSO. Le rapport entre les fonctions azoture et alcyne a été ajusté selon la fraction de PANB visée dans le glycopolymère. Après mélange des deux polymères, la solution est purgée sous azote pendant 10 min puis 1 équivalent de CuBr par alcyne est ajouté au mélange réactionnel ⁴ (Figure 118). Le mélange réactionnel est gardé sous agitation à 25°C et à l'abri de la lumière pour éviter toute dégradation du PANB. Après 48h, le milieu est précipité par un mélange MeOH/H $_2$ O (8/2, v/v) contenant 5 équivalents d'EDTA par Cu pour le complexer. Le produit est filtré et lavé par une solution Acétone / diéthyléther (8/2, v/v) pour éliminer l'excès de PANB-N $_3$ qui n'a pas réagit. Le produit est séché sous vide dynamique pendant une nuit à température ambiante puis analysé par RMN ^1H (Figure 119) dans le DMSO- d_6 . À partir du spectre RMN, la fraction massique du PANB dans le glycopolymère est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Fraction massique du PNBA dans le copolymère} = \frac{\frac{A(h,i,j)}{3} \times 207}{\left(\frac{A(h,i,j)}{3} \times 207\right) + (A_1 \times 176)} \times 100$$

$A(h,i,j)$: Aire des protons h,i et j du noyau aromatique des unités monomères du PANB

207 : Masse molaire de l'unité monomère du PANB (g/mol)

A_1 : Aire du proton anomérique des unités glucopyranosique

176 : Masse molaire de l'unité glucopyranosique (g/mol)

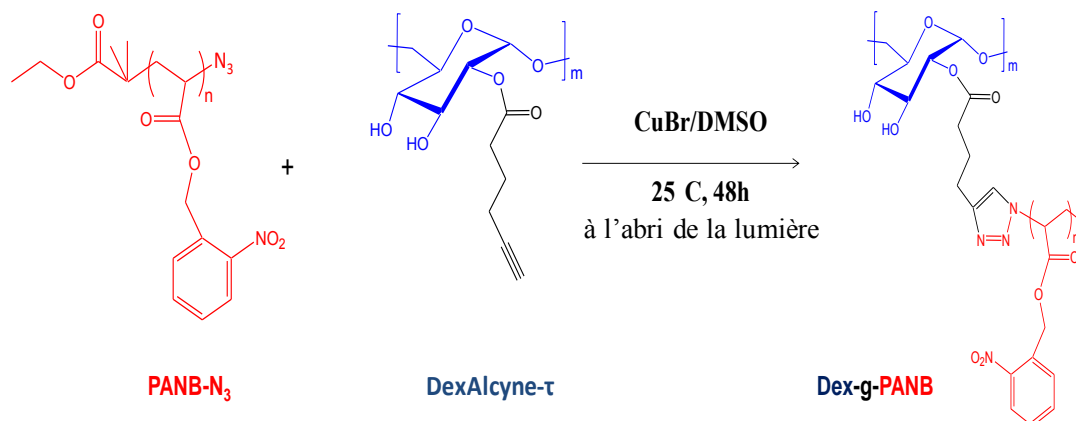


Figure 118 : Synthèse du glycopolymère Dex-g-PANB

A noter que la représentation du Dex-g-PANB donnée dans le schéma 10 est simplifiée : certaines unités glucopyranosiques peuvent contenir un azoture qui n'a pas réagi, certaines d'entre elles peuvent contenir un greffon greffé sur OH₃ ou OH₄, et certaines peuvent contenir deux greffons par exemple.

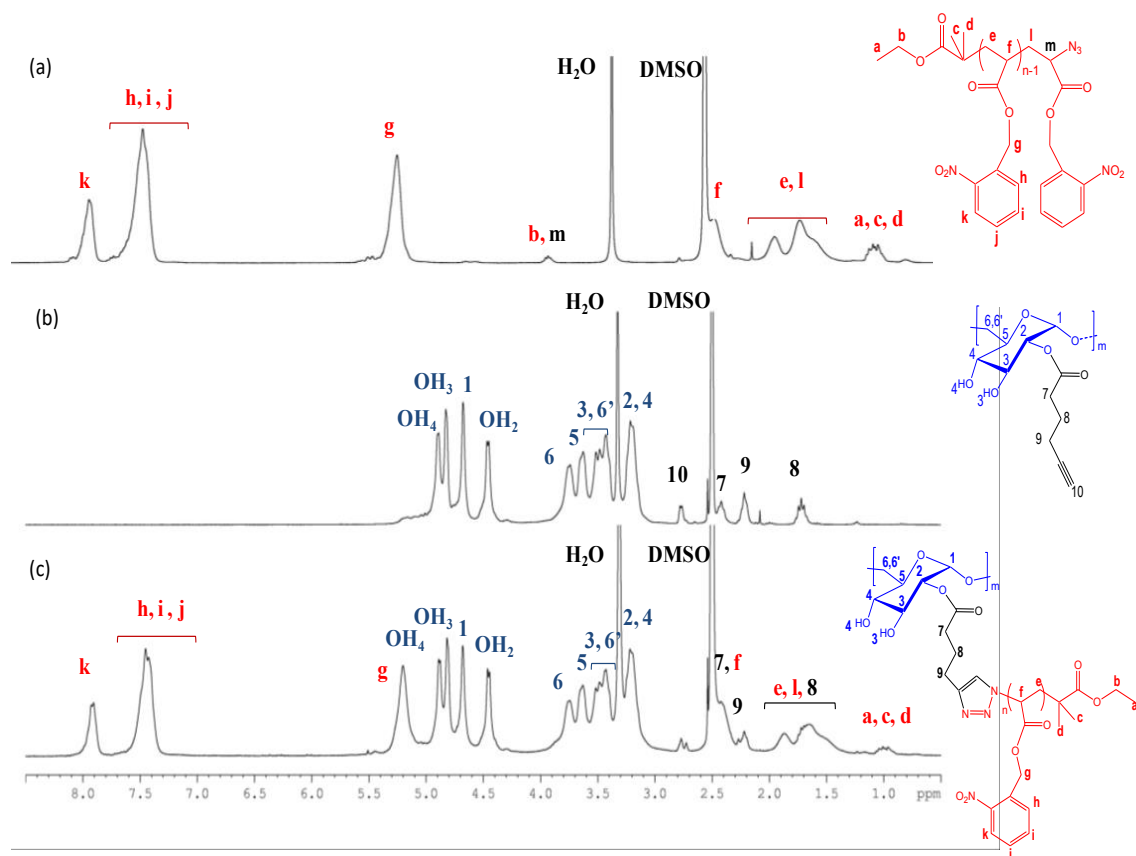


Figure 119 : Spectres RMN ^1H dans le DMSO- d_6 (a) du PANB- N_3 , (b) du DexAlcyne- τ et (c) du Dex-g-PANB

IV) Elaboration des nanoparticules

1) Par nanopréciipitation

Le glycopolymère Dex-g-PANB (25 mg) est dissous dans 5 mL de mélange de THF/ H_2O (95/5, v/v) si sa fraction massique en PANB est supérieure à 70 %. Pour le glycopolymère avec une fraction massique en PANB égale à 40 %, on utilise un mélange de THF/ H_2O (75/25, v/v). Cette solution est versée dans 10 mL d'eau Milli-Q avec une vitesse 0,1 mL/minute, sous faible agitation (100 tr/min). Après addition totale de la phase organique, 10 mL d'eau Milli-Q sont ajoutés pour figer le cœur des NPs. Finalement, les NPs obtenues sont lavées trois fois par centrifugation (Centrifugeuse GR20-22 JOUAN avec un rotor d'un diamètre de 14,5 cm, 13000 tr/min, à 15°C et pendant 30 min). Après chaque centrifugation, le surnageant est retiré puis remplacé par 10 mL d'eau Milli-Q et la suspension est redispersée durant 30 minutes en utilisant un bain à ultrasons. La distribution de taille des NPs est déterminée avant et après lavage.

2) Par Émulsion/Évaporation de solvant organique

a) Cas des nanoparticules Clickées, chargées en Doxorubicine :

(i) Utilisation de CuBr comme catalyseur

1 mL de DCM contenant 25 mg du PANB-N₃ ($\overline{M}_n = 10300 \text{ gmol}^{-1}$, $2,42 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$) ou un mélange PANB-N₃ + Doxorubicine est ajouté à 10 mL d'une solution aqueuse (eau Milli-Q saturée par du DCM) contenant 50 mg de DexAlcyne- τ ($\tau = 15 \%$, $4,26 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$ d'alcyne). Dès le mélange 3 équivalents de CuBr par azoture (1 mg, $6,90 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$) sont introduits. Le mélange est préémulsifié à l'aide d'un vortex pendant 1 minute sous flux d'azote, puis émulsifié en utilisant une sonde à ultrasons (puissance égale à 46 W et pendant 2 minutes) en mode pulsé et en présence d'un bain glacé. La sonde à ultrasons est couplée à un amplificateur Bioblock Scientific Vibracell 75043 et placée dans une enceinte capitonnée. L'émulsion obtenue est transférée dans un cristallisateur puis le DCM est évaporé pendant 2h dans une étuve (Thermoshaker, 37°C, agitation de 100 tr/min). Les NPs formées sont lavées 3 fois par centrifugation (13 000 tr/min, 45 minutes à 15°C) puis mises en contact avec une solution aqueuse d'EDTA (5 équivalents par équivalent de cuivre) pendant une nuit, sous agitation et à température ambiante. Les NPs sont à nouveau lavées par centrifugation, puis caractérisées par mesure de leurs tailles par HPPS.

(ii) Utilisation de CuSO₄/Acide ascorbique comme catalyseur

Le sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO₄, 5H₂O), l'acide L-ascorbique (AAsc, 99 %) et le chlorure de sodium (NaCl) proviennent de Sigma-Aldrich. La phase organique et la phase aqueuse ont des compositions identiques à celles employées pour préparer des NPs Clickées en présence du catalyseur CuBr. Dans le cas de la «Click» catalysée au CuSO₄/Acide ascorbique, on introduit 10 équivalents d'acide ascorbique par mole de CuSO₄ (soit 0,293 mL de la solution aqueuse d'AAsc à 80 mg/mL) dans la phase aqueuse. On ajoute ensuite la phase organique au mélange réactionnel et, avant la sonication, on introduit 5,5 équivalents de CuSO₄ par azoture (soit 0,164 mL de la solution aqueuse de CuSO₄ à 13 mg/mL). La suite de la procédure est identique au cas précédent avec le CuBr comme catalyseur.

b) Cas des nanoparticules non-Clickées :

Le protocole est similaire au précédent. Aucun catalyseur à base de cuivre n'est ajouté.

c) Cas des nanoparticules nues :

Le protocole est similaire au précédent, mais au lieu d'utiliser un dérivé du dextrane comme stabilisant, on emploie du Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) (3g/L). Un spectre RMN ^1H dans le DMSO- d_6 de ces NPs nues, réalisé après lavage et lyophilisation, confirme que les NPs ne contiennent plus de tensioactif à leur surface.

3) Stockage à l'état solide des NPs

Les NPs lavées sont lyophilisées en présence d'un cryoprotecteur (D-(+)-Tréhalose dihydrate, Sigma-Aldrich) car la lyophilisation conduit à une agrégation irréversible des NPs recouvertes de dextrane. Le cryoprotecteur est rajouté à raison de 10 mg par mL de suspension.

4) Analyse par RMN ^1H des NPs

Les NPs lyophilisées sans cryoprotecteur sont dissoutes dans du DMSO- d_6 . Leurs spectres RMN ^1H permet de déterminer la quantité de dextrane (et éventuellement de doxorubicine) dans les NPs.

V) TECHNIQUES DE CARACTÉRISATIONS**1) Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

Les spectres RMN sont réalisés à 25°C à l'aide d'un spectromètre Brüker Avance 300, avec un champ de 300 MHz pour les analyses RMN ^1H et de 75,5 MHz pour les RMN ^{13}C . Les analyses sont réalisées pour des solutions homogènes dans le DMSO- d_6 ou le CDCl_3 . Pour les analyses RMN ^1H , la concentration des échantillons est d'environ 10 mg/mL. Dans le cas des analyses RMN ^{13}C , les solutions sont de 80 mg/mL.

2) Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) a été réalisée avec le THF ou le DMSO comme éluant.

a) Cas du THF:

L'appareil est composé d'une pompe Waters 515 dont le débit a été fixé à 1mL/min, d'un dégazeur AF (waters in-line), d'une boucle d'injection de 100 μL et d'une série de trois colonnes Plgel 5 μm , 300 mm (10 $^5\text{\AA}$, 10 $^3\text{\AA}$, 10 $^2\text{\AA}$) équipée d'une pré-colonne de même type. Un détecteur de diffusion de la lumière de modèle Mini Dawn Treos (Wyatt Technology Corporation) ($\lambda = 658\text{ nm}$) est situé à la sortie des colonnes. Il est constitué de trois photodiodes qui mesurent l'intensité diffusée à 45, 90 et 140°. Un réfractomètre différentiel

de type OPTILAB rex (Wyatt Technology Corporation) est également installé en série. L'appareil est équipé d'un passeur d'échantillon de type Waters 2707 et d'un régulateur de température qui permet de faire les analyses à 40°C.

b) Cas de DMSO + 0,1 M NaNO₃ :

L'appareil est composé d'une pompe LC – 20AD Shimadzu dont le débit a été fixé à 0,7 mL/min, d'un dégazeur (DGU – 20A_{3R}, Shimadzu), d'une boucle d'injection de 100 µL et d'une série de trois colonnes Plgel 5 µm, 300 mm × 7,5 mm (10⁵Å, 10³Å, 10²Å) avec une pré-colonne de même type. Un détecteur de diffusion de la lumière de modèle Mini Dawn Wyatt. Il est constitué de trois photodiodes qui mesurent l'intensité diffusée à 45, 90 et 140°. Un réfractomètre différentiel de type (RID – 10A, Shimadzu) et d'un détecteur UV (SPD – 20A, Shimadzu).

c) Détermination de l'incrément d'indice de réfraction (dn/dC) :

Une solution de concentration égale à 10mg/mL est préparée dans 5 mL de l'éluant utilisé pour la SEC. Trois solutions diluées de 5 mg/mL, 2,5 mg/mL et 1,25 mg/mL sont alors préparées par dilutions successives, puis injectées dans le réfractomètre différentiel Waters 410. L'intensité I mesurée est proportionnelle à l'indice de réfraction et peut être tracée en fonction de la concentration massique en polymère C_p selon l'équation suivante, où la pente de la courbe permet d'estimer le dn/dC (Tableau 32):

$$I = A \times C_P$$

Avec :

$$A = dn/dC \times K$$

K: Constante de l'appareil, déterminée à partir d'une solution de dn/dC connu.

Tableau 32 : Incréments d'indice de réfractions des différents polymères

<i>Polymère</i>	<i>Éluant</i>	<i>dn/dC (mL/g)</i>
<i>PANB 10300</i>	THF	0,157
<i>PANB 3700</i>	THF	0,145
<i>Dextrane</i>	DMDO	0,073

On suppose que le PANB-Br et PANB-N₃ ont le même dn/dC.

3) Propriétés tensioactives des dérivés du dextrane

Des mesures de la tension superficielle air/solution aqueuse sont effectuées selon la méthode de l'anneau de Lecomte Du Noüy, sur un tensiomètre Krüss K20 EasyDyne automatique et thermostaté à 25°C (Figure 120).



Figure 120 : Tensiomètre Krüss K20 EasyDyne

Des solutions à différentes concentrations en produit sont préparées par dilution d'une solution mère, 24 h à l'avance, avec de l'eau MilliQ. Les mesures sont réalisées dans des piluliers qui sont préalablement nettoyés avec de l'acide sulfurique pour éliminer toute trace organique, puis rincés abondamment à l'eau, à l'acétone et enfin séchés. L'échantillon (20 mL) est introduit dans un pilulier et laissé au repos pendant 12 h dans un endroit frais pour permettre la saturation de l'interface par le tensioactif. Une durée de 15 minutes est nécessaire avant chaque mesure pour permettre la remontée en température (25° C dans notre cas pour tous les échantillons). Pour chaque échantillon, cinq mesures sont effectuées et une valeur moyenne est calculée. Entre chaque mesure, l'anneau est rincé à l'eau distillée puis à l'acétone, et finalement flambé.

4) Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres infrarouges ont été enregistrés avec un spectromètre Tensor 27, Brücker Optics sur un domaine compris entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} .

5) Distribution de taille des nanoparticules (HPPS)

a) Principe de la mesure :

Le HPPS (High Performance Particle Sizer) est une méthode de mesure de la taille des particules submicroniques basée sur la rétrodiffusion de la lumière. Un faisceau laser passe à travers une cuve contenant la dispersion et est diffusé par les particules en suspension. Celles-

ci sont constamment soumises au mouvement brownien et l'intensité de ce mouvement décroît lorsque la viscosité du milieu dispersant ou la taille des particules augmente. La diffusion de la lumière varie avec le temps et le coefficient de diffusion des particules dans un milieu donné est relié au diamètre des particules (d_H) selon la loi de Stokes-Einstein :

$$d_H = \frac{k_B T}{3\eta\pi D_t}$$

Où :

k_B est la constante de Boltzman

T : la température absolue du milieu dispersant

η : la viscosité du milieu dispersant

D_t : le coefficient de diffusion

La lumière diffusée est récupérée par un photomultiplicateur et le signal est ensuite traité par un corrélateur numérique permettant d'obtenir une fonction d'auto-corrélation. Cette fonction traduit la probabilité de retrouver une particule à l'instant ($t+dt$) au même endroit qu'à l'instant (t). Il s'agit d'une exponentielle décroissante en fonction du temps. La diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet donc la mesure du diamètre hydrodynamique de l'objet analysé, de l'intensité de la lumière diffusée (qui correspond au nombre de photons par seconde) et de l'indice de polydispersité ⁵. Pour une suspension monodisperse de NPs, la concentration de particules peut être déduite à partir de l'intensité de la lumière diffusée et de la taille des particules en se basant sur l'approximation de Rayleigh ⁵⁻⁸ :

$$I \propto d^6 C$$

Avec :

I: l'intensité de la lumière diffusée

d: Diamètre des NPs

C: Concentration de NPs

b) Appareillage :

Les mesures sont effectuées en rétro-diffusion, à un angle de 173° , sur l'appareil HPPS-ET Malvern Instrument. Cet appareil possède un laser de type He-Ne (3,0 mW, 633nm), d'un atténuateur automatique ou à transmission (100 % à 0,0003 %), d'un détecteur de type Avalanche Photodiode et il est possible de contrôler la température entre 10°C et 55°C car la température modifie la viscosité du milieu. La position de mesure du faisceau s'ajuste

automatiquement en fonction de la concentration de l'échantillon pour éviter les effets de diffusion multiple.

Le HPPS permet d'accéder à une valeur appelée « Z-Average Size » qui correspond à la taille moyenne des particules en intensité de lumière diffusée. Il donne aussi la distribution de taille réelle des NPs et un Indice de Polydispersité (Pdi). Cet indice traduit la concordance entre les courbes de corrélation mesurée et modélisée que l'appareil utilise pour calculer la distribution de taille. Un Pdi inférieur à 0,5 correspond à une mesure relativement conforme. Cette méthode est adaptée aux particules submicroniques. Elle ne détecte pas les agrégats de taille supérieure au micron pouvant se former lors de l'élaboration des particules.

c) Protocole opératoire :

Avant de commencer les mesures de taille par le HPPS, il faut créer une SOP (Procédure Opératoire Standardisée) qui représente un fichier où les paramètres nécessaires à la mesure sont indiqués. Les données présentées dans cette SOP concernent le dispersant qui est l'eau dans notre cas (indice de réfraction (1,330) et viscosité (0,887)) et les particules composées de PANB (indice de réfraction (1,491)). Toutes les mesures sont réalisées à 25°C.

6) Détermination des taux de recouvrement en dextrane des particules

A partir du spectre RMN ^1H des NPs lavées et lyophilisées sans cryoprotecteur, il est possible de quantifier la quantité de dextrane par rapport à la quantité du PANB- N_3 présentes dans la particule. En utilisant les masses molaires des unités monomères respectives, il est ainsi possible d'évaluer la masse de dextrane présent à la surface des particules par unité de masse (g) de PANB- N_3 par la formule suivante :

$$M_{\text{Dex}} (\text{g/g PANB}) = \left(\frac{A_{\text{Ha}}(\text{Dextrane})}{\frac{A_{\text{CH}_2}(\text{PANB-N}_3)}{2}} \right) \times \left(\frac{M_{\text{Dextrane}}}{M_{\text{PANB-N}_3}} \right)$$

Avec :

A_{Ha} : Aire du proton anomère des unités glucopyranosique (4,7 ppm)

A_{PANB} : Aire du CH_2 de l'unité monomère du PANB- N_3 (5,2 ppm)

$M_{\text{PANB-N}_3}$: Masse molaire de l'unité monomère du PANB- N_3 égale à 207 g/mol

M_{Dextrane} : Masse molaire de l'unité monomère du dextrane égale à 162 g/mol.

7) Stabilité colloïdale des nanoparticules

a) Stabilité colloïdale en fonction de la force ionique :

La turbidimétrie de la suspension a été étudiée à l'aide d'un spectromètre UVikon (Bio-Tek Instruments). 0,5 mL d'une suspension de NPs sont introduits dans des cuves spectrophotométriques contenant 3 mL de solution de NaCl de concentrations connues (10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, 10^{-1} M, 1M, 2M et 4M). Les cuves sont agitées manuellement et laissées au repos à température ambiante pendant une heure. Avant chaque mesure, les cuves sont à nouveau agitées et des mesures de la DO sont effectuées entre 450 nm et 650 nm avec des intervalles de 50 nm. Pour chaque concentration en NaCl, la courbe $\log(DO)$ en fonction de $\log(\lambda)$ est tracée et la pente notée $|n|$ est estimée.

b) Stabilité du recouvrement en dextrane en présence d'un tensioactif compétitif :

Afin d'évaluer la stabilité du recouvrement en dextrane présent à la surface des NPs, 1 % massique de SDS par rapport à la quantité de NPs employée est ajouté à 10 mL de suspension aqueuse de NPs. Le mélange est maintenu sous agitation magnétique à température ambiante pendant 24h puis les NPs sont centrifugées, lavées 2 fois avec de l'eau Milli-Q. Après lyophilisation, on peut estimer la quantité de dextrane par g de PANB grâce à l'équation donnée précédemment.

c) Stabilité du recouvrement en dextrane en présence du milieu de culture des cellules Caco-2 :

Cette étude consiste à évaluer la stabilité colloïdale des NPs en présence du milieu de culture (DMEM) des cellules Caco-2 en déterminant la quantité en dextrane présent sur les NPs avant et après contact du DMEM pendant 24h à température ambiante. Le protocole expérimental est identique à celui employé dans le cas du SDS.

8) Mesure de la mobilité électrophorétique (Détermination de l'épaisseur du recouvrement en dextrane)

La présence de groupes chargés à la surface d'une particule affecte la distribution ionique dans la région interfaciale entre la particule et le liquide. Il en résulte une augmentation de la concentration en contre-ions près de la surface de la particule, qui peut être modélisée sous la forme d'une double couche électrostatique. La première couche, appelée couche de Stern, correspond à la couche la plus proche de la surface et comporte des contre-ions fortement liés.

La seconde couche, appelée couche de Gouy-Chapman, est plus diffuse et son épaisseur dépend de la force ionique du milieu. Au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface de la particule, le potentiel chimique de la couche diffuse décroît (Figure 121).

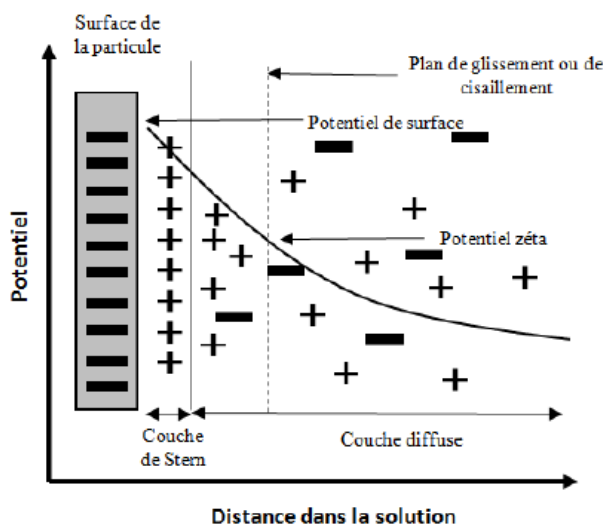


Figure 121 : Modélisation de la double-couche électrostatique autour d'une particule chargée⁹

Quand un champ électrique est appliqué à travers un électrolyte, les particules en suspension qui possèdent une charge électrique sont attirées vers l'électrode de charge opposée, alors que la force de frottement subie par les particules s'oppose à ce mouvement. Lorsque l'équilibre entre ces deux forces est établi, les particules se déplacent à vitesse constante. Leur vitesse dépend donc du champ électrique, du milieu et de la charge de la particule. Sous l'effet des forces de frottement, la couche d'ions diffuse est arrachée jusqu'à un certain plan appelé « plan de cisaillement ». Le potentiel mesuré au niveau de ce plan de cisaillement est appelé potentiel zêta (ζ). Pour une particule donnée dans un champ électrique donné, quelle que soit la composition ionique du milieu, la distance de la surface au plan de cisaillement reste la même. En pratique, le potentiel ζ que nous avons évalué n'est pas celui mesuré par l'appareil. Il a été recalculé à partir de la mobilité électrophorétique μ_E (exprimée en $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) des NPs mesurée par un Zétamètre selon l'équation modifiée de Booth¹⁰ ci-dessous, comme cela a été souvent réalisé au LCPM^{11,12}.

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

Avec $E = 7520 \mu\text{E}$ et f_1 le facteur de correction de Henry qui tient compte de la déformation du champ électrique autour des particules. Les effets de relaxation sont pris en compte par les coefficients C_3 et C_4 .

Cette équation permet de calculer ζ pour toute valeur de K_h (m^{-1}) (longueur de Debye-Hückel liée à la force ionique) et de a (rayon de la particule). Afin d'estimer l'épaisseur du recouvrement (Δ_{PZ}), l'évolution du ζ *versus* K_h aux faibles concentrations en sel peut être approximée par l'équation d'Eversole et de Boardman ¹⁰ci-dessous.

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

Avec :

Z : Valence de l'ion considéré dans le milieu salin (ici $Z=1$)

E : Charge élémentaire de l'électron ($1,6022 \times 10^{-19}$ C)

k_B : Constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23}$ JK⁻¹)

T : Température absolue du milieu (298 K)

Ψ_0 : Potentiel de surface de la particule

En mesurant le potentiel zêta à différentes forces ionique (C_i) et en reportant $\ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \zeta}{4 k_B T} \right) \right]$ en fonction de K_h , on obtient une courbe dont la pente à faible valeur de K_h est égale à Δ_{PZ} , la distance de la surface au plan de cisaillement. Δ_{PZ} peut être assimilé à l'épaisseur de la couche de dextrane recouvrant la surface des NPs.

Dans cette étude, la mobilité électrophorétique est mesurée dans des solutions de NaCl de concentration variable (de 10^{-6} à 10^{-2} mol/L) à l'aide de l'appareil Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments). Pour cela, 1,5 mL de la suspension des NPs sont ajoutés à 1,5 mL d'une solution de NaCl. La cuve d'analyse est d'abord rincée avec de l'eau Milli-Q, puis avec de la suspension à analyser. Enfin, cette cuve est remplie de la suspension de NPs en veillant à ne pas introduire de bulles d'air puis fermée par des bouchons des deux côtés.

9) Détermination de la quantité résiduelle de cuivre

Après lyophilisation, les NPs Clickées sont mises en suspension dans 5 mL de la solution aqueuse d'acide nitrique HNO_3 à 0,1 % massique à température ambiante, pendant une nuit. Avant analyse, la suspension est filtrée sur filtre de porosité 0,2 μm . La quantité de cuivre résiduel dans les NPs finales est déterminée par spectrométrie par torche à plasma (ICP-OES) à l'aide d'un spectromètre ICAP 6000 (Thermo Scientific). L'appareil est préalablement calibré avec des solutions de concentrations variant de 0 à 5 ppm en CuSO_4 dans l'eau Milli-Q.

10) Caractère photosensible des nanoparticules

L'étude du caractère photosensible des NPs a été réalisée à l'aide d'une lampe UV de type Omnicure S1000 équipée d'une fibre optique de diamètre égal à 8mm (Figure 122 (a)) et d'un filtre 320-390 nm (Figure 122 (b)).

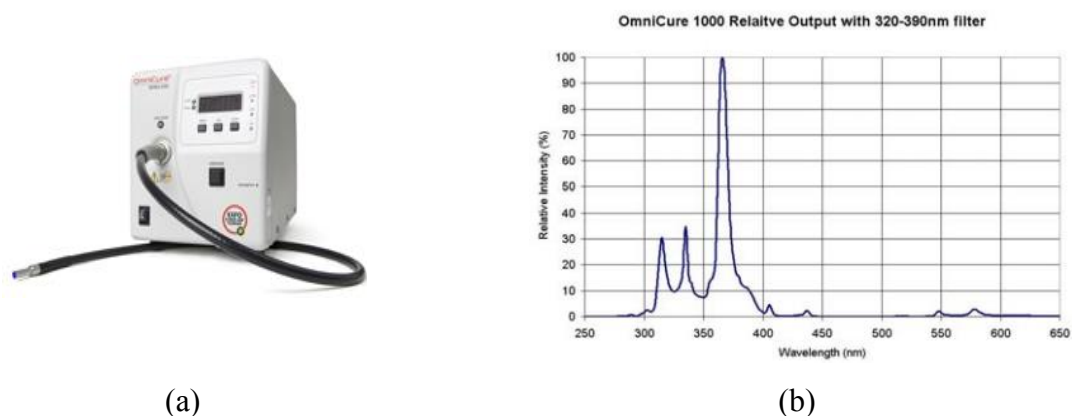


Figure 122 : (a) Lampe UV de type Omnicure S1000 (b) Spectre UV avec le filtre 320-390 nm

Une première expérience a été réalisée en faisant varier la puissance (50, 251, 419, 508 et 1010 mW/cm²) et la durée d'irradiation. Pour cela, 200 µL de suspensions de NPs dans le PBS, de concentration égale à 0,114 mg/mL ont été introduits dans un puit d'une plaque de culture cellulaire de 96 puits, puis irradiés en utilisant cette lampe UV. Après chaque condition d'irradiation, 100 µL sont prélevés et dilués avec 1mL de PBS. L'intensité diffusée est mesurée par HPPS. Cette grandeur est proportionnelle au nombre de particules et à leur concentration dans la suspension. Le PBS est choisi dans cette expérience car l'irradiation des PANB génère des PAA qui se transforment en polycarboxylates correspondant solubles dans le PBS. D'où la possibilité de suivre la disparition des NPs au cours de l'irradiation.

VI) ENCAPSULATION ET LIBERATION DE LA DOXORUBICINE DES NANOPARTICULES

1) Encapsulation de la Doxorubicine dans les NPs:

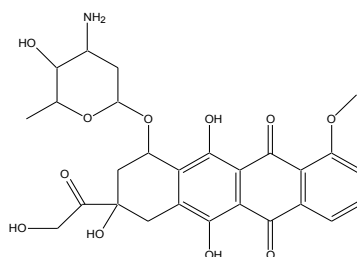


Figure 123 : Doxorubicine

L'encapsulation de la Doxorubicine (DOX, Figure 123) dans les NPs a été évaluée en calculant l'efficacité d'encapsulation (EE) et le taux de charge (τ_{charge}) qui sont déterminés soit par dosage direct de la DOX dans les NPs (solubilisation des NPs dans le DMSO- d_6 puis dosage de la DOX par RMN 1H) ou par dosage indirect (dosage par HPLC de la DOX non encapsulée présente dans les eaux de lavage lors de la centrifugation).

L'efficacité d'encapsulation (EE) et le taux de charge (τ_{charge}) sont définis comme suit :

$$\text{Efficacité d'encapsulation (EE)} = \frac{\text{Masse encapsulée de DOX}}{\text{Masse initiale de DOX}} \times 100$$

$$\text{Taux de charge } (\tau_{charge}) = \frac{\text{Masse encapsulée de DOX}}{\text{Masse totale des NPs}} \times 100$$

➤ Dosage direct par RMN 1H

Le dosage de la DOX encapsulée dans les NPs lavées et lyophilisées est réalisée en présence d'une référence interne (téréphthalaldéhyde, benzène-1,4-dicarboxaldéhyde). A partir des aires des pics des protons caractéristiques de la DOX et de la référence interne, il est possible de calculer le rapport molaire de ces deux composés (R_1) puis leur rapport massique (R_2) par les équations suivantes :

$$R_1 = \text{Rapport molaire } \left(\frac{DOX}{Réf} \right) = \frac{\frac{\text{Aire}_{\text{pic d}}}{3}}{\frac{\text{Aire}_{\text{pic CH (Réf interne)}}}{2}}$$

$$R_2 = \text{Rapport massique } \left(\frac{DOX}{Réf} \right) = \text{Rapport molaire } \left(\frac{DOX}{Réf} \right) \times \left(\frac{M_{DOX}}{M_{Réf}} \right)$$

Avec :

$\text{Aire}_{\text{pic CH (Réf interne)}}$: aire du pic caractéristique des 2 protons aldéhyde du téréphthalaldéhyde, situé à 10,15 ppm (Figure 124).

$\text{Aire}_{\text{pic d}}$: aire du pic (d) caractéristique du groupe OCH_3 de la DOX, situé à 4 ppm (Figure 125(a)).

M_{DOX} et $M_{Réf\ interne}$: masses molaires de la DOX (543 g/mol) et du téréphthalaldéhyde (134 g/mol).

Connaissant les quantités exactes de NPs (m_{NPs}) et de référence interne ($m_{Réf\ interne}$) introduites dans le tube RMN, on peut alors estimer la quantité massique de DOX présente dans ce tube ($m_{DOX} = R_2 \times m_{Réf\ interne}$).

Le taux de charge en DOX est alors calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de charge} = \frac{m_{DOX}}{m_{NPS}} \times 100$$

L'efficacité d'encapsulation (EE) est quant à elle estimée pour 25 mg de NPs :

Efficacité d'encapsulation

$$= \left(25 \text{ mg} \times \frac{m_{DOX}}{m_{NPS}} \right) \times \frac{100}{\text{Quantité initiale de DOX introduite lors de la formulation des NPs}}$$

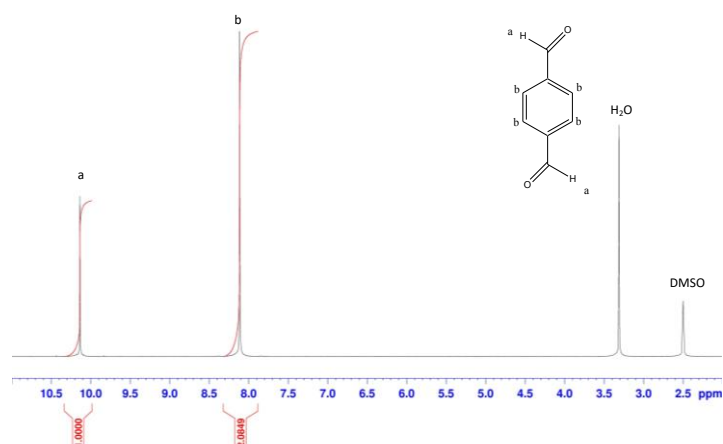


Figure 124 : Spectre RMN¹H du téréphthalaldéhyde dans le DMSO-d₆

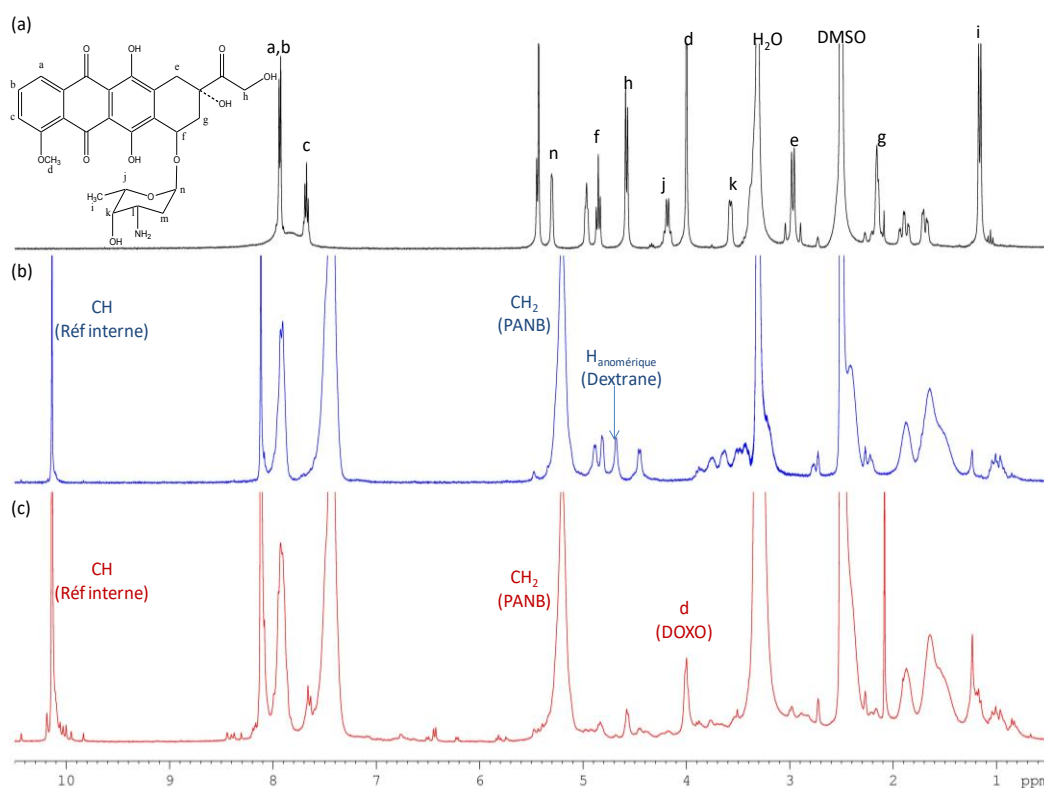


Figure 125 : Spectres RMN¹H dans le DMSO-d₆ (a) de la Doxorubicine, (b) des nanoparticules vides et (c) des nanoparticules chargées de Doxorubicine en présence de la référence interne

➤ **Dosage indirect par HPLC**

La quantité de DOX non encapsulée dans les NPs a été déterminée par Chromatographie en phase Liquide à Haute Pression (HPLC). Les conditions de dosage par HPLC de la DOX sont regroupées dans le Tableau 33. Une courbe d'étalonnage (Figure 126) a été établie par HPLC en utilisant des solutions de DOX de concentrations connues allant de $6 \cdot 10^{-2}$ à $6 \cdot 10^{-4}$ mg / mL, préparées par dilutions en série à partir d'une solution mère de DOX dans de l'eau Milli-Q. Pour doser la DOX non encapsulée dans les NPs, les trois eaux de lavages sont collectées après chaque centrifugation, puis dosées par HPLC.

$$\sum \frac{\text{Masse surnageant prélevé}}{\text{Densité de l'eau}} \times \frac{\text{Aire du pic}}{\text{Pente de la courbe de calibration}}$$

= Masse de la DOX dans les surnageants = Masse de la DOX non encapsulée

Tableau 33 : Conditions de dosage de la Doxorubicine dans de l'eau milli-Q par HPLC

Colonne	Colonne Pursuit C8 150 x 4,6 5µm 150 x 4,6: Longueur et diamètre de la colonne en mm 5µm : Diamètre des billes en µm		
Solvant	Eau/Acétonitrile/0,1 %(vol) TFA		
Gradient	Temps (min)	Eau (% vol)	Acétonitrile (% vol)
	0	90	10
	20	0	100
	25	0	100
Débit	1 mL/min		
Volume injecté	20 µL		
Détection en UV	480 nm		

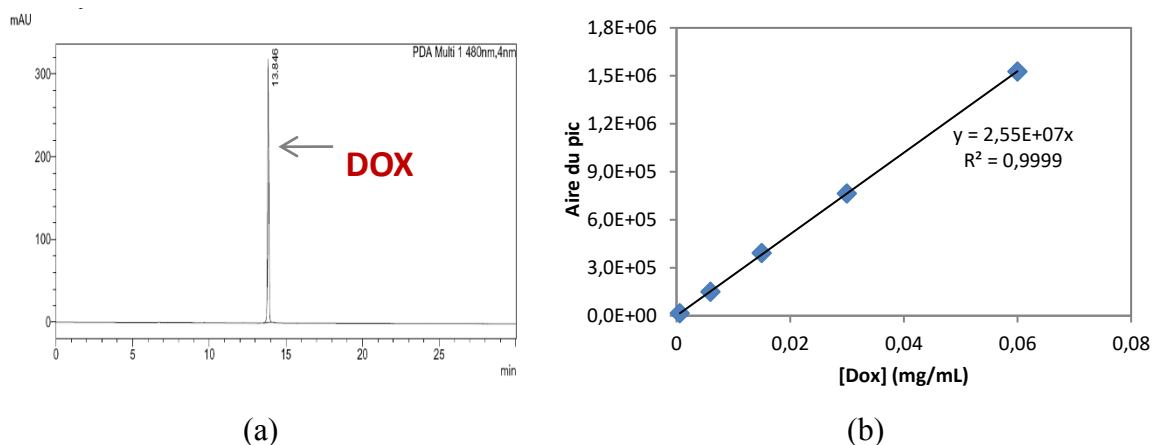


Figure 126 : Dosage de la Doxorubicine dans l'eau Milli-Q par HPLC, détection UV à 480 nm (a) Chromatogramme d'une solution de DOX dans l'eau Milli-Q, (b) Courbe de calibration de la Doxorubicine dans l'eau Milli-Q

2) Libération de la Doxorubicine

La libération de la DOX a été étudiée dans le tampon phosphate PBS (0,148 M, pH = 7,4) et dans le milieu de culture des cellules Caco-2 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM).

a) Solubilités maximales

Ces solubilités maximales sont préalablement déterminées expérimentalement par UV en saturant les milieux de libération par un excès de DOX. Ces deux suspensions sont laissées sous agitation à 37°C, pendant 24h à l'abri de la lumière puis centrifugées à 13 000 tr/min pendant 45 minutes. La concentration de la DOX dans le surnageant récupéré après centrifugation est égale à la solubilité maximale de la DOX dans le milieu étudié. Pour déterminer les solubilités maximales, deux courbes d'étalonnage de la DOX dans le PBS et dans le DMEM ont été tracées, pour des concentrations inférieures à ces concentrations maximales (Figure 127).

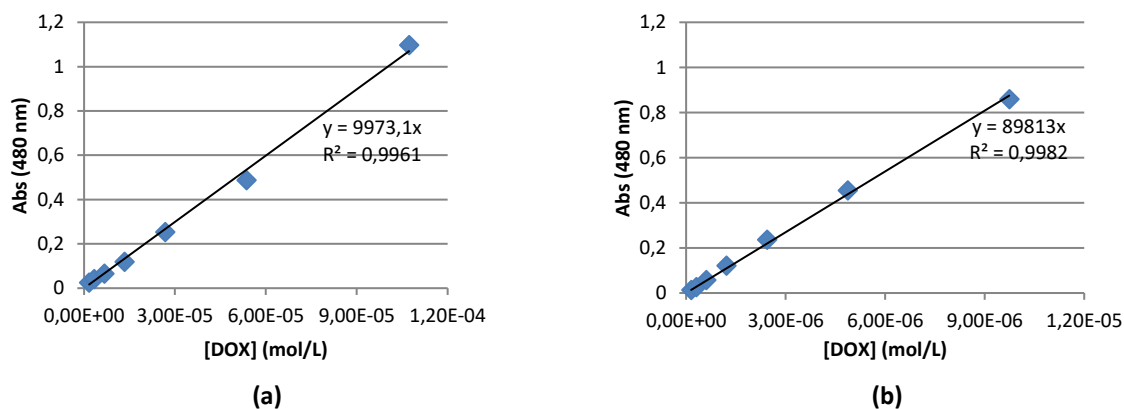


Figure 127 : Courbes d'étalonnage de la DOX dans le (a) PBS et le (b) DMEM (Observation par UV à 480 nm)

b) Libération de Doxorubicine par simple diffusion

5,7 mg de NPs sont introduits dans 50 mL de DMEM ce qui correspond à une concentration de NPs égale à 0,114 mg/mL. Cette concentration est celle des essais biologiques réalisés sur les cellules Caco-2. Compte tenu du taux de charge de la DOX dans les NPs (environ 30 %), les conditions Sink vont être bien respectées même si la totalité de la DOX était libérée. Les NPs sont mises sous agitation à 37°C et à l'abri de la lumière. 200 µL de cette suspension sont régulièrement prélevés, centrifugés pour ne pas injecter les NPs en HPLC (mini centrifugeuse, 3 minutes à 13000 tr/min) puis le surnageant est récupéré et analysé par HPLC pour doser la DOX libérée par simple diffusion (Figure 128). Les conditions du dosage HPLC de la DOX libérée par simple diffusion sont les mêmes que celles décrites précédemment.

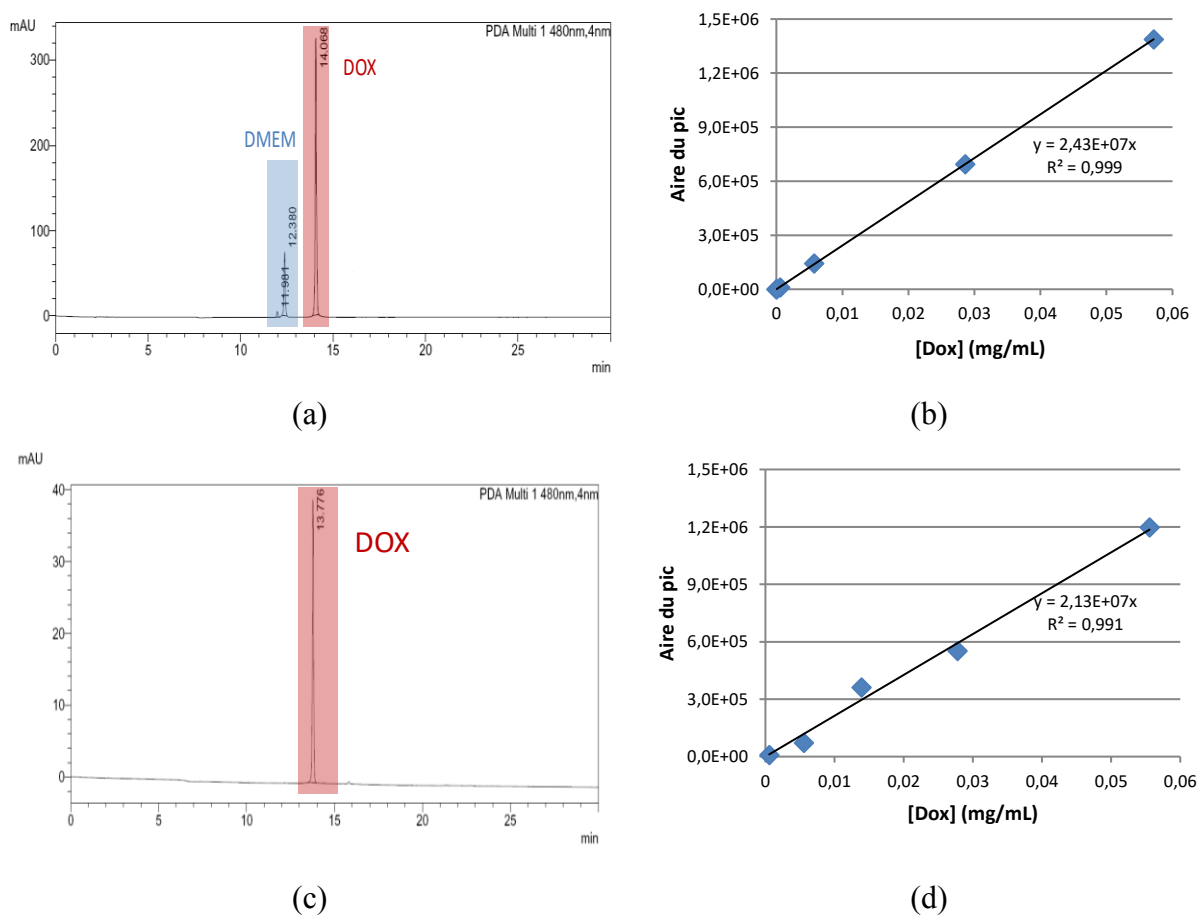


Figure 128 : Dosage de la Doxorubicine par HPLC, détection en UV à 480 nm (a) Chromatogramme d'une solution de DOX dans le DMEM, (b) Courbe de calibration de la DOX dans le DMEM, (c) Chromatogramme d'une solution de DOX dans le PBS (d) Courbe de calibration de la DOX dans le PBS

c) Libération de Doxorubicine par irradiation UV :

Pour cette étude, les essais de libération de la DOX par irradiation sont réalisés dans des microplaques de 96 puits. On utilise alors une concentration en NPs et un volume identiques à ceux qui seront employés pour les tests *in vitro*. Après irradiation, on suit la libération de la DOX dans le DMEM. Par exemple, pour une irradiation à 60 mW/cm² pendant 30 secondes, un suivi de la libération de la DOX des NPs est réalisée après : 0 (tout de suite après irradiation), 1h, 2h, 3h, 4h, 24h et 48h. Les conditions de dosage HPLC de la DOX libérée par irradiation sont les mêmes que précédemment (Tableau 33).

VII) POTENTIEL BIOLOGIQUE DES NANOPARTICULES**1) Culture cellulaire**

Dans cette étude, le potentiel biologique des NPs a été évalué sur des cellules Caco-2, lignée cancéreuse humaine de côlon. Le milieu de culture des cellules Caco-2 est le Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma) supplémenté par 10 % (v/v) de sérum fœtal bovin et 1 % (v/v) d'antibiotique (Antibiotique antimycotique, Sigma).

La congélation des cellules dans l'azote liquide à -196°C avait été effectuée sur une population cellulaire en phase exponentielle de croissance. Pour cela, la suspension des cellules a été centrifugée (800 tr/min pendant 5 min) et le culot repris dans un volume de milieu de culture DMEM afin de congeler environ 7.10⁶ cellules Caco-2 par cryotube dans 0,9 mL de milieu. 0,1mL de DMSO (agent cryoprotecteur) avait été ajouté ainsi que 0,1 mL de sérum fœtal bovin dans ce cryotube. Les cryotubes avaient ensuite été placés dans un « Nicool[®] » contenant de l'azote liquide à -196°C qui permet une congélation progressive des cellules dans les vapeurs d'azote pour limiter au maximum leur mort cellulaire. Les cryotubes sont stockés par la suite dans l'azote liquide à -196°C. Dans le cas de ces travaux, les cellules avaient été congelées au 55^{ème} passage, à une concentration initiale proche de 10⁷ cellules /mL.

Chaque cryotube est décongelé rapidement à 37°C pour éviter un contact prolongé du DMSO, fortement cytotoxique pour les cellules. La suspension décongelée est reprise dans 9 mL de DMEM préchauffé à 37°C. Après centrifugation à 800 tr/min pendant 5 minutes, le surnageant contenant les cellules mortes et le DMSO est éliminé, puis remplacé par du milieu de culture frais (13 mL). Les cellules sont remises en culture à 37°C dans des falcons de culture cellulaire T75 (75 cm³) sous atmosphère contrôlée (5 % CO₂). Les cellules Caco-2 adhèrent à la boîte de culture et lorsqu'elles atteignent la confluence, une étape de trypsination

est réalisée pour les détacher de la boîte de culture et les remettre en suspension dans du milieu frais. La trypsination est réalisée comme suit : après rinçage du tapis cellulaire avec du tampon phosphate PBS (pH = 7,4) 3 mL d'une solution de trypsine/EDTA à 0,5 % sont ajoutés. Après incubation pendant 3 minutes à 37°C et sous atmosphère contrôlée (5 % CO₂), le tapis cellulaire se dissocie. L'action de la trypsine est stoppée par ajout de 10 mL de milieu de culture frais contenant du sérum fœtal bovin(10 %). Les cellules en suspension sont récupérées par centrifugation à 800 tr/min pendant 5 min. Le culot qui contient les cellules est repris dans 10 mL de DMEM. 0,4 mL de cette nouvelle suspension est analysée par un compteur automatique de cellules (Vi-CELL XR) basé sur une méthode d'analyse d'images numériques après coloration des cellules au bleu trypan. Ce colorant rentre dans les cellules mortes, alors que les cellules vivantes l'excluent. Ainsi, une cellule vivante restera blanche au microscope et les cellules mortes paraîtront bleues. La suspension cellulaire est rediluée dans le DMEM pour atteindre environ 10⁵ cellules/mL et répartie dans plusieurs flacons de culture. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous atmosphère contrôlée (5 % de CO₂). Un changement du milieu de culture est nécessaire toutes les 48 h afin d'assurer l'apport nécessaire en nutriment aux cellules. La croissance des cellules est évaluée à l'aide d'un microscope optique. Les cellules sont cultivées jusqu'à environ 80 % de confluence. A ce stade, une trypsination est réalisée ainsi qu'un comptage automatique et un réensemencement des cellules. Le nombre de passages ou repiquages des cellules doit être noté dans la mesure où il peut influencer le temps de multiplication des cellules et leurs capacités métaboliques. Lorsqu'on introduit les cellules dans les microplaques de 96 puits, on dilue la suspension avec du milieu de culture pour atteindre une densité de 2.10⁴ cellules/mL.

2) Évaluation de la viabilité cellulaire

Afin d'évaluer la toxicité des traitements subis par les cellules Caco-2, un test de cytotoxicité par MTT (Méthylthiazoltétrazolium) est réalisé. Le sel de tétrazolium de ce réactif est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en formazan (Figure 129). La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu violacé. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test, mais aussi à leur activité métabolique. Une diminution de l'activité mitochondriale est donc signe de : (i) une diminution du nombre de cellules, (ii) une activité cellulaire signe d'une mort programmée ou (iii) une mort cellulaire.

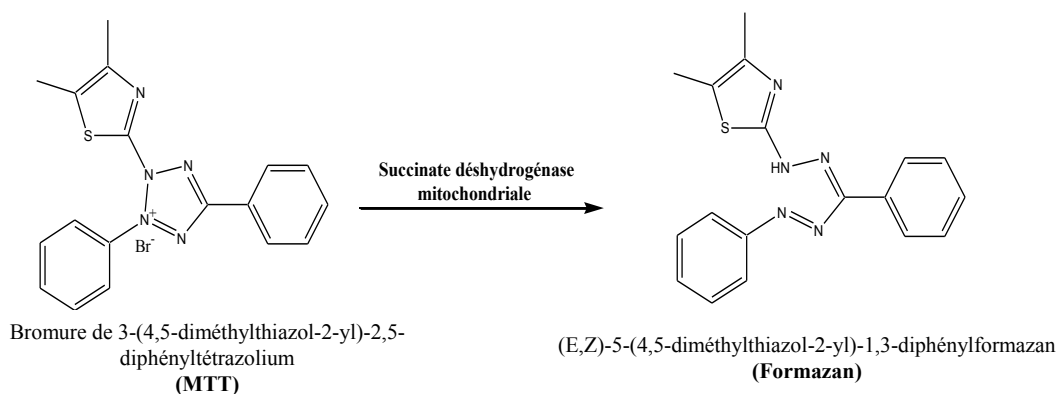


Figure 129 : Réaction de réduction du méthylthiazoltétrazolium en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives

Les tests sont réalisés dans des microplaques de 96 puits. 200 μL de la suspension cellulaire à une densité de 2.10^4 cellules/mL sont introduits dans chaque puit. Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère contrôlée (5 % de CO_2) pendant 24 h avant chaque traitement. Chaque traitement est réalisée 3 fois (3 puits différents) et chaque expérience est réalisée au moins 2 fois. Après chaque traitement, le milieu de culture est remplacé par du frais et chauffé à 37°C (200 μL) puis 20 μL d'une solution de MTT dans le PBS (2mg/mL) sont ajoutés. On laisse incubé pendant 3 h à 37°C sous atmosphère contrôlée (5 % de CO_2), puis tout le surnageant est éliminé. 150 μL d'isopropanol sont rajoutés dans chaque puits pour dissoudre les sels violets de formazan insolubles formés. Au final, une lecture de l'intensité de cette coloration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 550 nm.

a) Évaluation de la biocompatibilité des nanoparticules

Pour cette expérience, différentes concentrations de NPs allant de 14,2 $\mu\text{g/mL}$ jusqu'à 227 $\mu\text{g/mL}$ ont été testées. Après 24 h et 48 h d'incubation des NPs avec les cellules Caco-2 à 37°C et sous atmosphère contrôlée (5 % de CO_2), la viabilité des cellules Caco-2 a été évaluée par dosage MTT.

b) Étude de la résistance des cellules aux irradiations UV

L'irradiation des cellules Caco-2 a été réalisée en utilisant la même lampe UV décrite précédemment. Pour cette expérience, les cellules incubées pendant 24 h dans des microplaques de 96 puits sont soumises aux différentes conditions d'irradiation en termes de puissance et de durée d'irradiation. Les cellules irradiées sont incubées de nouveau pendant 24 et 48 h à 37°C et sous atmosphère contrôlée (5 % de CO_2) avant de réaliser le test MTT.

Ces expériences ont été réalisées en absence ou en présence des NPs. Dans ce dernier cas, la concentration finale en NPs dans les puits est égale à 0,114 mg/mL (20 μ L d'une solution mère de 1,25 mg de NPs/mL de PBS, dans un volume final de DMEM égal à 220 μ L).

Un renouvellement du milieu de culture a été parfois réalisé 4 h après l'irradiation, puis les cellules Caco-2 sont à nouveau incubées, dans ce milieu de culture rafraîchi, pendant 24 ou 48 h. Pour cela, 220 μ L de milieu sont prélevés et remplacés par du milieu de culture frais.

c) Analyses statistiques

Dans cette étude, le modèle choisi pour effectuer les analyses statistiques est le modèle Duncan.

Ce modèle de comparaisons multiples est utilisé pour déterminer les différences significatives entre les valeurs moyennes dans une analyse de variance (α). Ce modèle indique quelles sont les valeurs significativement différentes les unes des autres.

VIII) POST-FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES

1) Post-fonctionnalisation des nanoparticules avec l'acide folique

a) Fonctionnalisation de l'acide folique par un bras azoture (AF-N₃)

L'acide folique (AF, $\geq 97\%$), le *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et la 3-azido-1-propanamine (90%) proviennent de Sigma-Aldrich et sont utilisés sans purification préalable. Le DMSO est séché sur tamis moléculaire 48 h avant son utilisation et la pyridine est distillée puis stockée sur des pastilles de CaCl₂. La modification de l'AF avec une fonction azoture est réalisée selon la réaction suivante (Figure 130) :

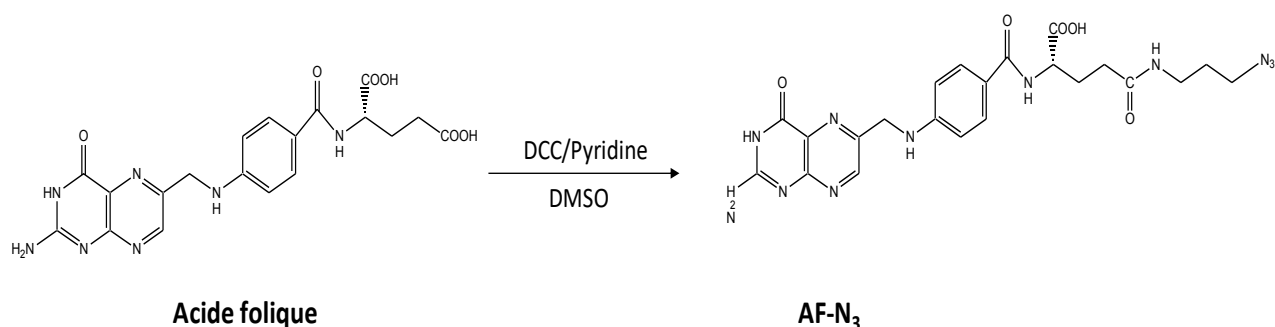


Figure 130 : Réaction de fonctionnalisation de l'acide folique avec la 3-azido-1-propanamine

1 g d'AF (2,26 mmol) et 1,16 g de DCC (5,62 mmol, 2,5 équivalents) sont introduits dans un ballon bicol et dissous dans un mélange DMSO/pyridine (60 mL, 2/1, v/v) sous atmosphère inerte (N₂). 221 μ L de 3-azido-1-propanamine (2,25 mmol, 1 équivalent) sont solubilisés dans

0,5 mL de DMSO, puis ajoutés au mélange réactionnel. La réaction est agitée à température ambiante pendant toute une nuit. Le mélange réactionnel est ensuite filtré, puis le surnageant est précipité dans 700 mL de diéthyléther froid. Le produit brut est récupéré après filtration et séchage sous la forme d'une poudre jaune (Figures 131 et 132) puis purifié par HPLC préparative. Le produit purifié est analysé par HPLC analytique et par RMN ¹H. Les conditions de purification de l'AF-N₃ par HPLC préparative ainsi que l'analyse par HPLC sont regroupées dans les tableaux suivants (Tableaux 34 et 35) :

Tableau 34 : Conditions de purification de l'AF-N₃ par HPLC préparative

Colonne	Colonne Nucleosil C18 250 x 21 100-5 250 x 21 : Longueur et diamètre de la colonne en mm 100-5: Taille des pores en Å et diamètre des billes en µm		
Solvant	Eau/Acétonitrile (v/v) + 0,1% Acide trifluoroacétique		
	Temps (min)	Eau (%v)	Acétonitrile (%v)
Gradient	0	90	10
	25	0	100
	30	0	100
Débit	9 mL/min		
Détection en UV	290 nm		

Tableau 35 : Conditions d'analyse de l'AF-N₃ par HPLC

Colonne	Colonne Pursuit C18 250 x 4,6 5µm 250 x 4,6: Longueur et diamètre de la colonne en mm 100-5: Taille des pores en Å et diamètre des billes en µm		
Solvant	Eau/Acétonitrile (v/v) + 0,1% Acide formique		
	Temps (min)	Eau (% v)	Acétonitrile (% v)
Gradient	0	90	10
	15	0	100
	18	0	100
Débit	1 mL/min		
Détection en UV	290 nm		

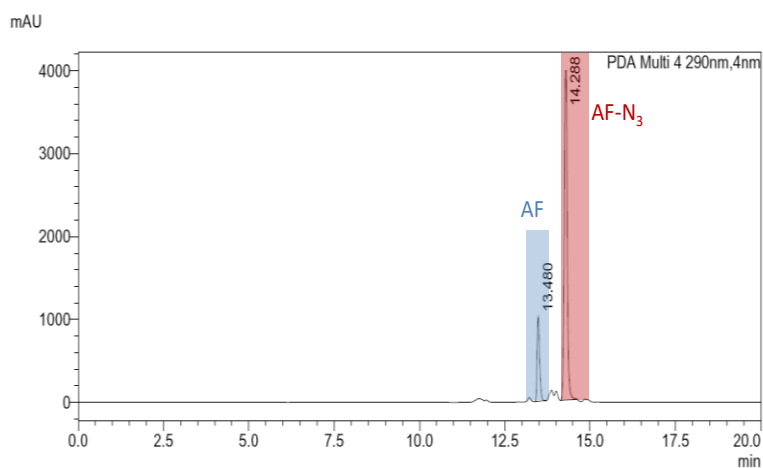


Figure 131 : Chromatogramme de l'acide folique azide par HPLC (détection en UV à 290 nm)

La pureté de l'AF-N₃ est estimée à 80 % en se basant sur les aires des pics caractéristique de l'AF et de l'AF-N₃.

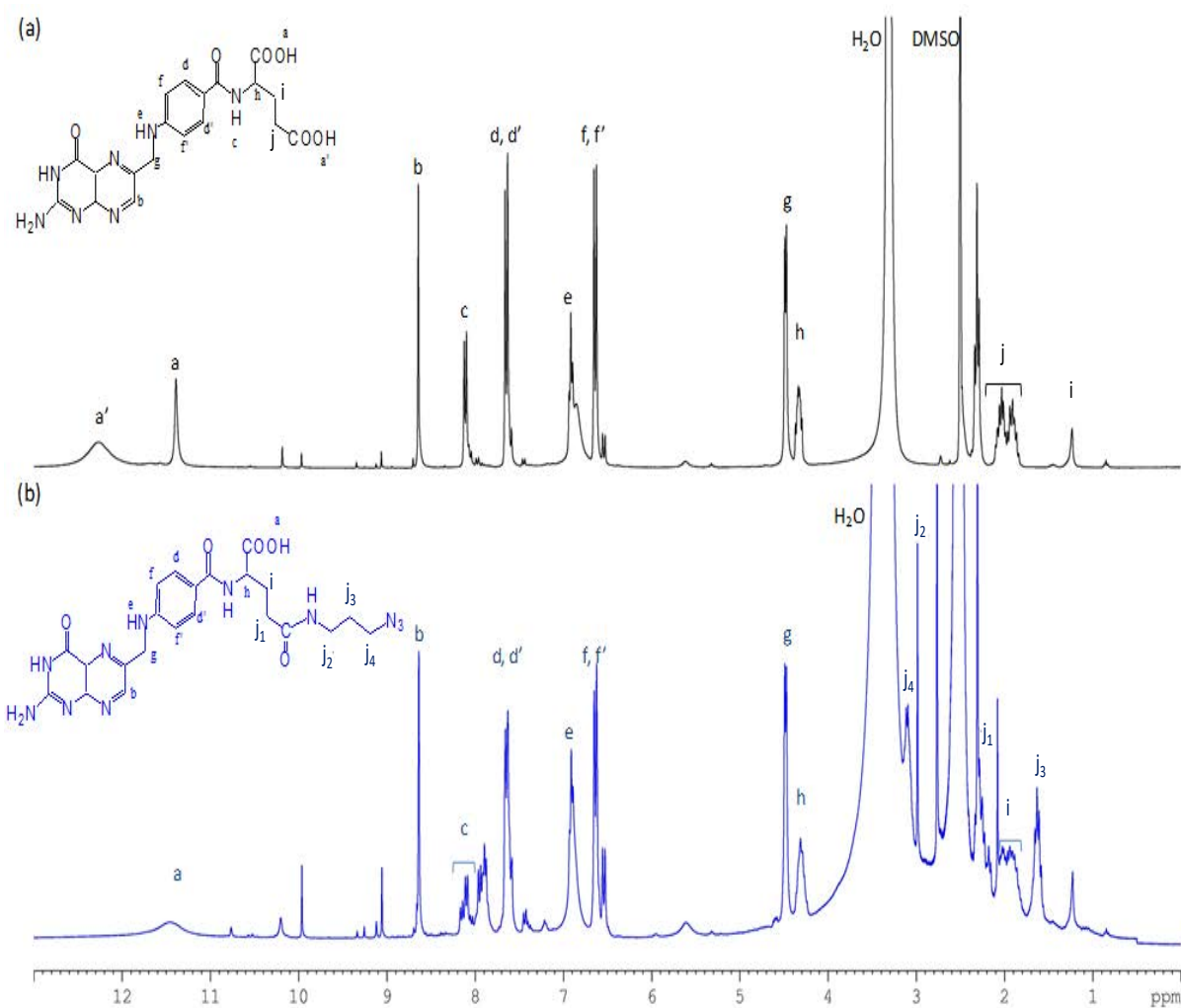


Figure 132 : Spectres RMN ¹H (DMSO-d₆, 298 K) de (a) AF commercial et (b) dérivé AF-N₃

b) Post-fonctionnalisation des nanoparticules avec l'acide folique

La post-fonctionnalisation des NPs avec AF-N₃ a été réalisée sur des NPs déjà « Clickées » comportant un cœur PANB-N₃ et une couronne Dex-Alcyne.

On introduit 3 mL de suspension de NPs dans l'eau milli-Q (à 5 mg/mL) ainsi que 5,21 mg d'AF-N₃ dissous dans 100 µL de DMSO dans un schlenk. Ceci revient à introduire 5 équivalents de fonctions azoture d'AF-N₃ par fonctions alcyne libres et estimées présentes à la surface des NPs (quantifiées *via* le spectre RMN ¹H des NPs). Pour réaliser cette post-fonctionnalisation, on introduit 5,5 équivalents de CuSO₄ par fonctions azoture et 10 équivalents d'acide ascorbique (AAsc) par mole de CuSO₄. Après ajout du catalyseur (CuSO₄/AAsc), le milieu réactionnel est maintenu à température ambiante et sous agitation pendant toute une nuit. Les NPs post-fonctionnalisées sont lavées 3 fois par centrifugation (13 000 tr/min, 45 minutes à 15°C) puis mises en contact avec une solution aqueuse d'EDTA (5 équivalents par équivalent de CuSO₄) pendant une nuit sous agitation et à température ambiante. Les NPs post-fonctionnalisées sont à nouveau lavées par centrifugation, puis caractérisées par mesure de leurs tailles par HPPS

A partir du spectre RMN ¹H des NPs post-fonctionnalisées avec AF-N₃ (Figure 133) lavées et lyophilisées sans cryoprotecteur, il est possible d'évaluer la masse d'AF présente à la surface des NPs par unité de masse (g) de PANB-N₃ par la formule suivante :

$$M_{AF} \text{ (g/g PANB)} = \left(\frac{A_{CH}(AF)}{A_{\frac{CH_2}{2}}(PANB-N_3)} \right) \times \left(\frac{M_{AF}}{M_{PANB-N_3}} \right)$$

Avec :

A_{CH} : Aire du CH de l'acide folique (8,6 ppm)

$A_{CH_2(PANB-N_3)}$: Aire du CH₂ de l'unité monomère du PANB-N₃ (5,2 ppm)

M_{PANB-N_3} : Masse molaire de l'unité monomère du PANB-N₃ (207 g/mol)

M_{AF} : Masse molaire de l'AF-N₃ (441 g/mol)

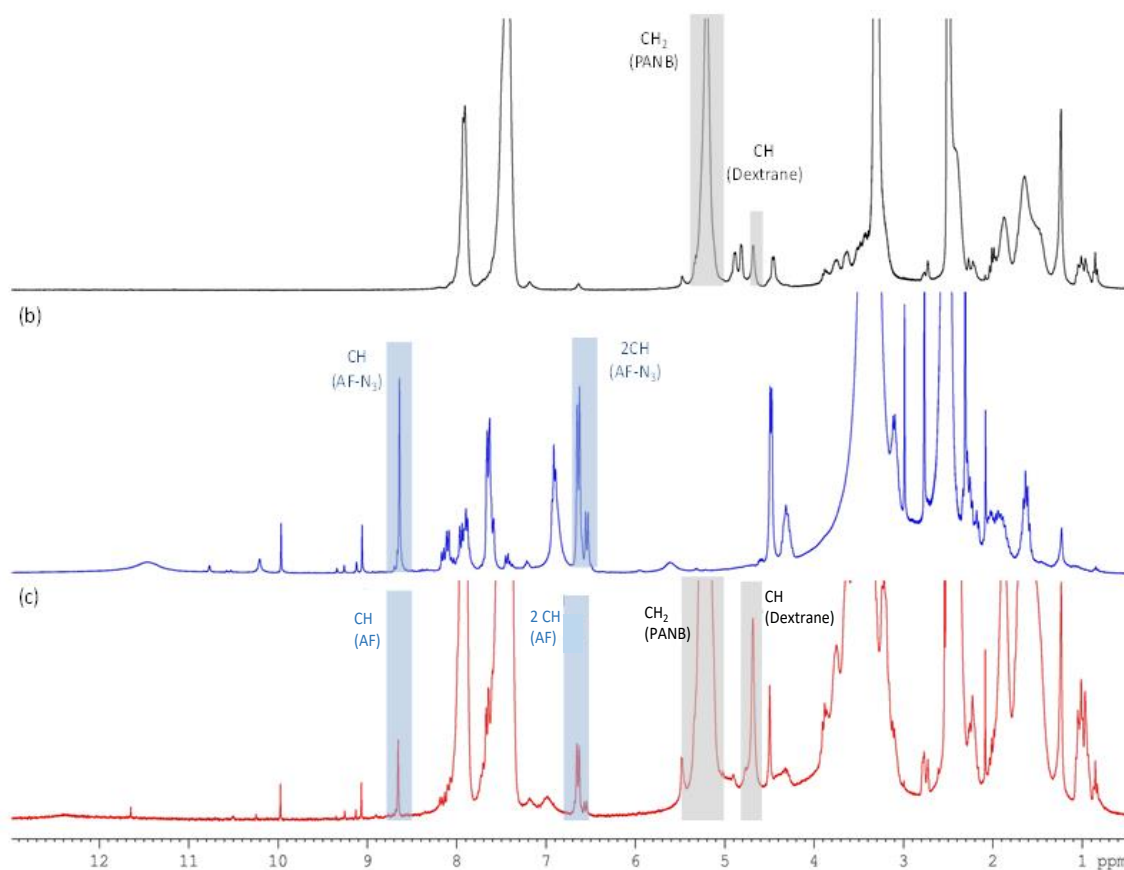


Figure 133 : Spectres RMN ^1H (DMSO- d_6 , 298 K) (a) des NPs composées d'un cœur de PANB- N_3 et d'une couronne de Dex-Alcyne (b) de l'AF- N_3 et (c) des NPs post-fonctionnalisées avec l'AF

2) Post-fonctionnalisation des nanoparticules avec un peptide de ciblage

a) Synthèse du peptide ETTCASLCYP-résine 2-chlorotryl

La synthèse du peptide ETTCASLCYP-résine 2-chlorotryl (Figure 134) (masse molaire égale à 1086,44 g/mol) est réalisée sur un support solide en utilisant une résine 2-chlorotryl (2CT) portant le résidu proline (Proline H-L-Pro-2CT chargée à 0,55 mmol/g, Iris Biotech GmbH, Germany). La synthèse est réalisée à l'aide d'un synthétiseur de peptides (ResPep XL, Intavis AG Bioanalytical Instruments, Allemagne) sur une échelle de synthèse de 200 μmol par réacteur, en utilisant une stratégie Fmoc/*t*Bu. Les acides aminés utilisés dans cette synthèse peptidique sont protégés par des groupements trityle ou tert-butyle sur leurs chaînes latérales. Le solvant utilisé pour les réactions de couplage dans cette synthèse peptidique est le *N,N*-Diméthylformamide (DMF). La déprotection des groupements Fmoc des différents acides aminés au cours de la synthèse peptidique est réalisée en utilisant une solution de pipéridine (Sigma-Aldrich, Germany) à 20% dans du DMF. Les acides aminés sont activés

avec du Hexafluorophosphate de (1H-benzotriazol-1-yloxy)(diméthylamino)-*N,N*-diméthylméthaniminium (HBTU, Iris Biotech) en présence de *N*-méthylmorpholine (NMM) (Alfa-Aesar GmbH, Germany) dans le DMF. La NMM est utilisée comme base car elle s'élimine facilement avec un lavage à l'eau. L'excès d'acides aminés et de réactifs n'ayant pas réagi au cours de la synthèse peptidique sont éliminés au cours des différents lavages réalisés 3 fois avec du DCM, 3 fois avec du méthanol et 3 fois avec du DMF. Une étape de « capping » avec de l'anhydride acétique après chaque étape de couplage est nécessaire pour bloquer (acétyler) les fonctions amines libres sur la résine n'ayant pas réagi.

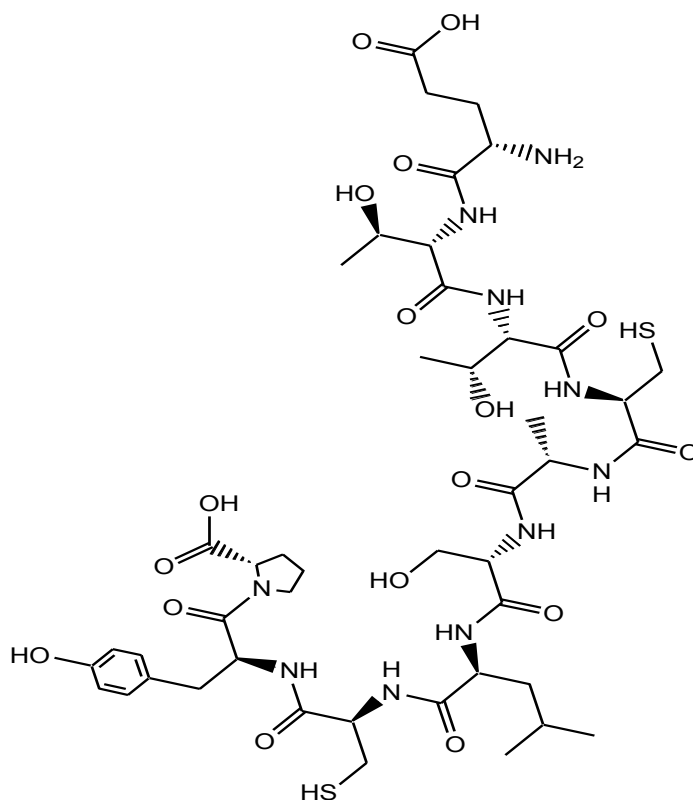


Figure 134 : Formule développée du peptide ETTCASLCYP

Pour réaliser des analyses, le clivage du peptide accroché sur la résine est réalisé sur une petite quantité de peptide-résine avec un mélange acide trifluoroacétique (Acros organics)/Triisopropylsilane (Sigma-Aldrich)/eau (95/2,5/2,5, v/v/v) pendant 2 h à température ambiante. Le volume total du mélange à employer est calculé à raison de 1 mL pour 100 mg de peptide-résine. Après le clivage, 3 rinçages de la résine sont réalisés avec environ 2 mL de DCM, puis 3 fois avec 2 mL de DMF afin de récupérer le peptide clivé dans les filtrats. Le peptide clivé brut est alors précipité dans de l'éther diéthylique à froid puis lyophilisé. Il est ensuite analysé par chromatographie en phase liquide couplée à un

spectromètre de masse (LC-MS) dont les conditions sont regroupées dans le Tableau 36 et les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 135 et 136.

Tableau 36 : Conditions d'analyse du peptide ETTCASLCYP par LC-MS

Colonne	Colonne Nucleodur C18 250 x 4,6 10μm 250 x 4,6 : Longueur et diamètre de la colonne en mm 10 μm : Taille des billes		
Solvant	Eau/Acétonitrile (v/v) + 0,1% Acide formique		
	Temps (min)	Eau (% v)	Acétonitrile (% v)
Gradient	0	95	5
	25	0	100
	30	0	100
Débit	1 mL/min		
Volume injecté	20 μ L		
Détection en UV	214 nm		
Détection en MS	Ionisation positive par Electrospray (m/z entre 100 et 2000)		

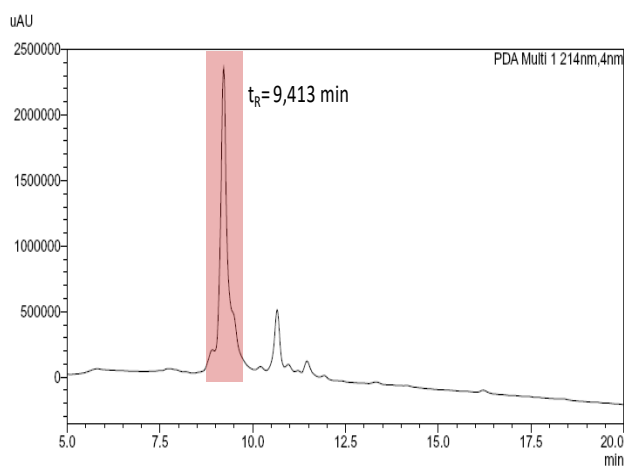


Figure 135 : Chromatogramme du peptide ETTCASLCYP (détection en UV à 214 nm)

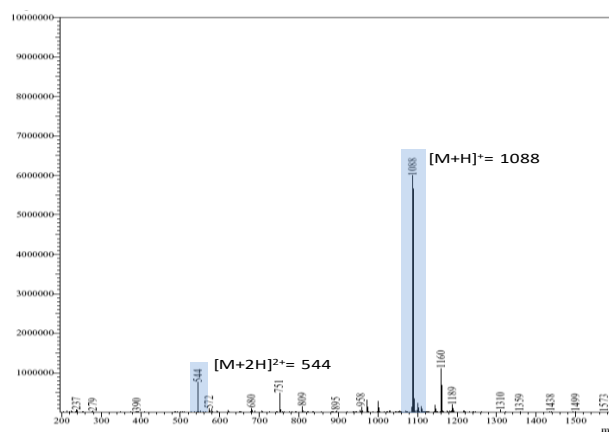


Figure 136 : Spectre de masse du peptide ETTCASLCYP (pic principal $t_R=9,413$ min)

b) Synthèse du dérivé Azidohexyl-Leu-OH

La modification de la leucine avec l'acide 6-azidohexanoïque (Figure 137) (masse molaire égale à 270,19 g/mol) a été réalisée sur un support en utilisant également une résine 2-

chlorotriyl (2CT) portant le résidu Leucine (H-L-Leu-2CT chargée à 0,82 , Iris Biotech GmbH, Germany). Le couplage de l'acide 6-azidohexanoïque avec la H-L-Leu-2CT est réalisée manuellement. La synthèse de l'acide 6-azidohexanoïque a été décrite précédemment. Les réactifs utilisés pour réaliser ce couplage sont regroupés dans le Tableau 37. La résine est directement pesée dans le réacteur et gonflée trois fois avec du DMF. Les autres réactifs sont solubilisés séparément dans du DMF, puis mélangés dans l'ordre suivant : l'acide 6-azidohexanoïque, 1-hydroxybenzotriazole (HOBt, Sigma), *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA, Sigma) et HBTU, avant d'être rajoutés dans le réacteur.

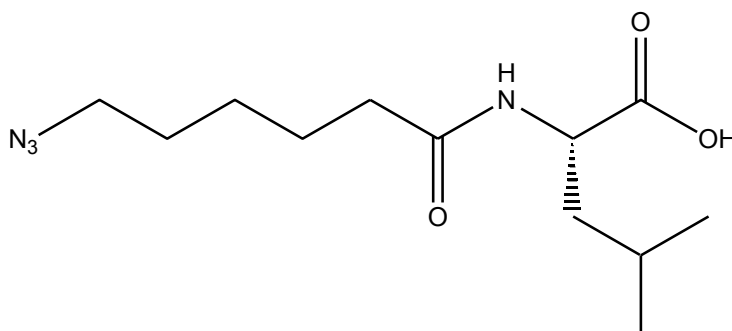


Figure 137 : Formule développée de l'azidohexyl-Leu-OH

Tableau 37 : Réactifs employés pour le couplage de la leucine avec l'acide 6-azidohexanoïque

	<i>H-L-Leu-2CT</i>	<i>HBTU</i>	<i>HOBt</i>	<i>DIEA</i>	<i>Acide 6-azidohexanoïque</i>
<i>Equivalent</i>	1	3	3	6	3
<i>Nombre de mole (mmol)</i>	0,82	2,46	2,46	5,27	2,46
<i>Masse (mg)/Volume (μL)</i>	1000 mg	930 mg	330 mg	850 μL	386 mg
<i>Volume de DMF (mL)</i>	x	2,5	1,93	0,81	1,25

Le couplage entre l'acide 6-azidohexanoïque et la résine H-L-Leu-2CT est réalisé à 22°C pendant 2,5 h, sous agitation à 500 tr/min (shaker). Le clivage de la leucine modifiée de la résine est réalisé de la même façon que le clivage du peptide décrit précédemment. Les conditions de purification par HPLC préparative et d'analyse par LC-MS de l'azidohexyl-Leu-OH par HPLC préparative sont regroupées dans les Tableaux 38 et 39. Le chromatogramme et le spectre de masse de l'azidohexyl-Leu-OH sont représentés dans les

Figures 138 et 139. Une analyse par RMN ^1H a été aussi réalisée sur le produit purifié (Figure 140).

Tableau 38: Conditions de purification de l'azidohexyl-Leu-OH par HPLC préparative

Colonne	Colonne Nucleosil C18 250 x 21 100-5 250 x 21 : Longueur et diamètre de la colonne en mm 100-5 : Taille des pores et taille des billes en μm		
Solvant	Eau/Acétonitrile (v/v) + 0,1 % Acide trifluoroacétique		
	Temps (min)	Eau (% v)	Acétonitrile (% v)
Gradient	0	95	5
	10	85	15
	35	0	100
Débit	15 mL/min		
Détection UV	214 nm		

Tableau 39 : Conditions d'analyse de l'azidohexyl-Leu-OH par LC-MS

Colonne	Colonne Nucleodur C18 250 x 4,6 10μm 250 x 4,6 : Longueur et diamètre de la colonne en mm 10 μm : Taille des billes		
Solvant	Eau/Acétonitrile (v/v) + 0,1% Acide formique		
	Temps (min)	Eau(% v)	Acétonitrile (% v)
Gradient	0	85	15
	15	0	100
	20	0	100
Débit	1 mL/min		
Volume injecté	20 μL		
Détection en UV	214 nm		
Détection MS	Ionisation positive par Electrospray (m/z entre 100 et 600)		

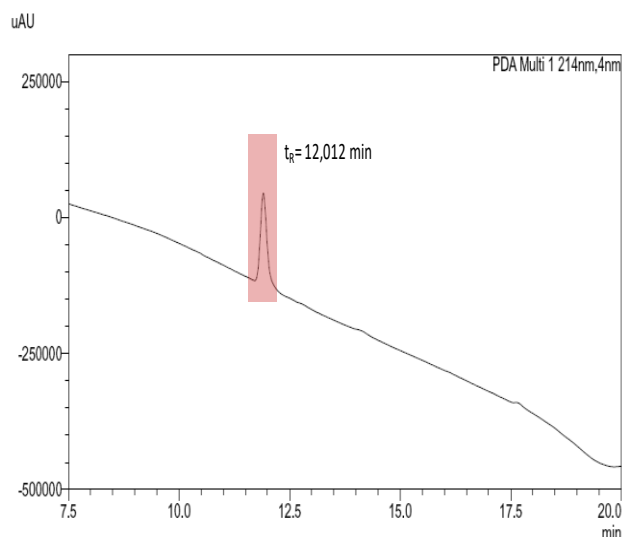


Figure 138 : Chromatogramme de l'azidohexyl-Leu-OH (détection en UV à 214 nm)

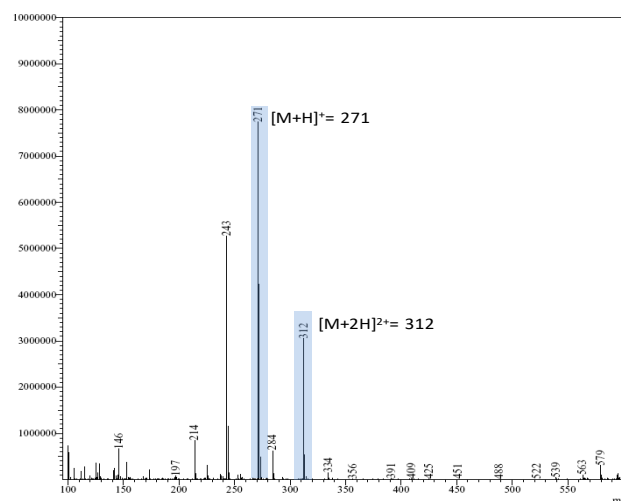


Figure 139 : Spectre de masse de l'azidohexyl-Leu-OH (pic principal $t_R=12,012$ min)

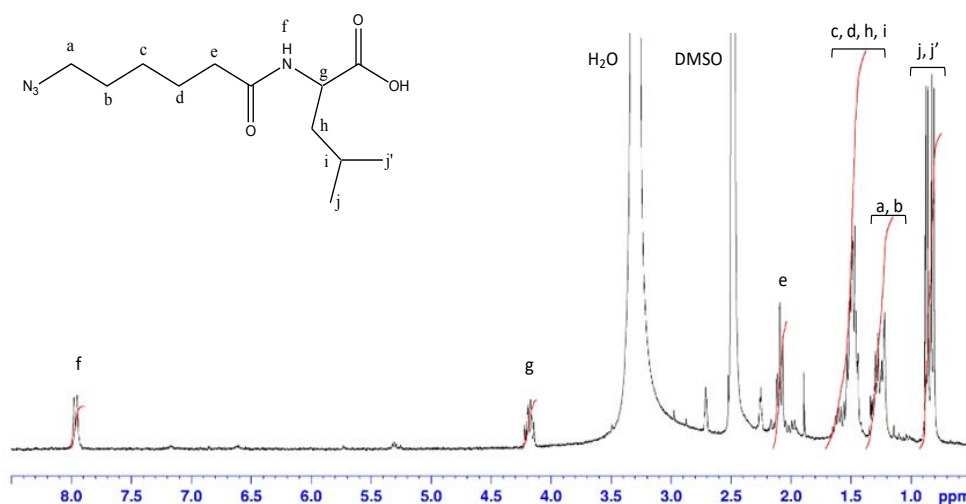


Figure 140 : Spectre RMN 1H (DMSO- d_6 , 298 K) de l'azidohexyl-Leu-OH

c) Couplage de l'azidohexyl-Leu-OH et ETTCASLCYP-résine 2-chlorotrityl

Le couplage de l'azidohexyl-Leu-OH avec le peptide ETTCASLCYP-résine 2-chlorotrityl est réalisé manuellement. Les réactifs utilisés pour réaliser ce couplage sont regroupés dans le Tableau 40. La résine sur laquelle le peptide est encore fixé (ETTCASLCYP-résine 2-chlorotrityl) est directement pesée dans le réacteur et est gonflée 3 fois avec du DCM et 3 fois avec du DMF. Les autres réactifs sont solubilisés séparément dans du DMF, puis mélangés dans l'ordre suivant : l'azidohexyl-Leu-OH, HOBt, DIEA et HBTU puis le tout est rajouté dans le réacteur. Le couplage entre l'azidohexyl-Leu-OH et le peptide ETTCASLCYP-résine 2-chlorotrityl est réalisé à 22°C pendant 2,5 h, sous agitation à 500 tr/min (shaker). Le clivage

du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH (masse molaire égale à 1338,59 g/mol) de la résine(Figure 141) est réalisé de la même façon que le clivage du peptide décrit précédemment.

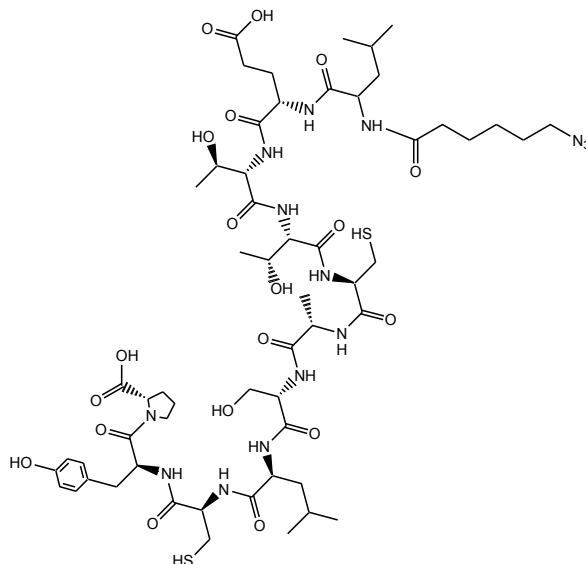


Figure 141 : Formule développée du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH

*Tableau 40 : Réactifs employés pour le couplage de l'azidohexyl-Leu-OH avec le peptide
ETTCASLCYP*

	<i>Azidohexyl- Leu-OH</i>	<i>HBTU</i>	<i>HOBt</i>	<i>DIEA</i>	<i>ETTCASLCYP- résine chlorotriyl</i>
<i>Equivalent</i>	3	3	3	6	1
<i>Nombre de mole (μmol)</i>	600	600	600	1200	200
<i>Masse (mg)/Volume (μL)</i>	162 mg	227 mg	81 mg	208 μL	--
<i>Volume de DMF (mL)</i>	1,6	1,2	1,2	0,16	--

Les conditions de purification par HPLC préparative et d'analyse par LC-MS du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH sont regroupées dans les Tableaux 41 et 42. Le chromatogramme et le spectre de masse correspondants sont représentés dans les Figures 142 et 143. Une analyse par RMN ^1H est réalisée sur sur le peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH purifié (Figures 144 et 145).

Tableau 41 : Conditions de purification du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH par HPLC préparative

Colonne	Colonne Nucleosil C18 150 x 21 5µm 250 x 21 : Longueur et diamètre de la colonne en mm 5 µm: Taille des billes		
Solvant	Eau/Acétonitrile (v/v) + 0,1% Acide trifluoroacétique		
	Temps (min)	Eau (% v)	Acétonitrile (%v)
Gradient	0	95	5
	25	0	100
	35	0	100
Débit	9 mL/min		
Détection UV	214 nm		

Tableau 42 : Conditions d'analyse du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH par LC-MS

Colonne	Colonne Nucleodur C18 250 x 4,6 10µm 250 x 4,6 : Longueur et diamètre de la colonne en mm 10 µm : Taille des billes		
Solvant	Eau/Acétonitrile (v/v) + 0,1%Acide formique		
	Temps (min)	Eau (% v)	Acétonitrile (% v)
Gradient	0	95	5
	25	0	100
	30	0	100
Débit	1 mL/min		
Volume injecté	20 µL		
Détection UV	214 nm		
Détection MS	Ionisation positive par Electrospray (m/z entre 200 et 2000)		

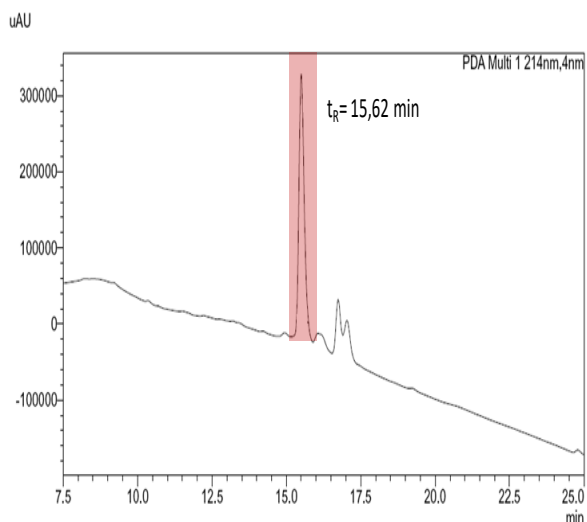


Figure 142 : Chromatogramme de l'azido-hexyl-LETTCASLCYP-OH détecté en UV à 214 nm

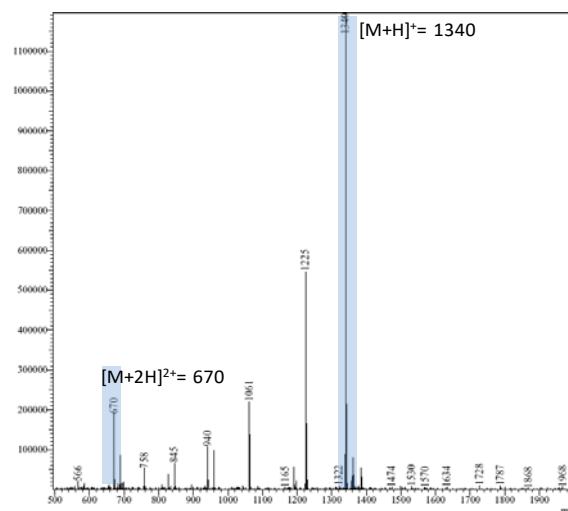


Figure 143 : Spectre de masse de l'azido-hexyl-LETTCASLCYP-OH (pic principal $t_R = 15,62$ min)

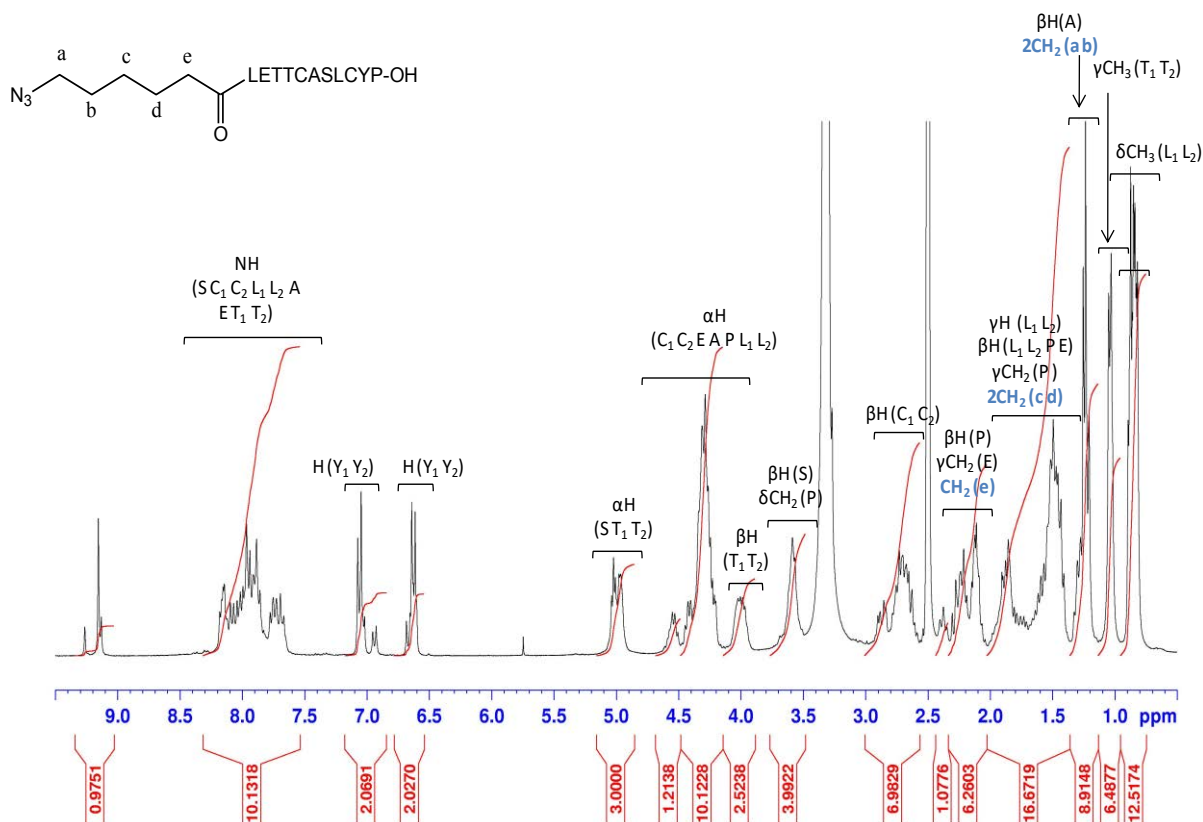


Figure 144 : Spectre RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 298 K) du peptide azido-hexyl-LETTCASLCYP-OH

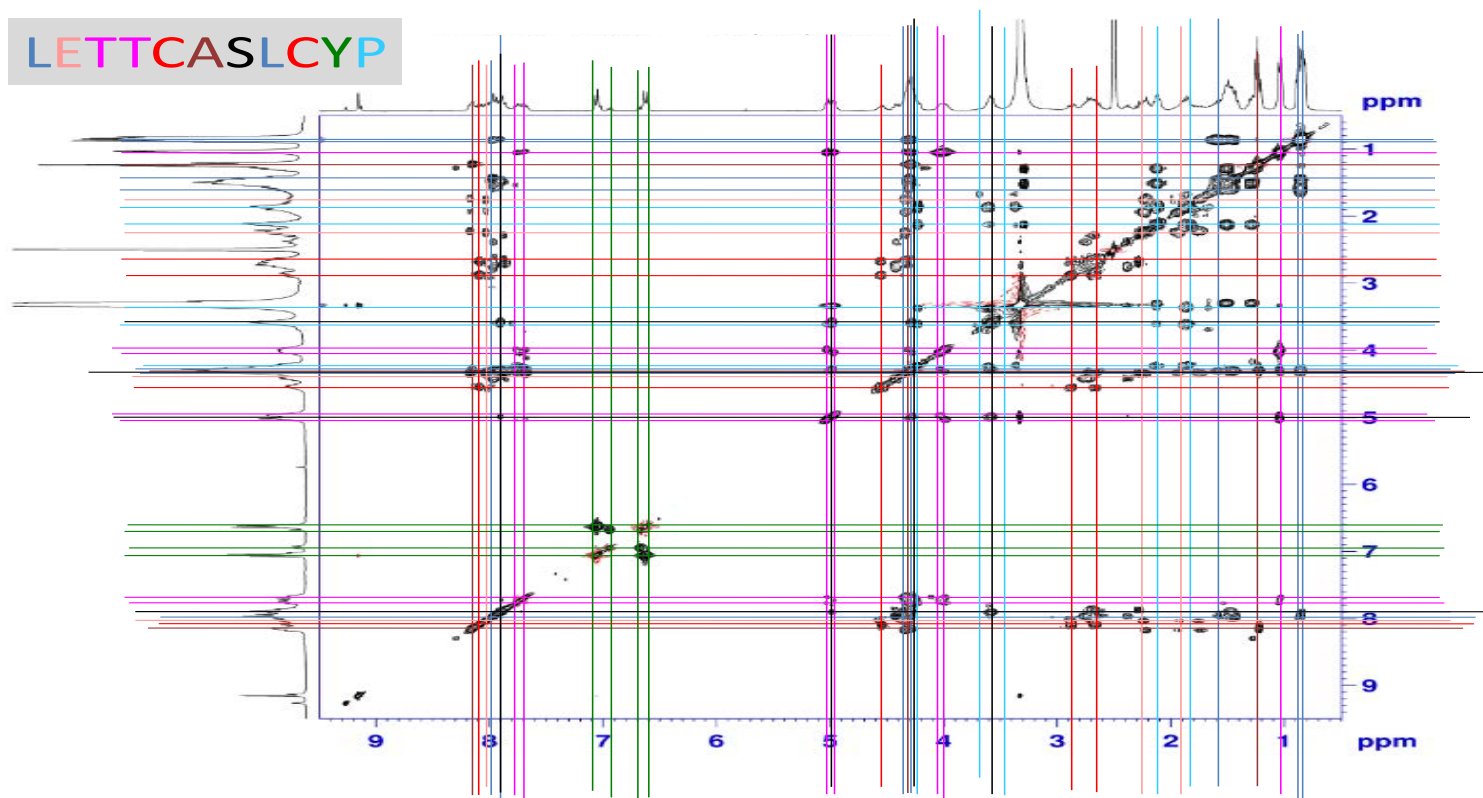


Figure 145 : Spectre RMN 2D TOCSY homonucléaire ^1H - ^1H (DMSO- d_6 , 298 K) du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH

d) Post-fonctionnalisation des nanoparticules avec l'azidohexyl-LETTCASLCYP-OH

La post-fonctionnalisation des NPs « Clickées » (cœur PANB- N_3 et couronne Dex-Alcyne) avec le peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH est réalisée de la même façon que la fonctionnalisation des NPs par l'AF- N_3 , c'est-à-dire par réaction de chimie Click.

On introduit dans un schlenk 2 mL de suspension de NPs dans l'eau milli-Q (5 mg/mL) ainsi que 5 mg de peptide de ciblage dissous dans un mélange acétonitrile/*t*-butanol (400 μL , 1/1, v/v). Cela revient à introduire 5 équivalents de fonction azoture par fonctions alcyne libres estimées présentes à la surface des NPs (quantifiées par spectre RMN ^1H des NPs). Le catalyseur utilisé est le $\text{CuSO}_4/\text{AAsc}$ (conditions identiques à la post-fonctionnalisation des NPs avec l'AF- N_3). La procédure adoptée pour les étapes de lavage et d'élimination du cuivre par l'EDTA est la même que dans le cas des NPs post-fonctionnalisées avec l'AF. Les NPs sont caractérisées par mesure de leurs tailles par HPPS.

La quantification de peptide présent à la surface des NPs a été réalisée par UV sur des NPs composées d'un cœur de PLA- N_3 et de couronne de Dex-alcyne. Cette quantification a été

réalisée sur des NPs de PLA au lieu de PANB car le PLA n'absorbe pas en UV, contrairement au PANB qui absorbe en UV (entre 200 nm et 300 nm avec un maximum d'absorption à 265 nm). Or le peptide sélectionné contient une tyrosine (Tyr, T) qui absorbe à 280 nm. Cette absorption est donc faussée par la présence de chaînes de PANB, d'où notre choix du PLA. À partir d'une courbe de calibration du peptide dans le DMSO (Figure 146) et en connaissant l'absorbance mesurée pour une solution DMSO de NPs post-fonctionnalisées d'une concentration connue (mg/mL), il est possible d'évaluer la concentration du peptide (azidohexyl-LETTCASLCYP-OH) présente à la surface des NPs(en mg/mL).

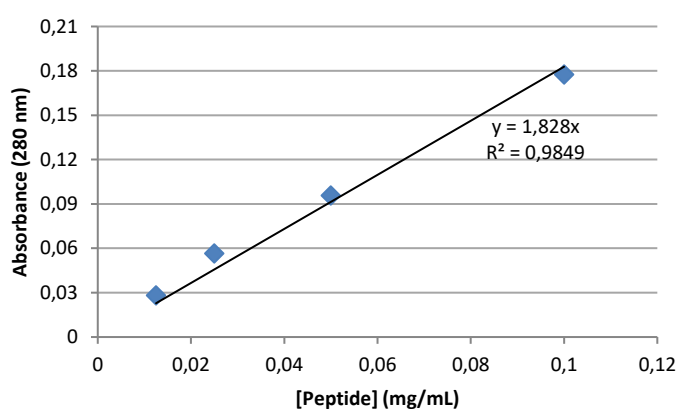


Figure 146 : Courbe de calibration du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH dans le DMSO (Observation par UV à 280 nm)

3) Post-fonctionnalisation des nanoparticules avec l'azoture de α -D-Mannopyranosyle

L'azoture de α -D-Mannopyranosyle (Man-N₃, 95 %) (Figure 147) provient de Apollo Scientific et est utilisé sans modification préalable. La post-fonctionnalisation des NPs avec ce sucre est réalisée de la même façon que les cas de post-fonctionnalisation précédentes, c'est-à-dire par réaction de chimie Click en introduisant 5 équivalents de fonction azoture par fonctions alcyne. Pour cela, on introduit 4 mL de suspension de NPs Clickées (cœur PANB-N₃ couronne Dex-Alcyne, 5 mg/mL) lavées avec de l'eau milli-Q par centrifugation ainsi que 2 mg de Man-N₃ (100 μ L d'eau milli-Q) dans un schlenk. Le catalyseur utilisé (CuSO₄/AAsc) et les étapes de lavage et d'élimination du CuSO₄ résiduel sont les mêmes que dans les cas précédents de post-fonctionnalisation. A partir du spectre RMN ¹H des NPs lavées et

lyophilisées sans cryoprotecteur (Figure 148), il est possible d'évaluer la masse de Mannose présente à la surface des NPs par unité de masse (g) de PANB-N₃ par la formule suivante :

$$M_{\text{Mannose}} (\text{g/g PANB}) = \left(\frac{A_{\text{CH}}(\text{Mannose-N}_3)}{A_{\text{CH}_2}(\text{PANB-N}_3)} \right) \times \left(\frac{M_{\text{Mannose}}}{M_{\text{PANB-N}_3}} \right)$$

Avec :

A_{CH} : Aire du proton anomérique du Mannose-N₃ (5,3 ppm)

$A_{\text{CH}_2}(\text{PANB-N}_3)$: Aire du CH₂ de l'unité monomère du PANB-N₃ (5,2 ppm)

$M_{\text{PANB-N}_3}$: Masse molaire de l'unité monomère du PANB-N₃(207 g/mol)

M_{Mannose} : Masse molaire de l'azoture de α -D-Mannopyranosyle (180 g/mol)

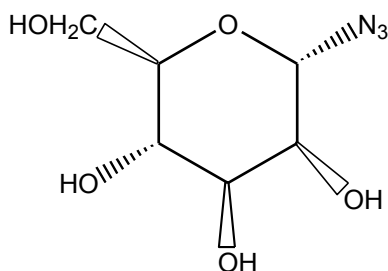


Figure 147 : Formule développée de l'azoture de α -D-Mannopyranosyle

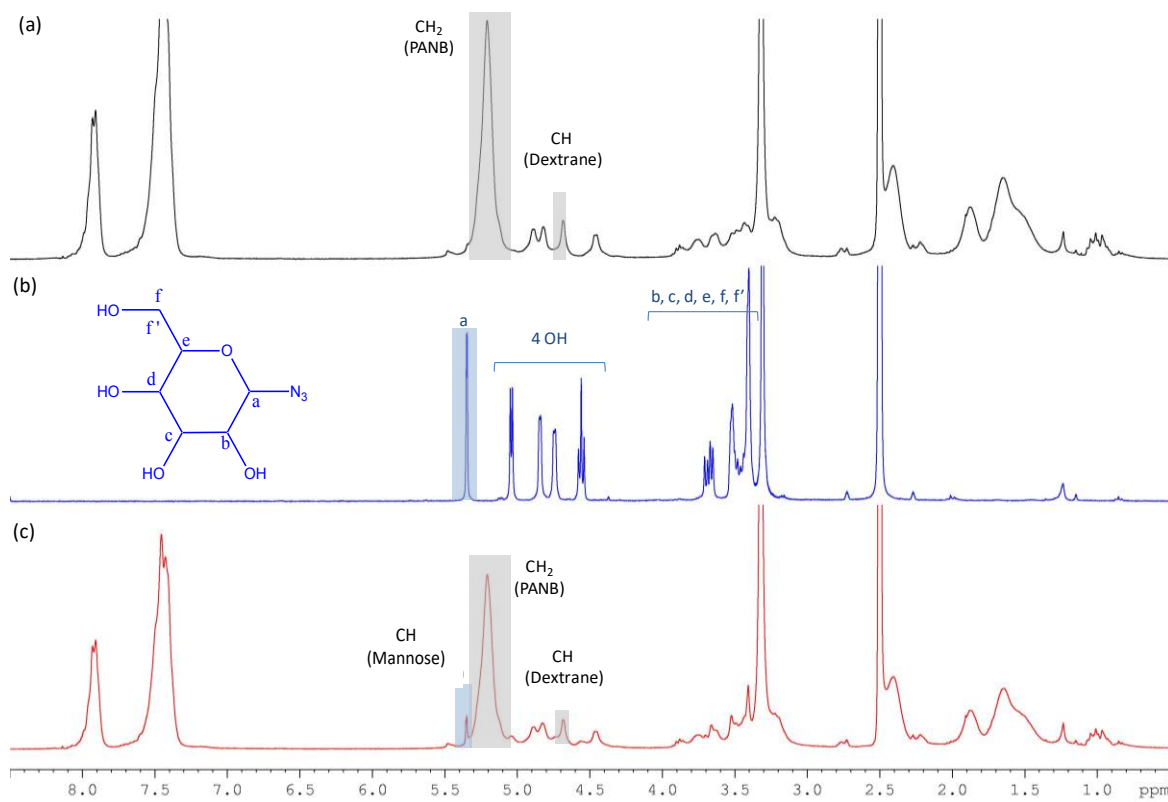


Figure 148 : Spectres RMN ¹H (DMSO-d₆, 298 K) (a) des NPs composées d'un cœur de PANB-N₃ et d'une couronne de Dex-Alcyne (b) de l'azoture de α -D-Mannopyranosyle et (c) des NPs-Man

IX) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Soliman, S. M. A. From Photosensitive Glycopolymers to Smart Drug Delivery Systems, Université de Lorraine, 2014.
- (2) Dupayage, L.; Nouvel, C.; Six, J.-L. Protected versus Unprotected Dextran Macroinitiators for ATRP Synthesis of Dex-g-PMMA. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2011**, *49* (1), 35–46.
- (3) Forero Ramirez, Laura Marcela. Élaboration de Nanocapsules par Polymérisation Radicalaire Contrôlée à Partir d'un Tensioactif Réactif Dérivé du Dextrane, Université de lorraine, 2016.
- (4) Soliman, S. M. A.; Colombeau, L.; Nouvel, C.; Babin, J.; Six, J.-L. Amphiphilic Photosensitive Dextran-g-Poly(*o*-Nitrobenzyl Acrylate) Glycopolymers. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 598–608.
- (5) Shang, J.; Gao, X. Nanoparticle Counting: Towards Accurate Determination of the Molar Concentration. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 7267–7278.
- (6) Wallace, S. J.; Li, J.; Nation, R. L.; Boyd, B. J. Drug Release from Nanomedicines: Selection of Appropriate Encapsulation and Release Methodology. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2012**, *2* (4), 284–292.
- (7) Makra, I.; Terejászky, P.; Gyurcsányi, R. E. A Method Based on Light Scattering to Estimate the Concentration of Virus Particles without the Need for Virus Particle Standards. *MethodsX* **2015**, *2*, 91–99.
- (8) Smeraldi, J.; Ganesh, R.; Safarik, J.; Rosso, D. Statistical Evaluation of Photon Count Rate Data for Nanoscale Particle Measurement in Wastewaters. *J. Environ. Monit.* **2012**, *14* (1), 79–84.
- (9) Man, W. U. Synthèse de Nanoparticules à Propriétés de Surface Contrôlées par Polymérisation en Miniémulsion pour la Vectorisation de Molécules Actives, Université de lorraine, 2007.
- (10) Deshiikan, S. R.; Papadopoulos, K. D. Modified Booth Equation for the Calculation of Zeta Potential. *Colloid Polym. Sci.* **1998**, *276* (2), 117–124.
- (11) Delgado, A. D. S.; Leonard, M.; Dellacherie, E. Surface Modification of Polystyrene Nanoparticles Using Dextrans and Dextran–POE Copolymers: Polymer Adsorption and Colloidal Characterization. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2000**, *11* (12), 1395–1410.
- (12) Rouzes, C.; Gref, R.; Leonard, M.; De Sousa Delgado, A.; Dellacherie, E. Surface Modification of Poly(Lactic Acid) Nanospheres Using Hydrophobically Modified Dextrans as Stabilizers in an o/w Emulsion/Evaporation Technique. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50* (4), 557–565.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La chimiothérapie est un traitement reposant sur la prise d'un ou de plusieurs principes actifs chimiothérapeutiques « anticancéreux ». Depuis les années 70, de nombreux médicaments anticancéreux ont été révélés. Ils agissent soit en détruisant les cellules cancéreuses soit en arrêtant leur multiplication, mais présentent des effets secondaires d'où le recours à la vectorisation de ces anticancéreux *via* des nanovecteurs. Ces nanovecteurs ont l'avantage de protéger le PA de sa dégradation *in vivo*, de l'adresser sélectivement vers les cellules à traiter et d'en contrôler sa libération dans l'espace et dans le temps.

Au cours de ces travaux de thèse, des nanovecteurs particuliers (nanoparticules - NPs) photosensibles chargés en Doxorubicine (DOX) ont été élaborés. Plus précisément les NPs étudiées dans le cadre de ce doctorat sont des systèmes cœur/couronne formulés à l'aide de deux matériaux biocompatibles et biodégradables/bioéliminables: le poly(acrylate d'*o*-nitrobenzyle) (PANB) et le DexAlcyne-15 dérivé hydrophobisé du dextrane.

La partie bibliographique de ce manuscrit se composait de trois parties. Dans la première partie, les différents types de cancers colorectaux et les traitements actuellement proposés ont été présentés. La deuxième partie traitait de la vectorisation d'anticancéreux, de l'évolution des vecteurs au cours du temps et des procédés employés pour l'élaborer ces nanovecteurs. Enfin, dans la troisième partie les modes de libération d'un principe actif (PA) encapsulé au sein des NPs (libérations par simple diffusion ou provoquée par un stimulus et plus particulièrement photo-déclenchée) ont été exposés.

La seconde partie du manuscrit se découpait en quatre chapitres.

Le premier chapitre a été dédié à la synthèse des polymères précurseurs utilisés par la suite pour élaborer les NPs. D'une part, nous avons exposé la synthèse des PANB-Br par polymérisation SET-LRP de l'acrylate d'*o*-nitrobenzyle à 25°C dans le DMSO en utilisant le 2-bromoisobutyrate d'éthyle (EBiB) comme amorceur, le Me₆TREN comme ligand et du cuivre sous les formes Cu⁰ et Cu^IBr₂ comme système catalytique. Le polymère obtenu (PANB-Br) a été produit avec succès grâce au contrôle maîtrisé de la SET-LRP de ce monomère ce qui est assez rare dans la littérature. Par la suite, le brome terminal de ces chaînes macromoléculaires a été aisément substitué par un azote, sans dégradation de chaîne, pour conduire au PANB-N₃. En parallèle, l'hydrophobisation partielle du dextrane a été réalisée par estérification de quelques fonctions hydroxyle du dextrane natif par des chaînes grasses présentant un alcyne terminal. La capacité du composé alors produit (DexAlcyne-15) à abaisser la tension superficielle d'une solution aqueuse nous a permis d'envisager son utilisation comme tensioactif hydrosoluble dans les procédés d'élaboration des NPs. Enfin, plusieurs copolymères Dex-g-PANB présentant différentes fractions

massiques en PANB ont été produits en appliquant la stratégie « grafting onto » et en mettant en œuvre une réaction de chimie « Click » CuAAC entre les fonctions azoture des chaînes PANB-N₃ et les fonctions alcyne du DexAlcyne-15.

Le deuxième chapitre a été consacré à l'obtention et aux caractérisations physico-chimiques des NPs de PANB recouvertes de DexAlcyne-15. Tout d'abord, les Dex-g-PANB présentant une fraction massique importante en PANB (> 40 %), solubles dans un mélange THF/H₂O, ont été nanoprécipités sans recourir à un tensioactif supplémentaire. Le second procédé testé, plus énergétique que la nanoprécipitation, est l'émulsion-évaporation de solvant organique. Dans ce cas, le PANB-N₃ est dissous en phase organique alors que le DexAlcyne-15 est employé comme tensioactif hydrosoluble stabilisant de l'interface liquide/liquide formé au cours de ce procédé. Grâce à leurs fonctions complémentaires (azoture et alcyne), une réaction de chimie Click CuAAC a pu avoir lieu, *in situ*, à l'interface liquide/liquide, pendant l'étape de sonication. Deux systèmes de catalyseurs ont été évalués (CuBr et CuSO₄/AAAsc) et trois lots de NPs ont ainsi pu être formulés : NPs « non Clickées », NPs « Clickées » CuBr et NPs « Clickées » CuSO₄/AAAsc. Quel que soit le procédé employé, des NPs de distribution étroite centrée autour des diamètres moyens compris entre 120 et 170 nm ont été formulées. Ces NPs ont ensuite été caractérisées par diverses techniques. Ainsi, l'épaisseur de la couronne dextrane située à la surface des NPs a été estimée de 4 nm à 10 nm dans le cas des NPs produites par nanoprécipitation, et de 4 nm à 8 nm pour les NPs produites par le second procédé. La quantité de dextrane présente dans les NPs varie quant à elle de 109 à 916 mg par g de PANB selon les conditions expérimentales employées. La présence de cette couronne dextrane à la surface des NPs permet alors d'écranter les charges surfaciques du cœur PANB, et accroît considérablement la stabilité colloïdale de ces objets, quel que soit le procédé de formulation employé. Ainsi, toutes les NPs synthétisées sont stables en solutions salines jusqu'à une concentration en NaCl égale à 1 mol/L, ce qui n'est pas le cas des NPs dites « nues ». L'étude de la stabilité du recouvrement de ces NPs en présence d'un tensioactif compétitif (SDS) ou du milieu de culture des cellules cancéreuses sélectionnées pour la suite de cette étude (DMEM) a de plus clairement démontré l'avantage d'une immobilisation covalente de la couronne dextrane sur le cœur des NPs (cas des NPs « Clickées ») par rapport à une couronne adsorbée de façon physique à la surface des NPs (cas des NPs « non Clickées »). La lyophilisation des suspensions de NPs a ensuite été réalisée en présence d'un cryoprotecteur (tréhalose) à raison de 10 mg/mL de suspension, afin de pouvoir aisément redisperser les NPs après lyophilisation et faciliter alors la conservation des NPs. Par la suite, le caractère photosensible des NPs a été mis en évidence en appliquant différentes puissances

et durées d'irradiation UV. L'évaluation de ce caractère photosensible a été réalisée par deux techniques : suivi de l'intensité diffusée de la suspension de NPs avec l'irradiation et par dosage par RMN ^1H des unités ANB résiduelles après irradiation. Les résultats obtenus ont montré qu'une irradiation de 30 secondes à une puissance de $54\text{mW}/\text{cm}^2$ permettait de photolyser environ 70 % des unités ANB initialement présentes dans les NPs, mais que ces NPs n'étaient pour autant pas encore dissoutes à ce stade.

Des tests d'encapsulation de la DOX puis de libération *in vitro* de la DOX ont été exposés dans le troisième chapitre. Le premier objectif de cette étude était d'optimiser l'encapsulation de la DOX dans les NPs tout en gardant une taille nanométrique des NPs et une distribution de taille monomodale assez étroite. Pour ce faire, trois paramètres ont été étudiés: la neutralisation préalable de la DOX par la triéthylamine, le rapport massique DOX/PANB dans la phase organique utilisée lors du procédé émulsion-évaporation de solvant organique et la réalisation simultanée d'une réaction de chimie « Click » interfaciale et de l'encapsulation de la DOX au sein de ces NPs. Quel que soit le lot de NPs produit (NPs « non Clickées », « Clickées » CuBr ou « Clickées » CuSO₄/AAsc), une meilleure encapsulation de la DOX a été atteinte après neutralisation préalable avec la triéthylamine. L'efficacité d'encapsulation a pu être optimisée en variant le rapport massique DOX/PANB et les meilleurs résultats ont été observés avec une fraction massique initiale de DOX dans la phase organique égale à 35,89 %. Au-delà de cette proportion, des particules ayant un diamètre trop important pour l'application visée ont été obtenues. Nous avons également montré que la réaction de chimie Click interfaciale catalysée par CuBr, n'influencait pas le taux de charge et l'efficacité d'encapsulation par rapport aux NPs « non Clickées ». En revanche, le système CuSO₄/AAsc conduit à la réduction du taux de charge et de l'efficacité d'encapsulation probablement relié à l'hydrolyse acide de la doxorubicine. Par la suite, la libération de la DOX hors des NPs a été suivie par deux mécanismes : la libération par simple diffusion et la libération photo-déclenchée par irradiation UV. Deux milieux de libération (PBS et DMEM) ont alors été employés. Nous avons pu observer que la libération par simple diffusion était plus rapide dans le PBS que dans le DMEM, en accord avec la solubilité limitée de la DOX dans ce dernier milieu. Cependant la quantité de DOX libérée n'atteignait pas les 20 % même après 48 h, quelles que soient les NPs étudiées. En revanche, lorsque la libération de la DOX est déclenchée sous irradiation UV, cette libération est favorisée par augmentation de la durée d'irradiation à une même puissance. De plus, nous avons alors montré que la présence de la chimie Click interfaciale lors du procédé d'élaboration des NPs n'affecte toujours pas le profil de libération de la DOX. Enfin cette photo-libération de la DOX est progressive après

l'irradiation des NPs, quel que soit le type de NPs et le milieu de libération. Ainsi, 30 secondes d'irradiation à 54 mW/cm² permettent de libérer plus de 40 % (25,2 µM) de la DOX contenue dans le cœur des NPs. Ceci confirme le caractère photosensible des particules à cœur PANB qui se lysent sous l'effet de l'irradiation UV, entraînant leur dissolution progressive et une libération photodéclenchée de leur contenu. Tous ces résultats nous ont permis de valider l'utilisation de ces NPs comme potentiels systèmes stimulables de délivrance de médicament.

Enfin, dans le dernier chapitre le potentiel biologique de ces NPs photosensibles a été évalué en menant plusieurs tests préliminaires. D'une part, leur biocompatibilité au contact des cellules Caco-2 a été vérifiée et il a été montré que les NPs élaborées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique, avec ou sans chimie Click interfaciale, pouvaient être utilisées jusqu'à 114 µg/mL *in vitro* sans présenter de toxicité avérée après 48 h d'incubation. La résistance à l'irradiation des cellules Caco-2 seules et en présence des NPs a également été étudiée. Nous avons pu montrer que le renouvellement du milieu de culture 4 h après l'irradiation (puissance de 54 mW/cm²) permettait de mimer le drainage naturel du côlon et était bénéfique à la viabilité cellulaire. D'autre part, des tests de libération de la DOX *in vitro* par simple diffusion ou déclenchée par irradiation UV ont été réalisés. Alors que la libération par simple diffusion est très lente, 30 secondes d'irradiation à une puissance égale à 54 mW/cm² suffisent pour libérer suffisamment de DOX et éradiquer environ 50 % des cellules Caco-2, dans le cas de NPs présentant un taux de charge de DOX égal à 30 %. Enfin, des études préliminaires sur la post-fonctionnalisation des NPs ont été menées dans le but d'atteindre un ciblage actif des cellules Caco-2. Ces expériences préliminaires ont consisté à étudier le couplage de divers ligands (AF-N₃ et Man-N₃) ou peptide de ciblage (Peptide-N₃) à la surface des NPs en réalisant une chimie Click CuAAC en mettant en jeu les alcynes résiduels présents dans leur couronne hydrophile surfacique. Au regard de ces premiers résultats, les NPs post-fonctionnalisées peuvent être considérées comme cytocompatibles. Les études de libération de la DOX hors des NPs post-fonctionnalisées montrent que la libération n'est pas influencée par la présence de ces ligands ou peptide de ciblage à la surface des NPs. Cependant, les résultats ne sont pas aussi concluant qu'espérés et des expériences complémentaires doivent être réalisées pour conclure sur l'adhésion préférentielle/l'internalisation de ces NPs post-fonctionnalisées à la surface des cellules Caco-2 et donc sur un ciblage actif efficace de celles-ci.

Les travaux présentés dans ce manuscrit montrent qu'il est possible d'obtenir des NPs composées d'un cœur photosensible (PANB) et d'une couronne biodégradable (dérivée du

dextrane (DexAlcyne-15). Les caractérisations physico-chimiques et les études biologiques réalisées sur ces objets témoignent de leur potentiel à être utilisés comme des systèmes de délivrance photo-déclenchée d'un anticancéreux. Néanmoins, plusieurs points intéressants restent à approfondir :

- Caractérisation plus poussée de la morphologie de NPs en réalisant par exemple des analyses par diffusion de neutrons aux petits angles pour mieux connaître la structure interne de ces NPs.
- Tester l'encapsulation de la Doxorubicine dans les NPs élaborées par nanoprecipitation à partir des glycopolymères Dex-g-PANB.
- Tester l'encapsulation d'autres anticancéreux tels que le Paclitaxel au sein des NPs ou encapsuler un mélange d'anticancéreux pour atteindre peut-être une synergie de leur action ; puis étudier leur cinétique de libération.
- Etudier par tests ELISA les interactions spécifiques des ligands utilisés pour la post-fonctionnalisation des NPs avec des récepteurs surexprimés à la surface des cellules Caco-2.
- Etudier l'adhésion des NPs à la surface des cellules Caco-2, voire leur internalisation en formulant des NPs fluorescentes (utilisation de dérivé fluorescent du dextrane ou nanoparticule chargée de Doxorubicine par exemples).

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Agents chimiothérapeutiques utilisés pour le traitement du cancer colorectal</i>	11
<i>Tableau 2 : Traitements ciblés pour le traitement du cancer colorectal</i>	12
<i>Tableau 3 : Quelques nanoparticules préparées par nanoprécipitation</i>	27
<i>Tableau 4 : Encapsulation de principes actifs dans des nanoparticules cœur/couronne de PVA par simple Emulsion/Evaporation de solvant organique</i>	28
<i>Tableau 5 : Encapsulation des principes actifs dans des nanoparticules produites par double Emulsion/Evaporation de solvant organique</i>	32
<i>Tableau 6 : Quelques nanoparticules préparées par émulsion-diffusion de solvant organique</i>	34
<i>Tableau 7 : Exemples de quelques nanoparticules élaborées par le procédé d'émulsion-salting out.</i>	35
<i>Tableau 8 : Exemples de nanoparticules élaborées par dialyse</i>	37
<i>Tableau 9 : Polymères thermosensibles utilisés dans le domaine biomédical</i>	41
<i>Tableau 10 : Polymères pH-sensibles utilisés dans le domaine biomédical</i>	43
<i>Tableau 11 : Résultats de la polymérisation déterminés par SEC (THF).</i>	100
<i>Tableau 12 : Polymérisation du ANB par SET-LRP</i>	101
<i>Tableau 13 : Caractéristiques du dextrane et du DexAlcyne-τ</i>	107
<i>Tableau 14 : Fractions massiques de PANB pour les différents glycopolymères</i>	110
<i>Tableau 15: Solubilités des Dex-g-PANB dans différents solvants ou mélange de solvants</i>	121
<i>Tableau 16 : Caractéristiques des NPs préparées par nanoprécipitation</i>	123
<i>Tableau 17 :Caractéristiques des NPs préparées par émulsion-évaporation de solvant en utilisant le PANB-N_3 ($M_n = 10300 \text{ g mol}^{-1}$) et le DexAlcyne- 15</i>	125
<i>Tableau 18 : Epaisseur ΔPZ des NPs élaborées par différents procédés</i>	129
<i>Tableau 19 : Masse du dextrane (mg/g PANB) déterminées par RMN 1H des NPs élaborées par différents procédés</i>	132
<i>Tableau 20 : Détermination de la masse du dextrane en surface des NPs avant et après contact avec SDS</i>	136
<i>Tableau 21 : Détermination de la masse du dextrane (mg dextrane / g PANB) en surface des NPs élaborés par émulsion-évaporation de solvant avant et après contact avec DMEM</i>	137
<i>Tableau 22 : Détermination de la quantité du cuivre résiduel dans les NPs par méthode d'ICAP-OES</i>	139
<i>Tableau 23 : Évaluation rapide de la solubilité de la DOX dans le DCM à température ambiante</i> ..	149
<i>Tableau 24 : Effet de la neutralisation de la DOX sur le diamètre moyen et l'indice de polydispersité, le taux de charge et l'efficacité d'encapsulation des NPs de PANB/DOX sans chimie « Click »</i>	152
<i>Tableau 25 : Influence du rapport massique DOX/PANB sur le diamètre moyen, l'indice de polydispersité, le taux de charge et l'efficacité d'encapsulation des NPs de PANB/DOX « non Clickées »</i>	152

<i>Tableau 26 : Effet de la CuAAC interfaciale sur l'évolution du diamètre moyen, de l'indice de polydispersité, du taux de charge et de l'efficacité d'encapsulation des NPs de PANB/DOX</i>	154
<i>Tableau 27 : Solubilités maximales de la DOX neutralisée dans le PBS et dans le DMEM à 37 °C</i> .	156
<i>Tableau 28 : Coefficients de diffusion (D) de la DOX hors des différents types de NPs</i>	158
<i>Tableau 29 : Caractéristiques des nanoparticules post-fonctionnalisées avec AF-N₃ ou Man-N₃, en présence ou non de CuSO₄/AAsc comme système catalytique</i>	181
<i>Tableau 30 :Caractéristiques des nanoparticules post-fonctionnalisées avec le Peptide-N₃ en utilisant CuSO₄/AAsc et non fonctionnalisées par le peptide en absence de CuSO₄/AAsc</i>	184
<i>Tableau 31 : Polymérisation du ANB par SET-LRP</i>	198
<i>Tableau 32 :Incréments d'indice de réfractions des différents polymères</i>	213
<i>Tableau 33 : Conditions de dosage de la Doxorubicine dans de l'eau milli-Q par HPLC</i>	223
<i>Tableau 34 : Conditions de purification de l'AF-N₃ par HPLC préparative</i>	230
<i>Tableau 35 : Conditions d'analyse de l'AF-N₃ par HPLC</i>	230
<i>Tableau 36 : Conditions d'analyse du peptide ETTCASLCYP par LC-MS</i>	235
<i>Tableau 37 : Réactifs employés pour le couplage de la leucine avec l'acide 6-azidohexanoïque</i>	236
<i>Tableau 38: Conditions de purification de l'azidohexyl-Leu-OH par HPLC préparative</i>	237
<i>Tableau 39 : Conditions d'analyse de l'azidohexyl-Leu-OH par LC-MS</i>	237
<i>Tableau 40 : Réactifs employés pour le couplage de l'azidohexyl-Leu-OH avec le peptide ETTCASLCYP</i>	239
<i>Tableau 41 : Conditions de purification du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH par HPLC préparative</i>	240
<i>Tableau 42 : Conditions d'analyse du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH par LC-MS</i>	240

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Localisation du côlon et du rectum dans l'appareil digestif et descriptif du gros intestin ..</i>	8
<i>Figure 2 : Types de nanovecteurs disponibles pour la thérapie cancéreuses ¹⁵</i>	14
<i>Figure 3 : Principaux nanovecteurs utilisés comme systèmes de délivrance de médicament (A) Liposome (B) Nanosphère (C) Nanocapsule (D) Micelle et (E) Dendrimère ¹⁶</i>	14
<i>Figure 4: Schéma d'un liposome ²³</i>	15
<i>Figure 5 : Nombre de publications traitant des nanoparticules polymère durant la période 2000 et 2017</i>	17
<i>Figure 6 : Différences entre tissus normaux et tumoraux permettant d'expliquer l'effet « EPR ». (A) Les tissus normaux contiennent des vaisseaux sanguins maintenus par des péricytes. La matrice extracellulaire contient des fibres de collagène, des fibroblastes, des macrophages et des vaisseaux lymphatiques. (B) Les tissus tumoraux contiennent des vaisseaux sanguins à l'endothélium perméable. La matrice extracellulaire contient plus de fibres de collagène, de fibroblastes et de macrophages que dans les tissus normaux ⁷⁸</i>	20
<i>Figure 7 : Représentations schématiques du (A) ciblage passif (effet EPR) et (B) ciblage actif des vecteurs décorés en surface pour se lier aux récepteurs spécifiques surexprimés par (1) des cellules cancéreuses ou (2) des cellules endothéliales ⁸⁴</i>	21
<i>Figure 8 : Préparation de nanoparticules recouvertes de dextrane par polymérisation en miniémulsion ⁸⁶</i>	23
<i>Figure 9 : (a) Schéma réactionnel de la polymérisation en émulsion aqueuse du MMA et du styrène à partir d'une macro-alcoxyamine P(AMA₄₁-co-SS₁₀) fonctionnalisée par un groupement SGI. (b) Clichés obtenus par MET de la dispersion finale constituée de copolymères P(AMA₄₁-co-SS₁₀)-b-P(MMA_n-co-S_m) en fonction de la longueur du bloc hydrophobe PMMA produit.</i>	25
<i>Figure 10 : Schéma réactionnel de la polymérisation du styrène en dispersion dans le méthanol, en présence de macroRAFTs hydrophiles</i>	26
<i>Figure 11 : Images MET des glycopolymères (Dex-g-PHPMA) qui se forment in situ par photo-PISA en phase aqueuse et s'auto-organisent pour conduire à des nano-objets ⁹⁶</i>	26
<i>Figure 12 : Préparation des particules par double émulsion-évaporation de solvant (Emulsion E/H/E) ¹¹⁷</i>	31
<i>Figure 13 : Préparation des nanoparticules par le procédé d'émulsion-diffusion ¹³⁶</i>	33
<i>Figure 14 : Préparation des nanoparticules par le procédé d'émulsion-salting-out ¹⁴⁹</i>	35
<i>Figure 15 : Préparation des nanocapsules par le procédé d'émulsion-coacervation ¹⁶⁷</i>	36
<i>Figure 16 : Différents stimulus externes et internes employés dans les systèmes de délivrance de médicaments ¹⁸⁸</i>	40
<i>Figure 17 : Modification schématique de la balance hydrophile-hydrophobe d'un copolymère ²²⁸ ...</i>	45

<i>Figure 18 : Photoisomérisations réversibles de copolymères à bloc à base d'azobenzène, de spiropyrane et de 1,2-diaryléthène</i> ²³⁶	45
<i>Figure 19 : Photoisomérisation réversible d'un copolymère à bloc à base d'azobenzène</i> ²²⁸	46
<i>Figure 20 : Photoisomérisation réversible Trans-Cis du spiropyrane</i> ²⁵³	47
<i>Figure 21 : Différents types d'esters photoclivables utilisés dans la modification irréversible de la balance hydrophile-hydrophobe</i> ²⁵³	48
<i>Figure 22 : Mécanisme de photoisomérisation d'un dérivé d'o-nitrobenzyle</i> ²⁶⁷	49
<i>Figure 23 : Fixation d'une molécule par lien photosensible sur le bloc hydrophobe d'un copolymère amphiphile et encapsulation d'une deuxième molécule hydrophobe lors de la formation des micelles, puis libération des molécules sous irradiation UV</i> ²⁶⁸	50
<i>Figure 24 : (a) Irradiation d'un copolymère PEO-b-PNBM (b) Représentation schématique de la destruction d'une micelle et libération d'un principe actif sous l'effet de l'irradiation</i> ²⁶⁹	50
<i>Figure 25 : Illustration schématique (A) de la rupture de la liaison entre le bloc hydrophobe et le bloc hydrophile, (B) de la rupture multiple</i> ²⁵³	51
<i>Figure 26 : Assemblage photosensible supramoléculaire à base de PCL-Cyclodextrine et poly(acide acrylique)-Azobenzène</i> ²³⁶	52
<i>Figure 27 : Différents groupements photosensibles utilisés dans le cas d'une rupture irréversible de la jonction entre les blocs hydrophobe et hydrophile</i> ²³⁶	53
<i>Figure 28 : Irradiation UV du copolymère dibloc Polystyrène-b-Poly(oxyde d'éthylène)</i>	53
<i>Figure 29 : Images Cryo-MET des polymersomes à base de PCL-b-PEO dont les blocs sont liés par un lien 2-nitrophénylalanine (a) avant et (b) après irradiation UV pendant 6 h</i> ²⁷⁴	54
<i>Figure 30 : Différence de sensibilité à l'irradiation entre des particules avec des jonctions photosensibles entre les deux blocs et des particules avec des groupements photosensibles placés d'une manière répétitive dans le bloc hydrophobe</i> ²⁷⁶	55
<i>Figure 31 : Représentation schématique d'une photo-réticulation réversible d'un copolymère dibloc</i> ²²⁸	56
<i>Figure 32 : Réaction de photo-réticulation réversible d'un copolymère amphiphile via des groupements de coumarine</i> ²⁸¹	57
<i>Figure 33 : Photodimérisation de l'ester cinnamique</i>	57
<i>Figure 34 : Photo-réticulation irréversible des vésicules comportant un carbamate d'o-nitrobenzyle</i> ²⁸⁵	58
<i>Figure 35 : Représentation schématique de la libération photo et thermo-déclenchée du Nile Red à partir de micelles</i> ²⁸⁷	60
<i>Figure 36 : Préparation de micelles photo et pH-sensibles contenant de la camptothécine et libération provoquée de ce PA</i> ²⁹⁰	61
<i>Figure 37 : Représentation schématique des transitions réversibles des micelles en vésicules</i> ²⁹¹	61

Figure 38: Nanoparticule de PANB recouverte d'une couronne en dextrane et fonctionnalisée en surface.....	82
Figure 39 : Mécanisme général de la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP)	88
Figure 40 : Comparaison des mécanismes SARA ATRP et SET-LRP ¹⁶	89
Figure 41 : Mécanisme de polymérisation par SET-LRP ¹⁷	90
Figure 42 : Réactions impliquées dans le cas des polymérisations SET-LRP et ATRP ²⁵	91
Figure 43 : Formules chimiques des ligands utilisés en SET-LRP	94
Figure 44 : Polymérisation de l'ANB par SET-LRP et substitution de l'extrémité Br par une fonction azoture.....	96
Figure 45 : Spectres RMN ¹ H dans CDCl ₃ du milieu réactionnel de la polymérisation par SET-LRP de l'ANB avec [ANB] ₀ /[EBiB] ₀ /[Me ₆ Tren] ₀ /[CuBr ₂] ₀ = 26/1/1/0,1 dans DMSO à 20 °C. (a) à t=0 (b) après 1 heure de réaction.....	97
Figure 46 : Evolutions de Ln11 – x en fonction de la durée de polymérisation. SET-LRP dans le DMSO à 20 °C de l'ANB avec (a) [ANB] ₀ /[EBiB] ₀ / [Me ₆ TREN] ₀ / [CuBr ₂] ₀ = 26/1/1/0,1 et (b) 100/1/10,1.....	98
Figure 47 : Réaction de terminaison par couplage.....	98
Figure 48 : Réaction de terminaison par dismutation	98
Figure 49 : Evolutions des chromatogrammes SEC (THF).	99
Figure 50 : Polymérisation par SET-LRP de l'ANB dans le DMSO à 20 °C. Evolutions de Mn en fonction du taux de conversion (Les droites correspondent à l'évolution des Mn th) et évolutions de la dispersité en fonction du taux de conversion. (a) pour [ANB] ₀ / [EBiB] ₀ / [Me ₆ TREN] ₀ / [CuBr ₂] ₀ = 26/1/1/0,1 et (b) pour [ANB] ₀ / [EBiB] ₀ / [Me ₆ TREN] ₀ / [CuBr ₂] ₀ = 100/1/1/0,1.....	100
Figure 51 : Spectres RMN ¹ H (a) du PANB-Br (Mn th= 3500 g mol ⁻¹) (b) du PANB-N ₃ (Mn th= 3440 g mol ⁻¹) dans le CDCl ₃	102
Figure 52 : SEC dans le DMSO-NaNO ₃ du PANB-Br (Mn th= 3500 g mol ⁻¹) et du PANB-N ₃ (Mn th= 3440 g mol ⁻¹) en détection LS et dRI	102
Figure 53 : Spectre IR (a) du PANB-Br (Mn th= 3500 g mol ⁻¹) et (b) du PANB-N ₃ (Mn th= 3440 g mol ⁻¹)	103
Figure 54 : Structure chimique du dextrane natif. Les unités α-D-glucopyranoses sont essentiellement liées par des liaisons α (1 → 6). La présence des chaînes latérales en α (1 → 2), α (1 → 3) et α (1 → 4) est représentée.....	104
Figure 55 : Structure linéaire du dextrane.....	104
Figure 56: Réaction de synthèse du DexAlcyne-τ	105
Figure 57 : Spectres RMN ¹ H dans le DMSO-d ₆ (a) du Dextrane et (b) du DexAlcyne-τ.....	106
Figure 58 : SEC dans le DMSO-NaNO ₃ du dextrane natif et du DexAlcyne-τ (avec τ = 15 %) en détection LS et en détection dRI	107

<i>Figure 59 : Evolution de la tension superficielle des solutions aqueuses de dextrane et de DexAlcyne-15 en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes dans la phase aqueuse.....</i>	108
<i>Figure 60 : Synthèse du glycopolymère Dex-g-PANB</i>	109
<i>Figure 61: Spectres IR (a) du PANB₃₇₀₀-N₃, (b) du DexAlcyne-15 et (c) du Dex(15)-g-IPANB₃₇₀₀ ...</i>	110
<i>Figure 62 : Spectres RMN ¹H dans le DMSO-d₆ (a) du PANB-N₃, (b) du DexAlcyne-τ et (c) du Dex(15)-g-IPANB₃₇₀₀</i>	111
<i>Figure 63 : SEC dans le DMSO-NaNO₃ du DexAlcyne-15, du PANB-N₃ et du Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀ en détection dRI</i>	112
<i>Figure 64 : Evolution de la tension superficielle des solutions aqueuses du Dex-g-PANB (F_{PANB}= 10 %) et du Dextrane natif en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes dans la phase aqueuse.....</i>	112
<i>Figure 65 : Distribution de taille des NPs préparées par nanopréciipitation du</i>	123
<i>Figure 66 : Distributions de taille des NPs préparées par nanopréciipitation à partir de divers Dex-g-PANB.....</i>	124
<i>Figure 67 : Distribution de tailles des NPs élaborées par émulsion-évaporation de solvant</i>	126
<i>Figure 68 : Evolution du potentiel Zêta de NPs Clickées ou non, dispersées dans une phase aqueuse de NaCl de 10⁻⁶ à 10⁻² mol/L.</i>	128
<i>Figure 69: Spectres RMN ¹H des NPs préparées par émulsion-évaporation de solvant organique dans le DMSO-d₆ avec (A) et sans (B) chimie Click CuAAC, en utilisant le CuBr comme catalyseur.</i>	130
<i>Figure 70 : Stabilité colloïdale de NPs en présence de NaCl.....</i>	133
<i>Figure 71 : Spectres RMN ¹H des NPs produites par émulsion-évaporation de solvant dans le DMSO-d₆avec (A, B) ou sans (C) Click in situ CuAAC (CuBr). La chimie Click a été réalisée sous (A) ou sans (B) flux d’N₂. Les spectres sont donnés avant et après contact avec SDS.....</i>	134
<i>Figure 72 : Distribution de tailles des NPs après lavages et après leur lyophilisation en présence et en absence de tréhalose (cas des NPs obtenues par émulsion-évaporation de solvant sans Click)</i>	138
<i>Figure 73 : Effet de l’irradiation UV sur les glycopolymères Dex-g-PANB.....</i>	140
<i>Figure 74 : Evolution de l’intensité diffusée en fonction de la durée d’irradiation.....</i>	140
<i>Figure 75 : Suivi de l’irradiation (54 mW/cm²) du glycopolymère Dex(15)-g-3PANB₃₇₀₀ (F_{PANB} = 40 %) par RMN ¹H dans le DMSO-d₆.....</i>	141
<i>Figure 76 : Formules chimiques (a) de la Doxorubicine et (b) de la Doxorubicine chlorhydrate</i>	148
<i>Figure 77 : Spectres RMN ¹H dans le DMSO-d₆(a) de la Doxorubicine, (b) des nanoparticules vides et (c) des nanoparticules chargées de Doxorubicine en présence de la référence interne (Téréphthalaldéhyde, benzène-1,4-dicarboxaldéhyde)</i>	151
<i>Figure 78 : Profils de libération de la DOX encapsulée dans les NPs de PANB dans le PBS à 37 °C</i>	157
<i>Figure 79 : Profils de libération de la DOX encapsulée dans les NPs de PANB dans le DMEM à 37 °C</i>	157

<i>Figure 80 : Profils de libération de la DOX hors des NPs « non Clickées » à 37 °C sous l'effet de l'irradiation à 54mW/cm² pour différents temps d'irradiation (a) dans le PBS et (b) dans le DMEM</i>	159
<i>Figure 81 : Profils de libération de la DOX hors des NPs « non Clickées », des NPs « Clickées » CuBr et des NPs « Clickées » CuSO₄/AAsc après 30 secondes d'irradiation à 54 mW/cm² à 37 °C (a) dans le PBS et (b) dans le DMEM</i>	159
<i>Figure 82: Profils de libération de la DOX hors des NPs « non Clickées », des NPs « Clickées » CuBr et des NPs Clickées CuSO₄/AAsc après 10 minutes d'irradiation à 54 mW/cm² à 37 °C (a) dans le PBS et (b) dans le DMEM</i>	160
<i>Figure 83 : Etude de la viabilité des cellules Caco-2 en présence de différentes concentrations de tréhalose, dosage MTT après (a) 24 h et (b) 48 h. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).</i>	169
<i>Figure 84 : Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence de différentes concentrations en NPs (« non Clickées », « Clickées » CuBr et « Clickées » CuSO₄/AAsc) après 24 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).</i>	170
<i>Figure 85 : Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence de différentes concentrations en NPs (« non Clickées », « Clickées » CuBr et « Clickées » CuSO₄/AAsc) après 48 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).</i>	171
<i>Figure 86 : Etude de la viabilité des cellules Caco-2 irradiées avec différentes puissances et durées d'irradiation. Dosage MTT effectué après (a) 24 h et (b) 48 h. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).</i>	173
<i>Figure 87 : Effet du changement du milieu de culture 4 h après l'irradiation (54 mW/cm²). Dosage MTT (a) après 24 h et (b) après 48 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).</i>	174
<i>Figure 88 : Effet du changement du milieu de culture 4 h après l'irradiation (54 mW/cm²) des cellules Caco-2 en présence des NPs « non Clickées ». Dosage MTT (a) après 24 h et (b) après 48 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).</i>	175
<i>Figure 89 : Détermination de la viabilité des cellules Caco-2 après traitement avec de la DOX neutralisée et après renouvellement du milieu de culture 4 h après le traitement. Dosage MTT après 24 h d'incubation (n=3).</i>	176
<i>Figure 90 : Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence des différentes NPs (« non Clickées », « Clickées » CuBr et « Clickées » CuSO₄/AAsc) chargées de DOX. Etude de la durée d'irradiation (54 mW/cm²). Dosage MTT après 24 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).</i>	178

<i>Figure 91 :Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence des différentes NPs (« non Clickées », « Clickées » CuBr et « Clickées » CuSO₄/AAsc) chargées de DOX. Etude de la durée d'irradiation (54 mW/cm²). Dosage MTT après 48 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).</i>	179
<i>Figure 92 : Spectres UV des solutions de nanoparticules cœur PLA/couronne DexAlcyne-15 dans le DMSO (a) fonctionnalisées par le peptide en utilisant CuSO₄/AAsc et (b) non fonctionnalisées par le peptide en absence de CuSO₄/AAsc.....</i>	183
<i>Figure 93 :Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence de différentes concentrations en ligands (AF-N₃ ou Man-N₃) ou en Peptide-N₃. Dosage MTT après 24 h. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3). 185</i>	185
<i>Figure 94 :Evolution de la viabilité des cellules Caco-2 en présence de différentes concentrations en ligands (AF-N₃ ou Man-N₃) ou en Peptide-N₃. Dosage MTT après 48 h. Selon le test de Duncan ($\alpha=0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3). 186</i>	186
<i>Figure 95 :Evolution de la viabilité cellulaire des Caco-2 en présence des NPs « Clickées » CuBr et chargées de DOX sans post-fonctionnalisation et post-fonctionnalisées avec AF, Man et Peptide. Renouvellement du milieu de culture 4 h après irradiation puis dosage MTT réalisé après 24 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha =0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).</i>	187
<i>Figure 96 :Evolution de la viabilité cellulaire des Caco-2 en présence des NPs « Clickées » CuBr et chargées de DOX sans post-fonctionnalisation et post-fonctionnalisées avec AF, Man et Peptide 3. Renouvellement du milieu de culture 4 h après irradiation puis dosage MTT réalisé après 48 h d'incubation. Selon le test de Duncan ($\alpha = 0,05$), une même lettre signifie que la différence entre les valeurs n'est pas significative (n=3).</i>	188
<i>Figure 97 : Evolution de la viabilité cellulaire des Caco-2 en présence des NPs chargées de DOX sans post-fonctionnalisation et post-fonctionnalisées avec AF, Man et Peptide. Incubation 24 h des NPs avant l'irradiation, renouvellement du milieu de culture 4 h après irradiation puis dosage MTT après 24 h d'incubation. (Les valeurs non suivies de la même lettre sont significativement différentes selon un test de Duncan ($a = 0,05$)) (n=3)).</i>	189
<i>Figure 98 : Evolution de la viabilité cellulaire des Caco-2 en présence des NPs chargées de DOX sans post-fonctionnalisation et post-fonctionnalisées avec AF, Man et Peptide. Incubation 24 h des NPs avant l'irradiation, renouvellement du milieu de culture 4 h après irradiation puis dosage MTT après 48 h d'incubation. (Les valeurs non suivies de la même lettre sont significativement différentes selon un test de Duncan ($a = 0,05$)) (n=3)).</i>	190
<i>Figure 99:Estérification de l'alcool d'o-nitrobenzylique par le chlorure d'acryloyle</i>	195
<i>Figure 100 : Spectre RMN¹H dans le CDCl₃ de l'acrylate d'o-nitrobenzyle.....</i>	196
<i>Figure 101 : Spectre RMN¹³C dans le CDCl₃ de l'Acrylate d'o-nitrobenzyle</i>	196
<i>Figure 102: Polymérisation de l'acrylate d'o-nitrobenzyle par SET-LRP</i>	197

Figure 103 : Spectres RMN ¹ H dans le DMSO-d ₆ du (a) monomère ANB et (b) du PANB-Br	199
Figure 104 : Réaction de modification du PANB-Br en PANB-N ₃ avec l'azoture de sodium	199
Figure 105 : Spectres RMN ¹ H dans le CDCl ₃ (a) du PANB-Br et (b) du PANB-N ₃	200
Figure 106 : Réaction de modification du PANB-Br par la propargylamine	200
Figure 107 : Réaction de synthèse du DexAlcyne-τ	201
Figure 108: Réaction d'activation de l'acide 5-hexynoïque par le carbonyldiimidazole (CDI)	202
Figure 109 : Spectres RMN ¹ H dans le DMSO-d ₆ (a) de l'acide hex-5-ynoïque et (b) de l'acide hex-5-ynoïque activé.....	202
Figure 110 : Spectres RMN ¹ H dans le DMSO-d ₆ (a) du Dextrane et(b) du DexAlcyne-τ.....	203
Figure 111 : Spectres RMN ¹³ C dans le DMSO-d ₆ (a) du Dextrane et (b) du DexAlcyne-τ.....	204
Figure 112 :Réaction de synthèse de l'acide 6-azidohexanoïque	204
Figure 113:Réaction de synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohexanoïque.....	205
Figure 114 : Spectres RMN ¹ H dans le CDCl ₃ de (a) l'acide 6-bromohexanoïque, (b) de l'acide 6-azidohexanoïque et (c) de l'acide 6-azidohexanoïque activé.....	206
Figure 115 : Synthèse du DexN ₃ -τ.....	206
Figure 116 :Spectres RMN ¹ H dans le DMSO-d ₆ (a) du Dextrane et (b) du DexN ₃ -τ.....	207
Figure 117 : Spectres RMN ¹³ C dans le DMSO-d ₆ du (a) Dextrane et du (b) DexN ₃ -τ	208
Figure 118 : Synthèse du glycopolymère Dex-g-PANB	209
Figure 119 : Spectres RMN ¹ H dans le DMSO-d ₆ (a) du PANB-N ₃ , (b) du DexAlcyne-τ et (c) du Dex-g-PANB.....	210
Figure 120 : Tensiomètre Krüss K20 EasyDyne	214
Figure 121 : Modélisation de la double-couche électrostatique autour d'une particule chargée ⁹ ...	218
Figure 122 : (a) Lampe UV de type Omnicure SI1000 (b) Spectre UV avec le filtre 320-390 nm.....	220
Figure 123 : Doxorubicine.....	220
Figure 124 : Spectre RMN ¹ H du téréphthalaldéhyde dans le DMSO-d ₆	222
Figure 125 : Spectres RMN ¹ H dans le DMSO-d ₆ (a) de la Doxorubicine, (b) des nanoparticules vides et (c) des nanoparticules chargées de Doxorubicine en présence de la référence interne	222
Figure 126 : Dosage de la Doxorubicine dans l'eau Milli-Q par HPLC, détection UV à 480 nm (a) Chromatogramme d'une solution de DOX dans l'eau Milli-Q, (b) Courbe de calibration de la Doxorubicine dans l'eau Milli-Q.....	224
Figure 127 : Courbes d'étalonnage de la DOX dans le (a) PBS et le (b) DMEM (Observation par UV à 480 nm).....	224
Figure 128 : Dosage de la Doxorubicine par HPLC, détection en UV à 480 nm (a) Chromatogramme d'une solution de DOX dans le DMEM, (b) Courbe de calibration de la DOX dans le DMEM, (c) Chromatogramme d'une solution de DOX dans le PBS (d) Courbe de calibration de la DOX dans le PBS.....	225

<i>Figure 129 : Réaction de réduction du méthylthiazoltétrazolium en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives</i>	228
<i>Figure 130 : Réaction de fonctionnalisation de l'acide folique avec la 3-azido-1-propanamine</i>	229
<i>Figure 131 : Chromatogramme de l'acide folique azide par HPLC (détection en UV à 290 nm)</i>	231
<i>Figure 132 : Spectres RMN ¹H (DMSO-d₆, 298 K) de (a) AF commercial et (b) dérivé AF-N₃</i>	231
<i>Figure 133 : Spectres RMN ¹H (DMSO-d₆, 298 K) (a) des NPs composées d'un cœur de PANB-N₃ et d'une couronne de Dex-Alcyne (b) de l'AF-N₃ et (c) des NPs post-fonctionnalisées avec l'AF</i>	233
<i>Figure 134 : Formule développée du peptide ETTCASLCYP</i>	234
<i>Figure 135 : Chromatogramme du peptide ETTCASLCYP (détection en UV à 214 nm)</i>	235
<i>Figure 136 : Spectre de masse du peptide ETTCASLCYP (pic principal t_R=9,413 min)</i>	235
<i>Figure 137 : Formule développée de l'azidohexyl-Leu-OH</i>	236
<i>Figure 138 : Chromatogramme de l'azidohexyl-Leu-OH (détection en UV à 214 nm)</i>	238
<i>Figure 139 : Spectre de masse de l'azidohexyl-Leu-OH (pic principal t_R=12,012 min)</i>	238
<i>Figure 140 : Spectre RMN ¹H (DMSO-d₆, 298 K) de l'azidohexyl-Leu-OH</i>	238
<i>Figure 141 : Formule développée du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH</i>	239
<i>Figure 142 : Chromatogramme de l'azidohexyl-LETTCASLCYP-OH et détection en UV à 214 nm</i> ..	241
<i>Figure 143 : Spectre de masse de l'azidohexyl-LETTCASLCYP-OH (pic principal t_R=15,62 min)</i> ...	241
<i>Figure 144 : Spectre RMN ¹H (DMSO-d₆, 298 K) du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH</i>	241
<i>Figure 145 : Spectre RMN 2D TOCSY homonucléaire ¹H-¹H (DMSO-d₆, 298 K) du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH</i>	242
<i>Figure 146 : Courbe de calibration du peptide azidohexyl-LETTCASLCYP-OH dans le DMSO (Observation par UV à 280 nm)</i>	243
<i>Figure 147 : Formule développée de l'azoture de α-D-Mannopyranosyle</i>	244
<i>Figure 148 : Spectres RMN ¹H (DMSO-d₆, 298 K) (a) des NPs composées d'un cœur de PANB-N₃ et d'une couronne de Dex-Alcyne (b) de l'azoture de α-D-Mannopyranosyle et (c) des NPs-Man</i>	244

Nanoparticules photosensibles pour un traitement anticancéreux plus efficace

Résumé

Ce doctorat portait sur le développement de nanoparticules (NPs) photosensibles constituées d'un cœur photolysable poly(acrylate d'*o*-nitrobenzyle) (polymère hydrophobe biocompatible - PANB) et d'une couronne basée sur un dérivé du dextrane (polysaccharide bactérien, hydrophile et biodégradable).

Dans un premier temps, le PANB-N₃ a été synthétisé par i) polymérisation radicalaire contrôlée (SET-LRP) de l'acrylate d'*o*-nitrobenzyle puis ii) modification chimique de l'extrémité de chaîne par une fonction azoture. En parallèle, le dextrane a été hydrophobisé par quelques chaînes grasses dotées d'un groupe alcyne (obtention du DexAlcyne-15). Ces polymères précurseurs peuvent alors réagir par chimie click CuAAC (Cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu(I)) pour engendrer divers glycopolymères greffés Dex-g-PANB.

Dans un deuxième temps, les NPs ont été formulées par deux procédés puis caractérisées en termes de taille, recouvrement en dextrane (quantité par gramme de PANB, épaisseur de la couche surfacique) et stabilité colloïdale en milieu salin, en présence de tensioactif compétitif ou dans un milieu de culture (DMEM). Le procédé de nanopréciptation a été appliqué aux Dex-g-PANB présentant de fortes fractions massiques en PANB (>40%) alors que le procédé d'émulsion-évaporation de solvant organique a été mis en œuvre en utilisant le DexAlcyne-15 comme tensioactif hydrosoluble et le PANB-N₃ comme matériau hydrophobe. Grâce à leurs fonctionnalités complémentaires, une réaction CuAAC peut (ou non) avoir lieu à l'interface liquide/liquide pendant l'élaboration des NPs et conduire à l'obtention de NPs « non clickées » ou « clickées ». Enfin, le caractère photosensible des NPs a été validé par irradiation UV en observant une disparition progressive des NPs résultant de la photolyse des PANB.

Afin d'utiliser ces NPs comme systèmes stimulables de délivrance de médicaments, un anticancéreux (Doxorubicine - Dox) a été encapsulé au sein des NPs, pendant leur élaboration.

Cette encapsulation a été optimisée et les NPs chargées de DOX ont été caractérisées en termes de taille et d'efficacité d'encapsulation. La libération de la DOX hors des NPs a ensuite été suivie par simple diffusion, ou provoquée par irradiation UV.

Enfin, le potentiel biologique de ces NPs a été évalué vis-à-vis d'une lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique (Caco-2). Après vérification de leur biocompatibilité et de la résistance des Caco-2 aux irradiations UV, nous avons pu montrer que les NPs chargées pouvaient libérer suffisamment de DOX en seulement 30 secondes d'irradiation (puissance: 54mW/cm²) pour éradiquer plus de 50% de ces cellules cancéreuses.

Mots clés:

Nanoparticules, photosensible, polysaccharide, biocompatible, biodégradable, émulsion-évaporation de solvant organique, nanopréciptation, anticancéreux, encapsulation

Photosensitives nanoparticles for more efficient cancer treatment

Abstract

This work was focused on the development of light-sensitive nanoparticles (NPs) based on a photodegradable poly(*o*-nitrobenzyl acrylate) core (PNBA, hydrophobic and biocompatible polymer) and a dextran derivative shell (dextran is a biodegradable and hydrophilic bacterial polysaccharide).

Firstly, PNBA-N₃ was synthesized by i) Single-Electron Transfer Living Radical Polymerization (SET-LRP) of *o*-nitrobenzyl acrylate then ii) introduction of one azide end-function. In the same time, DexAlkyne-15 carrying several alkyne groups was produced by hydrophobization of dextran. Such DexAlkyne-15 and PNBA-N₃ can react by CuAAC (Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) click chemistry leading to Dex-g-PNBA glycopolymers with various macromolecular parameters.

Secondly, NPs were produced by comparing two processes then characterized in terms of size, dextran amount, shell thickness and colloidal stability in NaCl or cell culture media, or in presence of one strong surfactant. On one hand, NPs were made by nanoprecipitation of Dex-g-PNBA exhibiting high PNBA weight fractions (>40 %). On the other hand, NPs were produced by emulsion-evaporation of the organic solvent using DexAlkyne-15 as water-soluble surfactant and PNBA-N₃ as hydrophobic materials. In this case, *in situ* CuAAC occurred (or not) at the liquid/liquid interface during the NPs formulation, leading to “clicked” and “not-clicked” NPs. Finally, NPs disruption was studied by UV irradiation according the PNBA chains photolysis.

To use such NPs as smart drug delivery systems, Doxorubicin (DOX - an anticancer agent), was loaded inside the NPs during their elaboration. The experimental conditions were optimized to enhance the DOX encapsulation. The kinetics release of encapsulated DOX were studied by diffusion or under UV irradiation.

Finally, the biological potential of these NPs was estimated towards Caco-2 (continuous line of heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells). After checking the NPs biocompatibility and the Caco-2 strength under UV irradiation, we proved that such loaded NPs can release enough DOX under 30 second irradiation (power: 54mW/cm²) to decrease the Caco-2 viability about more than 50%.

Keywords:

Nanoparticles, photosensitive, polysaccharide, biocompatible, biodegradable, emulsion-evaporation of the organic solvent, nanoprecipitation, anticancer, encapsulation