



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des procédés et des produits

Par

Laura Marcela FORERO RAMIREZ

Elaboration de nanocapsules par polymérisation radicalaire contrôlée à partir d'un tensioactif réactif dérivé du dextrane

Soutenue publiquement le 13 juin 2016 devant la commission d'Examen

MEMBRES DU JURY

| | | |
|-------------------------|----------------------|--|
| Président : | Lionel CHOPLIN | Professeur Université de Lorraine |
| Rapporteurs : | Muriel LANSALOT | Chargée de Recherche CNRS, Lyon |
| | François STOFFELBACH | Maître de Conférences Université Pierre et Marie Curie Paris 6 |
| Examineur : | Valérie HEROGUEZ | Directeur de Recherche CNRS, Bordeaux |
| Membres invités : | Ariane BOUDIER | Maître de Conférences Université de Lorraine |
| | Jérôme BABIN | Maître de Conférences Université de Lorraine |
| Directrice de thèse : | Cécile NOUVEL | Professeur Université de Lorraine |
| Co-directeur de thèse : | Jean-Luc SIX | Professeur Université de Lorraine |

A mes parents Gladys y Pedro
A mes sœurs Lorena y Alejandra
A Aramis

*Je voudrais tout d'abord remercier grandement ma directrice de thèse, **Cécile Nouvel**. Les mots ne suffisent pas pour exprimer ma profonde gratitude. J'ai toujours eu l'impression d'avoir trouvé une marraine française. Je suis honorée d'avoir travaillé à tes côtés car outre que ton appui sur le plan scientifique, tu as toujours été là pour me soutenir, me conseiller et t'assurer que mon séjour en France se passe dans les meilleures conditions. J'ai beaucoup grandi et gagné de la confiance grâce à toi. **Merci pour tout**.*

*Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse, **Jean-Luc Six**. Merci pour ta confiance, ton soutien et ta sympathie au cours de ces trois années de thèse. Je te remercie aussi d'avoir été toujours disponible. Un grand merci pour toutes les heures que tu as consacré à ces travaux de recherche.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers les membres du jury. Merci à Madame **Muriel Lansalot** et Monsieur **François Stoffelbach** de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ces travaux de thèse en tant que rapporteurs. J'associe ces remerciements à Monsieur **Lionel Choplin** et Madame **Valérie Heroguez**. Vos remarques ont permis d'enrichir ces travaux de recherche.*

*Je remercie également **Alain Durand**, directeur du laboratoire pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM). Merci pour ton aide, ta gentillesse, ton appui scientifique et tes encouragements. Merci d'avoir toujours trouvé mes travaux si passionnants même dans les périodes de mauvais résultats.*

*Je tiens à remercier spécialement **Jérôme Babin** pour sa précieuse aide au cours de ces années. Merci pour ta bonne humeur, ton accompagnement et les corrections apportées à mes travaux. J'ai beaucoup appris lors de nos échanges.*

*Je présente ma profonde gratitude à toute l'équipe **CITHEFOR**, en particulier à **Ariane Boudier**, **Caroline Gaucher** et **Isabelle Fries**. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et pour votre*

sensibilité à me transmettre vos savoir-faire, connaissances et compétences. J'avoue que la partie de mes travaux réalisée en collaboration avec votre équipe est ma préférée.

J'adresse mes remerciements à **Marc Schmutz** et **Mériem Er-Rafik** de l'Institut Charles Sadron (ICS) à Strasbourg pour les caractérisations par Cryo-MET. Je remercie également à **Cécile Dreiss** et **Daniela Ridolfi** (Institute of Pharmaceutical Science, King's College London) et **Isabelle Grillo** (Institut Laue-Langevin) pour les analyses SANS. Merci à vous tous pour la disponibilité dont vous avez fait preuve.

Je tiens également à remercier **Marie-Christine Grassiot** pour les analyses SEC, **Olivier Fabre** pour les analyses RMN, **Jean-Claude Sivault** et **Henri Lenda** pour leur aide et leur appui technique tout au long de ces années. Je remercie **Jeanine Fourier** et **Nathalie Brenon** pour leur aide administrative et leur gentillesse.

Mes plus chaleureux remerciements vont aux doctorants, jeunes docteurs et stagiaires que j'ai pu côtoyer ces dernières années. Je pense à **Charlotte**, **Khalid** et **Soliman**, merci de m'avoir initié aux installations du labo et de m'avoir aidé lors de mes premières manipulations. **Ancuta**, comment pourrais-je oublier tes délicieux cheesecakes et nos séances body sculpt au SUAPS. Après ton départ, je suis devenue la plus gourmande du labo. **Karen**, **Melissa** et **Nesrine** mes petites stagiaires, merci pour votre précieuse contribution à l'avancement de mes travaux de thèse. Je garde de très bons souvenirs de vous toutes. J'espère vous avoir appris deux ou trois petites choses. Ma petite **Asma**, avec qui j'ai commencé l'aventure du master et ensuite de la thèse. Tu es un vrai rayon du soleil pour toutes les personnes qui ont eu le plaisir de te rencontrer. J'ai trouvé en toi une grande amie et je suis ravie d'avoir partagé avec toi cette étape de ma vie. N'oublies surtout pas de m'inviter à ton mariage en Tunisie !! Pour ma part, je te dois toujours le cours de salsa. Un grand merci également à **Katarzyna**, **Mariam**, **Isabelle**, **Vincent**, **Laura**, **Camilo** (x2), **Carlos**, **Ning**, **Natcha**, **Lupita**, **Keyni**, **Miao**, **Rudy**, **Maxime**, **Audrey**, **Faten**, **Mohammed** (x2), **Sébastien**, **Eugénie**, **Lucie**, **Xavier**... pour les bons moments passés ensemble.

*Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans parler de mes proches. Mes spéciales dédicaces vont à mes très chers amis **Moïta (ma moche)**, **Hans (number 1)** et **Jess (perris)** pour leur soutien inconditionnel. Merci pour vos relectures mais surtout pour être toujours à mes côtés. Vous êtes plus que des amis, vous êtes ma famille française (J'espère que cette mention me permettra de rattraper mon oubli lors de la soutenance😊). Merci à toi **Aramis** pour ton soutien constant et ta patience lors de la rédaction de ma thèse, merci pour les repas piquants, les séries, tes apports enrichissants à la mise en forme de mon manuscrit, tes « ya pasho, ya pasho »...merci pour tout. Merci à tous ceux que j'ai connu sur la piste de danse et qui m'ont aidé à me détendre de temps en temps (bon, j'avoue, très souvent😊).*

*Je tiens à remercier mes sœurs **Lorena** et **Alejandra** qui ont toujours été là pour moi. Merci Ale d'avoir utilisé tes talents artistiques pour remplir ce manuscrit avec de très belles figures. Merci également pour mon merveilleux pot de thèse. Je suis ravie de t'avoir très près de moi. Vas-y pour le rêve ratatouille !!!*

*Ces remerciements ne peuvent pas s'achever, sans une pensée pour ma plus grande fan : **ma maman**. Gracias mi gordis por creer siempre en mi. Tú me inspiras y me motivas a ser mejor. Esta tesis también es tuya, un logro más para que te sientas orgullosa y puedas « presumir »😊. Eres la mejor...*

Laura

TABLE DES MATIERES

| | |
|------------------------------------|----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
|------------------------------------|----------|

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCTION | 5 |
| 2. NANOMEDECINE ET THERAPIE CANCEREUSE | 6 |
| 2.1. PHYSIOPATHOLOGIE DES TUMEURS SOLIDES : GENERALITES | 7 |
| 2.2. STRATEGIES DE CIBLAGE | 9 |
| 2.2.1. Ciblage passif | 9 |
| 2.2.2. Ciblage actif | 10 |
| 2.3. METHODES POUR FONCTIONNALISER LA SURFACE DES NANOVECTEURS..... | 12 |
| 2.3.1. La Chimie « Click » | 13 |
| 2.3.1.1. Cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu(I) (CuAAC) | 15 |
| 2.3.1.2. Cycloaddition azide-alcyne non catalysée..... | 16 |
| 2.4. NANOVECTEURS STIMULI-SENSIBLES | 19 |
| 2.4.1. Les systèmes pH-sensibles | 21 |
| 2.4.1.1. NVs contenant des liaisons acide-labiles..... | 21 |
| 2.4.1.2. NVs à base de matériaux ionisables | 23 |
| 2.4.1.3. NVs producteurs de CO ₂ | 28 |
| 2.5. CRITERES POUR LA CONCEPTION D'UN NANOVECTEUR..... | 28 |
| 2.5.1. Devenir de nanovecteurs <i>in vivo</i> après administration par voie intraveineuse | 29 |
| 2.5.2. Propriétés d'un nanovecteur pour un ciblage passif..... | 29 |
| 2.5.3. Cahier de charges | 32 |
| 2.6. NANOCAPSULES ET THERAPIE CANCEREUSE | 32 |
| 3. FABRICATION DE NANOCAPSULES A CŒUR LIQUIDE | 39 |
| 3.1. METHODES | 39 |
| 3.1.1. Ségrégation de phases | 40 |
| 3.1.2. Utilisation de templates | 41 |
| 3.1.3. Reactions interfaciales..... | 42 |
| 3.2. POLYMERISATION EN MINIEMULSION..... | 44 |
| 3.2.1. Principe..... | 44 |
| 3.2.2. Problèmes de contrôle de la morphologie des objets | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.3. Tensioactifs réactifs..... | 49 |
| 4. POLYMERISATIONS RADICALAIRES PAR DESACTIVATION REVERSIBLE (PRDR)..... | 62 |
| 4.1. PRINCIPE | 62 |
| 4.2. POLYMERISATION RADICALEE CONTROLEE PAR TRANSFERT D'ATOME (ATRP)..... | 64 |
| 4.3. POLYMERISATION RAFT | 65 |
| 4.3.1. Principe..... | 65 |
| 4.3.2. Critères pour la sélection de l'agent RAFT (CTA). | 67 |
| 4.3.3. Aspects cinétiques | 69 |
| 4.3.3.1. Constantes de transfert | 69 |
| 4.3.3.2. Masses molaires moyennes en nombre | 71 |
| 4.3.3.3. Effets de l'agent RAFT sur la cinétique de polymérisation | 73 |
| 4.3.4. Polymérisation RAFT en milieu hétérogène | 75 |
| 4.3.4.1. Polymérisation en émulsion | 75 |
| 4.3.4.2. Polymérisation en miniémulsion | 77 |
| 5. CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 80 |
| 6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 82 |

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|---|-----------|
| OBJECTIFS ET STRATEGIE DE SYNTHESE | 99 |
|---|-----------|

CHAPITRE I : *Modifications du dextrane : synthèse du transurf*

| | |
|---|------------|
| 1. SYNTHESE DES DERIVES DU DEXTRANE | 107 |
| 1.1. GENERALITES SUR LE DEXTRANE | 107 |
| 1.2. LES DERIVES AMPHIPHILES DexN ₃ : INTRODUCTION DES GROUPEMENTS HYDROPHOBES..... | 109 |
| 1.2.1. Estimation du taux de modification par RMN ¹ H..... | 110 |
| 1.3. LES DERIVES REACTIFS DexN ₃ CTA : INTRODUCTION DES GROUPEMENTS AGENT DE TRANSFERT RAFT..... | 111 |
| 1.3.1. Choix des groupements agent de transfert RAFT..... | 112 |
| 1.3.2. Choix des conditions opératoires..... | 116 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 1.3.3. | Estimation du taux de modification par RMN ¹ H | 118 |
| 1.3.4. | Influence des conditions sur le taux de modification | 119 |
| 2. | CARACTERISATION DES DERIVES DU DEXTRANE | 123 |
| 2.1. | CARACTERISATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (SEC) | 123 |
| 2.2. | ETUDE DES PROPRIETES TENSIOACTIVES DES DERIVES DexN _{3-τ} ET DexN _{3-τ} CTAy | 124 |
| 3. | CONCLUSIONS DU CHAPITRE | 127 |
| 4. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 128 |

CHAPITRE II : Polymérisation du MMA en miniémulsion à partir du transurf

| | | |
|-----------|---|------------|
| 1. | SELECTION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR LA POLYMERISATION RAFT DU MMA EN MINIEMULSION | 133 |
| 1.1. | FORMULATION ENVISAGEE..... | 133 |
| 1.2. | ETAPES DU PROCEDE DE POLYMERISATION | 136 |
| 1.3. | CHOIX DU M810 COMME AGENT HYDROPHOBE ET CŒUR HUILEUX DES NCS... .. | 137 |
| 1.3.1. | Admissibilité pour une application biomédicale | 137 |
| 1.3.2. | Rôle du M810 comme agent hydrophobe..... | 138 |
| 1.3.2.1. | Etude de la stabilité de la miniémulsion | 138 |
| 1.3.2.2. | Influence de la quantité de DexN _{3-τ} sur le diamètre des nanogouttelettes. | 140 |
| 1.3.3. | Possibilité d'obtention d'une morphologie cœur-écorce : Rôle du M810 comme cœur huileux de la NC..... | 143 |
| 2. | POLYMÉRISATION DU MMA AVEC LE SYSTÈME MODELE DexN_{3-τ}/CPDB.. | 146 |
| 2.1. | POLYMERISATION RAFT DU MMA EN PRESENCE DU CPDB : ETAT DE L'ART | 146 |
| 2.1.1. | Polymérisations en masse, solution et suspension..... | 147 |
| 2.1.2. | Polymérisations en émulsion et miniémulsion | 148 |
| 2.1.3. | Conclusion..... | 150 |
| 2.2. | MISE AU POINT DES CONDITIONS DE POLYMERISATION..... | 151 |
| 2.2.1. | Influence de la température | 152 |
| 2.2.2. | Influence de la concentration en CPDB | 157 |
| 2.2.3. | Influence de la teneur en M810 | 162 |
| 3. | POLYMÉRISATION RAFT DU MMA EN MINIÉMULSION À PARTIR DES TRANSURFS DÉRIVÉS DU DEXTRANE..... | 165 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.1. | ETUDE CINETIQUE..... | 165 |
| 3.2. | VERIFICATION DE LA CROISSANCE DES GREFFONS A PARTIR DES TRANSURFS..... | 170 |
| 3.2.1. | RMN ¹ H..... | 170 |
| 3.2.2. | RMN 2D DOSY ¹ H..... | 171 |
| 3.2.3. | SEC-MALLS..... | 173 |
| 3.3. | ANALYSE DES GREFFONS PMMA | 176 |
| 3.3.1. | Analyse SEC-MALLS des greffons | 177 |
| 3.3.2. | Efficacité moyenne des groupements réactifs CTA | 179 |
| 4. | CONCLUSIONS DU CHAPITRE | 186 |
| 5. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 189 |

CHAPITRE III : *Caractérisation des nano-objets*

| | | |
|-----------|---|------------|
| 1. | RAPPEL DES OBJETS ÉTUDIÉS..... | 193 |
| 2. | STABILITÉ COLLOÏDALE DES OBJETS LORS DE LEUR STOCKAGE | 195 |
| 2.1. | EN SUSPENSION COLLOÏDALE | 195 |
| 2.2. | A L'ETAT SOLIDE | 196 |
| 3. | CARACTÉRISATION DE LA COURONNE DE DEXTRANE EN SURFACE DES NCS..... | 197 |
| 3.1. | POTENTIEL ZETA ET MISE EN EVIDENCE DU RECOUVREMENT HYDROPHILE EN DEXTRANE..... | 197 |
| 3.2. | DETERMINATION DE L'ÉPAISSEUR DE LA COURONNE DE DEXTRANE ET DU TAUX DE RECOUVREMENT | 203 |
| 4. | STABILITE COLLOIDALE DE NANO-OBJETS..... | 206 |
| 4.1. | STABILITE COLLOÏDALE EN FONCTION DE LA FORCE IONIQUE. | 207 |
| 4.2. | STABILITE DE LA COURONNE DE DEXTRANE EN PRESENCE DU SDS. | 209 |
| 5. | MORPHOLOGIE DES NANO-OBJETS | 212 |
| 5.1. | ANALYSE THERMIQUE (MDSC)..... | 212 |
| 5.2. | Cryo-MET | 213 |
| 6. | CONCLUSIONS DU CHAPITRE | 214 |

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....216**CHAPITRE IV : *Potentiel biomédical des nano-objets***

| | |
|--|------------|
| 1. PUBLICATION | 221 |
| 1.1. INTRODUCTION..... | 221 |
| 1.2. EXPERIMENTAL SECTION..... | 223 |
| 1.2.1. Materials and methods..... | 223 |
| 1.2.2. RAFT miniemulsion (co)polymerization | 224 |
| 1.2.3. Particle size..... | 224 |
| 1.2.4. Zeta potential measurements | 224 |
| 1.2.5. Swelling measurements | 224 |
| 1.2.6. Drug loading and in vitro release studies | 224 |
| 1.2.7. Reactivity with albumin | 225 |
| 1.2.8. Reactivity with fibrinogen..... | 225 |
| 1.2.9. Human monocytes culture..... | 225 |
| 1.2.10. Cytocompatibility of nanocapsules | 225 |
| 1.2.11. Ncs surface post-functionalization | 226 |
| 1.2.12. Characterizations | 226 |
| 1.3. RESULTS AND DISCUSSION | 227 |
| 1.3.1. RAFT miniemulsion (co)polymerization | 228 |
| 1.3.2. NCs characterization | 232 |
| 1.3.2.1. Particle size..... | 232 |
| 1.3.2.2. Dextran coverage characterization | 232 |
| 1.3.2.3. NCs colloidal stability | 233 |
| 1.3.2.4. pH-sensitivity of COPO-NCs | 233 |
| 1.3.3. Biomedical potential..... | 235 |
| 1.3.3.1. Loading and release study of a model active substance | 235 |
| 1.3.3.2. Interaction with blood proteins..... | 238 |
| 1.3.3.3. NCs cytotoxicity..... | 238 |
| 1.3.3.4. NCs surface labeling..... | 239 |
| 1.4. CONCLUSIONS | 241 |
| 2. SUPPORTING INFORMATION..... | 243 |
| 3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE | 249 |
| 4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 252 |

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 257

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

1. MATERIELS 265

2. MODIFICATION CHIMIQUE DU DEXTRANE 266

2.1. SYNTHÈSE DES DERIVES DexN₃-τ 266

2.1.1. Synthèse de l'acide 6-azidohéxanoïque..... 266

2.1.2. Synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohéxanoïque..... 268

2.1.3. Réaction du dextrane avec l'acide 6-azidohéxanoïque activé 269

2.2. SYNTHÈSE DES MACROAGENTS RAFT DexN₃-τCTAγ 269

3. ELABORATION DES NANO-OBJETS 270

3.1. PAR POLYMERISATION RAFT DU MMA EN MINIEMULSION 270

3.1.1. En présence du système modèle DexN₃-τ/CPDB 270

3.1.2. En présence des transurfs DexN₃-τCTAγ 271

3.2. PAR COPOLYMERISATION RAFT DU MMA ET DU DEAEMA. 271

3.3. PAR EMULSION-EVAPORATION DU SOLVANT..... 272

4. ETUDE DES GREFFONS PMMA : ETAPE DE DEGREFFAGE 272

5. CARACTERISATIONS DES POLYMERES 273

5.1. SPECTROSCOPIES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE..... 273

5.2. INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (FTIR)..... 273

5.3. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (SEC)..... 274

5.4. PROPRIETES TENSIOACTIVES DES DERIVES DU DEXTRANE..... 276

6. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES NANO-OBJETS..... 278

6.1. CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE MODULEE (MDSC)..... 278

6.2. DETERMINATION DU TAUX DE RECOUVREMENT EN DEXTRANE 279

6.2.1. Dosage direct (par RMN ¹H) 280

6.2.2. Dosage indirect à l'anthrone..... 281

6.3. DISTRIBUTION DE TAILLE DES OBJETS 282

6.3.1. Granulomètre 282

6.3.2. HPPS..... 283

| | | |
|-----------|---|------------|
| 6.4. | MESURES DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE (DETERMINATION DE L'ÉPAISSEUR DU RECOUVREMENT EN DEXTRANE) | 284 |
| 6.5. | STABILITE COLLOÏDALE EN PRESENCE DE NaCl..... | 287 |
| 6.6. | STABILITE DU RECOUVREMENT EN DEXTRANE EN PRESENCE DE SDS..... | 288 |
| 6.7. | GONFLEMENT DES NP _s pH-SENSIBLES | 289 |
| 6.8. | MORPHOLOGIE : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE TRANSMISSION (MET)..... | 289 |
| 7. | POTENTIEL DES NANO-OBJETS POUR DES APPLICATIONS BIOMEDICALES | 290 |
| 7.1. | ENCAPSULATION ET CINETIQUE DE LIBERATION DE LA COUMARINE 1..... | 290 |
| 7.1.1. | Milieux de libération | 290 |
| 7.1.2. | Détermination de la masse de Cou1 encapsulée..... | 290 |
| 7.1.3. | Protocole de libération de la Cou1 à partir de NCs à écorce PMMA..... | 292 |
| 7.1.4. | Dosage de la Cou1 par fluorimétrie..... | 293 |
| 7.1.5. | Libération de la Cou1 à partir de NPs à écorce pH sensible | 295 |
| 7.2. | INTERACTIONS AVEC LES MILIEUX BIOLOGIQUES | 296 |
| 7.2.1. | Dosage BSA | 296 |
| 7.2.2. | Dosage fibrinogène..... | 297 |
| 7.2.3. | Interaction avec les cellules immunocompétentes monocytes sanguins humains (THP-1)..... | 298 |
| 7.3. | POST-FONCTIONNALISATION DES NC _s PAR UNE SONDE FLUORESCENTE MODELE | 299 |
| 7.3.1. | Par Chimie « Click » en présence de cuivre..... | 299 |
| 7.3.2. | Par Chimie « Click » sans cuivre | 301 |
| 8. | REFERENCES..... | 303 |
| | LISTE DES TABLEAUX | 305 |
| | LISTE DES SCHEMAS | 307 |
| | LISTE DES FIGURES | 309 |

LISTE D'ABREVIATIONS

A

| | |
|----------|---|
| AA | acide acrylique |
| AGET | activateurs générés par transfert d'électrons |
| AIBN | 2,2'-azobisisobutyronitrile |
| ATR-FTIR | infrarouge à transformée de Fourier (ang. « Attenuated Total Reflection-Fourier Transformation Infra red ») |

B

| | |
|-----|--------------------------|
| BA | acrylate de butyle |
| BSA | albumine de sérum bovine |

C

| | |
|-----------|--|
| CDI | 1,1'-carbonyldiimidazole |
| COPO-NCs | nanocapsules à écorce Poly (MMA-co-DEAEMA) |
| Cou1 | 7-diéthylamino-4-méthylcoumarine |
| Cou-click | 4-carbéthoxy-7-propargyloxy-coumarine |
| CPADB | acide 4-cyano-4-(phénylcarbonothioylthio)pentanoïque |
| CPDB | dithiobenzoate de 2-cyano-2-propyle |
| Cryo-MET | Microscopie Electronique à Transmission à basse température |
| CTA | (groupement) agent RAFT (ang. « chain transfer agent ») |
| C_{tr} | constante de transfert dans le pré-équilibre de la polymérisation RAFT |
| C_{trP} | constant de transfert du macroagent RAFT lors de l'équilibre principal de la polymérisation RAFT |
| CuAAC | cycloaddition azide-alcyne catalysée par le cuivre (I) |

D

| | |
|-------------------------------|---|
| D | dispersité |
| DBCO-PEG4-TAMRA | dibenzocyclooctyne-PEG4-Fluor545 |
| DCC | <i>N, N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide |
| DCM | dichlorométhane |
| DEAEMA | méthacrylate de <i>N,N</i> -diéthylaminoéthyle |
| Dex $N_{3,\tau}$ | dextrane porteur de groupements hydrophobes |
| Dex $N_{3,\tau}$ CTA γ | dextrane porteur de groupements hydrophobes et agents de transfert RAFT |
| DMAC | diméthylacétamide |
| DMAP | 4-diméthylaminopyridine |
| DMF | diméthylformamide |

Liste d'abréviations

| | |
|--------------------|--|
| DMSO- d_6 | diméthylsulfoxyde déutééré |
| dn/dc | incrément d'indice de réfraction pour un polymère dans un solvant mL/g |
| DOX | doxorubicine |
| E | |
| EDC | hydrochlorure de <i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide |
| EE | efficacité d'encapsulation |
| EPR | Enhanced Permeability and Retention effect |
| Eff_{CTA} | efficacité des groupements CTA du transurf |
| F | |
| f | efficacité de l'amorceur |
| f_{app} | efficacité apparente du système de polymérisation |
| F_{PMMA} | fraction massique en PMMA dans un glycopolymère Dex- <i>g</i> -PMMA |
| FDA | Food and Drug Administration |
| F_{DEAEMA} | Fraction massique du DEAEMA dans le poly(MMA- <i>co</i> -DEAEMA) |
| H | |
| HD | hexadécane |
| K | |
| KPS | persulfate de potassium |
| k_{add} | constante de vitesse d'addition |
| k_d | constante de vitesse de dissociation de l'amorceur |
| k_i | constante de vitesse de réamorçage |
| k_p | constante de vitesse de propagation |
| k_{tr} | constante de vitesse de transfert de chaîne |
| k_β | constante de vitesse de fragmentation |
| M | |
| MMA | méthacrylate de méthyle |
| MDSC | calorimétrie différentielle à balayage modulée |
| MPS | système phagocytaire mononucléaire |
| \bar{M}_n | masse molaire moyenne en nombre |
| $\bar{M}_{n\ exp}$ | masse molaire moyenne en nombre expérimentale |
| $\bar{M}_{n\ th}$ | masse molaire moyenne en nombre théorique |
| \bar{M}_w | masse molaire moyenne en masse |

N

| | |
|-------|-------------------------------|
| NIPAM | <i>N</i> -isopropylacrylamide |
| NCs | nanocapsules |
| NPs | nanoparticules |
| NSs | nanosphères |
| NVs | nanovecteurs |

O

| | |
|-----|-------------------------|
| O/W | émulsion huile-dans-eau |
|-----|-------------------------|

P

| | |
|----------|---|
| PAA | poly(acide acrylique) |
| PBA | poly(acrylate de butyle) |
| PBS | tampon phosphate |
| PCL | poly(ϵ -caprolactone) |
| PDEAEMA | poly(méthacrylate de <i>N,N</i> -diéthylaminoéthyle) |
| PDFHA | poly(acrylate de dodecafluoroheptyle) |
| PDMAEMA | poly(méthacrylate de <i>N,N</i> -diméthylaminoéthyle) |
| PEG | poly(éthylène glycol) |
| PGA | poly(acide glutamique) |
| PLA | poly(acide lactique) |
| PLGA | poly(acide lactique- <i>co</i> -glycolique) |
| PMMA | poly(méthacrylate de méthyle) |
| PMMA NCs | nanocapsules à écorce PMMA |
| POE | poly(oxyde éthylène) |
| PRDR | polymérisation radicalaire par désactivation réversible |
| PS | polystyrène |

R

| | |
|--------------------|--|
| RAFT | polymérisation par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation |
| RMN ¹ H | résonance magnétique nucléaire du proton |
| R _p | vitesse de polymérisation |

S

| | |
|----|------------------|
| SA | substance active |
|----|------------------|

Liste d'abréviations

| | |
|-----------|---|
| SDS | docéyl sulfate de sodium |
| SEC-MALLS | chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière multi-angle |
| Sty | styrène |

T

| | |
|-------|------------------------------------|
| T_g | température de transition vitreuse |
| THF | tétrahydrofurane |
| THP-1 | monocytes sanguins humains |

W

| | |
|-----|-------------------------|
| W/O | émulsion eau-dans-huile |
|-----|-------------------------|

X

| | |
|-------------|---|
| \bar{X}_n | degré de polymérisation moyen en nombre |
| x | conversion en monomère |

Autres

| | |
|-----------------|---|
| % m. | pourcentage massique |
| % vol. | pourcentage volumique |
| % $PMMA_{homo}$ | proportion d'homopolymères PMMA non-accrochés au dextrane |
| Δ_{PZ} | épaisseur du recouvrement en dextrane en surface de nano-objets |
| Γ_{dex} | taux de recouvrement en dextrane |
| γ | nombre de groupements CTA introduits par 100 unités glucopyranose. |
| τ | nombre des groupements hydrophobes introduits par 100 unités glucopyranose. |
| α | ratio massique $DexN_{3.\tau}(CTA\gamma)$ /phase organique |

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

Cancer : un cancer correspond à une prolifération incontrôlée de cellules au sein de l'organisme. En se multipliant de façon anarchique, les cellules cancéreuses donnent naissance à une masse nommée tumeur qui va peu à peu envahir l'organe dans lequel elle est née, altérant son fonctionnement. Des cellules peuvent, en outre, s'échapper de cette tumeur, diffuser dans l'organisme et conduire à la formation de tumeurs secondaires. On parle alors de métastases.

Physiopathologie : Étude des troubles du fonctionnement de l'organisme ou de ses parties, au cours des maladies. La physiopathologie envisage à la fois les mécanismes physiques, cellulaires ou biochimiques qui conduisent à l'apparition d'une maladie et les conséquences de celle-ci.

Système phagocytaire mononucléaire (MPS) : Réseau de cellules disséminées dans l'organisme, caractérisées par leur activité phagocytaire, leur mobilité, leur rôle dans le déclenchement et l'entretien des réactions immunitaires. Ces cellules, d'origine médullaire (c'est-à-dire produites par la moelle osseuse), passent dans le sang (monocytes), et parviennent dans les tissus conjonctifs lâches où elles prennent le nom d'histiocytes-macrophages. Dans les alvéoles pulmonaires, elles sont nommées cellules à poussières ou macrophages alvéolaires, dans le foie on parle de cellules de Kupffer ; dans le cerveau des cellules de la microglie, dans la peau des cellules de Langerhans et dans l'os des ostéoclastes.

Phagocytose : processus cellulaire par lequel certaines cellules regroupées sous la dénomination générale de phagocytes (par exemple les cellules du MPS) peuvent ingérer des particules étrangères solides d'échelle micrométrique. Grâce à la phagocytose, les microbes et les cellules nuisibles sont détruits par les phagocytes.

Endocytose : L'endocytose est le mécanisme de transport de molécules voire de particules, vers l'intérieur de la cellule. Elle s'effectue par formation de vésicules membranaires, appelées endosomes, autour de l'élément à ingérer.

Endosome : Les endosomes (ou vésicules d'internalisation) sont de petites structures sphériques entourées d'une membrane de lipides et situées dans le cytoplasme cellulaire. Il s'agit des zones de la cellule sur lesquelles viennent s'accrocher les vésicules d'endocytose provenant de l'espace extracellulaire. En fusionnant avec ces vésicules, les endosomes vont pouvoir trier les molécules qui étaient dans ces dernières afin de les recycler, de les dégrader ou de les rediriger vers d'autres zones de la cellule.

Lysosome : le lysosome est une petite structure sphérique (une vésicule) délimitée par une membrane lipidique et située dans le cytoplasme cellulaire. La membrane contient des canaux ioniques qui permettent l'entrée active d'ions hydrogène, afin de maintenir un pH acide au sein de la vésicule lysosomale. Le lysosome a une fonction de poubelle cellulaire, où les molécules non fonctionnelles sont éliminées par digestion. Le lysosome contient des hydrolases, des enzymes destinées à la dégradation de molécules intracellulaires. Elles ne sont actives qu'à pH acide, d'où l'abaissement du pH dans cette vésicule.

Oponisation : processus biochimique par lequel une molécule (dite opsonine) recouvre la membrane d'une cellule cible (une bactérie, une cellule du corps infectée par un pathogène ou encore la surface d'un biomatériau) pour favoriser sa phagocytose par une cellule dotée de récepteurs pour les opsonines. Les opsonines les plus importantes sont les anticorps, les protéines du complément (C3a, C4a, C5a) et les lectines.

Système du complément : Le système du complément est un ensemble de 35 protéines à synthèse hépatique qui peuvent circuler dans le plasma sanguin ou servir de récepteurs membranaires sur la surface de nombreuses cellules. Ce système fait partie de l'immunité innée, c'est-à-dire qu'il n'implique pas de reconnaissance spécifique d'une cible. Le système du complément intervient dans la destruction des agents infectieux mais également dans le contrôle des réponses inflammatoires ainsi que dans la régulation des réponses immunes spécifiques.

Apoptose : l'apoptose ou mort cellulaire programmée, est le processus par lequel des cellules s'autodétruisent sous l'impulsion d'un signal. La mort cellulaire est un phénomène naturel génétiquement programmé qui permet l'élimination des cellules inutiles. Il existe un équilibre étroit entre l'apoptose et la fabrication de nouvelles cellules, ce qui permet d'éviter la prolifération cellulaire. Quand l'apoptose ne fonctionne pas, les cellules peuvent se multiplier de façon anarchique et être à l'origine d'un cancer.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

D'après l'Institut National du Cancer (INCa)¹, 385 000 nouvelles pathologies cancéreuses ont été diagnostiquées en 2015 en France métropolitaine et ont atteint 211 000 hommes et 174 000 femmes. Les cancers de la prostate, du sein, du côlon-rectum et du poumon sont les cancers les plus fréquents.

La dangerosité d'un cancer et les chances de guérison dépendent principalement du type de cancer et de son stade d'évolution. Plus un cancer est avancé, plus il est compliqué à soigner. L'ablation chirurgicale de la tumeur est la stratégie de traitement la plus utilisée mais celle-ci est souvent associée à des séances de chimiothérapie, de radiothérapie ou d'hormonothérapie. La chimiothérapie, quant à elle, consiste à l'administration d'agents chimiques, souvent par voie intraveineuse, destinées à éliminer les cellules cancéreuses soit en les détruisant directement, soit en les empêchant de se multiplier. Il s'agit d'un traitement systémique car il agit dans l'ensemble du corps et permet d'atteindre les cellules cancéreuses quel que soit l'endroit où elles se trouvent, même si elles sont isolées et non détectées lors du diagnostic. C'est pourquoi la chimiothérapie est souvent utilisée pour traiter des métastases².

Malgré la grande gamme de médicaments disponibles, l'efficacité de la plupart des agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie est limitée par leur manque de spécificité. Suite à une administration parentérale³, ces anticancéreux se distribuent en effet dans l'organisme sans

¹ L'INCa est l'agence d'expertise sanitaire et scientifique en cancérologie chargée de coordonner la lutte contre les cancers en France.

² Propagation du cancer de l'endroit où il est apparu à une autre partie du corps.

³ Administration d'un médicament qui se fait par injection (intramusculaire, intraveineuse, etc.) et non par le tube digestif (voie dite entérale).

aucune différenciation entre tissus sains et pathologiques, ce qui peut entraîner une toxicité importante et des effets secondaires. Le Tableau 1 présente les anticancéreux les plus couramment utilisés et leurs effets secondaires. Par ailleurs, plusieurs anticancéreux puissants présentent une faible solubilité en milieux aqueux, sont susceptibles de se dégrader en milieu physiologique ou sont éliminés du corps humain avant même d'atteindre l'organe ou le tissu ciblé. Il faut alors en administrer des doses importantes ou diminuer l'intervalle entre deux injections pour obtenir une action thérapeutique appropriée, ce qui augmente encore le risque d'effets indésirables.

Tableau 1 : Exemples des agents anticancéreux couramment utilisés en chimiothérapie et leurs effets secondaires. (D'après Estanqueiro M. et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015, 126, 631–648).

| Médicament | Contraintes pratiques et/ou effets secondaires |
|------------------------|---|
| Camptothécine | Faible solubilité dans l'eau. Risque d'anémie, d'alopécie, de nausées, de vomissements, de fatigue, de diarrhée et d'éruptions. |
| Doxorubicine | Effets toxiques sur les cellules à croissance rapide comme celles qui tapissent la bouche et l'intérieur des intestins et sur la moelle osseuse. Affections du cœur et du foie pour des administrations à très forte dose. |
| Cisplatine | Dose maximale tolérée limitée par néphrotoxicité (mauvais fonctionnement des reins). Risque de problèmes gastro-intestinaux ou visuels. |
| 5-Fluorouracile | Faible temps de demi-vie dans l'organisme à cause d'un métabolisme rapide. Effets toxiques sur la moelle osseuse, le foie, les tissus cardiaques et le tube digestif. |
| Paclitaxel | Réactions d'hypersensibilité sévères, de néphrotoxicité et neurotoxicité. |

Lorsqu'une substance active (SA) est incorporée au sein d'un nanovecteur (NV), sa biodistribution et son devenir *in vivo* dépendent alors des propriétés du vecteur et non plus de celles de la SA. Ainsi, des NVs peuvent être conçus de façon à s'affranchir des inconvénients intrinsèques aux SAs en les protégeant et les acheminant jusqu'au site malade. L'encapsulation des anticancéreux au sein d'un NV peut alors permettre d'augmenter leur indice thérapeutique. Ceci signifie une amélioration de leur activité biologique accompagnée d'une réduction de leur

toxicité. Ces NVs offrent également la possibilité de contrôler la dose de médicament à administrer. Comme nous l'évoquerons dans la partie bibliographique, plusieurs types de nanosystèmes ont été développés pour la thérapie du cancer. Les nanocapsules (NCs) à cœur huileux et écorce polymère sont plus particulièrement les systèmes sur lesquels porte cette thèse. Bien que plusieurs travaux de recherche fondamentale soient consacrés à la fabrication de NCs polymères à cœur liquide chargées en anticancéreux⁴, elles ne sont pas encore commercialisées, à notre connaissance.

Depuis plusieurs années, les recherches menées au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM) portent sur la fabrication de nanoparticules polymères recouvertes de polysaccharides et destinées à l'encapsulation et la libération de SAs d'intérêt pharmaceutique ou environnemental. Afin d'élargir la morphologie des nano-objets disponibles au LCPM, jusqu'à alors restreinte aux nanosphères, nous nous sommes attachés à développer dans cette thèse des NCs biocompatibles destinées à l'administration intraveineuse et permettant la libération contrôlée, idéalement ciblée, de SAs lipophiles, plus particulièrement des agents anticancéreux. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du projet ANR JCJC NANOCAPDEX.

Cette nouvelle plateforme de NCs a été élaborée grâce à l'utilisation combinée d'une polymérisation en miniémulsion, d'un tensioactif réactif et d'une technique avancée de polymérisation radicalaire par désactivation réversible (PRDR) : la polymérisation par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (polymérisation RAFT). Le tensioactif réactif est ici un dérivé amphiphile polysaccharidique qui porte, d'une part des groupements réactifs qui interviennent lors d'une polymérisation RAFT, et d'autre part, des groupements hydrophobes qui lui confèrent un caractère tensioactif et lui permettent de stabiliser une miniémulsion. L'utilisation simultanée de la polymérisation en miniémulsion et de la polymérisation RAFT doit permettre de contrôler la nature chimique et la morphologie des NCs. De plus, la présence d'un recouvrement hydrophile en polysaccharide, attaché de façon covalente à la surface des NCs, permettra idéalement d'allonger la durée de vie de ces objets dans le corps humain en limitant leur reconnaissance par le système immunitaire.

Le challenge de ce doctorat a donc tout d'abord été centré sur la synthèse du dérivé polysaccharide tensioactif réactif. L'élaboration des NCs, leurs caractérisations physico-chimiques et morphologiques et l'étude de leur potentiel biomédical a constitué la deuxième

⁴ Voir exemples des NCs conçues pour la thérapie du cancer dans la Partie I, Tableau I- 5, p. 35.

phase de ce défi. Le présent manuscrit est donc divisé en trois parties : (I) étude bibliographique, (II) résultats et discussion et (III) partie expérimentale.

La première partie est entièrement consacrée à une étude bibliographique focalisée sur deux grands thèmes : nanomédecine et thérapie du cancer et la polymérisation RAFT menée en miniémulsion. Dans un premier temps, nous décrivons les différents types de NVs et les stratégies de ciblage développées pour le traitement du cancer puis nous élaborons le cahier de charges auquel doivent répondre les NCs. Dans un deuxième temps, nous nous intéressons aux différents procédés d'élaboration de NCs à cœur liquide. Nous examinons plus en détail les polymérisations en miniémulsion confinées à l'interface liquide/liquide à l'aide de tensioactifs réactifs. Cette partie bibliographique se termine sur des généralités sur les PRDR et sur une étude approfondie de la polymérisation RAFT et sa mise en œuvre en milieu hétérogène.

Après avoir explicité la stratégie de synthèse que nous avons employée pour obtenir les NCs les résultats obtenus au cours de cette thèse sont présentés dans la deuxième partie de ce document. Ainsi, un 1^{er} chapitre expose la synthèse et la caractérisation des tensioactifs réactifs, obtenus à partir du dextrane, et utilisés à la fois comme stabilisants et comme macroagents RAFT lors de l'élaboration des NCs. Le 2^{ème} chapitre est consacré quant à lui à l'optimisation de la polymérisation RAFT en miniémulsion du méthacrylate de méthyle (MMA). Cette dernière a d'abord été réalisée en présence d'un agent RAFT modèle, puis à partir des tensioactifs réactifs. Dans le 3^{ème} chapitre, les NCs à écorce poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) obtenues sont caractérisées en termes de taille, de recouvrement en dextrane (quantité de polysaccharide, épaisseur et stabilité), de stabilité colloïdale et de morphologie. Le 4^{ème} chapitre aborde ensuite le potentiel biomédical de ces objets. L'extrapolation de la plateforme vers la fabrication de NCs à écorce pH-sensible, les études sur l'encapsulation et la libération d'une SA modèle, les premiers tests biologiques et la fonctionnalisation de la surface des NCs font l'objet de ce dernier chapitre.

Au final, une conclusion générale reprend les principaux résultats obtenus et des perspectives sont proposées. Les protocoles expérimentaux et les techniques de caractérisation utilisées lors de cette thèse sont présentés à la fin de ce manuscrit.

PARTIE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCTION..... | 5 |
| 2. NANOMEDECINE ET THERAPIE CANCEREUSE | 6 |
| 2.1. PHYSIOPATHOLOGIE DES TUMEURS SOLIDES : GENERALITES | 7 |
| 2.2. STRATEGIES DE CIBLAGE..... | 9 |
| 2.2.1. Ciblage passif | 9 |
| 2.2.2. Ciblage actif..... | 10 |
| 2.3. METHODES POUR FONCTIONNALISER LA SURFACE DES NANOVECTEURS | 12 |
| 2.3.1. La Chimie « Click »..... | 13 |
| 2.3.1.1. Cycloaddition Azoture-Alcyne catalysée par Cu(I) (CuAAC)..... | 15 |
| 2.3.1.2. Cycloaddition azide-alcyne non catalysée | 16 |
| 2.4. NANOVECTEURS STIMULI-SENSIBLES | 19 |
| 2.4.1. Les systèmes pH-sensibles | 21 |
| 2.4.1.1. NVs contenant des liaisons acide-labiles | 21 |
| 2.4.1.2. NVs à base de matériaux ionisables | 23 |
| 2.4.1.3. NVs producteurs de CO ₂ | 28 |
| 2.5. CRITERES POUR LA CONCEPTION D'UN NANOVECTEUR | 28 |
| 2.5.1. Devenir de nanovecteurs <i>in vivo</i> après administration par voie intraveineuse | 29 |
| 2.5.2. Propriétés d'un nanovecteur pour un ciblage passif | 29 |
| 2.5.3. Cahier de charges..... | 32 |
| 2.6. NANOCAPSULES ET THERAPIE CANCEREUSE | 32 |
| 3. FABRICATION DE NANOCAPSULES A CŒUR LIQUIDE..... | 39 |
| 3.1. METHODES | 39 |
| 3.1.1. Ségrégation de phases..... | 40 |
| 3.1.2. Utilisation de templates | 41 |
| 3.1.3. Réactions interfaciales | 42 |
| 3.2. POLYMERISATION EN MINIEMULSION | 44 |
| 3.2.1. Principe..... | 44 |
| 3.2.2. Problèmes de contrôle de la morphologie des objets..... | 46 |
| 3.2.3. Tensioactifs réactifs..... | 49 |
| 4. POLYMERISATIONS RADICALAIRES PAR DESACTIVATION REVERSIBLE (PRDR) | 62 |
| 4.1. PRINCIPE | 62 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2. | POLYMERISATION RADICALEIRE CONTROLEE PAR TRANSFERT D'ATOME (ATRP)..... | 64 |
| 4.3. | POLYMERISATION RAFT | 65 |
| 4.3.1. | Principe | 65 |
| 4.3.2. | Critères pour la sélection de l'agent RAFT (CTA)..... | 67 |
| 4.3.3. | Aspects cinétiques..... | 69 |
| 4.3.3.1. | Constantes de transfert..... | 69 |
| 4.3.3.2. | Masses molaires moyennes en nombre | 71 |
| 4.3.3.3. | Effets de l'agent RAFT sur la cinétique de polymérisation | 73 |
| 4.3.4. | Polymérisation RAFT en milieu hétérogène..... | 75 |
| 4.3.4.1. | Polymérisation en émulsion..... | 75 |
| 4.3.4.2. | Polymérisation en miniémulsion..... | 77 |
| 5. | CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE | 80 |
| 6. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 82 |

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION

Les recherches visant à développer des nouveaux nanovecteurs pour le diagnostic et/ou le traitement de la maladie du cancer ont connu un grand essor ces dernières décennies. De par leur faible taille et leur propriétés physico-chimiques uniques, ces nanovecteurs peuvent potentiellement améliorer l'efficacité thérapeutique des anticancéreux, voire assurer un adressage sélectif de ces molécules vers les tissus malades. La première partie de ce chapitre bibliographique a pour objectif de réaliser un tour d'horizon sur le rôle de la nanomédecine dans la thérapie du cancer. Les différentes stratégies développées pour cibler les tissus cancéreux et obtenir une libération locale des substances actives (SAs) en réponse à des stimuli internes (physiologiques) ou externes seront évoquées. Ensuite, le cahier des charges pour la conception d'un vecteur pharmaceutique destiné à l'administration intraveineuse d'anticancéreux sera établi. Finalement, quelques exemples de nanocapsules (NCs) à écorce polymère et cœur liquide conçues pour la vectorisation d'anticancéreux seront décrits.

Dans une deuxième partie, les différents procédés d'élaboration des NCs seront abordés. Parmi ces procédés, la polymérisation en miniémulsion sera étudiée en détail, notamment l'utilisation de tensioactifs réactifs pour réaliser des polymérisations radicalaires par désactivation réversible (PRDR) de type ATRP ou RAFT à partir de l'interface liquide/liquide.

Enfin, dans une troisième et dernière partie, nous présenterons des généralités sur les PRC. La polymérisation RAFT sera ensuite approfondie avec une attention particulière pour son application en milieu dispersé.

Afin de faciliter la lecture de ce chapitre, un glossaire de termes médicaux et pharmaceutiques est donné en début de thèse.

2. NANOMEDECINE ET THERAPIE CANCEREUSE

La **nanomédecine** concerne l'application des nanotechnologies dans le domaine biomédical. Cette discipline, qui exploite les propriétés physiques, chimiques et biologiques des matériaux à l'échelle nanométrique (gamme de dimensions s'étendant approximativement de 1 nm à 100 nm⁵), ouvre des nouvelles perspectives pour la détection et le traitement de nombreuses pathologies. Dans ce contexte, la conception de vecteurs de taille nanométrique⁶ capables de **protéger** une SA de la dégradation *in vivo*, de l'**adresser** sélectivement vers le tissu ou la cellule cible et d'en **contrôler la libération** est devenue un sujet de recherche de plus en plus développé [1]–[4].

La cancérologie est de loin le domaine médical dans lequel le plus d'efforts sont investis en nanomédecine. Il existe actuellement une cinquantaine de nanovecteurs (NVs) approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA)⁷ [5]–[7] et environ 1600 ont été enregistrés pour des essais cliniques humains en 2014 [6]. Ces NVs, qui diffèrent de par leur composition chimique et leur structure, incluent des virus modifiés (vecteurs viraux) ; des conjugués du médicament avec des polymères ou d'anticorps ; des vecteurs à base de lipides ; des vecteurs à base de polymères et des particules inorganiques [4], [6], [8]. La Figure I- 1 en donne quelques exemples.

Dans ce qui suit, nous décrirons brièvement les particularités des pathologies du cancer. Ensuite, nous montrons la façon dans laquelle ces spécificités sont exploitées pour la construction des

⁵ D'après la norme ISO TS 27687, qui donne la liste des termes et définitions concernant les particules appartenant au domaine des nanotechnologies.

⁶ Selon la norme ISO TS 27687, un vecteur de taille nanométrique (ou nanovecteur) peut être défini comme un matériau ayant une, deux ou les trois dimensions externes à l'échelle nanométrique (inférieures à 100 nm), ou un objet de plus grand taille contenant des charges à l'échelle nanométrique.

⁷ Service du gouvernement américain responsable de la pharmacovigilance, c'est-à-dire chargé des études, du contrôle et de la réglementation des médicaments avant et après leur commercialisation.

différents types de NVs cités précédemment. Comme nous nous sommes intéressés à l'élaboration de NCs nous aborderons également les particularités spécifiques à ce type de NVs.

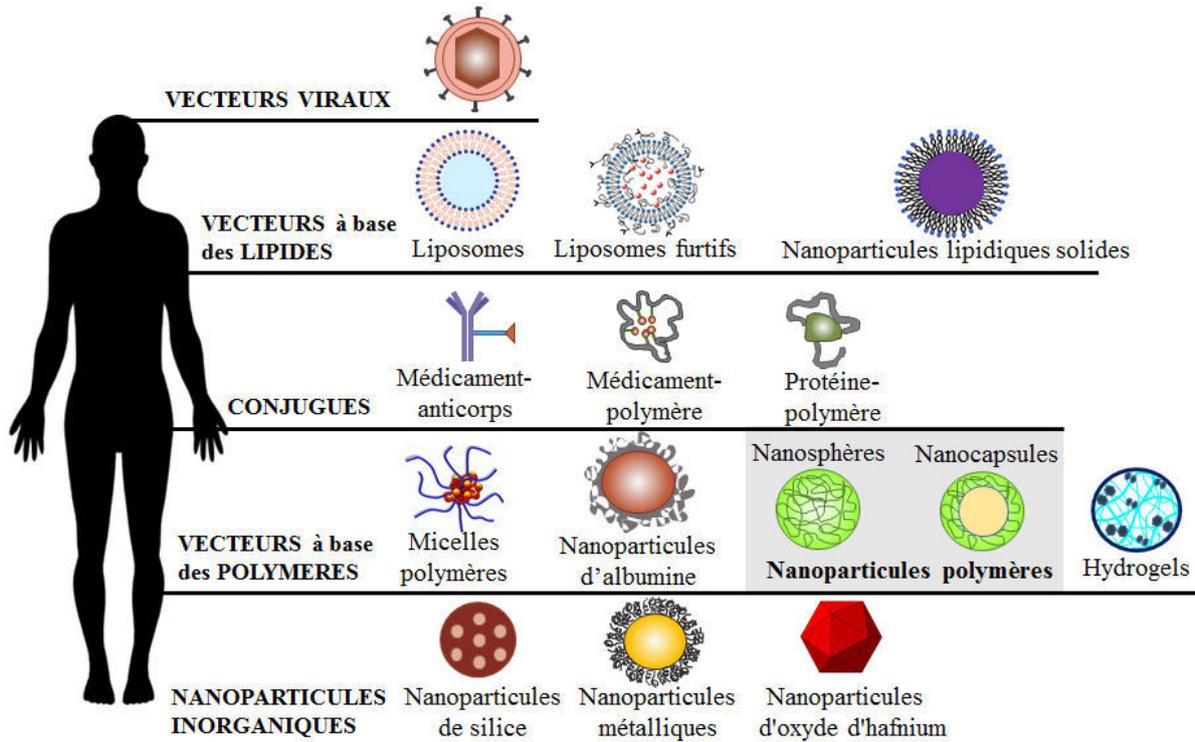


Figure I- 1: Types de NVs disponibles pour la thérapie cancéreuse. Inspirée de [6].

2.1. PHYSIOPATHOLOGIE DES TUMEURS SOLIDES : GENERALITES

La majorité des cancers se développent sous la forme de tumeurs solides constituées de deux parties distinctes : i) les cellules tumorales ou cellules prolifératives anormales et ii) un tissu de soutien non-tumoral, appelé stroma, qui assure les apports nutritifs [9], [10]. Ce dernier comprend le tissu conjonctif, les vaisseaux, les leucocytes et la matrice extracellulaire dans laquelle se situe la vascularisation de la tumeur (Figure I- 2).

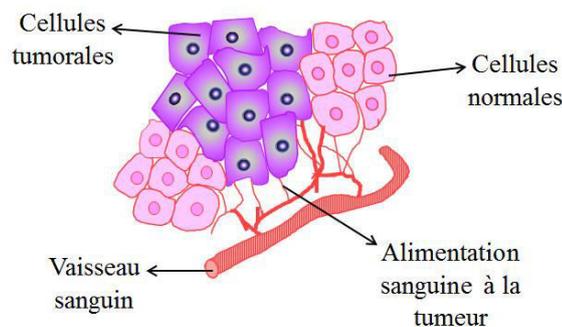


Figure I- 2 : Structure simplifiée d'une tumeur cancéreuse.

Les cellules tumorales, ainsi que leur microenvironnement (stroma), présentent plusieurs anomalies par rapport aux tissus sains :

- Lorsque la taille de la tumeur est inférieure à 1-2 mm³, l'approvisionnement en oxygène et nutriments se fait par simple diffusion de ces molécules à partir des vaisseaux environnants [11]. Cependant, au-delà de cette taille, ce mécanisme devient insuffisant. Les cellules tumorales déclenchent alors l'angiogenèse qui consiste à former de nouveaux vaisseaux sanguins capables d'irriguer et alimenter la tumeur. Le réseau vasculaire ainsi formé présente cependant beaucoup d'anomalies architecturales et fonctionnelles comme par exemple des dilatations et/ou rétrécissements du diamètre vasculaire normal [12]. Ceci engendre une perméabilité des vaisseaux tumoraux accrue. Les tissus tumoraux possèdent également un drainage lymphatique insuffisant par comparaison avec les tissus sains. La combinaison de ce faible drainage avec l'augmentation de la perméabilité vasculaire provoque *in fine* une rétention préférentielle de certaines macromolécules et d'objets de taille suffisamment petite (voir Paragraphe 2.2.1) dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet EPR qui signifie en anglais « Enhanced Permeability and Retention effect » [13], [14].
- Les tumeurs cancéreuses se caractérisent par des zones présentant des niveaux d'oxygène inférieurs par rapport aux tissus normaux. Ce phénomène est appelé hypoxie [15], [16]. Cette condition physiopathologique induit des modifications du métabolisme des tumeurs. En conséquence, les zones hypoxiques constituent un environnement fortement réducteur en raison d'une présence importante des enzymes bioréductrices à un ou deux électrons (comme la reductase) et d'autres agents réducteurs tels que le glutathion [17], [18].
- En raison d'un taux de glycolyse aérobie et anaérobie élevé, le pH extracellulaire de plusieurs types de tumeurs est inférieur (environ 6,8) à celui des tissus normaux (pH = 7,4) [19], [20].
- La croissance accélérée de la tumeur demande une quantité importante de vitamines, oligo-éléments et nutriments. Ainsi, les cellules cancéreuses présentent à leur surface des récepteurs spécifiques surexprimés facilitant l'assimilation de ces substances qui leur sont essentielles [21]. Par ailleurs, certaines enzymes de type protéase, glucuronidase ou carboxylestérase s'expriment préférentiellement dans les tissus cancéreux [6].

Ces spécificités des tumeurs sont déjà exploitées dans le but de produire des nanovecteurs capables de différencier les tissus sains des tissus malades et de permettre ainsi une libération contrôlée et ciblée des anticancéreux couramment utilisés en chimiothérapie au voisinage des cellules ciblées. Nous décrivons ci-dessous les différentes stratégies de ciblage mises en place dans le cas d'une administration par voie intraveineuse.

2.2. STRATEGIES DE CIBLAGE

2.2.1. Ciblage passif

La plupart des nanomédicaments disponibles commercialement sont basés sur un ciblage passif des cellules cancéreuses. On peut citer par exemple des liposomes chargés en doxorubicine (Doxil[®]/Caelyx[®]) [22] ou des nanoparticules d'albumine contenant du paclitaxel (Abraxane[®]) [23]. L'accumulation de ces vecteurs au sein de tumeurs est assurée par la perméabilité accrue des vaisseaux sanguins grâce à l'effet EPR (Figure I- 3) [6]. Après infiltration dans les vaisseaux, les NVs doivent diffuser vers les cellules cancéreuses pour pouvoir y libérer la SA encapsulée et induire leur mort. La libération de la SA peut avoir lieu par simple diffusion hors du nanovecteur ou être déclenchée par un stimulus interne ou externe (voir Paragraphe 2.4).

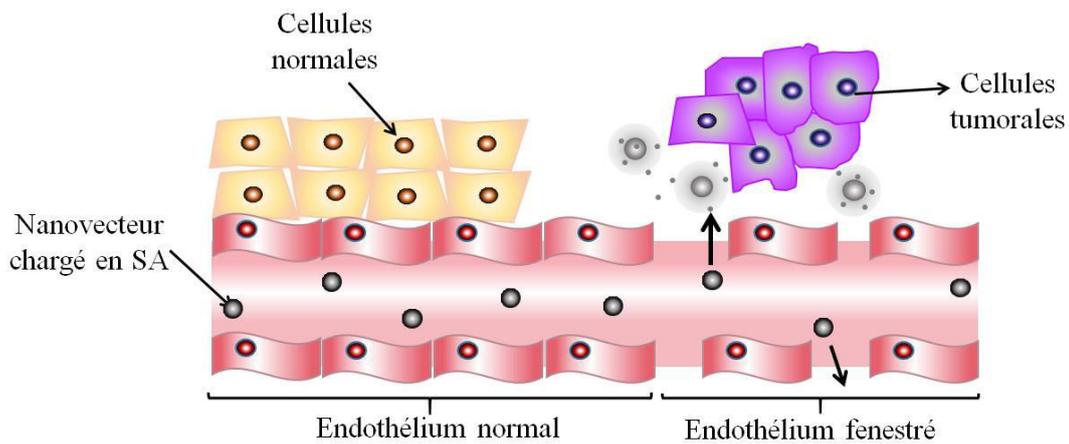


Figure I- 3: Ciblage passif des cellules cancéreuses grâce à l'effet EPR.

De façon générale, les vecteurs ayant un diamètre inférieur à 200 nm sont accumulés sélectivement dans certaines tumeurs par l'effet EPR (par exemple le sarcome de Kaposi) [3], [11], alors que seulement ceux avec une taille d'environ 30 nm sont capables de pénétrer les tumeurs à faible perméabilité (comme la tumeur du pancréas) [24]. Le ciblage passif via l'effet

EPR n'est ainsi exploitable que pour certains types de cancer. De plus, cette stratégie ne permet pas de limiter l'accumulation des vecteurs dans d'autres organes ayant un endothélium fenestré (par exemple le foie et la rate) [25]. Ainsi, les scientifiques ont trouvé intéressant de développer des systèmes permettant de favoriser un ciblage spécifique.

2.2.2. Ciblage actif

Dans ce cas, il s'agit de modifier la surface des NVs pour y introduire des éléments de reconnaissance ou ligands capables d'interagir de manière spécifique avec les récepteurs surexprimés par les cellules cancéreuses (Figure I- 4) [26], [27]. Plusieurs molécules telles que l'acide folique et certains carbohydrates; ou des macromolécules telles que des peptides, des protéines, des anticorps et des oligonucléotides ont été utilisées dans ce but [28]. Le Tableau I- 1 en donne quelques exemples, néanmoins aucun des vecteurs à ciblage actif ainsi décrit n'est encore disponible sur le marché [29].

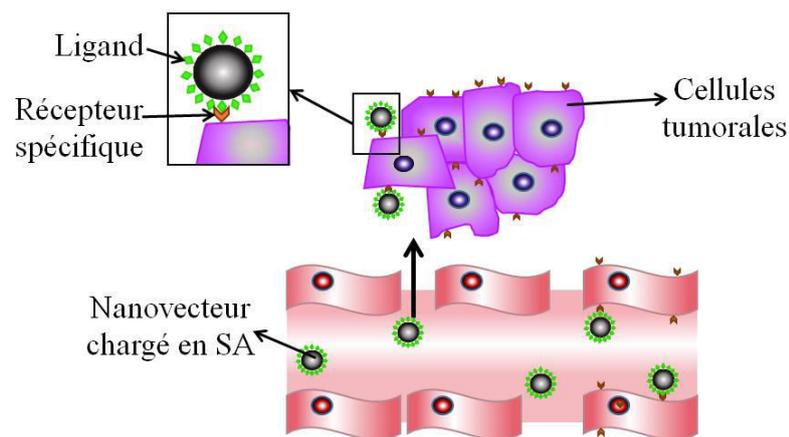


Figure I- 4 : Ciblage actif des cellules cancéreuses.

Les objectifs de base du ciblage actif sont : i) de permettre une reconnaissance spécifique des cellules cancéreuses, ii) de favoriser l'endocytose des NVs par les cellules cancéreuses, iii) de limiter la déposition non-spécifique des NVs à proximité des cellules saines (non-ciblées) et iv) d'augmenter la concentration en SA au voisinage de la tumeur avant sa dilution dans le flux sanguin et/ou son élimination par clairance rénale [30].

Avec ces objectifs, il est ainsi possible de cibler, par exemple, le réseau vasculaire de la tumeur pour y favoriser l'accumulation des NVs. La SA, libérée au voisinage du tissu cancéreux, peut ensuite traverser la membrane cellulaire via un mécanisme de diffusion passive [31], [32]. Une

Tableau I- 1 : Ligands de ciblage et cibles moléculaires respectives utilisées dans la formulation de NVs à ciblage actif [28].

| Type de ligand | Ligand de ciblage | Cibles moléculaires en surface | Cellules ciblées | Ref. |
|----------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--|------|
| Anticorps | mAb anti HER2 | HER2 | Cancer du sein | [33] |
| | mAb anti VEGF | VEGF | Angiogenèse tumorale | [34] |
| Aptamères | Aptamère dirigé contre la E-sélectine | E-sélectine | Tissu vasculaire enflammé des tumeurs en état avancé | [35] |
| | Aptamère dirigé contre nucléoline | Nucléoline | Cancer du sein | [36] |
| Protéines | Transferrine | Récepteur de la transferrine | Cellules cancéreuses | [37] |
| | EGF | Récepteur de l'EGF | | [38] |
| Peptides | Peptide RGD | Intégrine $\alpha V\beta 3$ | Système vasculaire de la tumeur | [39] |
| | Octréotide | SSTR2 | Cancer de l'ovaire | [40] |
| | ATWLPPR | Neuropiline 1 | Néovaisseaux | [41] |
| Carbohydrates | Galactose | ASGPR | Hépatocytes | [42] |
| Vitamines | Acide folique | Récepteur folate | Cellules cancéreuses | [43] |

autre stratégie consiste à favoriser une endocytose sélective des NVs. Dans ce cas, les ligands présents à la surface des vecteurs doivent pouvoir se fixer sur un récepteur membranaire à la surface des cellules malades. La libération de la SA se fait alors au niveau intracellulaire, une fois que les NVs sont internalisés [21].

2.3. METHODES POUR FONCTIONNALISER LA SURFACE DES NANOVECTEURS

Deux approches peuvent être utilisées pour l'introduction de ligands à la surface des NVs :

- L'adsorption physique du ligand via la formation de complexes de forte affinité. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'interaction avidine/biotine, l'une des plus fortes interactions non-covalentes protéine-ligand existantes dans la nature [44]. La fabrication d'un vecteur recouvert d'avidine peut permettre par la suite d'incorporer des ligands biotinylés (ligands marqués à la biotine) [45]. Les interactions vancomycine/D-Ala-D-Ala [46] et adamantane/cyclodextrine [47] sont également employées.
- Le greffage covalent du ligand avant ou après fabrication du vecteur (Figure I- 5) [48]–[51]. Cette stratégie reste la plus utilisée car elle permet un contrôle plus précis de l'orientation des ligands et de leur densité surfacique [52]. L'ancrage chimique du ligand à la surface permet également d'assurer une liaison ligand-nanovecteur plus stable en milieu physiologique [27].

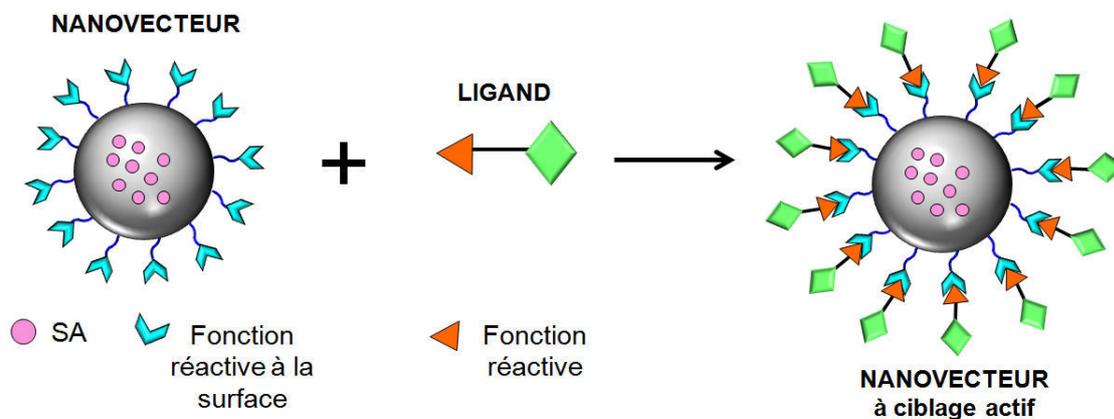


Figure I- 5: Introduction de ligands à la surface d'un nanovecteur par couplage covalent.

Etant donné que la plupart de ligands (anticorps, fragments d'anticorps, peptides, protéines...) sont des composés à base d'acides aminés, une première approche consiste à les attacher aux NVs via leurs fonctions chimiques naturelles (-NH₂, -COOH, -SH, -OH). Ceci est possible par la formation des liaisons de type thiol-maléimide, amide, disulfure ou thioester [53], [54]. Bien qu'aucune modification préalable du ligand n'est nécessaire dans ce cas, l'inconvénient principal de cette méthode repose sur l'hétérogénéité des produits obtenus en raison d'un nombre non-contrôlé de liaisons ligand-nanovecteur, ce qui complique leur caractérisation [27], [55]. Une

façon de contourner cette problématique consiste à modifier le ligand pour lui introduire d'autres fonctions réactives (non-naturelles) capables d'intervenir dans des réactions de conjugaison spécifiques avec la surface du NV. C'est d'ailleurs ce que nous avons testé dans le cadre d'une précédente thèse [41]. Dans la suite de ce paragraphe sont présentées les réactions de couplage par Chimie « Click ». Ces réactions sont effectivement largement utilisées en biologie et dans le domaine de la santé, mais aussi en ingénierie macromoléculaire en raison de leur sélectivité, leurs forts rendements et leurs conditions expérimentales simples.

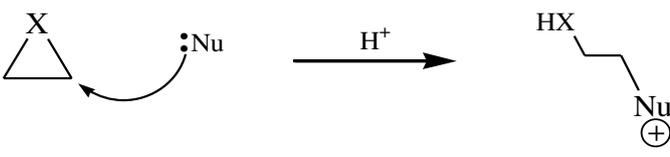
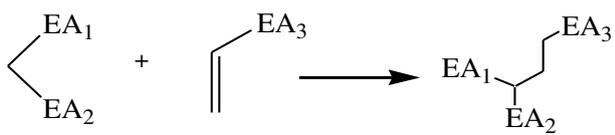
2.3.1. La Chimie « Click »

La Chimie « Click » est un concept introduit par Sharpless et al. en 2001 [56]. Inspiré des réactions ayant lieu dans la nature, il regroupe un certain nombre de transformations chimiques permettant la synthèse rapide et efficace de diverses molécules par assemblage de petites unités entre elles via des liaisons carbone-carbone (C-C) ou hétéroatomiques (C-X-C). Les réactions chimiques doivent remplir un certain nombre de critères pour être considérées comme Chimie « Click » : rendement élevé, utilisation de solvants non toxiques et de réactifs facilement disponibles, stéréospécificité, facilité de mise en œuvre, obtention de sous-produits inoffensifs et facilement éliminables (absence d'utilisation de techniques de chromatographie pour la séparation) et des produits stables dans des conditions physiologiques.

D'après Sharpless, plusieurs familles de réactions peuvent être considérées dans la notion de Chimie « Click » (Tableau I- 2) :

- Les cycloadditions d'espèces insaturées, en particulier les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaires et les réactions Diels-Alder.
- Certaines réactions de substitution nucléophiles. Par exemple les réactions d'ouverture d'hétérocycles tendus tels que les époxydes, aziridines, ions aziridium et ions épisulfonium.
- Les réactions faisant intervenir des fonctions carbonyle (type "non-aldol"). Nous pouvons citer la formation d'urées, de thiourées, d'hétérocycles aromatiques, d'éthers d'oximes, d'hydrazones et d'amides.
- Les réactions d'addition sur des doubles liaisons carbone-carbone telles que l'époxydation, la dihydroxylation, l'aziridination, mais aussi certaines réactions d'addition de Michaël.

Tableau I- 2: Exemples de réactions de Chimie « Click » [57].

| Type | Exemples |
|--|--|
| Cycloadditions | $R-N_3 + R'-C\equiv C \xrightarrow{Cu(I)} R-N=N-N=C(R')$ <p>(Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire Azoture/Alcyne)</p> |
| Substitutions nucléophiles |  <p>X = O, NR, ⁺SR, ⁺NR₂ Nu = Nucléophile</p> <p>(Ouvertures de cycle)</p> |
| Chimie de carbonyles type "non-aldol" | $R_1-C(=O)-R_2 \xrightarrow{R_3X-NH_2} R_1-C(=N-XR_3)-R_2 + H_2O$ <p>(Formation d'hydrazones/ d'éthers d'oximes)</p> <hr/> $R_1-C(=O)-R_2 \xrightarrow{R_3-NH_2} R_1-C(=O)-N(H)-R_3 + HR_2$ <p>(Formation d'amides)</p> |
| Réactions d'addition sur des doubles liaisons carbone-carbone | $R_1-C=C-R_2 \xrightarrow{[X]} \begin{matrix} X \\ / \quad \backslash \\ R_1 \quad R_2 \end{matrix} + \text{Sous-produit}$ <p>X = O, NR, ⁺SR, ⁺NR₂</p> <p>(Formation de cycles à trois atomes)</p> <hr/>  <p>EA = Groupement électroattracteur</p> <p>(Réactions d'addition de Michaël)</p> |

Parmi ces réactions, nous nous sommes particulièrement intéressés aux cycloadditions dipolaires entre un azoture et un alcyne que ce soit en présence ou en absence de catalyseurs de cuivre.

2.3.1.1. Cycloaddition Azoture-Alcyne catalysée par Cu(I) (CuAAC)

La cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne fut décrite pour la première fois par Michael en 1893 [58], puis étudiée en profondeur par Huisgen au milieu du 20^{ème} siècle [59]. Cette réaction, à forte énergie d'activation, n'était alors possible qu'à de hautes températures et conduisait à un mélange de triazoles 1,4 et 1,5-disubstitués (Schéma I- 1).

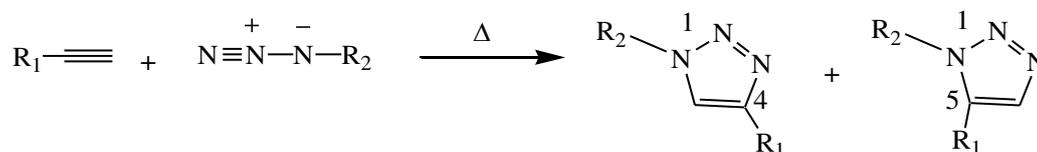


Schéma I- 1: Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire Azoture/Alcyne développée par Huisgen.

En 2002, les équipes de Sharpless [60] et Meldal [61] ont découvert parallèlement que l'utilisation de sels de cuivre (I) permettait de catalyser la réaction de cycloaddition azoture/alcyne à température ambiante, d'accélérer la vitesse de réaction mais aussi de favoriser l'obtention de triazoles (1,4) régio-sélectifs. Cette variante de la réaction de Huisgen a été nommée CuAAC (Cu(I)-catalyzed Azide-Alkyne 1,3-dipolar Cycloaddition) et est vite devenue un outil de base dans des divers domaines tels que la biologie, la chimie organique et la chimie de matériaux [62]–[64].

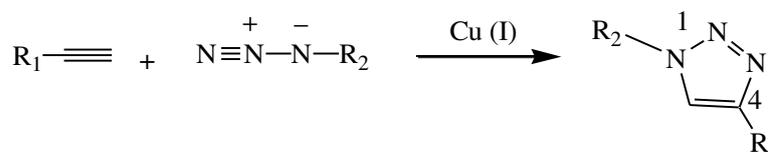


Schéma I- 2: Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire Azoture/Alcyne catalysée par le Cu(I).

Les sels de Cu(I) peuvent être soit directement introduits dans le milieu réactionnel (par exemple, CuBr), soit générés *in situ* par la réduction de sels cuivriques (par exemple CuSO₄.5H₂O associé à un agent réducteur tel que l'acide ascorbique ou l'ascorbate de sodium) [62], [65]. Afin d'assurer le bon déroulement de la réaction, il est nécessaire de stabiliser l'état d'oxydation (I) du catalyseur Cu(I) afin d'éviter des réactions secondaires. Ainsi, pour limiter l'oxydation spontanée du Cu(I) en Cu(II) par l'oxygène atmosphérique, un agent réducteur peut

être utilisé en excès et la réaction est souvent menée sous atmosphère inerte. De plus, des agents chélateurs, tels que la tris-(benzyltriazolylmethyl)amine (TBTA) sont souvent ajoutés au milieu réactionnel pour garder le cuivre dans l'état d'oxydation désiré (I).

La CuAAC a été largement employée pour le développement de bibliothèques de petites molécules d'intérêt thérapeutique, la création de nouveaux assemblages supramoléculaires tels que des polymères ou des dendrimères, le marquage sélectif de molécules biologiques sur des cellules fixées et l'introduction de ligands de ciblage à la surface de NVs [26], [41], [57], [66], [67]. Les fonctions azoture sont en effet les marqueurs chimiques les plus utilisés du fait de leur petite taille, leur stabilité métabolique et leur caractère inerte vis-à-vis les fonctions naturelles présentes dans les systèmes biologiques [68]. Toutefois, l'application de la CuAAC dans des organismes vivants reste limitée à cause de la nature cytotoxique du catalyseur cuivreux [66], [68], [69]. C'est pourquoi de nombreux efforts ont été déployés au cours des dernières années afin de s'affranchir de l'utilisation du Cu(I).

2.3.1.2. Cycloaddition azide-alcyne non catalysée

Bertozzi et ses collaborateurs [70]–[74] ont été des pionniers dans le développement d'alcynes activés capables de réagir avec des azotures sans besoin de catalyseur cuivreux. Ils ont montré que lorsque la fonction alcyne est insérée dans un cycle tendu comme celui des cyclooctynes, sa réactivité vis-à-vis des azotures est alors accrue. La réaction de cycloaddition dipolaire Azoture/Alcyne peut alors être menée dans des conditions physiologiques, sans avoir recours à un catalyseur (Schéma I- 3).

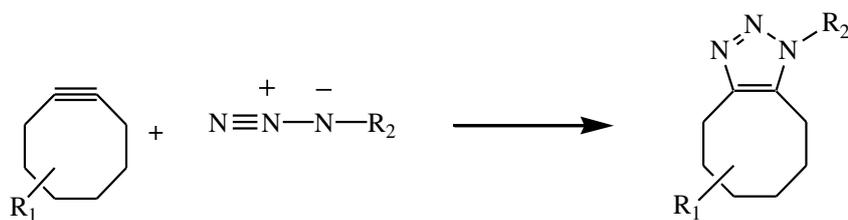
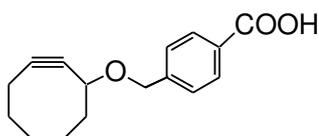


Schéma I- 3: Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire Azide/Alcyne non-catalysée.

L'acide 4-(((cyclooct-2-yne)oxy)méthyl) benzoïque (OCT, a, Figure I- 6) a été le premier cyclooctyne développé par Bertozzi et al. [75]. Grâce à sa fonction acide carboxylique, l'OCT a été biotinylé (b, Figure I- 6) par la biotine modifiée, puis utilisé pour le marquage de cellules. Alors que les alcynes linéaires sont incapables de réagir avec les azotures à la température physiologique (37 °C), l'OCT-biotine réagit facilement avec des peptidoglycanes porteurs de

fonctions azoture dans des lysats ou des cultures cellulaires [72]. Plus important, ce cyclooctyne s'est avéré non-toxique. Néanmoins, la constante de vitesse de réaction de l'OCT dans des réactions Azoture/Alcyne modèles ($0,0024 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est inférieure à celle des cycloadditions catalysées par le Cu (I) (qui peuvent alors atteindre de vitesses supérieures à $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ selon la concentration du catalyseur cuivreux) [71]. Il faut également noter que l'OCT présente une solubilité limitée dans l'eau.

a) OCT



b) OCT-biotinylé

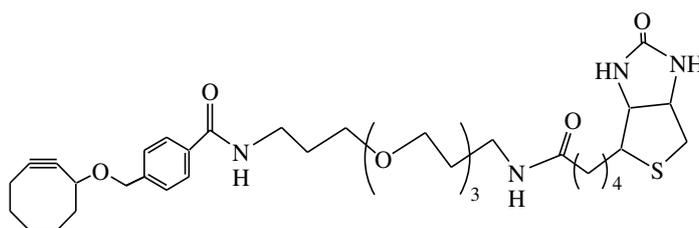


Figure I- 6: Structure de l'OCT et l'OCT biotinylée développés par Bertozzi et al. [75].

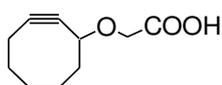
Plusieurs équipes se sont en conséquence intéressées à la synthèse de cyclooctynes plus réactifs et plus hydrosolubles [71], [72]. Le Tableau I- 3 présente les différents analogues développés pour mener des réactions Azoture/Alcyne dans des systèmes vivants, classés selon leur réactivité sur un système modèle dans des conditions similaires. Pour améliorer la réactivité de la fonction alcyne plusieurs stratégies ont été utilisées : modifier les propriétés électroniques des cyclooctynes via l'ajout des groupements électroattracteurs sur le cycle (par exemple, entrée 6 par rapport à l'entrée 1) ou augmenter la géométrie tendue du cycle par fusion de la cyclooctyne avec des groupements aromatiques (par exemple, entrée 8 par rapport à l'entrée 6). Les cyclooctynes les plus efficaces sont le dibenzocyclooctynone (Keto-DIBO) conçu par Mbua et al. [76], le dibenzoazacyclooctyne (DBCO) développé par Debets et al. [77] et le dibenzoazacyclooctynone (BARAC) synthétisé par Jewett et al. [74].

Des molécules fluorescentes incluant ces cyclooctynes, souvent utilisées pour le marquage des cellules, sont disponibles commercialement. Nous nous en servons pour fonctionnaliser la surface de nos NCs via des réactions de cycloaddition dipolaire Azoture/Alcyne. Ceci permettra de montrer le potentiel de ces NCs pour fixer des ligands de ciblage en surface.

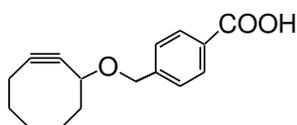
Tableau I- 3: Cyclooctynes utilisées pour mener des réactions de chimie-click sans Cu(I) dans des systèmes biologiques. Les constantes de vitesse (k) ont été obtenues pour la réaction avec l'azoture de benzyle dans l'acétonitrile (1-4, 6, 8, 11) ou le méthanol (5, 7, 9, 10) à température ambiante.

| N. | Cyclooctyne | k ($M^{-1}.s^{-1}$) ^a | Ref. |
|----|--------------|--------------------------------------|------|
| 1 | ALO | 0,0013 | [78] |
| 2 | OCT | 0,0024 | [75] |
| 3 | DIMAC | 0,0030 | [79] |
| 4 | MOFO | 0,0043 | [78] |
| 5 | DIBO | 0,057 | [80] |
| 6 | DIFO | 0,076 | [81] |
| 7 | TMDIBO | 0,094 | [82] |
| 8 | DIFBO | 0,22 | [83] |
| 9 | Keto-DIBO | 0,26 | [76] |
| 10 | DBCO (ADIBO) | 0,31 | [77] |
| 11 | BARAC | 0,96 | [74] |

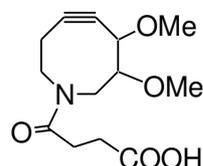
1) ALO



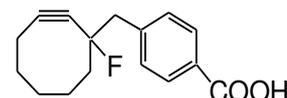
2) OCT



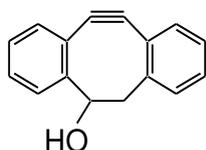
3) DIMAC



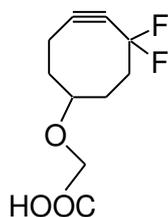
4) MOFO



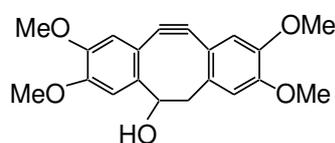
5) DIBO



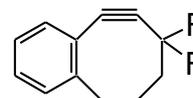
6) DIFO



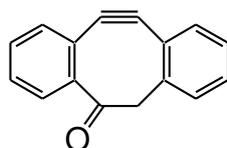
7) TMDIBO



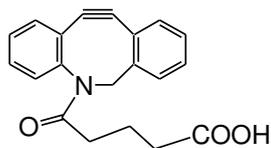
8) DIFBO



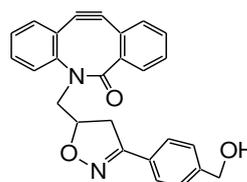
9) Keto-DIBO



10) DBCO/ADIBO



11) BARAC



2.4. NANOVECTEURS STIMULI-SENSIBLES

Les NVs stimuli-sensibles permettent d'améliorer le traitement des cellules malades en contrôlant la libération du principe actif dans le temps et/ou dans l'espace. En effet, ces systèmes sont conçus pour, une fois acheminés sur le site désiré via les stratégies de ciblage passif et/ou actif discutées précédemment, pouvoir libérer leur contenu en réponse à un ou plusieurs stimuli grâce à des changements de conformation, solubilité, forme, taille ou charge du NV (Figure I- 7) [84], [85]. Plusieurs stimuli sont exploités à l'heure actuelle pour améliorer, déclencher et/ou contrôler la libération localisée des principes actifs anticancéreux (Figure I- 8). Ces stimuli peuvent être classés en deux grandes catégories : i) stimuli physiques ou externes : température, contrainte mécanique, lumière, champs magnétiques et électriques ; ii) stimuli (bio)chimiques ou internes : température, pH, force ionique, enzymes et potentiel redox [6], [86], [87]. Les NVs répondant à des stimuli internes tirent leurs avantages des caractéristiques physiopathologiques des tumeurs discutées dans le Paragraphe 2.1 alors que les NVs à stimuli externe sont activés à distance, une fois arrivés à leur cible thérapeutique. La Figure I- 8 détaille les mécanismes qui peuvent être impliqués dans la libération de la SA [85], [87]. Le paragraphe suivant s'attardera sur les systèmes pH-sensibles, le pH étant le stimulus choisi au cours de cette thèse pour favoriser la libération de la SA encapsulée.

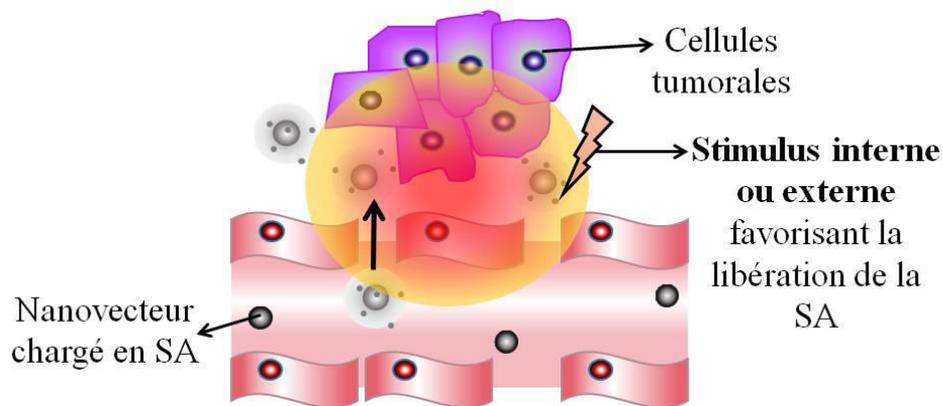


Figure I- 7 : Libération d'une SA au sein d'une tumeur à partir d'un système stimuli-sensible.

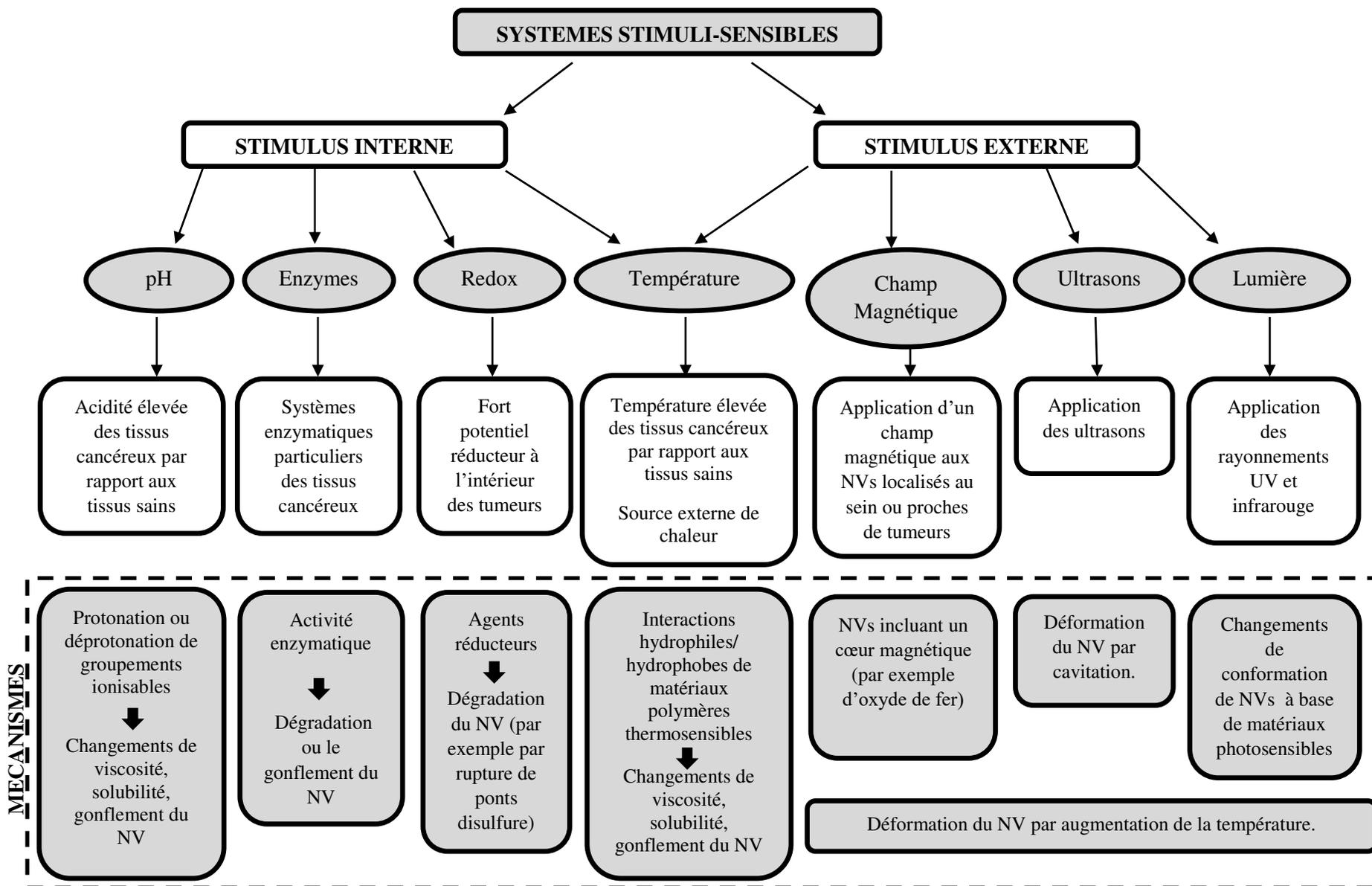


Figure I- 8: Systèmes stimuli-sensibles développés pour les thérapies cancéreuses et mécanismes impliqués dans la libération de la SA.

2.4.1. Les systèmes pH-sensibles

Le pH est le stimulus le plus étudié pour la conception de NVs destinés à la thérapie du cancer. Comme mentionné dans le Paragraphe 2.1, 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) [19], [88], [89]. Des gradients de pH sont également observés au niveau intracellulaire. Ainsi, alors que le cytoplasme des cellules cancéreuses présente un pH proche du pH normal (pH = 7,4), les endosomes et les lysosomes ont un pH beaucoup moins élevé variant de 5 à 6 et de 4 à 5, respectivement (Figure I- 9) [90]. Cette différence de pH à l'intérieur des cellules tumorales est particulièrement intéressante car de nombreux NVs sont internalisés par endocytose, et donc retenus dans les compartiments endosomal et lysosomal. Plusieurs efforts ont ainsi été consacrés au développement de NVs capables d'encapsuler et retenir une SA au pH physiologique, puis ensuite de la libérer aux environs voire à l'intérieur des cellules cancéreuses, suite à un abaissement du pH.

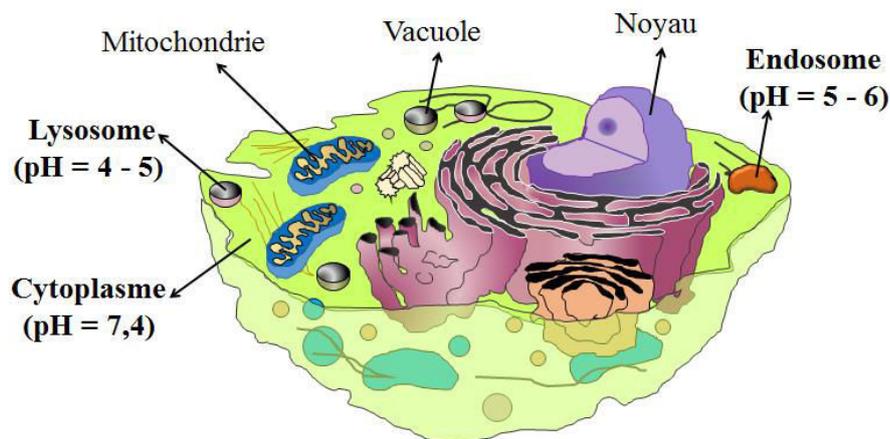


Figure I- 9 : Structure simplifiée d'une cellule humaine.

Plusieurs stratégies peuvent être employées pour rendre un nanovecteur pH-sensible :

2.4.1.1. NVs contenant des liaisons acide-labiles

Une première stratégie consiste à utiliser des liaisons acide-labiles pour attacher des médicaments à la surface de NVs préalablement synthétisés ou pour fabriquer de nouveaux vecteurs (Figure I- 10) [90]. Ces liaisons covalentes acide-labiles restent stables à pH neutre et sont dégradées ou hydrolysées en milieu acide. Cette dégradation provoque alors l'effondrement de la structure du nanovecteur et *in fine* la libération de la SA.

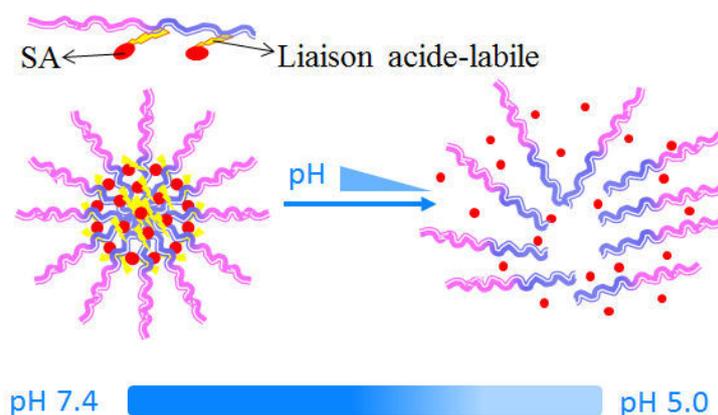


Figure I- 10 : Mécanisme de libération d’une SA à partir d’un NV contenant des liaisons acide-labiles.

Parmi les liens clivables les plus utilisés, on trouve les fonctions orthoester, ester, hydrazone, imine, cis-aconityle et acétal [91]–[93]. Leur structure et leurs produits de dégradation sont présentés dans le Tableau I- 4.

Tableau I- 4: Exemples des liaisons acido-labiles employés pour la fabrication de NVs pH-sensibles [90].

| Type | Liaison acido-labile | Produits de dégradation |
|---------------|----------------------|-------------------------|
| Orthoester | | + HO--- |
| Ester | | + HO--- |
| Hydrazone | | + H ₂ N-NH- |
| Imine | | H ₂ N--- + |
| Cis-aconityle | | + H ₂ N--- |
| Acétal | | + HO--- |

A titre d'exemple, la doxorubicine (DOX) est une anthracycline qui comporte des groupements cétone et amine (Figure I- 11). Ces groupements ont déjà été utilisés pour attacher cet anticancéreux à des chaînes polymères via de liaisons hydrazone ou amide, respectivement. Les prodrogues DOX-polymère ainsi obtenues ont été utilisées en tant que tels [94], [95] ou ont permis de fabriquer des micelles [96] et des nanoparticules [97] sensibles au pH. La DOX a également été attachée à des quantum dots⁸ [98] ou à la surface de nanoparticules d'or [99] via la formation de liaisons hydrazone.

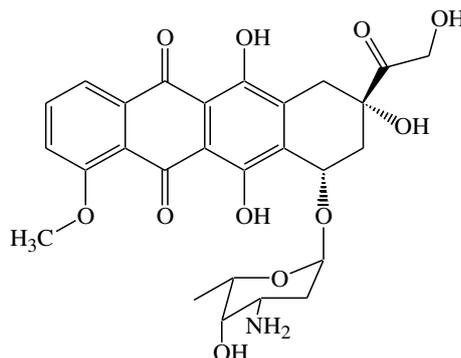


Figure I- 11: Structure chimique de la doxorubicine (DOX)

2.4.1.2. NVs à base de matériaux ionisables

Une autre stratégie permettant la fabrication de NVs pH-sensibles consiste à utiliser des matériaux comportant des groupements ionisables (amines, acides phosphoriques ou acides carboxyliques). Ces groupements, possédant différentes structures chimiques et valeurs de pKa, peuvent accepter ou donner des protons et subir des changements physiques et/ou chimiques lors de petites modifications de pH de leur environnement local [28], [87]. Des matériaux organiques (polymères et peptides) et inorganiques susceptibles de s'ioniser ont ainsi été employés dans la fabrication de nanomédicaments pH-sensibles pour la thérapie du cancer.

a) Polymères

Les polymères pH-sensibles sont des polyélectrolytes possédant des fonctions ionisables distribuées le long de leur squelette, sur des groupements latéraux, ou en bout des chaînes. Lorsque le pH et la composition ionique du milieu aqueux changent, le degré d'ionisation de ces polymères est modifié, ce qui entraîne un changement de leur conformation. Ces changements

⁸ Les Quantum Dots, appelés également boîtes quantiques, sont des nanocristaux de matériaux semiconducteurs, dont la taille est généralement comprise entre 1,5 et 6 nm.

peuvent aller d'un gonflement du polymère dû à la répulsion électrostatique entre les charges présentes sur les chaînes, jusqu'à sa solubilisation en milieu aqueux [100], [101]. Lorsque des polymères pH-sensibles sont incorporés dans un NV, leurs transitions pH-dépendantes peuvent ainsi être utilisées comme facteur déclenchant la libération de la SA. Ainsi, on peut imaginer d'exploiter la diminution de pH au voisinage du tissu tumoral pour favoriser la libération de la SA, par gonflage du NV (Figure I- 12).

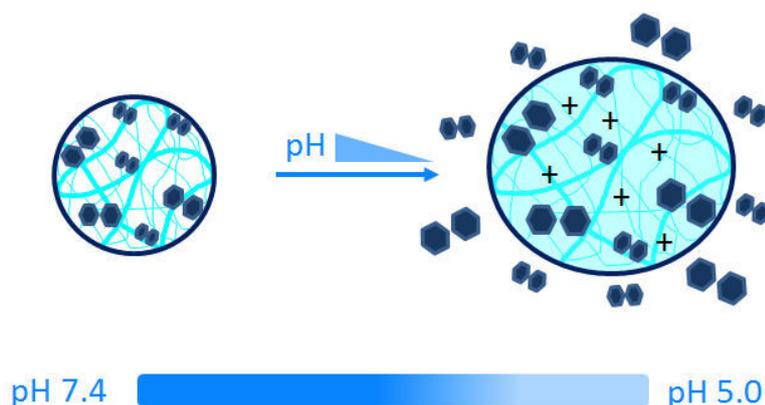


Figure I- 12 : Libération d'une SA en milieu acide par gonflage d'un nanovecteur à base de polymère pH-sensible.

Plusieurs NVs à base de polymères pH-sensibles, aussi bien anioniques que cationiques, ont été reportés : par exemple des micelles [102], [103], des polymersomes [104], [105], des nanoparticules [106], [107], des hydrogels [108], [109] et des liposomes [110], [111]. Parmi les polymères pH-sensibles les plus employés, nous pouvons citer les polymères anioniques contenant des fonctions acide carboxylique (voir 1 à 7, Figure I- 13) ou des groupements sulfamide (voir 8, Figure I- 13) [111]–[113]. Lorsque le milieu est acidifié, ces polymères sont alors protonés et leurs chaînes deviennent hydrophobes. En revanche, ils sont deprotonés en milieu neutre ou basique et présentent un caractère hydrophile.

Par rapport aux polymères anioniques, les polymères cationiques (9-13, Figure I- 13) présentent plusieurs avantages. A cause de la présence de charges positives à la surface, les NVs à base de polymères cationiques sont internalisés plus facilement via des interactions électrostatiques avec les charges négatives présentes sur la membrane cellulaire [28]. Le poly(méthacrylate de *N,N*-diméthylaminoéthyle) (PDMAEMA) (9, Figure I- 13) et le poly(méthacrylate de *N,N*-diéthylaminoéthyle) (PDEAEMA) (10, Figure I- 13) sont les polybases les plus utilisées [114]–[117]. Ils possèdent des groupements amine tertiaire dans leurs chaînes latérales capables de capter des protons en milieu acide, et de les libérer dans des conditions basiques. Les polymères

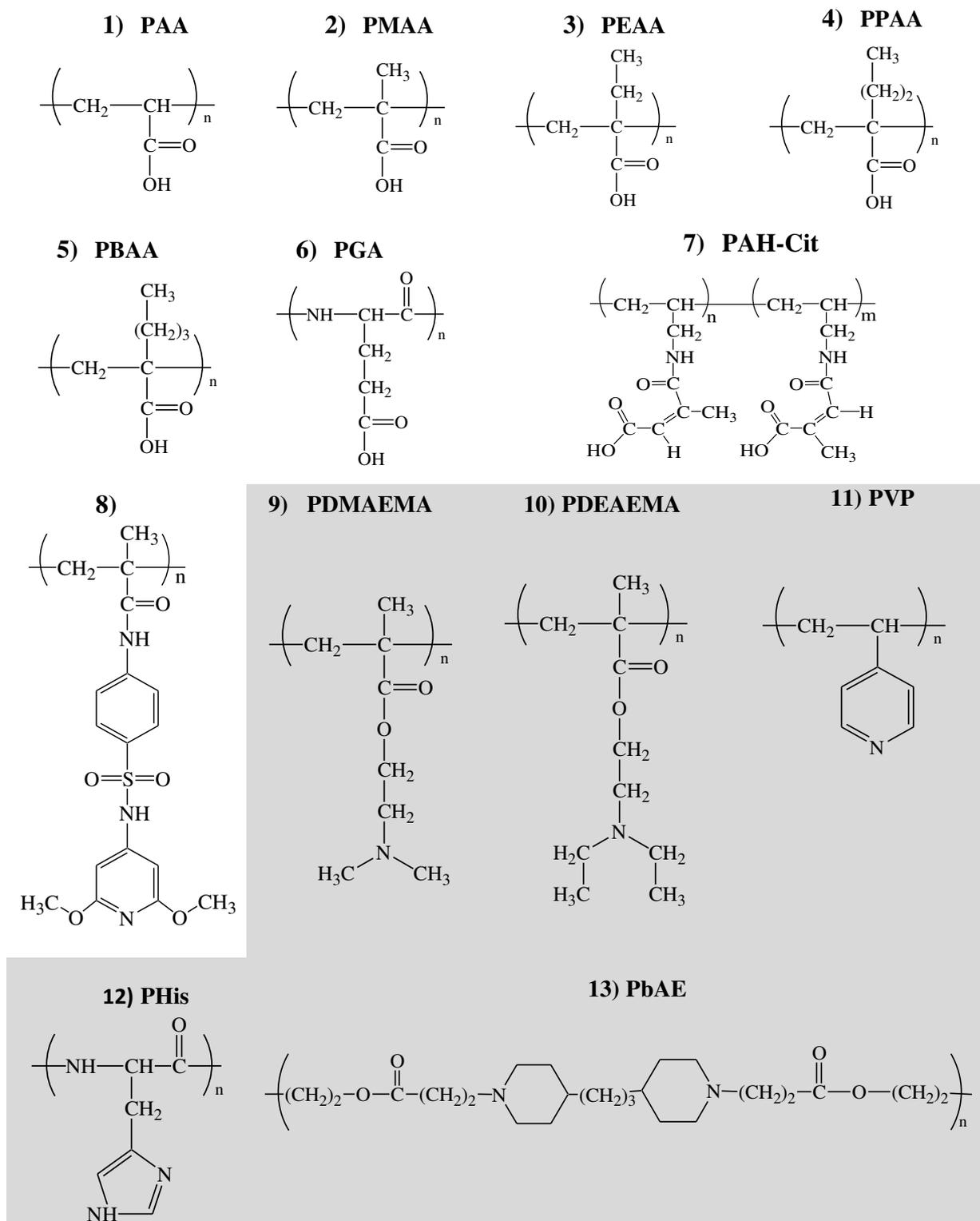


Figure I- 13: Polymères pH-sensibles les plus utilisés. Polymères anioniques : 1) Poly(acide acrylique)-PAA, 2) Poly(acide méthacrylique)-PMAA, 3) Acide poly(2-éthyl acrylique)- PEAA, 4) poly(acide 2-propyl acrylique)-PPAA, 5) poly(acide 2-butyl acrylique)-PBAA, 6) Poly (acide glutamique)-PGA, 7) Poly(chlorohydrate d'allylamine)-anhydride citroconique- PAH-cit, 8) polymères contenant des groupements sulfonamide. Polymères cationiques : 9) Poly(méthacrylate de *N,N*-diméthylaminoéthyle)-PDMAEMA, 10) Poly(méthacrylate de *N,N*-diéthylaminoéthyle)-PDEAEMA, 11) Poly(4-vinylpyridine)-PVP, 12) Poly(L-histidine)-PHis, 13) Poly(β -amino ester)-PbAE. Inspirée de [90].

contenant des groupements pyridine (12, Figure I- 13) ou imidazole (13, Figure I- 13) sont également utilisés [118]–[120].

Tout particulièrement, le PDEAEMA ($pK_a \sim 7,3$ [121]) choisi au cours de cette thèse pour conférer un caractère pH-sensible à nos NCs, a été largement utilisé pour la fabrication des plusieurs NVs, notamment des hydrogels, avec un comportement pH-dépendant dans le domaine de pH d'intérêt physiologique [108], [121]–[124]. Les gels résultants gonflent en milieu acide et deviennent des particules compactes au-dessus du $pH = 7$. A pH acide, lors du gonflement des NVs, l'hydratation des chaînes polymères favorise la libération de la SA. Des microgels polyampholytes ont également été fabriqués par copolymérisation en émulsion du méthacrylate de N,N-diéthylaminoéthyle (DEAEMA) avec l'acide méthacrylique (MAA) [125], [126]. Ces gels sont capables de gonfler à faible ($pH < 4$) et haut pH ($pH > 6$), et deviennent compacts au pH intermédiaires ($pH = 4-6$) (Figure I- 14). Des microgels à cœur PDEAEMA et écorce PMAA ont aussi été reportés [127]. Contrairement aux gels constitués de copolymères aléatoires, pour lesquels les procédés de protonation/déprotonation des unités acides et basiques se passent simultanément, le gonflement du cœur et celui de l'écorce de ces gels sont indépendants (Figure I- 15). Ceci pourrait d'ailleurs être exploité pour la libération sélective de différentes SAs en fonction du pH.

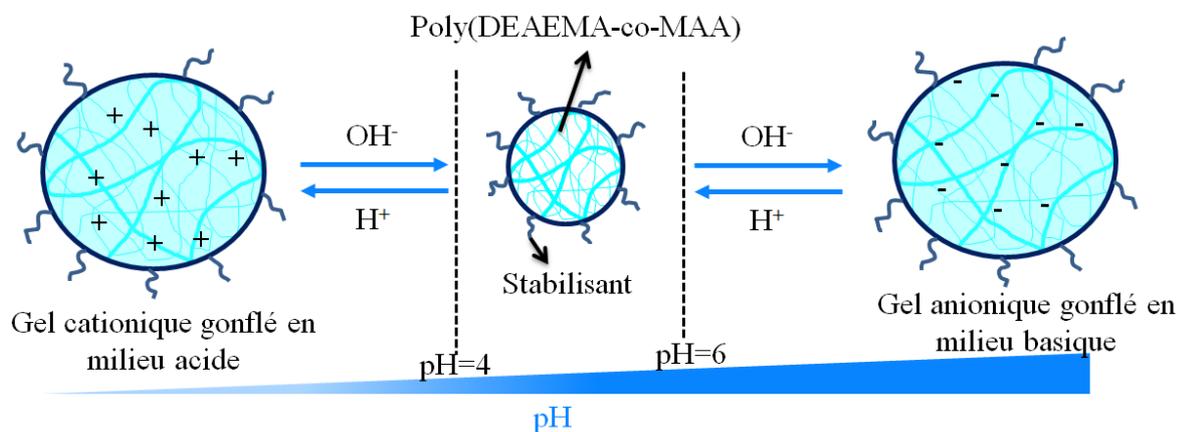


Figure I- 14 : Propriétés pH-sensibles des hydrogels à base des copolymères aléatoires poly(DEAEMA-co-MAA). Inspirée de [125].

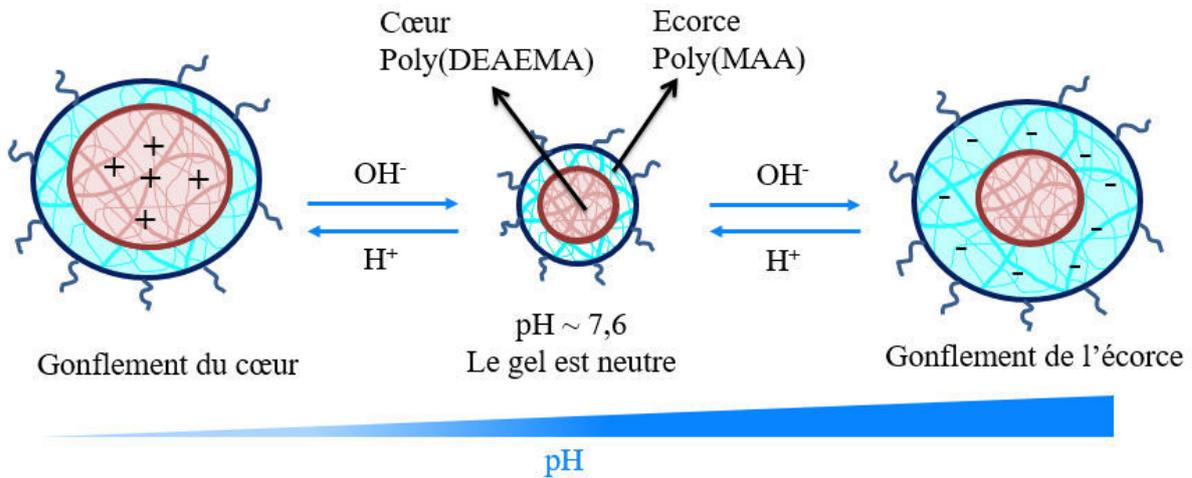


Figure I- 15 : Propriétés pH-sensibles des hydrogels à cœur PDEAEMA et écorce PMAA [127].

b) Peptides

Certains peptides sont capables de déstabiliser et induire la fusion⁹ des membranes des phospholipides comme celles entourant les endosomes et les lysosomes. C'est le cas des peptides synthétiques contenant plusieurs unités de répétition GALA (Glu-Ala-Leu-Ala). A pH-neutre, les répulsions électrostatiques entre les carboxylates des unités acide glutamique (Glu) déstabilisent la conformation hélicoïdale du peptide, alors qu'au pH acide des endosomes ($\text{pH} = 5$) la neutralisation de ces groupements favorise la formation de l'hélice. Sous sa conformation hélicoïdale, le peptide est capable de s'insérer de manière oblique dans la membrane endosomale, d'induire la déstabilisation lipidique et de favoriser la fusion membranaire [90], [128]. Yamada et al. [129] ont par exemple développé des liposomes modifiés avec du GALA pour une libération ciblé du mastoparan¹⁰ à l'intérieur des cellules cancéreuses. Une fois dans le microenvironnement acide des endosomes, les unités GALA du NV favorisent la fusion entre les membranes lipidiques des endosomes et lysosomes. Le médicament, libéré au niveau du cytosol¹¹, peut alors attaquer les mitochondries et ainsi démarrer son activité anti-tumorale.

c) Matériaux inorganiques

Plusieurs NVs pH-sensibles à base de matériaux inorganiques ont aussi été synthétisés. Kester et al. [130] ont décrit la fabrication des nanoparticules à base de phosphate de calcium. Le

⁹ Mélange intime de deux cellules ou des deux compartiments cellulaires.

¹⁰ Le mastoparan est un peptide qui perméabilise les mitochondries et induit l'apoptose de cellules cancéreuses.

¹¹ Le cytosol représente la phase liquide où baignent les organites cytoplasmiques (lysosomes, endosomes, mitochondries...)

phosphate de calcium se dissout dans des environnements acides pour donner des ions calcium et phosphate non-toxiques, ce qui permet un relargage pH-dépendant de la SA. De façon similaire, Muhammad et al. [131] ont préparé des quantum dots d'oxyde de zinc chargés en DOX. Ces quantum dots se dissolvent rapidement en milieu acide et permettent une libération de la DOX à l'intérieur des compartiments intracellulaires.

2.4.1.3. NVs producteurs de CO₂

Plus récemment, des NVs capables de générer du dioxyde de carbone (CO₂) ont été développés [90]. Il est bien connu que les ions bicarbonate (HCO₃⁻) peuvent réagir en milieu acide pour produire de l'acide carbonique (H₂CO₃) qui n'est que modérément stable et se décompose facilement en H₂O et CO₂. Ainsi, des NVs contenant des ions HCO₃⁻ peuvent potentiellement être utilisés pour contrôler la libération d'une SA en milieu acide. Ke et al. [132] ont ainsi montré l'élaboration de microsphères creuses à base d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) chargées en DOX. Le composé clé dans ce système était le bicarbonate de sodium (NaHCO₃) incorporé également à l'intérieur du vecteur. Dans un environnement acide, le NaHCO₃ réagit avec les ions hydrogène pour produire des bulles de CO₂ qui font éclater la paroi de la microsphère et induisent alors une libération rapide de l'anticancéreux. Le relargage de la DOX a lieu au niveau de lysosomes où le pH est d'environ 5. Le même principe a été utilisé par Liu et al. [133] lors de la conception de liposomes pH-sensibles chargés en DOX. Cette fois-ci, le bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) a été employé pour encapsuler la DOX à l'intérieur de liposomes et pour provoquer la libération de CO₂.

2.5. CRITERES POUR LA CONCEPTION D'UN NANOVECTEUR

Nous venons de voir que les différentes particularités physiopathologiques de tumeurs cancéreuses peuvent être exploitées pour favoriser l'accumulation de NVs au sein des tissus malades et permettre une libération ciblée des médicaments. Néanmoins, pour la réussite de n'importe quelle stratégie de ciblage il est nécessaire que les NVs, une fois administrés dans le sang, puissent y rester suffisamment longtemps afin de pouvoir arriver à leur site d'action. Par ailleurs, avant qu'un ciblage actif ou une libération déclenchée par un stimulus puissent avoir lieu, les NVs doivent d'abord s'accumuler au sein des tumeurs par ciblage passif.

2.5.1. Devenir de nanovecteurs *in vivo* après administration par voie intraveineuse

Lorsqu'un NV est injecté dans la circulation sanguine, il est confronté à plusieurs obstacles (Figure I- 16) [85], [134]. Il peut interagir et se fixer de manière non-spécifique aux parois endothéliales ce qui réduit sa distribution systémique. Il peut également se dégrader et être ensuite éliminé par le système phagocytaire mononucléaire (MPS) qui est un des mécanismes de régulation des réactions immunitaires (voir glossaire en début de manuscrit) ou via les systèmes de filtration rénale et pulmonaire. Finalement, comme n'importe quel corps étranger, un NV peut interagir avec les protéines du plasma sanguin aboutissant à une agrégation plaquettaire, à l'activation du système du complément ou à une opsonisation suivi d'une phagocytose par le MPS. Tous ces processus conduisent à une élimination prématurée du NV de la circulation sanguine et réduisent donc son efficacité thérapeutique.

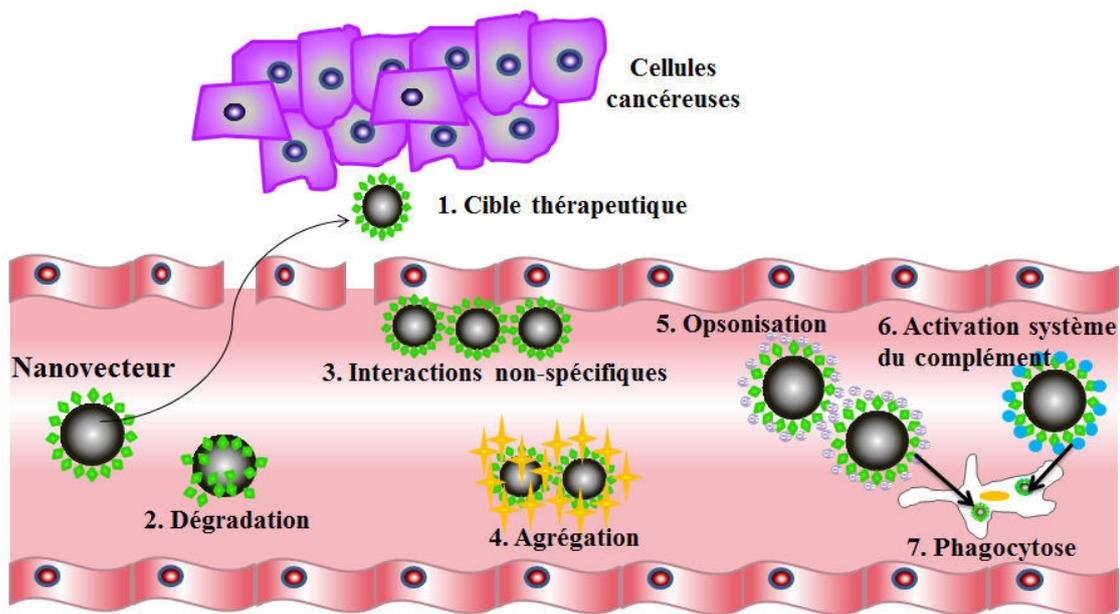


Figure I- 16 : Destins possibles de NVs *in vivo* après leur administration par voie intraveineuse. Inspirée de [85].

2.5.2. Propriétés d'un nanovecteur pour un ciblage passif

Afin de franchir ces barrières biologiques, la taille et les propriétés de surface (charge, hydrophobie) des NVs doivent répondre à des critères précis. Les NVs de taille inférieure à 10 nm sont rapidement éliminés de l'organisme par clearance rénale [135]. Rappelons également qu'une taille de 200 nm est considérée comme la limite supérieure pour avoir une accumulation de NVs via l'effet EPR [11] (voir Paragraphe 2.2.1). De plus, les objets ayant de tailles

supérieures à 200 nm présentent des faibles rayons de courbure, ce qui favorise l'interaction des opsonines à leur surface.

Il a été montré que les NVs non-ioniques sont moins opsonisés par rapport aux NVs chargés [136], [137]. Parmi les vecteurs chargés, ceux avec une charge de surface positive interagissent le plus avec les protéines plasmatiques, les membranes cellulaires et les tissus connectifs. Il est tout aussi important de signaler que les vecteurs chargés positivement présentent cependant une meilleure efficacité d'internalisation.

L'hydrophobicité du NV influence pour sa part l'ampleur de l'opsonisation et la nature de protéines plasmatiques qui s'adsorbent à la surface des NVs, ce qui détermine également le type de récepteurs avec lesquels un NV peut interagir [138], [139]. Plus le NV est hydrophobe, plus il est opsonisé et rapidement éliminé. Le recouvrement des NVs par des chaînes polymères hydrophiles neutres peut permettre de leur conférer un caractère furtif vis-à-vis du système immunitaire. En effet, la présence de certaines macromolécules hydrophiles en surface peut empêcher, en créant une barrière stérique, la fixation des opsonines à la surface des objets et les rendre indétectables par les macrophages du MPS. Ceci limite l'élimination des NVs et prolonge notablement leur demi-vie plasmatique *in vivo* [140], [141].

Dans ce cadre, le poly(éthylène glycol) (PEG) est apparu dans un premier temps comme le candidat idéal pour conférer une certaine furtivité aux NVs et avec lui est née une génération d'objets PEGylés, ayant une persistance sanguine plus importante par rapport à leurs homologues non-recouverts [142]–[144]. Cependant cette furtivité dépend de l'épaisseur et de la densité du recouvrement en chaînes PEG. De plus, l'absence de groupements réactifs à la surface de ces objets peut rendre difficile le couplage chimique des anticorps ou des ligands spécifiques des tissus tumoraux, essentiel pour améliorer le ciblage des cellules cancéreuses [140].

C'est une des raisons pour lesquelles les polysaccharides ont été considérés comme de bons candidats pour remplacer le PEG à la surface des NVs. La présence des plusieurs fonctions hydroxyle sur leur dorsale permet en effet d'envisager une modification ultérieure de la surface des vecteurs [145]. De plus, leur biocompatibilité et biodégradabilité en font des biomatériaux de choix pour la vectorisation de SAs par voie intraveineuse.

Parmi les polysaccharides disponibles, le dextrane est de loin le polysaccharide dont les dérivés sont les plus employés dans des formulations biomédicales [146]–[148]. La gamme des NVs à base de dextrane disponibles actuellement inclut des prodrogues médicament-dextrane [149]–

[152], des hydrogels [153]–[155], des micelles [156]–[158], des liposomes [159]–[161] et des NPs [162]–[165]. Plusieurs études semblent montrer que la décoration de la surface de NVs par le dextrane peut effectivement empêcher l’adsorption des protéines circulantes et conférer une « furtivité » aux NVs. Néanmoins, le débat sur la conformation du dextrane à la surface des NVs (configuration « *end-on* » vs. configuration « *side-on* ») (Figure I- 17), reste encore ouvert. Selon Öesterberg et al.[166], un recouvrement de type « *end-on* », obtenu avec un copolymère dibloc à base d’un bloc hydrophile en dextrane, est moins efficace que celui obtenu à partir d’un copolymère diblocs à base de PEG. Ceci s’explique par la moindre mobilité et flexibilité des chaînes de dextrane en surface par rapport à celles du PEG. En revanche, un recouvrement en dextrane de type « *side-on* », issu d’un copolymère en peigne, peut être aussi efficace qu’un recouvrement PEG « *end-on* ». De plus, la densité du recouvrement s’est avéré être le paramètre clé pour prévenir efficacement l’adsorption des protéines alors qu’aucune influence de la longueur des chaînes hydrophiles, quelle que soit la conformation du dextrane en surface, n’a été notée. D’un autre côté, une étude plus récente menée par Vauthier C. et al. [167], suggère qu’un recouvrement en dextrane de type « *end-on* » peut prévenir de manière efficace l’adsorption des protéines plasmatiques de grande taille (par exemple le fibrinogène) et empêcher l’activation du système du complément à condition d’avoir une densité importante des chaînes hydrophiles en surface.

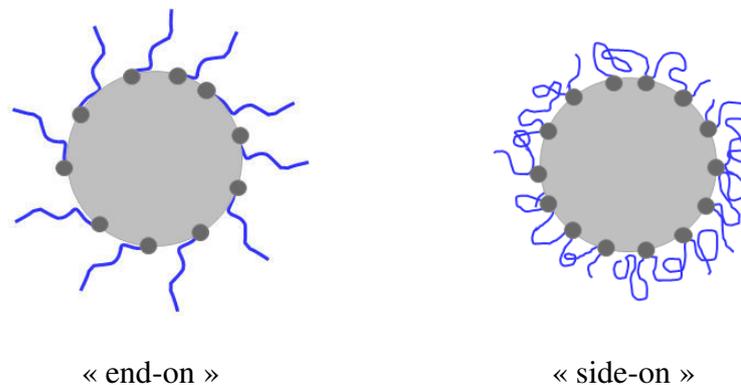


Figure I- 17 : Conformations possibles du dextrane à la surface d’un NV. Dans le cas d’une configuration « *end-on* », l’adsorption ou le greffage du dextrane à la surface s’effectue par un point d’ancrage (cas de copolymères diblocs). Dans une configuration « *side-on* » la fixation du dextrane s’effectue par des nombreux points (cas de copolymères en peigne) et le dextrane adopte une conformation en boucle-trains et queues à la surface du NV.

2.5.3. Cahier de charges

Pour conclure cette partie, la Figure I- 18 synthétise le cahier de charges et les critères de conception d'un NV destiné à l'administration d'anticancéreux par voie intraveineuse.

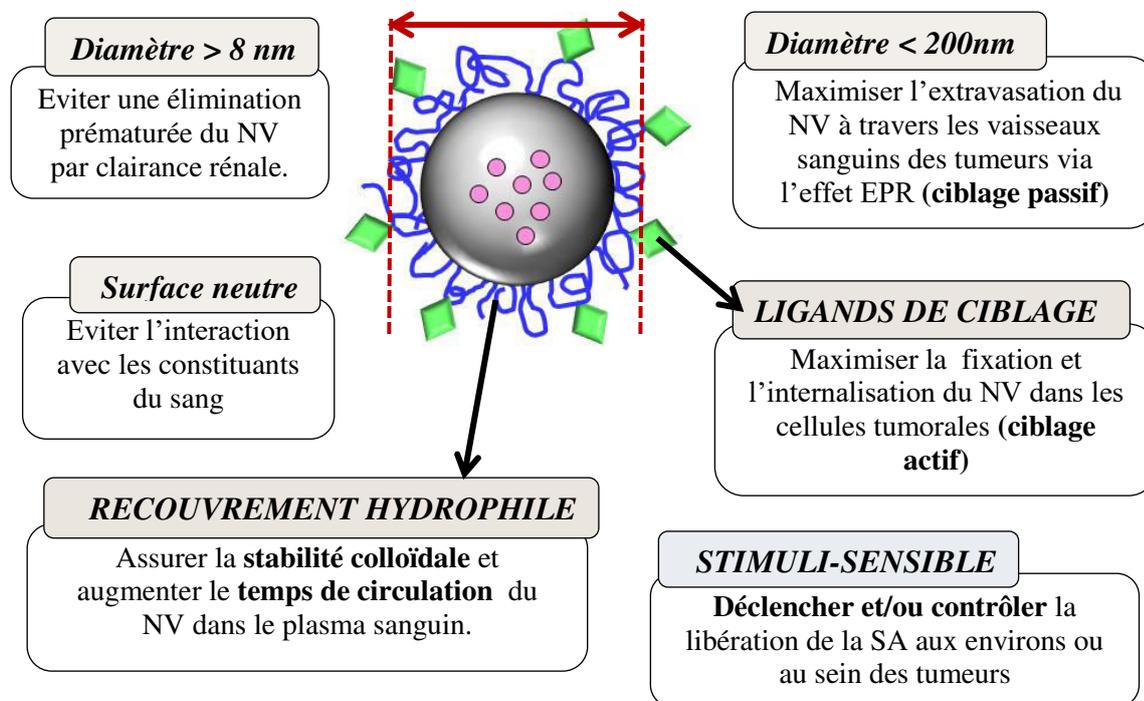


Figure I- 18 : Cahier de charges d'un NV destiné à l'administration d'anticancéreux par voie intraveineuse.

2.6. NANOCAPSULES ET THERAPIE CANCEREUSE

Il existe deux types de nanoparticules polymères qui se distinguent essentiellement par leur morphologie : les nanosphères (NSs) et les nanocapsules (NCs) (Figure I- 19) [168]. Les NSs sont des systèmes colloïdaux sphériques composées d'une matrice polymère homogène de nature amorphe ou cristalline, dans laquelle la SA est souvent dissoute ou dispersée de façon uniforme (Figure I- 19, a). Les NCs, quant à elles, sont des systèmes particuliers à morphologie cœur/écorce constituées d'un cœur vide (NCs creuses), solide (cas des huiles qui se solidifient à température ambiante) ou liquide (de nature aqueuse ou huileuse), entouré par une écorce de polymère (Figure I- 19, b). Selon sa polarité, la SA est incorporée dans le cœur qui joue alors le rôle de réservoir, ou éventuellement dans l'écorce, adsorbée ou attachée de façon covalente à la couche polymère [169].

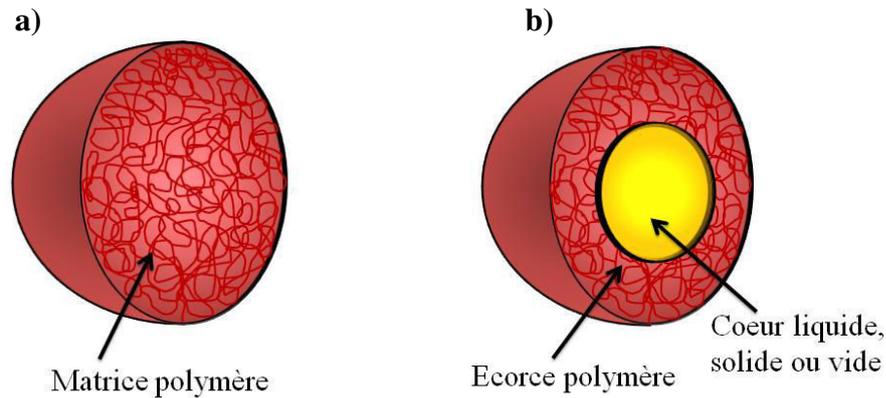


Figure I- 19: Différentes morphologies des nanoparticules polymères: a) nanosphères, b) nanocapsules

Comme mentionné auparavant, ces travaux de thèse étaient focalisés sur la fabrication d'une NC à cœur liquide. Un des principaux avantages de NCs par rapport aux NSs est la possibilité de moduler la cinétique de libération de la SA en variant l'épaisseur et la nature chimique de l'écorce polymère [170]. De même, il est possible d'encapsuler des composés lipophiles ou hydrophiles selon la nature du cœur liquide (phase aqueuse ou huile hydrophobe). En outre, le fait de confiner la SA dans la cavité interne de la capsule permet de la protéger d'une éventuelle dégradation *in vivo* [171]. Finalement, les NCs semblent avoir une meilleure efficacité d'encapsulation par rapport aux NSs grâce à la taille importante de la cavité liquide par rapport à l'écorce polymère [169]. De plus, le taux d'encapsulation exprimé en pourcentage de SA par rapport au polymère peut être considérablement augmenté si la solubilité de la SA dans le cœur liquide est optimale. Toutefois, l'efficacité d'encapsulation est fortement liée à la nature chimique de la SA, à la nature de la NC (nature et polarité du cœur et de l'écorce, morphologie et taille de l'objet...) et au procédé utilisé pour l'élaboration des objets.

Dans le Tableau I- 5 sont présentés quelques exemples de NCs à cœur liquide et écorce polymère développées pour le traitement du cancer. Il faut cependant noter que ces systèmes sont encore, pour la plupart, en développement recherche.

En ce qui concerne le matériel constituant l'écorce des NCs, les polymères plus couramment utilisés sont le poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA), le poly (acide lactique) (PLA) et la poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (voir Tableau I- 6). Ces polymères présentent l'avantage d'être biocompatibles et/ou biodégradables. Par exemple, le PLGA et le PLA s'hydrolysent en milieu physiologique pour former de l'acide glycolique et/ou lactique, composés qui sont facilement métabolisés par l'organisme [172]. Des NCs à base de polypeptides tels que le poly(acide

glutamique) (PGA) et la poly(L-asparagine), ou de polysaccharides naturels tels que le chitosane et l'acide hyaluronique sont également reportées. La poly(L-asparagine) et l'acide hyaluronique sont particulièrement intéressants car ils offrent la possibilité de cibler les cellules cancéreuses [173], [174]. En effet, l'acide aminé L-asparagine est un nutriment essentiel pour le développement de la tumeur, tandis que les récepteurs de l'acide hyaluronique sont surexprimés par les cellules cancéreuses. Ceci est susceptible de favoriser l'internalisation de NVs à base de ces polymères par endocytose.

La plupart de NCs polymères à cœur liquide reportées dans la littérature ont été conçues comme réservoir et véhicule d'anticancéreux lipophiles. Ainsi le cœur liquide est le plus souvent une huile hydrophobe. Parmi les plus courants, nous pouvons citer les triglycérides d'acides caprique (C_{10:0}) et caprylique (C_{8:0}) nommés Labrafac CC, Miglyol[®]810, Miglyol[®]812 et Myritol[®]318 [175]-[176]. Ces huiles, qui diffèrent de par leur origine et leur composition en acides gras (voir Tableau I- 7, a) sont biocompatibles, biodégradables et bioassimilables [177]–[179]. De plus, les coefficients de partage du paclitaxel et du docétaxel entre le Miglyol[®]810 et un tampon phosphate (0,148 M, pH = 7,4) ont été évalués à 15,4 et 69,4, respectivement [180]. Ces valeurs traduisent la forte affinité entre ces anticancéreux et le Miglyol[®]810, ce qui permet d'obtenir des bonnes efficacités d'encapsulation (généralement supérieures à 60%, voir Tableau I- 5). Des huiles triglycérides à base d'acides gras polyinsaturés, telles que l'huile de ricin et l'huile de soja [181], ou encore des esters d'acide gras tels que l'oléate d'éthyle et le myristate d'isopropyle [182] ont été aussi utilisés comme constituant du cœur liquide des NCs (Tableau I- 7, b-e).

Tableau I- 5 : Exemples des NCs polymères à cœur liquide utilisées comme NVs des SAs anticancéreuses.

| Ecorce polymère | Cœur liquide | Procédé d'élaboration | Diamètre (nm) | SA encapsulée | EE / TE (%) ^c | R |
|-------------------|--|-------------------------------|---------------|---------------|--------------------------|-----------------|
| PLA | Labrafac CC | Emulsion-diffusion de solvant | 115-582 | Paclitaxel | 65-93%/68% | [175] |
| PCL ^a | Labrafac CC | Emulsion-diffusion de solvant | 224 | Docétaxel | 60%/- | [183] |
| PLGA ^a | Huile de ricin | Nanoprécipitation | 150 | Curcumine | 92%/18% | [181] |
| | Miglyol [®] 812 | | 206 | | 88%/18% | |
| | Huile de soja | | 235 | | 69%/14% | |
| PLGA | Myritol [®] 318 | Nanoprécipitation | 280 | Xanthanes | 85-89%/- | [184] |
| PGA ^a | Miglyol [®] 812 | Nanoprécipitation | 200 | Docétaxel | 70-90%/- | [185] |
| PGA ^a | Miglyol [®] 812 | Nanoprécipitation | 190 | Plitidepsine | 85%/- | [186], [187] |
| Chitosane | Miglyol [®] 812 | Nanoprécipitation | <200 | Docétaxel | 72%/- | [188] |
| PCL | Mélange de triglycérides des acides caprique et caprylique | Nanoprécipitation | 246 | Indométacine | ~100%/- | [189] |

PARTIE I : Etude Bibliographique

| | | | | | | |
|--|---|---|---------|--|---------------|-----------------|
| PLA ^a | Miglyol® 810 | Nanoprécipitation | 245 | Antiestrogènes | 98%/0,5% | [190]– [192] |
| Polyarginine ^a | Miglyol® 812 | Nanoprécipitation | 170 | Docétaxel | 74%/- | [193] |
| Acide hyaluronique | Miglyol® 812 | Nanoprécipitation | 250 | Docétaxel | 66%/- | [174] |
| Poly(L-asparagine) | Miglyol® 812 | Nanoprécipitation | 170-200 | Docétaxel | 75%/- | [173] |
| PLA ^a | Miglyol® 812 | Nanoprécipitation | 180 | Méta-tétra(hydroxyphényl)chlorine ^b | 99%/- | [176] |
| Poly(methacrylate de pentafluorophényle) | Eau | Polymérisation RAFT à l'interface d'une miniémulsion eau dans l'huile | 200 | Gemcitabine | 96%/12% | [194] |
| Poly(cyanoacrylate de butyle) | Oléate d'éthyle Isooctane Acide oléique Myristate d'isopropyle | Polymérisation à l'interface d'une microémulsion huile dans l'eau | 200-500 | Cyanine IR-768 ^b | 65,7-91,7% /- | [182] |

a) NCs recouvertes de PEG, b) Photosensibilisant utilisé pour une thérapie photodynamique¹², c) EE = Efficacité d'encapsulation (I- 1), TE = Taux d'encapsulation (I- 2).

$$EE (\%) = \frac{\text{Masse SA encapsulée}}{\text{Masse SA introduite dans le milieu}} \times 100 \quad \text{I- 1}$$

$$TE (\%) = \frac{\text{Masse SA}}{\text{Masse SA encapsulée} + \text{masse polymère}} \times 100 \quad \text{I- 2}$$

¹² La thérapie photodynamique détruit les cellules cancéreuses en ayant recours à un médicament appelé photosensibilisant, qui rend les cellules sensibles à la lumière laser

Tableau I- 6 : Structure de certains polymères naturels et synthétiques utilisés dans la formulation de NCs destinées à la thérapie cancéreuse.

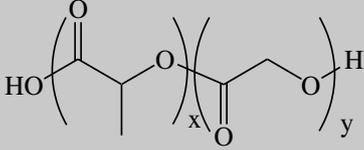
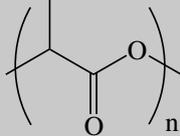
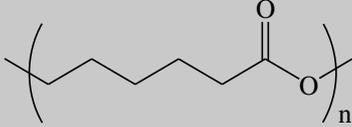
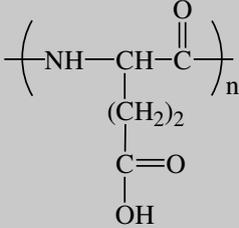
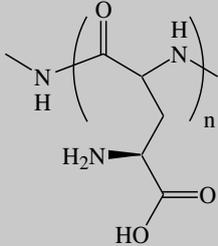
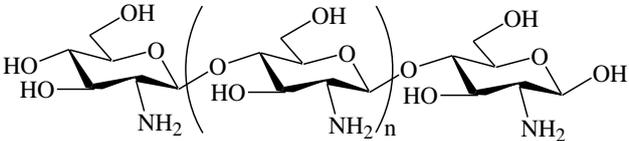
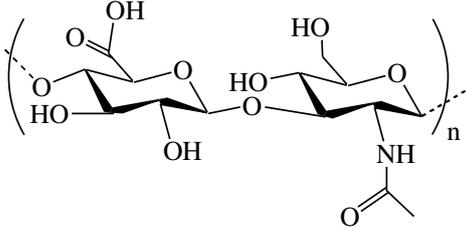
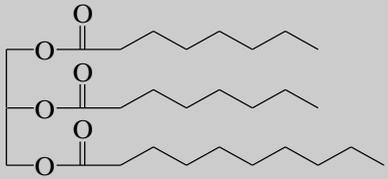
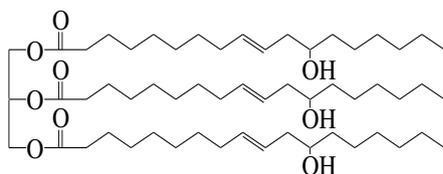
| Type | Nom | Structure |
|------------------------|--|--|
| Polymères synthétiques | poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) |  |
| | poly(acide lactique) (PLA) |  |
| | poly(ε-caprolactone) (PCL) |  |
| | poly(acide glutamique) (PGA) (Polypeptide) |  |
| | poly(L-asparagine) (Polypeptide) |  |
| Polymères naturels | Chitosane (Polysaccharide) |  |
| | Acide hyaluronique (Polysaccharide) |  |

Tableau I- 7 : Structure et composition massique moyenne de certaines huiles utilisées dans la formulation de NCs destinées à la thérapie cancéreuse.

a) Huiles à base d'acides caprique et caprylique

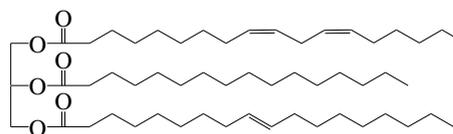
| Nom commercial | Acide caprylique (C ₈ :0) | Acide caprique (C ₁₀ :0) | Structure |
|----------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Labrafac CC | 50-80% | 20-50% |  |
| Miglyol®810 | 65-80% | 20-35% | |
| Miglyol®812 | 50-65% | 30-45% | |
| Myritol®318 | 65-77% | 23-35% | |

b) Huile de ricin



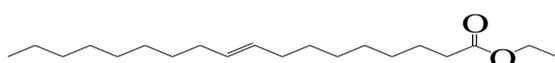
(Acide ricinoléique C₁₈:1)

c) Huile de soja

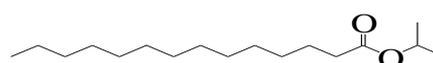


(Acide linoléique C₁₈:2-51%, palmitique C₁₆:0-10% et oléique C₁₈:1-23%)

d) Oléate d'éthyle



e) Myristate d'isopropyle



Quant à leur méthode de fabrication, plusieurs techniques ont été utilisées pour l'élaboration de NCs à cœur liquide chargé en agents anticancéreux. L'émulsion-diffusion de solvant [175]-[183], la nanoprécipitation [181]-[176] et la polymérisation localisée à l'interface d'une émulsion [194]-[182] peuvent être citées. Par la suite, nous allons brièvement présenter ces différentes techniques.

3. FABRICATION DE NANOCAPSULES A CŒUR LIQUIDE.

3.1. METHODES

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour l'élaboration de NPs polymères (NSs et NCs) [168], [195], [196]. Dans le cas de NCs à cœur liquide, ces méthodes peuvent être classifiées en trois grands groupes (Tableau I- 8) :

Tableau I- 8 : Méthodes d'élaboration de NCs à cœur liquide.

| PRINCIPE | Méthodes |
|--|---|
| Ségrégation de phases | Nanoprécipitation |
| | A partir d'un polymère préformé (<i>Procédés physico-chimiques</i>) Emulsion-évaporation de solvant Emulsion-diffusion du solvant Emulsion-coacervation |
| | Polymère synthétisé <i>in situ</i> (<i>Procédés chimiques</i>) Polymérisation en miniémulsion |
| Utilisation d'un cœur sacrificiel « Templating » | Déposition couche-par-couche de polyélectrolytes autour d'un cœur solide (« template » dur) ou liquide (« template » mou). |
| | Déposition d'une couche de polymère à la surface des nanogouttelettes d'une émulsion |
| Réactions interfaciales à la surface des nanogouttelettes d'une émulsion | Réactions de chimie « click » interfaciales |
| | A partir des polymères préformés Polycondensation/Polyaddition Polymère synthétisé <i>in situ</i> Polymérisation en miniémulsion en présence des tensioactifs réactifs |

3.1.1. Ségrégation de phases

Les techniques classiques de fabrication de NCs sont basées sur un procédé de ségrégation de phases entre le polymère constituant l'écorce et le cœur liquide. Cette ségrégation provoque *in fine* la précipitation du polymère autour du cœur liquide et donc l'obtention d'un objet à morphologie cœur-écorce. Le polymère utilisé peut être préformé (cas des procédés physico-chimiques) ou produit *in situ* lors de l'élaboration des objets (cas des techniques de polymérisation) (voir Tableau I- 8). Les méthodes physico-chimiques diffèrent essentiellement par l'utilisation ou non d'une étape d'émulsification et par la façon d'induire l'insolubilisation du polymère [168]. Dans le cas des polymères préparés *in situ* par polymérisation, la polymérisation en miniémulsion reste la technique la plus adaptée puisqu'elle permet d'obtenir le polymère et les NCs en une seule étape [196]. Ce procédé sera abordé dans le Paragraphe 3.2.

Pour illustrer plus en détail la préparation de NCs par ségrégation de phases, nous pouvons citer les travaux de Youm et al. [175]. Ils ont préparé de NCs à cœur huileux (Labrafac CC) et écorce PLA par un procédé d'émulsion-diffusion de solvant. Destinées à la thérapie contre le cancer du sein, ces NCs ont été utilisées pour encapsuler du docétaxel. L'élaboration de ces objets a nécessité la préparation d'une émulsion huile-dans-eau (O/W) (voir Figure I- 20). La phase organique (huile) contenait un PLA préformé, du Labrafac CC et du docétaxel solubilisés dans de l'acétate d'éthyle saturé en eau. La phase aqueuse, saturée en acétate d'éthyle, contenait du poly(alcool vinylique), tensioactif utilisé pour stabiliser l'émulsion. Après émulsification, une grande quantité d'eau a été rajoutée goutte à goutte afin de favoriser la diffusion de l'acétate d'éthyle dans la phase aqueuse. Cette diffusion entraîne alors la précipitation du PLA (immiscible dans le Labrafac CC) et aboutit à l'obtention de NCs chargées en docétaxel.

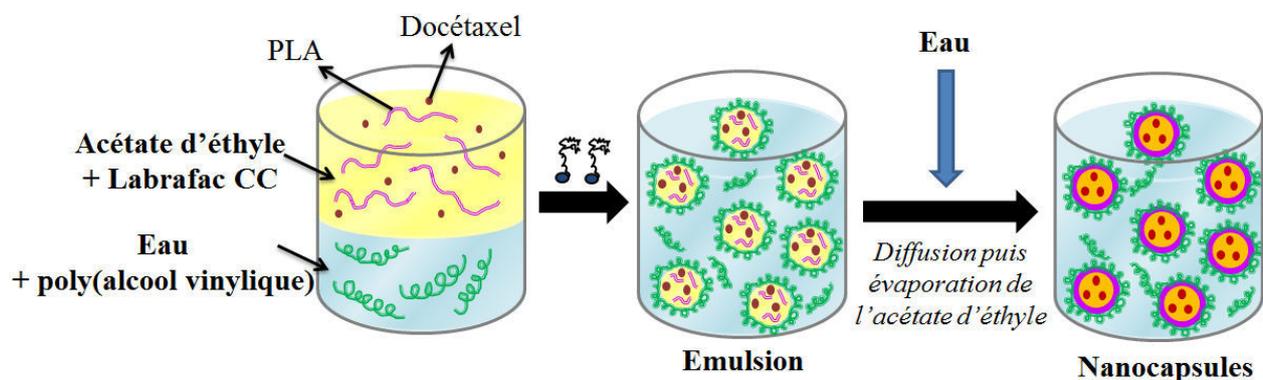


Figure I- 20: Elaboration de NCs par ségrégation de phases. Cas de la fabrication de NCs à écorce PLA et cœur huileux (Labrafac CC) par émulsion-diffusion de solvant.

3.1.2. Utilisation de templates

Le deuxième grand procédé classique permettant la fabrication de NCs consiste à utiliser un cœur sacrificiel ou « template ». Ce dernier peut être de nature solide (« template » dur) ou liquide (« template » mou), sur lequel le(s) polymère(s) qui constitueront l'écorce de la NC sont déposés. Parmi ce type de procédés, l'adsorption couche-par-couche de polyélectrolytes de charges opposées est la méthode la plus utilisée [197]–[199]. Les particules de silice [200], [201] et les gouttelettes des émulsions [202], [203] sont souvent employées comme template dur et mou, respectivement. Thomas et al. [201] ont par exemple déposé des couches de polysaccharides naturels chargés sur des nanoparticules de silice (« template » dur): le chitosane (chargé positivement), en alternance avec l'héparine (chargé négativement) (Figure I- 21). En conditions acides, le cœur solide de silice a ensuite été dissous et des NCs à cœur vide ont été obtenues. Au final, la cavité de ces NCs a été remplie avec la DOX par une méthode d'imprégnation.

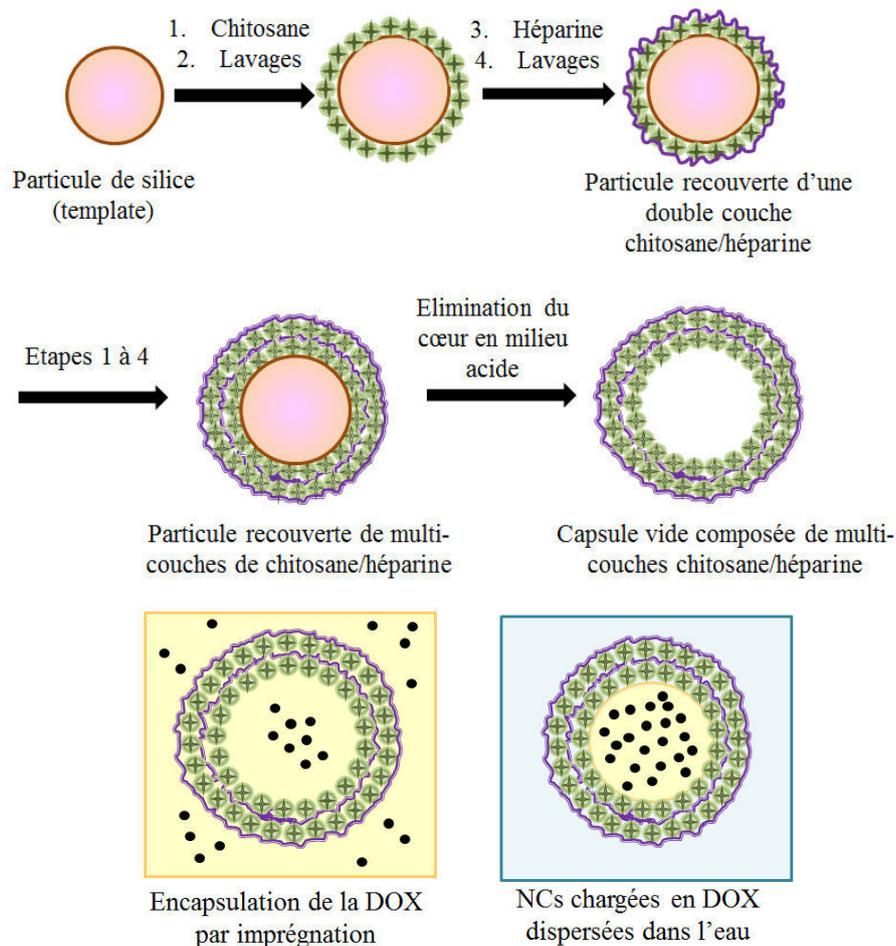


Figure I- 21 : Elaboration de NCs par adsorption couche par couche des polysaccharides naturels (chitosane et héparine) sur des nanoparticules de silice.

Un des principaux avantages de la méthode de déposition couche-par-couche est la possibilité de contrôler la morphologie des NCs. En effet, le diamètre du cœur et l'épaisseur de l'écorce de la NC peuvent être facilement modulés en fonction de la taille du cœur sacrificiel et du nombre de couches de polymère déposées, respectivement [204]. Néanmoins, les objets doivent souvent être lavés après chaque étape d'adsorption, ce qui rend ce procédé très laborieux [168]. De plus, le cœur sacrificiel (dans le cas d'un template dur) est généralement enlevé dans des conditions agressives (dissolution par un acide ou thermolyse) qui peuvent endommager la structure de la NC. L'incorporation de la SA à l'intérieur des objets nécessite souvent l'ajout d'une étape supplémentaire [205]. Les templates mous (par exemple une émulsion) peuvent permettre de lever certaines de ces difficultés : le cœur liquide peut être retiré par simple évaporation et la SA peut être directement encapsulée dans le cœur liquide. Néanmoins, la mise en œuvre de ce type des templates demande généralement l'utilisation d'une grande quantité de stabilisant qui reste dans les objets finaux et dont l'élimination peut s'avérer laborieuse.

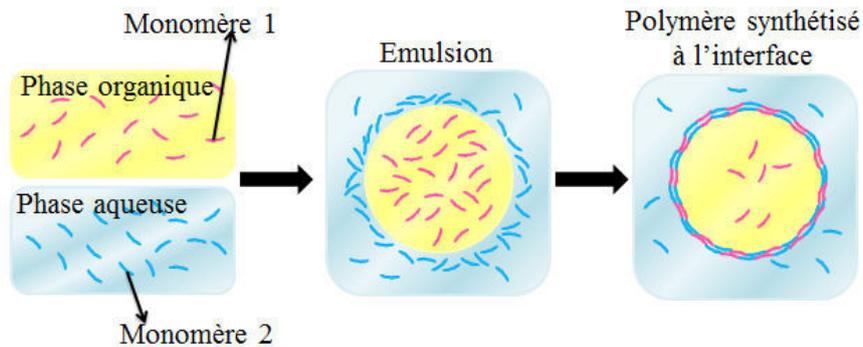
3.1.3. Réactions interfaciales

Dans ce cas particulier, le polymère constituant l'écorce de la NC est souvent synthétisé *in situ* lors d'un procédé de polymérisation confiné à l'interface liquide/liquide d'une émulsion. La polycondensation ou polyaddition interfaciale a par exemple été adaptée pour l'encapsulation de SAs hydrophiles [206] ou lipophiles [207]. Cette réaction met en jeu deux monomères réactifs, au moins bifonctionnels mais qui n'homopolymérisent pas, solubilisés chacun dans une des deux phases de l'émulsion (directe ou inverse) (Figure I- 22, a). La polycondensation se déroule alors à l'interface des deux phases créant ainsi la paroi de la NC.

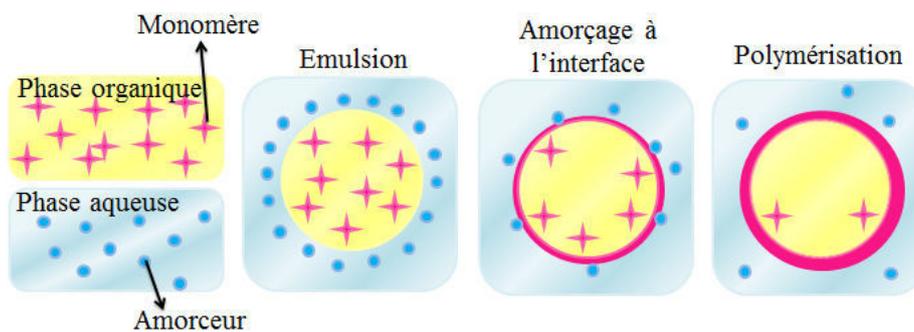
Une polymérisation en chaîne des monomères peut également être confinée à l'interface des nanogouttelettes et conduire à l'obtention de NCs à cœur liquide. Pour cela, deux stratégies ont été employées. D'une part, la localisation de la polymérisation à l'interface est favorisée par l'incorporation d'un des composants clés du système de polymérisation (amorceur, catalyseur, etc...) dans la phase opposée à celle qui contient le monomère (Figure I- 22, b) [208]. D'une autre part, des tensioactifs portant des groupements réactifs lors de la polymérisation peuvent être employés à la fois pour stabiliser l'émulsion et réagir durant la polymérisation à l'interface : par exemple amorçage à partir de l'interface [209]. Ces tensioactifs réactifs seront détaillés dans le Paragraphe 3.2.3.

Finalement, dans quelques cas, il ne s'agit pas de polymérisation mais de réaction entre deux polymères réactifs préformés. Ainsi, des réactions de chimie « click » de type azoture/alcyne (comme celles décrits dans la section 2.3) peuvent avoir lieu à l'interface d'une émulsion et conduire à l'obtention d'une NC [210]–[212] (Figure I- 22, c).

a) Polyaddition interfaciale



b) Polymérisation en chaîne interfaciale



c) Chimie « click » interfaciale

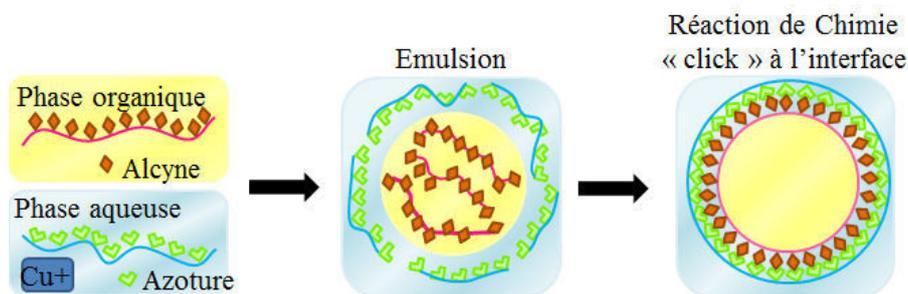


Figure I- 22 : Différentes stratégies de fabrication de NCs par des réactions à l'interface liquide/liquide d'une émulsion.

Par rapport aux procédés de ségrégation de phases décrits dans le paragraphe 3.1.1, l'utilisation de réactions confinées à l'interface d'une émulsion offre un meilleur contrôle de la morphologie

cœur-écorce des objets finaux. Les gouttelettes de l'émulsion jouent en fait un rôle de template mou à partir duquel l'écorce polymère est construite [213].

Après cet aperçu général des différentes techniques d'obtention de NCs, nous allons nous intéresser plus en détail à la polymérisation en miniémulsion qui est par ailleurs la méthode choisie pour l'élaboration de nos objets. Ensuite, nous présenterons les différents travaux portant sur l'élaboration de NPs (NSs et NCs) par polymérisation en chaîne localisée à l'interface d'une miniémulsion à l'aide de tensioactifs réactifs.

3.2. POLYMERISATION EN MINIEMULSION

3.2.1. Principe

La polymérisation en miniémulsion est une technique classique d'obtention de NPs (NSs et NCs) qui consiste à polymériser une dispersion de nanogouttelettes de monomères. Elle présente l'avantage de permettre l'incorporation de SAs et la formation de NPs en une seule étape, avec une grande efficacité d'encapsulation [214], [215]. Les NPs obtenues par ce procédé, s'il est maîtrisé, présentent des distributions de tailles idéalement étroites, comprises entre 50 et 500 nm [195], [216], [217]. Selon le type de miniémulsion utilisée, directe (huile-dans-eau, O/W) ou inverse (eau-dans-huile, W/O), des NCs à cœur huileux ou aqueux peuvent être formulées. Dans le cas de NCs à cœur huileux, les nanogouttelettes sont obtenues initialement par la dispersion d'une phase organique contenant le mélange monomère/huile dans une phase aqueuse contenant le tensioactif, grâce à un apport d'énergie important (homogénéisateur à haute pression ou ultrasons) (Figure I- 23) [216].

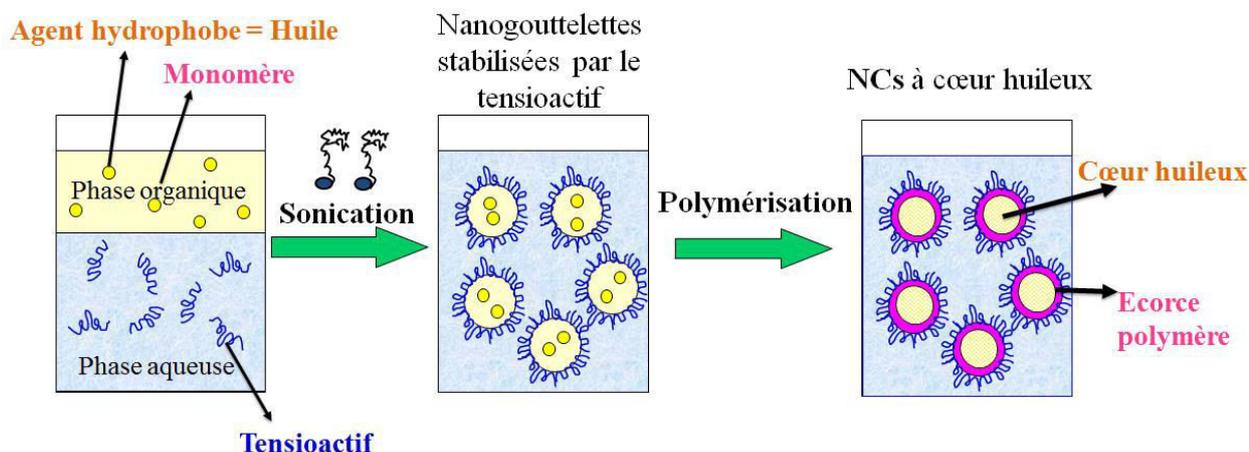


Figure I- 23 : Elaboration de NCs à cœur huileux par polymérisation en miniémulsion.

La taille finale des nanogouttelettes ainsi que leur stabilité colloïdale pendant la polymérisation est déterminée par la quantité et la nature du tensioactif utilisé pour limiter le phénomène de coalescence. De plus, un composé très peu soluble dans la phase continue (appelé hydrophobe ou co-stabilisant) est ajouté dans la phase organique dispersée afin de limiter le mûrissement d'Oswald, c'est-à-dire la diffusion de monomère entre différentes gouttelettes (Figure I- 24) [217]. La différence de pression de Laplace qui existe entre des gouttelettes de diamètres différents provoque effectivement une migration du monomère des petites gouttelettes vers les grosses gouttelettes. L'agent hydrophobe permet de contrebalancer la pression de Laplace, puisqu'il génère une pression osmotique au sein de la phase dispersée qui s'oppose à celle de Laplace. Un couple stabilisant/co-stabilisant adéquat permet donc d'obtenir une distribution de taille finale de NCs analogue à celles des gouttelettes de monomère au départ [218], [219]. L'utilisation de l'hexadécane (HD) comme agent hydrophobe est souvent reportée. Quelques travaux privilégient les triglycérides d'acides gras (comme ceux présentés dans le Tableau I- 7, Paragraphe 2.6) afin d'obtenir des objets biocompatibles [215], [220], [221].

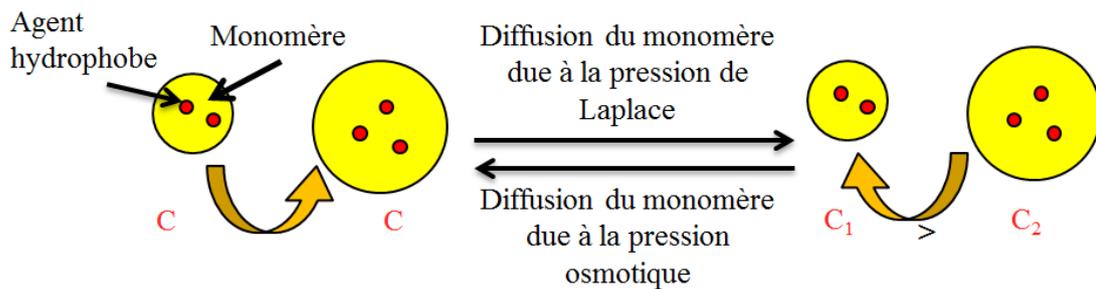


Figure I- 24: Utilisation d'un agent hydrophobe pour limiter le mûrissement d'Oswald.

Dans le but d'obtenir des NCs à cœur huileux par polymérisation en miniémulsion, on peut utiliser, comme agent hydrophobe, l'huile qui constituera le cœur des NCs finales, [220], [222]. Dans ce cas, le cœur liquide et l'écorce des NCs peuvent se former par ségrégation de phases durant la polymérisation. Mais pour cela, le monomère doit être soluble dans l'huile, alors que celle-ci ne doit pas dissoudre le polymère qui se formera par polymérisation. La précipitation du polymère se produit alors au fur et à mesure de la polymérisation, au-delà d'une certaine conversion en monomère. En fin de polymérisation, le tensioactif stabilisant la miniémulsion se trouve à la surface de NCs. Il influencera les propriétés de surface des objets finaux et leur stabilité colloïdale lors d'éventuelles applications ultérieures, par exemple, lors de leur injection en milieu physiologique.

Lors d'une polymérisation en miniémulsion, il est préférable que la nucléation des particules ait principalement lieu au sein des nanogouttelettes (nucléation hétérogène) préalablement obtenues par émulsification, afin que les NPs finales soient une copie la plus conforme possible en terme de taille des nanogouttelettes du départ. Dans ce cas, la nucléation homogène (c'est-à-dire dans la phase continue) ou micellaire (c'est-à-dire à l'intérieur des micelles de tensioactif) doivent idéalement être limitées voire inexistantes dans le milieu réactionnel [223]. Cette spécificité de la polymérisation en miniémulsion facilite l'incorporation des SAs au cœur de NPs par rapport à d'autres procédés de polymérisation en milieu dispersé tels que la polymérisation en émulsion. Dans ce dernier cas, l'encapsulation nécessite le transport de la SA à partir des gouttelettes réservoirs de monomère jusqu'aux particules en croissance, à travers la phase aqueuse. De plus, la prédominance de la nucléation hétérogène (c'est-à-dire au sein des nanogouttelettes) pendant la polymérisation en miniémulsion, peut faciliter le confinement de certains processus chimiques à l'interface liquide/liquide (par exemple si des tensioactifs réactifs sont utilisés, voir Paragraphe 3.2.3), afin de mieux maîtriser la morphologie cœur-écorce des objets finaux. Un autre avantage de la polymérisation en miniémulsion est la production de dispersions de NPs à fort taux en solide.

Plusieurs types de polymérisation peuvent être mis en œuvre dans un procédé en miniémulsion : radicalaire, cationique, anionique, polycondensation, polyaddition [217], [224]. La polymérisation radicalaire en chaîne est la plus souvent utilisée et elle a permis par exemple la fabrication de NCs à base de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) [214], [215], [221], [225], polystyrène (PS), poly(méthacrylate de méthyle-co-styrène) (poly(MMA-co-Sty)) [226], poly(MMA-co-acrylate de butyle) (poly(MMA-co-BA)) [227] et poly(MMA-co-acide acrylique) (poly(MMA-co-AA)) [227].

3.2.2. Problèmes de contrôle de la morphologie des objets

Dans le cas où la formation des NCs résulte d'un phénomène de ségrégation de phases au cours d'un procédé de polymérisation en miniémulsion, plusieurs problèmes de contrôle de la morphologie des objets peuvent être rencontrés [194]. La ségrégation de phases entre le polymère et l'huile lors d'une polymérisation (ou lors de la précipitation d'un polymère préformé à l'interface) est en effet un processus complexe, influencé à la fois par des paramètres thermodynamiques et cinétiques [195], [228]. D'un point de vue thermodynamique, on peut considérer un système à trois phases (polymère/huile/eau) dont l'état d'équilibre est régi principalement par les tensions interfaciales entre les différentes phases : polymère/eau,

polymère/huile et huile/eau [229]. Ainsi, ces tensions interfaciales doivent être judicieusement ajustées afin de favoriser l'obtention de la morphologie cœur-écorce. D'après la théorie de Torza et Mason [230], trois configurations sont thermodynamiquement possibles (Figure I- 25, a-c): encapsulation totale (morphologie cœur-écorce), encapsulation partielle (morphologie de double hémisphère) voire non-encapsulation dans le cas extrême où l'huile et le polymère forment deux phases complètement distinctes.

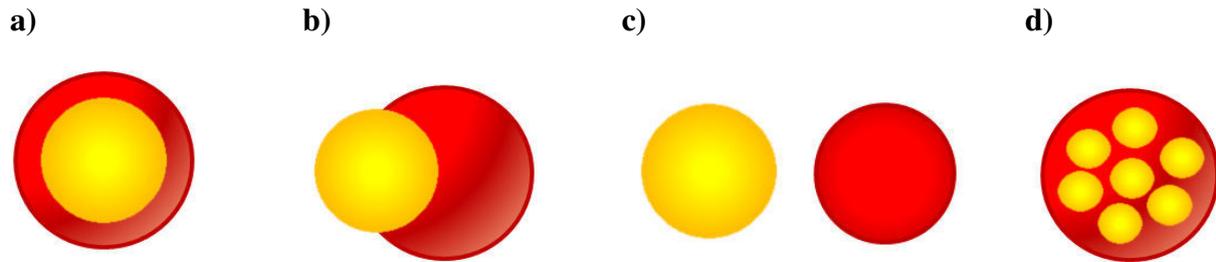


Figure I- 25 : Possibles morphologies des objets lors d'une ségrégation de phases : a) cœur-écorce, b) double hémisphère c) gouttelette d'huile et particule polymère séparées, d) matrice polymère polynucléaire.

Des paramètres tels que la polarité du polymère, le type de tensioactif et la nature de l'huile peuvent modifier les tensions interfaciales du système et donc déterminer la morphologie majoritaire [231]. En général, pour des NCs à cœur huileux l'augmentation du caractère hydrophile du polymère qui constitue l'écorce semble favoriser l'obtention d'une morphologie cœur-écorce tandis que l'utilisation d'un polymère très hydrophobe tel que le PS conduit majoritairement à des particules [195]. La copolymérisation en miniémulsion du styrène avec le MMA, l'acide acrylique (AA) [231] et l'acide méthacrylique (MAA) [232], en présence d'HD comme agent hydrophobe/cœur huileux, a permis l'obtention préférentielle des objets cœur-écorce, mais une fraction plus ou moins importante des objets à double hémisphère et/ou des particules a été toujours observée. En revanche, en utilisant uniquement le MMA comme monomère, Tiarks et al. [231] ont pu synthétiser des NCs bien définies par polymérisation en miniémulsion. Dans ce cas, la différence de polarité entre l'huile et le polymère est assez importante pour promouvoir la formation des NCs. L'épaisseur de l'écorce PMMA a également été modulée en ajustant le ratio HD/MMA. Shirin-Abadin et al. [233] ont pour leur part étudié la copolymérisation en miniémulsion du MMA avec des monomères de différente polarité : l'acrylate de 2-éthylhexyle (co-monomère très hydrophobe) et le MAA (co-monomère très hydrophile) toujours en présence d'HD. Ils ont observé que l'augmentation de l'hydrophobie ou l'hydrophilie de l'écorce polymère via l'utilisation de grandes quantités de co-monomères était

défavorable à l'obtention des NCs par rapport à l'emploi du MMA seul (Figure I- 26). Trouver une polarité optimale de l'écorce semble donc un paramètre crucial pour le contrôle de la morphologie des NCs finales.

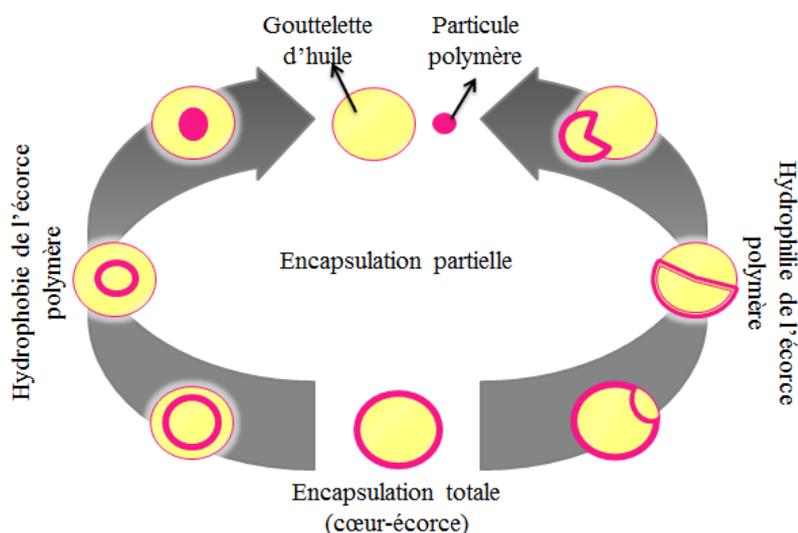


Figure I- 26 : Influence de la polarité de l'écorce polymère sur la morphologie des objets finaux. Inspirée de [233].

La concentration et la nature du tensioactif employé pour stabiliser la miniémulsion peuvent aussi influencer la morphologie finale des objets. Tiarks et al. [231] ont montré qu'une augmentation importante de la tension interfaciale PMMA/eau (grâce à la diminution de la quantité du tensioactif anionique docétyl sulfate de sodium (SDS)) favorise l'obtention des objets à double hémisphère et des fragments de capsules. Dans la même étude, les auteurs ont trouvé que ni le Lutensol AT 50 (un tensioactif non-ionique dérivé du POE), ni le chlorure de cétyltriméthylammonium (un tensioactif cationique) ni le copolymère à blocs POE₃₀-b-PS₃₀ ne conviennent à la fabrication de NCs de PMMA. Au contraire, l'utilisation du POE₃₀-b-PS₃₀ semble favoriser la formation de NCs à écorce PS par rapport aux systèmes employant le SDS.

La nature de l'huile employée est également un facteur à considérer. Par exemple, Romio et al. [215], [234] ont montré que la polymérisation en miniémulsion du MMA en présence des triglycérides d'acides caprique et caprylique (Miglyol®812 et Neobee M-5) conduit à la formation préférentielle d'une morphologie cœur-écorce (70-80% des objets). Dans ces systèmes, la tension interfaciale huile/eau est suffisamment supérieure à la tension polymère/eau pour favoriser le contrôle de la morphologie. Au contraire, une très faible proportion de NCs de morphologie bien définie sont observées lors de l'utilisation de l'huile de ricin [235]. Ceci a été

attribué à la présence de groupements hydroxyle dans la structure de cette dernière huile qui lui confèrent un caractère plus hydrophile.

D'un point de vue cinétique, la vitesse et l'efficacité de la ségrégation de phases dépendent de la mobilité des chaînes polymères [236]. Lors de la polymérisation, la viscosité au sein des nanogouttelettes/nano-objets augmente graduellement avec la consommation du monomère. Lorsque la viscosité est faible (faible conversion en monomère), les chaînes polymères sont assez mobiles pour migrer vers l'interface. Au contraire, une viscosité élevée constitue une barrière à la diffusion des chaînes polymères et limite donc la ségrégation de phases. Le contrôle de la morphologie de NCs lors d'une polymérisation en miniémulsion est donc lié à la compétition entre la vitesse de séparation de phase et la vitesse de polymérisation [233]. La cinétique de polymérisation devrait idéalement être contrôlée pour permettre une ségrégation de phases progressive et ainsi éviter l'obtention des morphologies indésirables comme par exemple une matrice polymère polynucléaire (Figure I- 25, d) [228].

Pour mieux contrôler la morphologie des NCs obtenues lors d'une polymérisation en miniémulsion, on peut penser à confiner la polymérisation à l'interface en plus d'une simple séparation de phases entre le polymère qui constituera l'écorce de la NC et le cœur liquide. L'utilisation des tensioactifs réactifs peut par exemple favoriser ou permettre exclusivement la formation du polymère à l'interface liquide/liquide afin de réduire les difficultés liées à la diffusion de chaînes polymères de l'intérieur vers l'interface des gouttelettes/nano-objets.

3.2.3. Tensioactifs réactifs

Les tensioactifs réactifs sont des tensioactifs qui servent à stabiliser les gouttelettes de la miniémulsion mais qui portent également des groupements réactifs lors d'une polymérisation. Tout en conservant leur rôle comme stabilisants de la miniémulsion, ils peuvent alors participer à la polymérisation comme amorceurs (inisurfs pour « initiators » et « surfactants ») [237]-[238], comme agents de transfert (transurfs pour « transfer agents » et « surfactants ») [239]- [240] ou comme monomères (surfmers pour « surfactants » et « monomers ») [241], [242] selon leur structure chimique.

Dans le cas d'une polymérisation en milieu dispersé, les tensioactifs réactifs présentent un avantage par rapport à des tensioactifs classiques. Après polymérisation, ces derniers sont seulement adsorbés à la surface de l'objet obtenu et risquent d'être désorbés dans des conditions

physiologiques. Les tensioactifs réactifs, quant à eux, restent liés à l'objet de façon covalente, ce qui augmente la stabilité des nano-objets obtenus [241].

L'utilisation combinée de la polymérisation en miniémulsion, d'un tensioactif réactif et d'une technique de polymérisation radicalaire par désactivation réversible (PRDR) telle que la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) ou la polymérisation par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (Polymérisation RAFT) semble encore plus intéressante pour l'obtention de NCs bien définies (les techniques de PRDR, en particulier la polymérisation RAFT, feront l'objet du paragraphe 4). Le tensioactif réactif peut permettre de faciliter la formation d'une écorce polymère en périphérie de l'objet en localisant la polymérisation exclusivement ou quasi-exclusivement à l'interface des nanogouttelettes (Figure I- 27) : si le groupement réactif est un amorceur ou un agent de transfert, la polymérisation a lieu à partir des groupements réactifs situés sur le tensioactif et l'écorce polymère croît à partir de l'interface. De plus, la PRDR peut permettre de contrôler les paramètres macromoléculaires du polymère qui constituera l'écorce. Ceci est particulièrement attractif dans le cas de la vectorisation d'une SA puisque contrôler l'épaisseur de l'écorce polymère de la NC devrait idéalement permettre de moduler la cinétique de libération de cette substance.

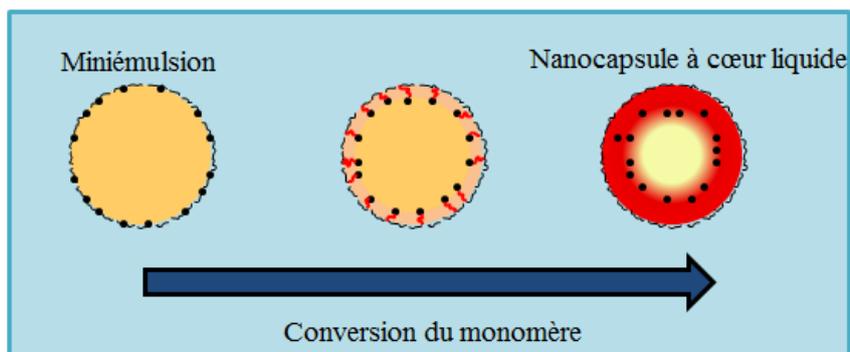


Figure I- 27 : Formation d'une nanocapsule lors de la polymérisation en miniémulsion directe d'un monomère vinylique à partir d'un tensioactif réactif. Les chaînes noires représentent le tensioactif réactif, les points sont les groupements réactifs et les chaînes rouges correspondent au polymère qui formera l'écorce. Inspirée de [243].

Compte-tenu de cette analyse, les surfmers ne paraissent intéressants que s'ils copolymérisent avec un deuxième monomère solubilisé en phase organique et que cette copolymérisation a lieu à l'interface. C'est pourquoi, nous nous sommes volontairement limités, dans cette recherche bibliographique, au cas des inisurfs et des transurfs utilisés pour mener une PRDR à l'interface liquide/liquide d'une miniémulsion. En revanche, nous avons considéré les travaux conduisant

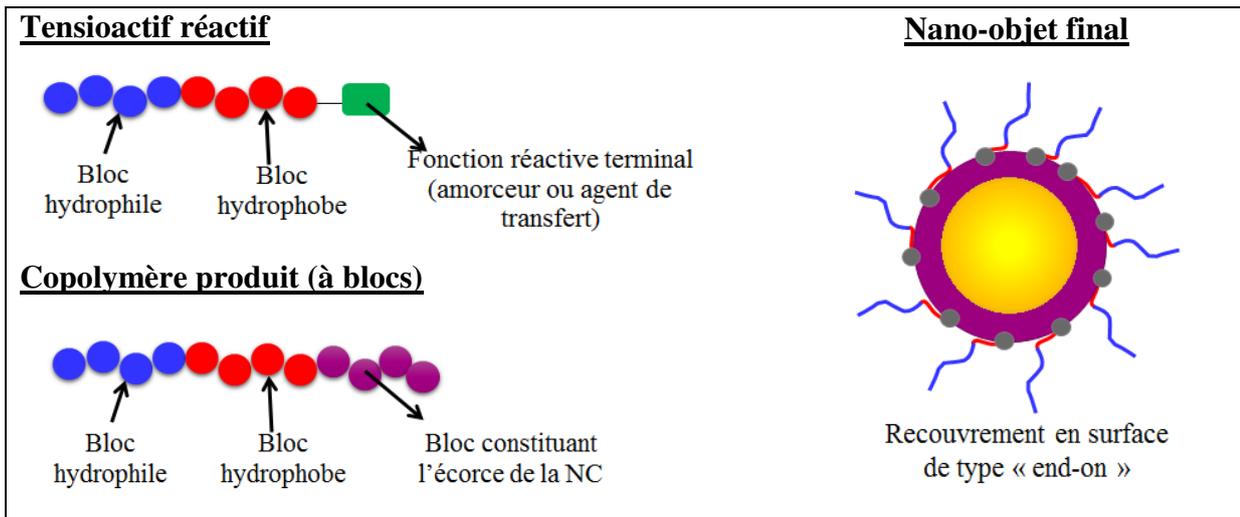
aussi bien à la fabrication de NSs que de NCs. La série d'exemples présentés ici est, à notre connaissance, exhaustive. Elle ne concerne que les polymérisations ATRP ou RAFT.

Environ une trentaine de travaux portent sur la fabrication de NPs par ATRP (Tableau I- 9) ou polymérisation RAFT (Tableau I- 10) en miniémulsion directe en présence d'un tensioactif réactif. Ces tensioactifs réactifs (inisurfs ou transurfs) sont en général des copolymères amphiphiles à blocs [238], [239] ou aléatoires [244], [245] qui possèdent un seul site amorceur (chloré ou bromé capable d'amorcer l'ATRP-AGET (activateurs générés par transfert d'électrons)) ou agent de transfert RAFT terminal (Figure I- 28, a). Les copolymères produits lors de la polymérisation présentent alors une structure linéaire multi-blocs et, au final, des NSs ou NCs (à cœur huileux) avec un recouvrement en surface de type « end-on » (voir paragraphe 2.5.2) sont obtenues. A notre connaissance, le LCPM a été la première et seule équipe à reporter l'utilisation d'un inisurf portant plusieurs sites amorceurs répartis sur sa chaîne pour mener une polymérisation interfaciale en miniémulsion. Cet inisurf était un dérivé du dextrane obtenu par modification chimique avec des groupements phénoxy et des groupements type ester bromé (voir Tableau I- 9, lignes 4 et 9). Ce macroamorceur multifonctionnel a été utilisé pour la fabrication de NSs [237] et de NCs [222] de PBA et PMMA respectivement. Dans ce cas, des copolymères greffés ont été obtenus et les objets finaux présentent un recouvrement de dextrane en surface en configuration « side-on » (Figure I- 28, b).

Mis à part notre travail sur la fabrication de NCs à écorce PMMA, cœur en Miglyol[®]810 et recouvrement en dextrane (Tableau I- 9, ligne 9), aucune des études de la littérature (Tableau I- 9 et Tableau I- 10) ne reporte à notre connaissance la formulation de NCs à cœur liquide huileux biocompatible. L'HD, le nonadécane, la cyclohexanone et le cyclohexane figurent parmi les co-stabilisants/cœur liquides les plus employés. Dans certains cas, ce cœur liquide est enlevé après polymérisation pour obtenir de NCs creuses [246].

Seuls deux travaux relatent l'utilisation des objets finaux pour l'encapsulation et la libération d'un anticancéreux. D'une part, Tian et al. [246] ont fabriqué des NCs PEGylées à écorce PAA réticulée par ATRP-AGET en miniémulsion en utilisant un inisurf. Il s'agissait d'un inisurf bromé, à blocs PEG et poly(acrylate de tert-butyle), présentant un groupement folate terminal (Tableau I- 9, ligne 8). Ce groupement folate devrait *a priori* permettre un ciblage actif des tumeurs. L'inisurf a été utilisé pour polymériser l'acrylate de tert-butyle (tBA) en miniémulsion. Les NCs ainsi obtenues ont été dialysées et ensuite hydrolysées dans un mélange dichlorométhane/acide trifluoroacétique afin de transformer les unités tBA en unités hydrophiles

a) Cas des tensioactifs réactifs monofonctionnels



b) Cas des tensioactifs réactifs multifonctionnels

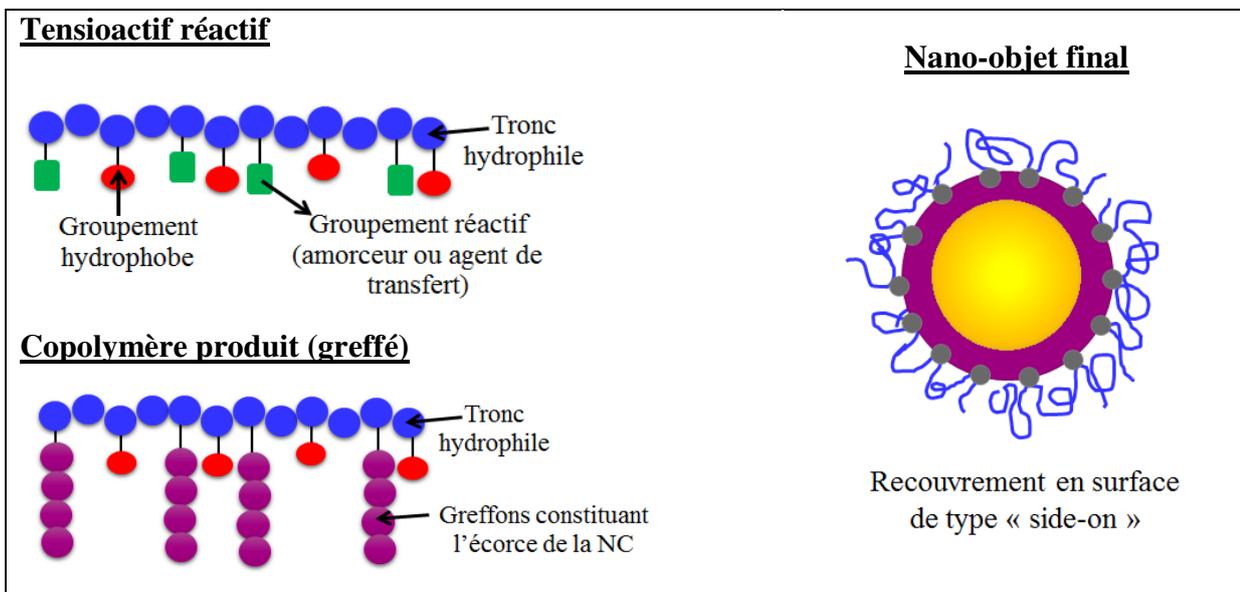


Figure I- 28 : Différentes structures de tensioactifs réactifs utilisés pour la fabrication de NCs par polymérisation interfaciale en miniémulsion. Configuration du recouvrement des objets finaux.

AA. L'écorce PAA résultant présentait un caractère pH sensible. Pour des $pH > 4,3$, les groupements acide carboxylique du PAA s'ionisent pour donner des anions carboxylate qui, par des répulsions électrostatiques, provoquent l'augmentation de la taille des NCs (de 350 nm ($pH=4$) à 550 nm ($pH=9$)). Ces NCs pH-sensibles ont ensuite été chargées en DOX par imprégnation grâce aux interactions électrostatiques entre la fonction amine de la DOX et les groupements carboxyliques du PAA. Le taux d'encapsulation et l'efficacité d'encapsulation ont été estimés à 40% et 99%, respectivement. Le relargage de la DOX a été modulé par le pH et une

libération plus rapide en milieu acide a été observée. De plus, ces auteurs ont choisi de réticuler l'écorce par un agent de réticulation portant des liaisons disulfure afin de favoriser la libération de la DOX au sein des cellules cancéreuses. Ainsi, la rupture de ces liaisons disulfure via l'utilisation d'un agent réducteur tel que le glutathion, présent au sein des cellules, renforce la libération de la DOX en milieu acide (voir Paragraphe 2.4). Finalement, des études préliminaires ont montré que les NCs étaient potentiellement biocompatibles. Pour cela, le caractère non cytotoxique de ces NCs a été évalué sur des cellules d'hépatome humain HepG2. D'une autre part, Wang et al. [247] ont préparé des NPs à cœur PS et écorce PDMAEMA à partir d'un transurf de type PDMAEMA-RAFT (Tableau I- 10, ligne 4). Au contraire du travail précédent où l'encapsulation de la SA a été réalisée après la fabrication des objets, la SA (indométacine) a dans ce cas été dissoute dans la phase organique de la miniémulsion pour être encapsulée lors du procédé de polymérisation. Cependant, le taux d'encapsulation est limité à 13 % massique. Ces NCs se sont avérées potentiellement biocompatibles (test sur la lignée cellulaire cancéreuse Hela) et sensibles au CO₂. La densité de l'écorce PDMAEMA diminuait sous l'effet d'un bullage de CO₂ dans le milieu. Ceci était dû à la protonation des groupements amine du PDMAEMA provoquée par la formation de H₂CO₃ dans l'eau. Lorsque le CO₂ était enlevé du milieu grâce à un bullage de N₂, l'écorce PDMAEMA redevient plus compacte. Ces phénomènes de protonation/déprotonation en présence/absence de CO₂ ont été utilisés pour moduler la cinétique de libération de l'indométacine.

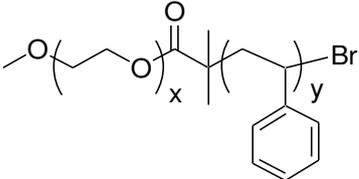
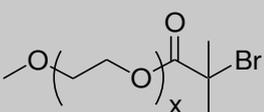
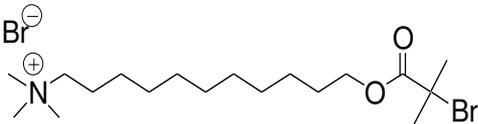
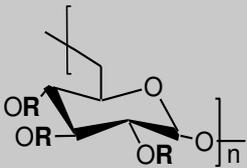
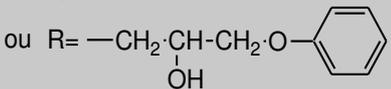
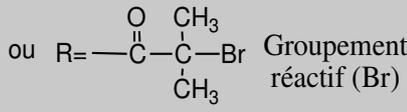
D'autres auteurs se sont intéressés à la fabrication de NPs PEGylées fluorescentes à base de monomères de BODIPY¹³, susceptibles d'être utilisées en imagerie [248], [249] (Tableau I- 10, ligne 6). Ces NPs ont été fabriquées à partir d'un macroagent RAFT hydrophile de type PEG-b-PAA-RAFT. Ce macroagent RAFT a été dans un premier temps employé pour copolymériser le styrène et le monomère dérivé du BODIPY (dérivé porteur d'une fonction méthacrylate, acrylate ou styrène) en masse, afin d'obtenir un macroagent-RAFT amphiphile à trois blocs (PEG-b-PAA-b-poly(styrène-co-BODIPY)-RAFT). Après 70 minutes de réaction à 80 °C (conversion d'environ 16%), cette copolymérisation a été stoppée par immersion du système dans un bain glacé. Puis, de l'eau a été ajoutée et le milieu a été émulsifié à l'aide des ultrasons pour obtenir des nanogouttelettes de monomère stabilisées par le macroagent RAFT. La polymérisation a été réamorcée et des NPs composées d'un cœur en poly(styrène-co-BODIPY) et d'une écorce en PEG-b-PAA ont été obtenues. Ces NPs étaient 40-2000 fois plus brillantes que les quantum dots

¹³ BODIPY est l'abréviation de bore-dipyrométhène, et correspond à une famille de colorants, stables dans des conditions physiologiques, qui absorbent fortement dans l'UV et qui ont la propriété d'émettre une fluorescence étroite avec un rendement quantique important.

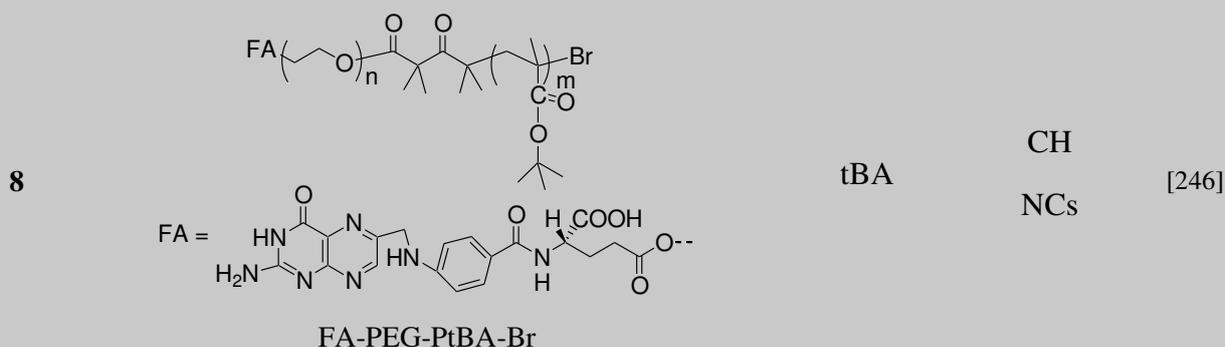
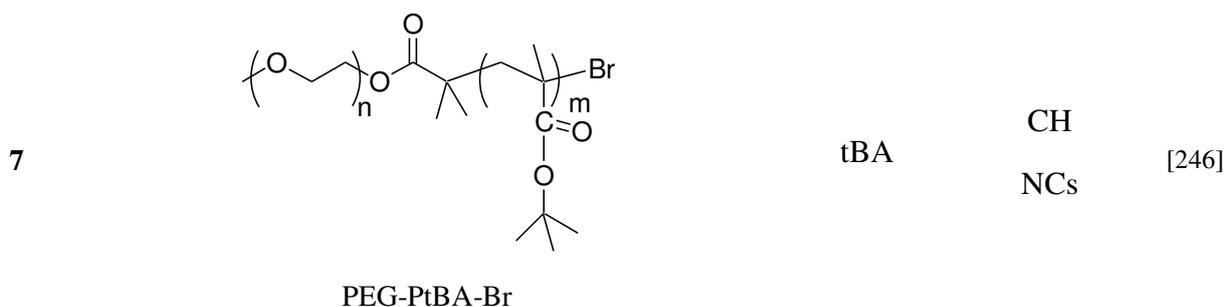
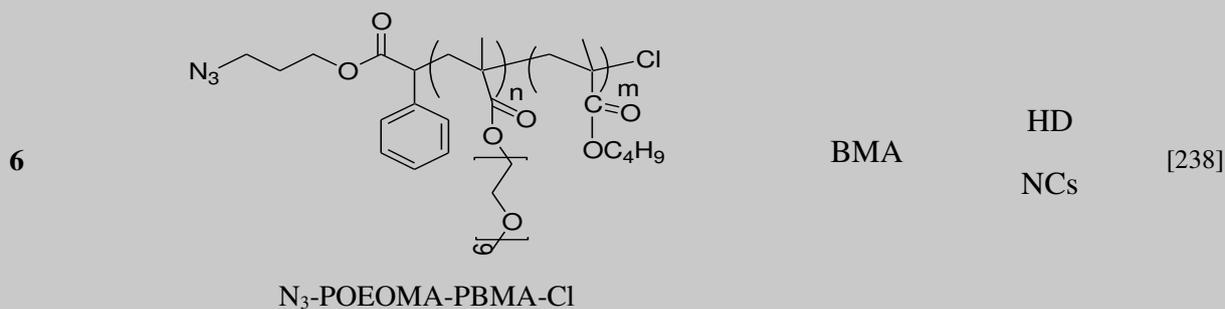
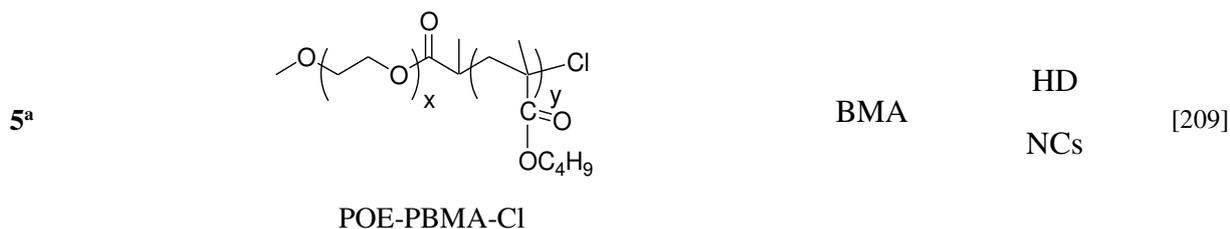
classiques, et 40-300 fois plus brillantes que d'autres particules polymères reportées dans la littérature.

Les polymères fluorés sont aussi des matériaux à haute valeur ajoutée du fait de leurs propriétés remarquables : faible indice de réfraction, haute perméabilité à l'oxygène et au CO₂, répulsion à l'eau et à l'huile, stabilité chimique et thermique. Ainsi, des NCs ou NSs à base de ces polymères peuvent potentiellement être utilisées comme vecteurs d'oxygène ou pour la fabrication des membranes de piles à combustible. Chen et al. [245] ont par exemple reporté l'élaboration de NCs à écorce poly(acrylate de dodécafluoroheptyle) (PDFHA) réticulée, par polymérisation RAFT en miniémulsion en présence d'un transurf poly(MAA-co-PDFHA)-RAFT (Tableau I- 10, ligne 15). Après polymérisation, le cœur liquide composé d'HD ou d'un mélange HD/acétate d'hexyle a été remplacé par du THF, solvant qui peut être facilement retiré par évaporation, afin d'obtenir des NCs creuses. Les auteurs ont montré la nécessité de confiner la polymérisation à l'interface liquide/liquide pour favoriser l'obtention des objets à morphologie cœur-écorce. En présence du transurf, 95% des objets étaient des NCs. En revanche, une formation préférentielle de particules pleines irrégulières a été observée lors de la polymérisation radicalaire conventionnelle du DFHA en miniémulsion, menée en présence de SDS comme tensioactif. D'après les auteurs, le PDFHA est plus hydrophobe que le mélange HD/acétate d'hexyle et en conséquence, la morphologie cœur-écorce n'est pas la morphologie thermodynamiquement favorable. De plus, l'utilisation d'un agent de réticulation provoque la formation de réseaux polymères de mobilité limitée qui ne peuvent pas migrer à l'interface. Ces inconvénients sont contournés en confinant la polymérisation à l'interface grâce à l'utilisation du transurf. Finalement, les auteurs ont ajusté l'épaisseur des NCs en faisant varier le ratio massique monomère/cœur liquide. Néanmoins, pour des ratios monomère/cœur liquide faibles, c'est-à-dire lorsqu'une écorce plus mince était visée, des objets déformés ont été obtenus. Dans ces conditions, l'ajout d'une quantité plus importante d'agent de réticulation a été nécessaire pour améliorer la résistance mécanique de l'écorce et assurer la formation de NCs bien définies.

Tableau I- 9 : Fabrication de NPs par ATRP-AGET en miniémulsion en présence d'inisurfs.

| N° | INISURF (Macroamorceur et tensioactif) | Monomère | Agent Hydrophobe | Ref. |
|--------------------|--|------------------|---------------------|-----------------|
| NANOSPHERES | | | | |
| 1 |  <p style="text-align: center;">POE-b-PS-Br</p> | BA Sty BMA | HD | [250], [251] |
| 2 |  <p style="text-align: center;">POE-Br</p> | BA | HD | [251] |
| 3 |  | MMA | HD | [252] |
| 4 | <p style="text-align: center;">Dérivé amphiphile du dextrane (DexPBr)</p>  <p>ou R=H ou R=  Groupement hydrophobe (P)</p> <p>ou R=  Groupement réactif (Br)</p> | BA | HD | [237] |

NANOCAPSULES



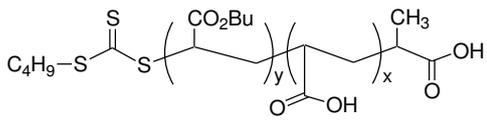
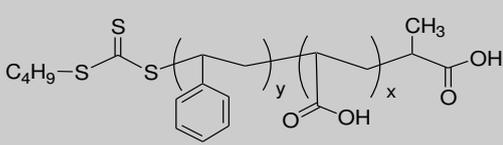
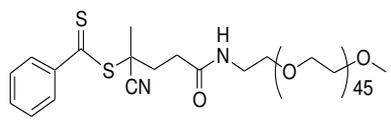
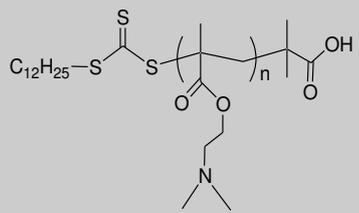
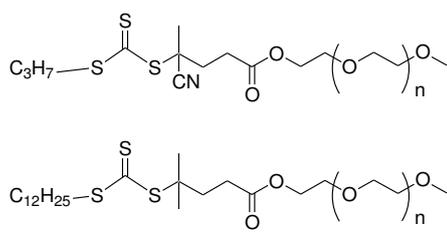
- **Polymères** : poly(oxyle éthylène)-POE, polystyrène-PS, dextrans-Dex, poly(méthacrylate de butyle)-PBMA, poly(méthacrylate d'oligo (oxyde éthylène) méthyl éther)-POEOMA, poly(acrylate de tert-butyle)-PtBA.

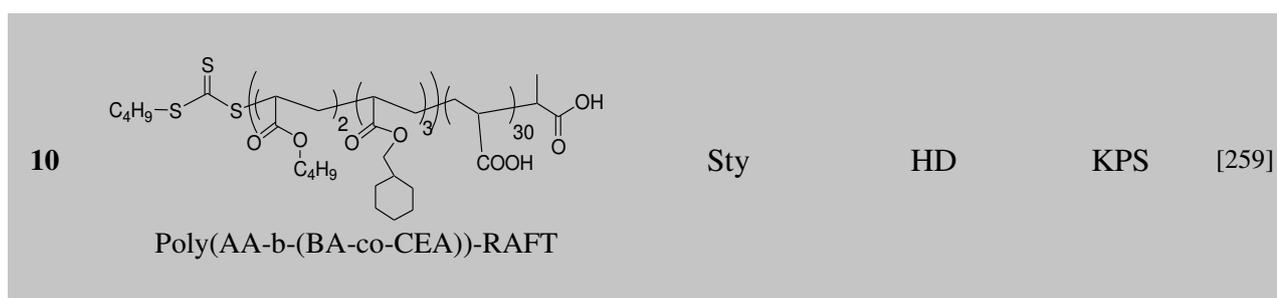
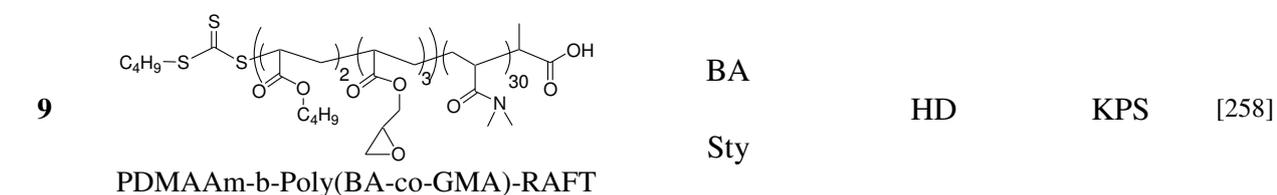
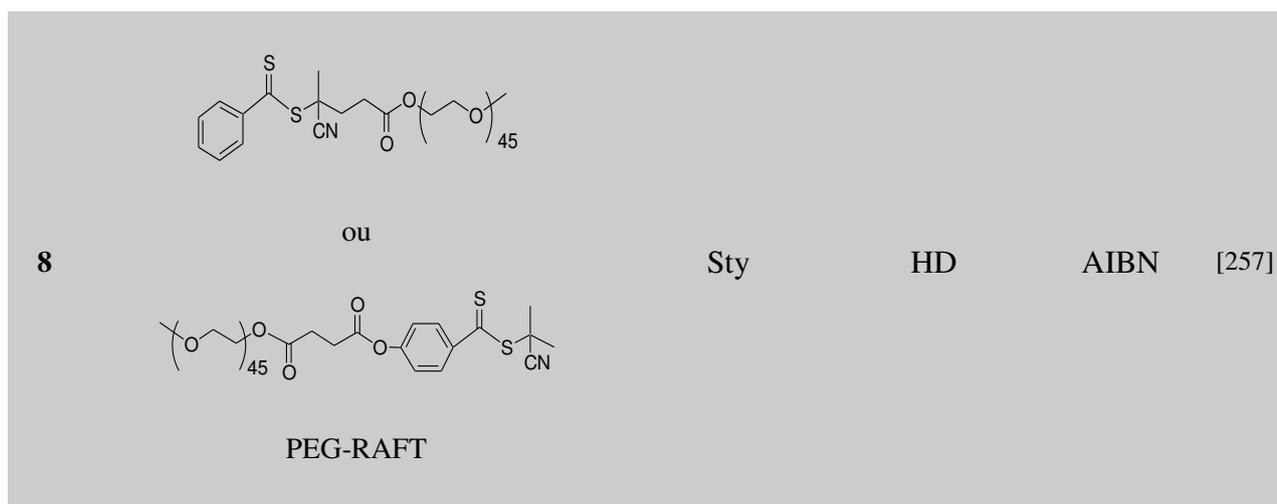
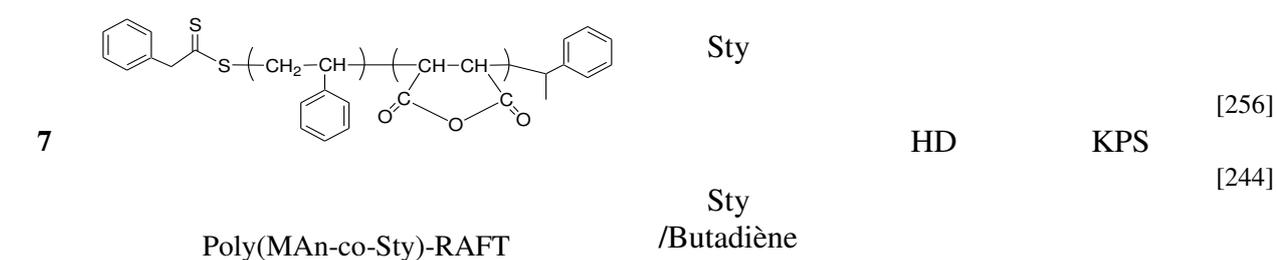
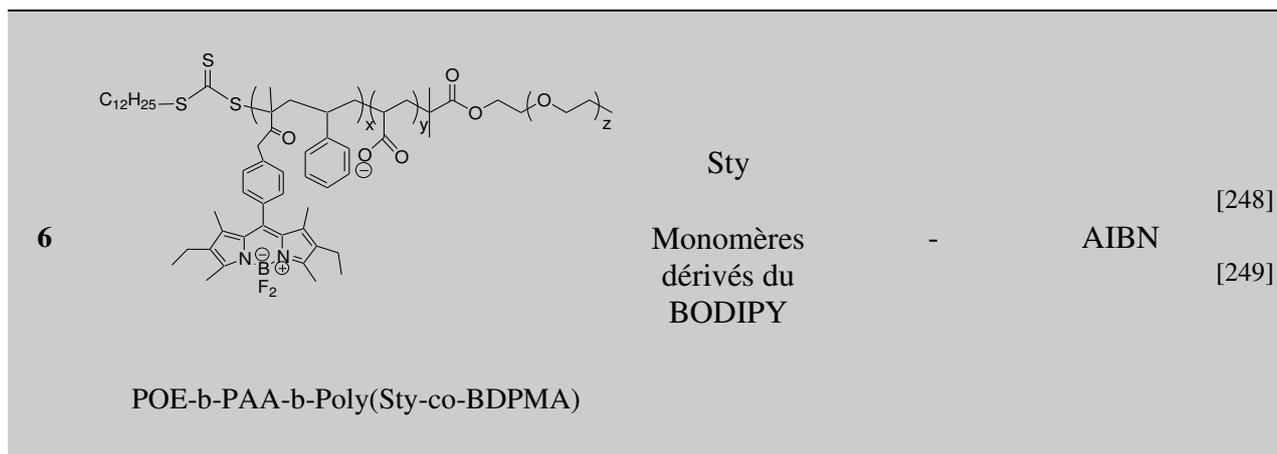
- **Monomères** : méthacrylate de butyle-BMA, acrylate de butyle-BA, styrène-Sty, acrylate de tert-butyle-tBA, méthacrylate de méthyle-MMA.

- **Huiles et/ou agent hydrophobe**: cyclohexanone-CH, hexadécane-HD, Miglyol[®]810-M810.

- **Autres** : Acide folique-FA

Tableau I- 10: Fabrication de NPs par polymérisation RAFT en miniémulsion directe en présence de transurfs.

| N° | TRANSURF (macroagent RAFT et tensioactif) | Monomère | A. Hydrophobe | Amorceur | Ref. |
|--------------------|--|----------|------------------|---------------|----------------|
| NANOSPHERES | | | | | |
| 1 |  <p>Poly(AA-b-BA)-RAFT</p> | BA | - | V-501 | [239] |
| 2 |  <p>Poly(AA-b-Sty)-RAFT</p> | Sty | - | V-501 AIBN | [239] [253] |
| 3 |  <p>POE-RAFT</p> | Sty | HD | AIBN KPS | [240] |
| 4 |  <p>PDMAEMA-RAFT</p> | Sty | Cyclohexane | AIBN | [247] [254] |
| 5 |  <p>POE-RAFT</p> | Sty | HD | AIBN | [255] |



NANOCAPSULES

| | | | | | |
|-------------------------|--|------|---|------|---------------------|
| 11 | | Sty | ND HD | KPS | [260] – [262] |
| Poly(MAn-co-Sty)-RAFT | | | | | |
| 12 | | Sty | HD | KPS | [263] |
| Poly(AA-b-Sty)-RAFT | | | | | |
| 13 | | Sty | ND | AIBN | [264] |
| Poly(MAA-co-Sty)-RAFT | | | | | |
| 14* | | Sty | Paraffine ($T_f=25^\circ\text{C}$) | AIBN | [265] |
| Poly(MAA-co-MMA)-RAFT | | | | | |
| 15* | | DFHA | HD HD + Acétate d'hexyle | AIBN | [245] |
| Poly(MAA-co-PDFHA)-RAFT | | | | | |

- **Polymères** : poly(oxyde éthylène)-POE-PEG, poly(méthacrylate de N,N-diméthylaminoéthyle) - PDMAEMA, poly(acrylate de dodécafluoroheptyle)-PDFHA, poly(acide acrylique)-PA poly(N,N-diméthylacrylamide)-PDMAAm.

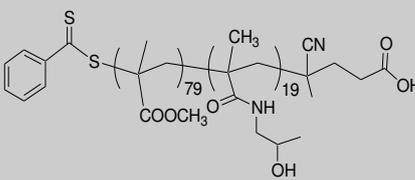
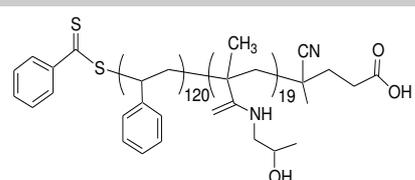
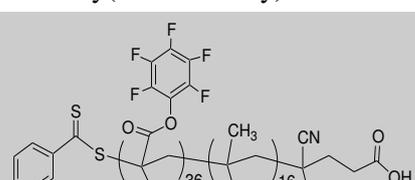
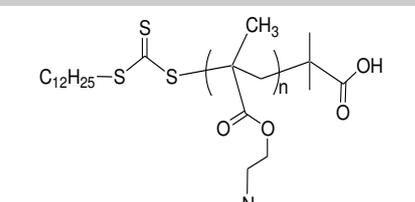
- **Monomères** : acide acrylique-AA, acrylate de butyle-BA, styrène-Sty, anhydride maléique-MAn, méthacrylate de glycidyle-GMA, acrylate de cyclohex-3-enyl méthyle-CEA, acide méthacrylique-MAA, acrylate de dodécafluoroheptyle-DFHA, méthacrylate de méthyle-MMA, 2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-(méthacryloyloxy)phényl)-1,3,5,7-tétraméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-BDPMA- (méthacrylate de BODIPY).

- **Huiles et/ou agent hydrophobe**: hexadécane-HD, nonadécane-ND.

- **Amorceurs** : persulfate de potassium-KPS, 2,2-azobisisobutyronitrile-AIBN, acide 4,4'-azobis(4-cyanopentanoïque)-V-501.

* Le cœur liquide a été enlevé après fabrication des objets afin d'obtenir de NCs creuses.

Tableau I- 11 : NCs à cœur aqueux polymérisation RAFT en miniémulsion inverse en présence de transurfs.

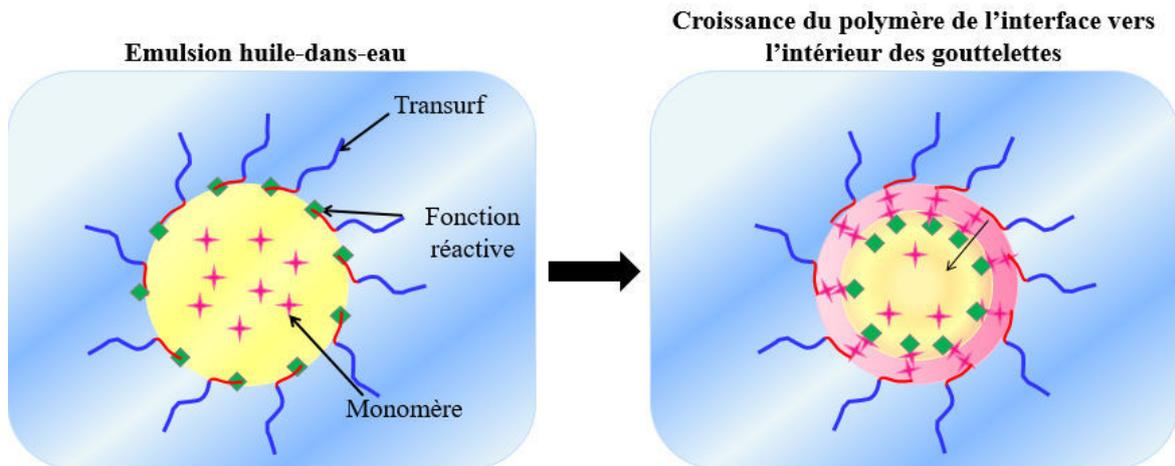
| N | TRANSURF (macroagent RAFT et tensioactif) | Monomère | Phase continue (co-stabilisant) | Amorceur | Ref. |
|---|---|----------|---|----------|----------------|
| 1 |  Poly(HPMA-b-MMA)-RAFT | MMA | Toluène (NaCl) | AIBN | [266] [267] |
| 2 |  Poly(HPMA-b-Sty)-RAFT | Sty | Toluène Toluène/n- hexane (NaCl) | AIBN | [267] [268] |
| 3 |  Poly(HPMA-b-PFPMA)-RAFT | PFPMA | Toluène (NaCl) | AIBN | [194] |
| 4 |  Poly(DMAEMA) | MAA | Cyclohexane | APS | [269] |

- **Monomères** : N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide-HPMA, Acide acrylique-AA, styrène-Sty, méthacrylate de pentafluorophényle-PFPMA, méthacrylate de méthyle-MMA,
 - **Amorceurs** : 2,2-azobisisobutyronitrile-AIBN, persulfate d'ammonium-APS

Plus récemment, Stenzel et ses collaborateurs ont reporté l'utilisation des transurfs monofonctionnels pour confiner la polymérisation à l'interface de nanoémulsions eau-dans-huile (Tableau I- 11 ci-dessus, lignes 1-3) [194], [266]-[268]. Des NCs à cœur aqueux ont ainsi été synthétisées. Au contraire d'une polymérisation RAFT interfaciale en miniémulsion directe où la croissance des chaînes polymères a lieu de l'interface vers l'intérieur des gouttelettes (Figure I- 29, a), dans une miniémulsion inverse la polymérisation se déroule dans la phase continue (qui contient le monomère) et les gouttelettes d'eau servent de templates mous à proprement parler

(Figure I- 29, b). Cette approche semble intéressante pour l'encapsulation de SAs hydrophiles dans le cœur aqueux. En effet, aucune réaction chimique n'a lieu à l'intérieur des gouttelettes (réservoirs de la SA) ce qui réduit le risque de dégradation de la SA lors de la fabrication des nano-objets. Néanmoins, dans ce cas, les objets finaux présentent une écorce hydrophobe non-recouverte, ce qui peut limiter leur utilisation *in vivo* en raison des risques de reconnaissance par le système immunitaire (voir Paragraphe 2.5.2).

a) Miniémulsion directe



b) Miniémulsion inverse

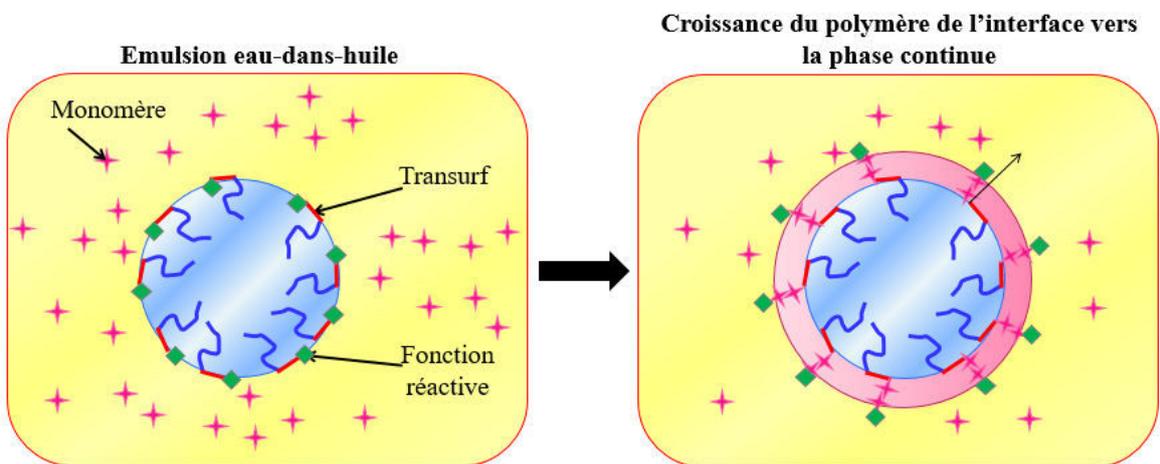


Figure I- 29 : Croissance des chaînes polymères et formation de NCs à partir de transurfs lors d'une polymérisation en miniémulsion a) directe ou b) inverse.

4. POLYMERISATIONS RADICALAIRES PAR DESACTIVATION REVERSIBLE (PRDR)

La polymérisation radicalaire classique est l'une des techniques les plus employées dans l'industrie. Ceci est notamment dû sa grande facilité de mise en œuvre : faibles contraintes expérimentales, grande variété de monomères disponible, large gamme de températures et solvants utilisables. Néanmoins, la présence importante de réactions de terminaison et de transfert limite la fabrication de polymères de structures bien définies : masses molaires contrôlées, faible dispersité, architecture contrôlée et fonctionnalité spécifique [270].

Les polymérisations radicalaires par désactivation réversible (PRDR) (précédemment connues sous l'appellation de « polymérisations radicalaires contrôlées ») permettent de lever les difficultés de la technique classique et rendent possible le contrôle efficace des paramètres macromoléculaires des polymères synthétisés. Ceci permet d'envisager la synthèse d'objets d'architectures très variées et complexes. Dans le paragraphe suivant, nous présenterons des généralités sur les PRDR, puis, après une brève description de l'ATRP nous présenterons en détail la polymérisation RAFT.

4.1. PRINCIPE

Les PRDR reposent sur la protection des radicaux en croissance afin d'augmenter leur durée de vie. Ceci est possible grâce à l'incorporation dans le milieu réactionnel d'une espèce capable de piéger réversiblement ces radicaux. Le radical est alors transformé momentanément en une espèce « dormante » non active (étape de désactivation) qui peut revenir à son état initial (étape d'activation) en redonnant le radical dont elle est issue (Schéma I- 4) Ainsi, la concentration instantanée en centres actifs dans le milieu est réduite par rapport au cas d'une polymérisation radicalaire classique, ce qui permet de limiter les réactions de transfert et de terminaison et d'accroître la durée de vie des centres actifs.

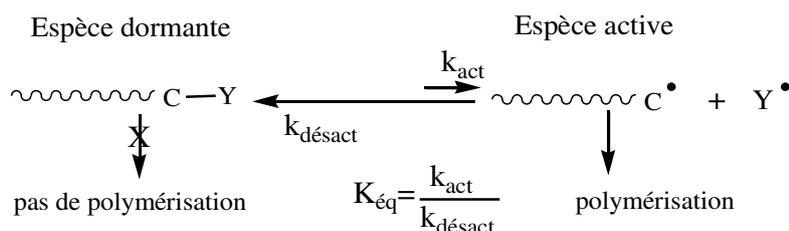


Schéma I- 4 : Principe du contrôle d'une PRDR.

Idéalement dans une PRDR, les chaînes macromoléculaires doivent : i) être toutes créées très rapidement en début de polymérisation, ii) croître ensuite simultanément selon une succession de cycles d'activation-désactivation et, iii) donner des polymères finaux de faible dispersité. Pour ce faire, l'amorçage ainsi que l'échange entre les espèces actives et dormantes doivent être plus rapides que la propagation.

Au niveau expérimental, la polymérisation est dite « contrôlée » lorsque les trois caractéristiques suivantes sont observées [271], [272] :

- Une évolution linéaire du $\ln([M]_0/[M]_t)$ avec le temps ($[M]_0$ et $[M]_t$ représentent respectivement les concentrations initiale et instantanée en monomère). Ceci traduit la conservation des centres actifs au cours de la polymérisation (état quasi-stationnaire). Un écart à l'idéalité est constaté lorsque l'amorçage est lent devant la propagation ou lorsque des réactions de transfert ou de terminaison irréversibles surviennent (Figure I- 30, a).
- De même, si le nombre des chaînes en croissance reste constant, le degré de polymérisation moyen en nombre des polymères \bar{X}_n devrait être directement proportionnel au taux de conversion (Figure I- 30, b).
- Finalement, la dispersité des chaînes polymères doit rester assez faible: $D < 1,2$.

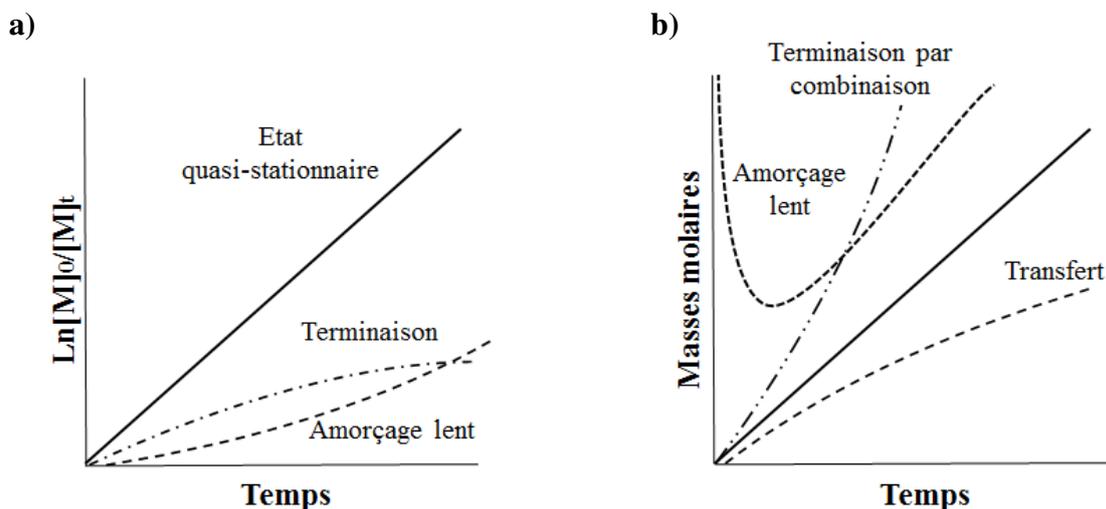


Figure I- 30 : Influence de la terminaison, de l'amorçage lent et du transfert sur (a) la cinétique de polymérisation, (b) l'évolution des masses molaires en fonction de la conversion.

4.2. POLYMERISATION RADICALAIRE CONTROLÉE PAR TRANSFERT D'ATOME (ATRP)

Parmi les différentes techniques de PRDR, l'ATRP a été largement utilisée au LCPM afin d'élaborer des glycopolymères greffés à dorsale dextrane en milieu homogène [273], [274] et plus récemment pour fabriquer des NPs recouvertes de dextrane par polymérisation en miniémulsion à partir d'inisurfs dérivés du dextrane [222], [225], [237] (voir Paragraphe 3.2.3).

Le contrôle de cette polymérisation repose sur la présence d'un radical persistant stabilisé et activé par la présence d'un catalyseur métallique [271]. Il s'agit d'un mécanisme d'oxydoréduction dans lequel la réduction par clivage homolytique d'un composé halogéné (R-Br) par un complexe d'un métal de transition ($\text{Cu}^{\text{I}}\text{Br}/\text{L}^{\text{m}}$) conduit à l'obtention d'un radical (R^\bullet) et d'un complexe métallique oxydé porteur d'un halogène supplémentaire ($\text{Cu}^{\text{II}}\text{Br}_2/\text{L}^{\text{m}}$). Le caractère réversible de cette réaction permet au catalyseur métallique de revenir à son état initial d'oxydation (Schéma I- 5).

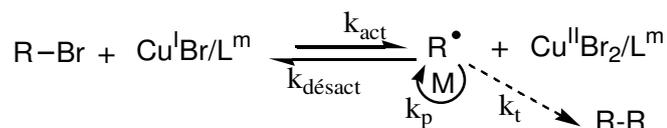


Schéma I- 5 : Equilibre réversible permettant le contrôle de l'ATRP.

L'ATRP permet une grande liberté dans les techniques d'amorçage, mais l'amorçage AGET (activateurs générés par transfert d'électrons) est le plus adapté à des réactions de polymérisation en miniémulsion. Cette technique permet de générer le $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Br}$ *in situ*, à partir du $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Br}_2$ introduit dans le milieu réactionnel hétérogène qui est alors plus facile à manipuler car moins sensible à l'oxydation, notamment par l'oxygène de l'air. Le $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Br}_2$ est réduit par un agent réducteur tel que l'acide ascorbique.

L'ATRP présente cependant l'inconvénient d'utiliser des catalyseurs à base de cuivre qu'il est nécessaire d'enlever après polymérisation, notamment dans le cas d'une application biomédicale. C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes rapidement tournés vers la polymérisation RAFT. Le paragraphe suivant fera l'objet d'une étude plus détaillée de cette technique.

4.3. POLYMERISATION RAFT

4.3.1. Principe

La polymérisation RAFT est une technique de PRDR dont le contrôle se fait via une réaction de transfert réversible. Les agents qui permettent ce contrôle présentent la structure générale du Schéma I- 6. L'agent RAFT (appelé ici CTA pour « chain transfer agent ») contient un groupe Z qui permet de stabiliser le CTA sous sa forme radicalaire, et un groupe R partant.

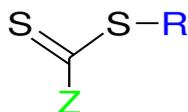


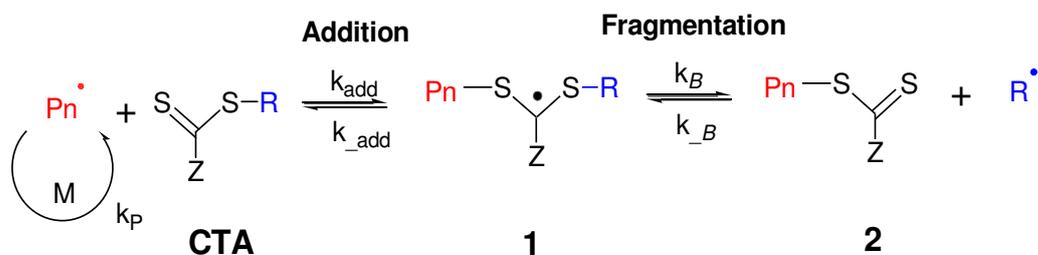
Schéma I- 6 : Structure générale de l'agent de transfert RAFT (CTA).

Le Schéma I- 7 présente le mécanisme détaillé et généralement accepté pour la polymérisation RAFT. Ce mécanisme a été proposé par le groupe « Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation » (CSIRO) qui a aussi prouvé la formation des radicaux intermédiaires (espèces 1 et 3 sur le Schéma I- 7) par résonance électronique de spin (RES) [275]. Un amorceur classique (par exemple le 2,2'-azobisisobutyronitrile - AIBN) est utilisé pour générer des radicaux qui amorcent la polymérisation (étape I) jusqu'à la formation d'oligomères radicalaires. Lors de l'étape II, ces oligomères réagissent avec la double liaison C=S du groupe thiocarbonyle du CTA pour donner un radical intermédiaire (espèce 1) qui peut ensuite se fragmenter soit pour régénérer les espèces initiales (le CTA et le macroradical P_n^\bullet) ; soit pour générer un macroagent RAFT oligomère (espèce 2) et un nouveau radical R^\bullet capable de réamorcer la polymérisation. Les chaînes polymères croissent grâce à l'addition du monomère sur ce nouveau radical R^\bullet (étape III) et vont s'échanger rapidement avec les espèces macroagent RAFT (espèce 2) lors de l'étape IV. Grâce à ce transfert, le groupe thiocarbonyle s'échange d'une chaîne active en croissance P_m^\bullet à une autre P_n^\bullet pour la désactiver. Mais, il peut aussi piéger deux chaînes actives simultanément pour former le macroradical intermédiaire qui est alors stable (1 sur le Schéma I- 7). Cet échange permettra d'assurer une concentration instantanée des chaînes en croissance (P_n^\bullet et P_m^\bullet) plus faible que celle des radicaux intermédiaires stabilisés (espèce 3) et donc de limiter les réactions de terminaison. Cependant, comme pour toute PRDR, les réactions de terminaison par recombinaison ou dismutation sont encore présentes, mêmes si elles sont rendues négligeables, et conduisent à la formation d'une faible proportion de chaînes mortes (étape V).

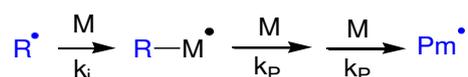
(I) Formation de radicaux à partir de l'amorceur moléculaire conventionnel (ex : AIBN) puis propagation



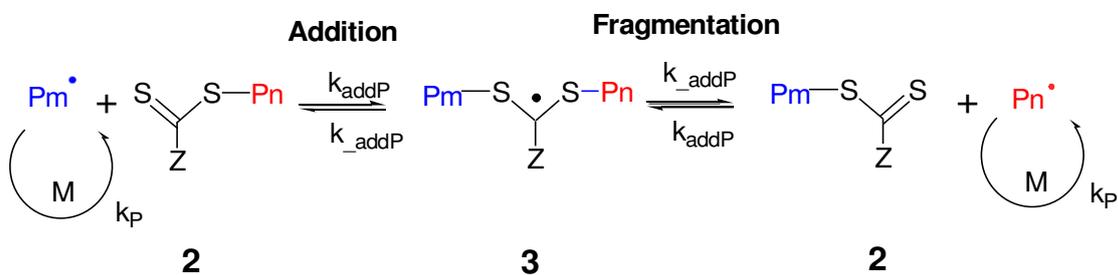
(II) Pré-équilibre. Transfert de chaîne réversible/propagation



(III) Réamorçage



(IV) Equilibre principal. Equilibration de chaînes/propagation



(V) Terminaison

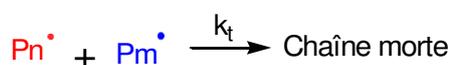


Schéma I- 7 : Mécanisme de la polymérisation RAFT proposé par le groupe CSIRO [276].

La technique RAFT permet de contrôler la polymérisation d'un grand nombre de monomères possédant des fonctionnalités variées. Il est possible de travailler en masse, en solution ou en milieu hétérogène (en émulsion, par exemple) [277], [278]. Par ailleurs, les polymères obtenus portent à leur extrémité la fonction thiocarbonylthio-Z, ce qui permet la synthèse ultérieure de copolymères à blocs mais aussi la fonctionnalisation des extrémités de chaînes par une fonction thiol.

4.3.2. Critères pour la sélection de l'agent RAFT (CTA).

En général pour que le contrôle de la polymérisation puisse être efficace en RAFT (voir Schéma I- 7), il faut tenir compte de certains critères [276], [279]:

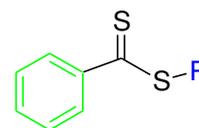
- Le CTA initial (Schéma I- 7) ainsi que les macroagents RAFT (espèce 2, Schéma I- 7) doivent avoir une liaison C=S très réactive.
- Les espèces radicalaires intermédiaires (espèces 1 et 3, Schéma I- 7) doivent se fragmenter rapidement et ne pas donner lieu à des réactions secondaires.
- L'intermédiaire 1 doit favoriser la formation des produits (espèces 2 et R•, Schéma I- 7). C'est-à-dire que la constante de vitesse de fragmentation (k_{β}) doit être supérieure à la constante de vitesse k_{add} .
- Les radicaux R• formés doivent réamorcer efficacement la polymérisation. Ainsi, la constante de vitesse de réamorçage (k_i) doit être supérieure à la constante de vitesse de propagation (k_p).

L'efficacité du CTA dépend de façon très importante de la nature de ses groupements Z et R, du monomère et des conditions de polymérisation [280]. En effet, le groupe Z est présent pour gouverner l'activité et la stabilité de la double liaison C=S en régissant sa vitesse d'addition sur la chaîne active. Par ailleurs, le groupe partant R présent au début de la polymérisation, doit être plus stable que le radical Pn• pour que la polymérisation puisse s'amorcer efficacement (pré-équilibre (II) déplacé vers la droite).

Les principaux types de CTA issus de la structure générale présentée dans le Schéma I- 6, sont énoncés ci-dessous:

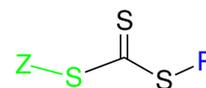
Dithiobenzoates **Z=Phényle** **R=groupe alkyle**

- Constantes de transfert très élevées.
- Sensibles à l'hydrolyse.
- Peuvent induire une période d'inhibition à haute concentration.



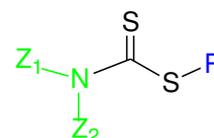
Trithiocarbonates **Z et R=groupe alkyle**

- Constantes de transfert élevées.
- Plus stables à l'eau par rapport aux dithiobenzoates.
- Période d'inhibition moins importante.



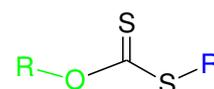
Dithiocarbamates **Z=NZ₁Z₂** **R=groupe alkyle**

- Réactivité déterminée par les groupes Z₁ et Z₂ sur l'azote.
- Efficace avec des monomères riches en électrons.



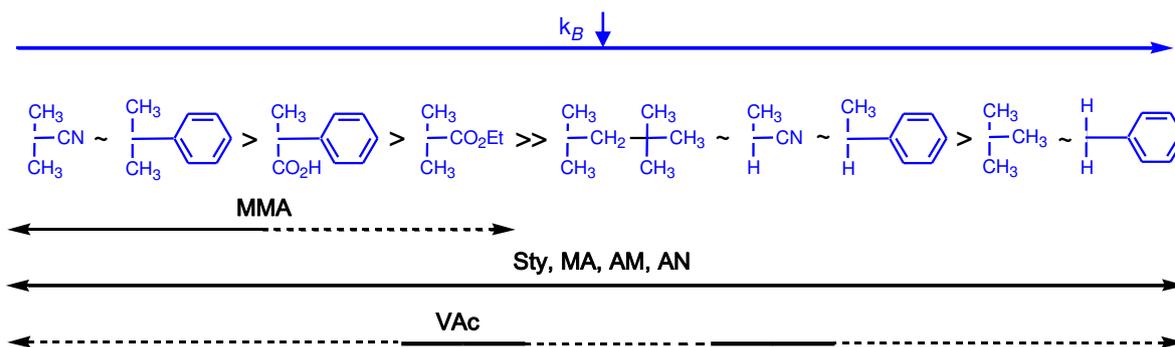
Xanthates (Polymérisation MADIX) **Z=OR** **R, R'=groupe alkyle**

- Faibles constantes de transfert.
- Plus efficaces avec des monomères moins réactifs.



La Figure I- 31 classe les groupes Z et R couramment utilisés selon leur vitesse de fragmentation (caractérisée par la constante de vitesse k_{β}) et indique leur capacité à contrôler la polymérisation de tel ou tel type de monomère. Le choix du CTA le plus convenable pour la polymérisation RAFT du MMA sera détaillé dans la partie II de ce manuscrit (Chapitre I Paragraphe 1.3.1). La Figure I- 31 met aussi en évidence la difficulté de synthétiser certains copolymères par polymérisation RAFT. Ainsi un agent RAFT efficace pour un certain monomère peut permettre la synthèse contrôlée d'un premier bloc mais si le deuxième monomère présente une réactivité différente, la croissance du second bloc peut s'avérer délicate. C'est par exemple le cas lorsque l'on cherche à produire un copolymère à partir d'un monomère parmi les plus actifs tel que le MMA et un monomère moins actif tel que l'acétate de vinyle (VAc) [281].

a) Groupement R



b) Groupement Z

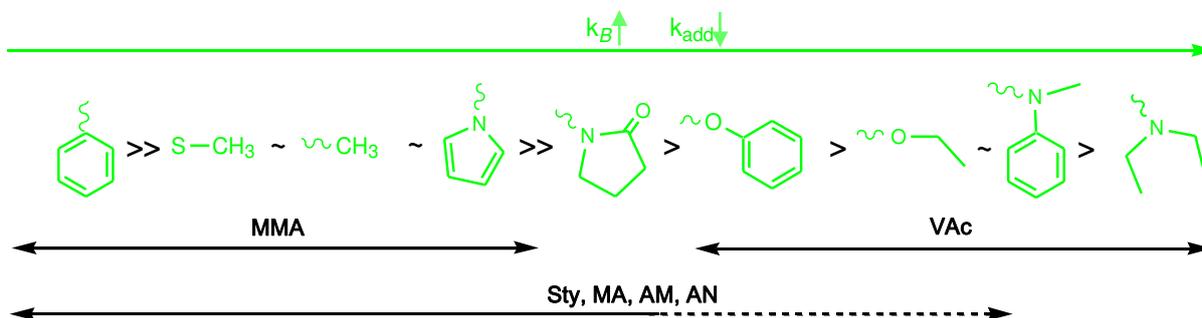


Figure I- 31 : Guide pour sélectionner les groupements R et Z du CTA pour la polymérisation RAFT de certains monomères. Pour R, la constante de vitesse de fragmentation (k_B) diminue de gauche à droite. Pour Z, la constante vitesse de fragmentation (k_B) augmente et celle d'addition (k_{add}) diminue de gauche à droite. La ligne pointillée indique un contrôle partiel de la polymérisation (par exemple bon contrôle de la masse molaire mais une grande dispersité). MMA=Méthacrylate de méthyle, Sty=Styrène, MA=Acrylate de méthyle, AM =Acrylamide, AN=Acrylonitrile, VAc=Acétate de vinyle [280].

4.3.3. Aspects cinétiques

4.3.3.1. Constantes de transfert

La vitesse de consommation du CTA dans l'étape de pré-équilibre (étape II, Schéma I- 7) dépend de deux constantes de transfert, $C_{tr} = k_{tr}/k_p$ et $C_{tr} = k_{tr}/k_p$ (avec k_p la constante de vitesse de propagation, k_{tr} la constante de vitesse de transfert de chaîne) qui décrivent la réactivité du radical propageant (Pn^\bullet) et du radical partant (R^\bullet) vis-à-vis des agents RAFT respectivement [279]. La constante de vitesse de transfert de chaîne (k_{tr}) peut être définie en tenant compte de la constante d'addition du CTA (k_{add}) et du coefficient de partage (Φ) (équation I- 1). Ce dernier coefficient Φ indique comment le radical intermédiaire (espèce 1, Schéma I- 7) se fragmente et se répartit entre les produits (espèce 2 et R^\bullet , Schéma I- 7) et les réactifs de départ (Pn^\bullet et espèce CTA, Schéma I- 7) selon l'équation I- 2.

Les constantes de transfert (C_{tr}) de différents composés portant la fonction thiocarbonyle varient de plusieurs ordres de grandeur (0,01-1000) en fonction des groupements Z et R et du monomère à polymériser [282]. L'évolution du degré de polymérisation (\bar{X}_n) et de la dispersité (\mathcal{D}) avec la conversion, pour différentes valeurs des constantes de transfert C_{tr} et C_{trP} , a été prédite à partir des équations proposées par Mueller et al. [282], [283]. Sans rentrer dans les détails du modèle utilisé, il apparaît que des constantes de transfert C_{tr} et C_{trP} supérieures à 10 sont nécessaires pour avoir un bon contrôle des masses molaires et de la dispersité respectivement (Figure I- 32).

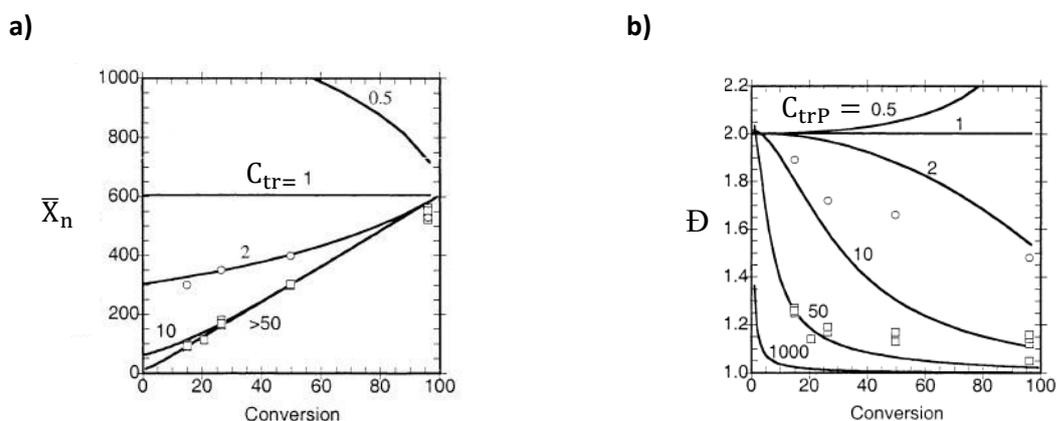


Figure I- 32 : Dépendance de l'évolution de a) \bar{X}_n et b) \mathcal{D} avec la conversion selon les valeurs des constantes de transfert de chaîne C_{tr} et C_{trP} , respectivement. Prédiction obtenues à partir des équations de Mueller et al. [282], [283] avec une concentration en espèces actives de 10^{-7} mol.L $^{-1}$ et un ratio monomère/CTA de 605. Valeurs expérimentales obtenues pour la polymérisation du méthacrylate de méthyle en présence des dithiobenzoates (avec $R=C(Me)_2Ph$ (\square) et $R=C(Me)_2CO_2Et$ (\circ)) à une concentration initiale de 0,0116 M.

4.3.3.2. Masses molaires moyennes en nombre

De façon générale, au cours d'une polymérisation RAFT, les chaînes polymères sont amorcées soit par un radical primaire I^\bullet issu de l'amorceur classique (étape I, Schéma I- 7), soit par le groupe partant R^\bullet provenant du CTA initial (étape II, Schéma I- 7). Ainsi, les masses molaires théoriques ($\bar{M}_{n\ th}$) peuvent être estimées grâce à l'équation I- 4 [279]:

$$\bar{M}_{n\ th} = \frac{[M]_0 x}{[CTA]_0 + df[A]_0(1 - e^{(-k_d t)})} M_{\text{monomère}} + M_{CTA} \quad \text{I- 4}$$

- $[M]_0$ = Concentration en monomère à t=0
- $[CTA]_0$ = Concentration en agent RAFT à t=0
- $[A]_0$ = Concentration en amorceur à t=0
- x = Conversion en monomère
- d = Proportion de chaînes produites par la terminaison de deux radicaux
- $M_{\text{monomère}}$ = Masse molaire du monomère
- M_{CTA} = Masse molaire de l'agent RAFT
- f = Efficacité de l'amorceur
- k_d = Constante de vitesse de dissociation de l'amorceur

Néanmoins, afin de garantir un bon contrôle des masses molaires et une distribution massique étroite, la plupart des chaînes polymères devraient être amorcées par le groupe R du CTA et non par les radicaux primaires I^\bullet issus de l'amorceur. C'est pourquoi, la polymérisation RAFT est en général menée avec un fort ratio CTA/Amorceur. Le ratio habituellement suggéré dans la littérature est d'environ 10 ou même supérieur [279]. Cependant, ce rapport doit souvent être adapté pour obtenir des cinétiques de polymérisation convenables. Si la proportion des chaînes polymères issues de l'amorceur classique est négligeable, les masses molaires devraient donc dépendre seulement du rapport initial monomère/CTA selon l'équation I- 5. Dans ce cas, \bar{M}_n évolue linéairement avec la conversion. Une déviation positive (masses molaires expérimentales supérieures aux masses théoriques) indique que le CTA n'a pas été complètement consommé, tandis qu'une déviation négative indique que la proportion de chaînes produites par l'amorceur classique n'est pas négligeable. Lorsque le rapport CTA/amorceur est faible, les $\bar{M}_{n\ th}$ doivent être calculées avec l'équation I- 4.

$$\bar{M}_{n\ th} = \frac{[M]_0 x}{[CTA]_0} M_{\text{monomère}} + M_{CTA} \quad \text{I- 5}$$

4.3.3.3. Effets de l'agent RAFT sur la cinétique de polymérisation

Si on considère le Schéma I- 7 (Paragraphe 4.3.1), les équilibres RAFT ne conduisent ni à la formation ni à la consommation de radicaux (comme c'est le cas pour toute réaction de transfert). C'est-à-dire qu'en l'absence de réactions secondaires, la concentration en espèces radicalaires propageantes reste inchangée par rapport à une polymérisation radicalaire conventionnelle. Une fois l'équilibre principal établi (étape IV, Schéma I- 7), le CTA devrait agir comme un agent de transfert idéal et, si la fragmentation et le réamorçage sont suffisamment rapides, sa présence dans le milieu ne doit pas modifier la vitesse de polymérisation, par rapport à celle d'une polymérisation radicalaire conventionnelle (équation I- 6). D'où :

$$R_p = -\frac{d[M]}{dt} = k_p[R^\bullet][M] \quad \text{I- 6}$$

R_p = Vitesse de polymérisation en absence de CTA

k_p = Constante de propagation.

$[R^\bullet]$ = Concentration en radicaux à l'instant t.

$[M]$ = Concentration en monomère à l'instant t

Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence des cinétiques de polymérisation RAFT qui ne suivent pas ce comportement idéal. Juste après l'avènement de la polymérisation RAFT, le groupe CSIRO a en effet observé que la vitesse de polymérisation (R_p), dans le cas des systèmes utilisant les dithiobenzoates comme agents de transfert, présentait un retard à la polymérisation [282]. Autrement dit, la vitesse de polymérisation diminuait avec l'augmentation de la concentration en CTA. Deux effets ont alors été identifiés:

- **Une période d'inhibition ou induction** : au début de la polymérisation, il y a une période où la vitesse de polymérisation est nulle.
- **Un retard** : La vitesse de polymérisation est réduite par rapport à celle d'un système qui ne contient pas un agent transfert.

Un exemple de polymérisation en masse de l'acrylate de méthyle à 80°C en présence de dithiobenzoate de cumyle (CDB) est donné à la Figure I- 33 [284]. Dans ce cas, les deux effets ont été mis en évidence et leur dépendance avec la concentration initiale du CTA est clairement visible.

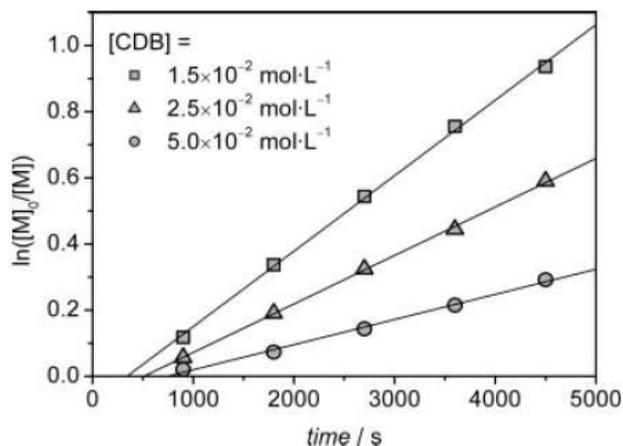


Figure I- 33 : Evolution du $\ln ([M]_0/[M])$ en fonction du temps. Polymérisation RAFT en masse de l'acrylate de méthyle en présence du CDB à différentes concentrations. Expériences menées à une température de 80 °C et $[AIBN]_0$ égale à 10 mM [284].

La période d'inhibition et le retard sont observés avec différents types d'agents RAFT, parmi lesquels figurent les trithiocarbonates et les dithioesters aliphatiques en raison de leurs grandes valeurs de C_{tr} . Cependant, ces deux effets se révèlent particulièrement marqués dans le cas des dithiobenzoates qui sont par ailleurs largement employés en polymérisation RAFT à cause de leur efficacité vis-à-vis d'un grand nombre de monomères. Ceci peut être attribué à la stabilisation du radical intermédiaire par le groupement phényle [285].

Les effets de retard sont en général attribués à : i) un réamorçage lent de la polymérisation par le radical R^\bullet (mauvais choix du CTA) [284], ii) un mauvais choix de l'amorceur [286], iii) des impuretés présentes dans le CTA, le monomère ou le milieu réactionnel [287], iv) la présence d'air ou d'oxygène dans le milieu réactionnel [288], v) les propriétés des radicaux intermédiaires (fragmentation lente, terminaison des radicaux intermédiaires avec eux-mêmes ou avec les espèces propageantes) [289], [290] ou vi) une combinaison de plusieurs de ces phénomènes. Les mécanismes expliquant le retard dans le cas des agents RAFT de type dithiobenzoate font l'objet de plusieurs publications [285], [291], [292]. La question du mécanisme précis reste ouverte malgré un nombre déjà important d'études dédiées à ce sujet.

4.3.4. Polymérisation RAFT en milieu hétérogène

Les procédés de polymérisation en milieu aqueux dispersé (suspension, émulsion, miniémulsion) offrent de nombreux avantages pour les industriels par rapport aux systèmes homogènes (masse, solution) : i) contrôle aisé de la température par échange de chaleur avec la phase continue qui sert de volant thermique, ii) faible viscosité du milieu réactionnel, iii) absence de solvant organique, iii) vitesses de polymérisation élevées, et iv) récupération en fin de réaction des polymères sous forme des particules micro ou nanométriques qui peuvent être directement utilisées dans de nombreux domaines.

Dans ce contexte, de nombreux chercheurs se sont récemment tournés vers la polymérisation RAFT en émulsion et en miniémulsion. Néanmoins, leurs premières tentatives se sont confrontées à plusieurs difficultés, principalement liées à l'étape de nucléation et à la répartition du CTA entre la phase continue et la phase dispersée. La série d'exemples qui suit n'est pas exhaustive mais permet d'illustrer les particularités des polymérisations RAFT en milieu hétérogène. Plusieurs revues dédiées à ce sujet sont disponibles dans la littérature [277], [278], [293]–[295].

4.3.4.1. Polymérisation en émulsion

La Figure I- 34 présente le mécanisme de nucléation d'une polymérisation RAFT en émulsion directe [296]. Dans un système en émulsion conventionnel, le tensioactif est introduit dans la phase aqueuse à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC) afin d'assurer la formation de micelles. L'amorçage a lieu dans la phase aqueuse et les oligoradicaux formés migrent progressivement vers les micelles gonflées en monomère pour y continuer leur croissance. Les micelles constituent donc le siège de la polymérisation et on parle alors d'une nucléation micellaire. Afin de réalimenter les micelles en monomère, ce dernier diffuse à partir des gouttelettes de monomère qui servent de réservoirs à travers la phase aqueuse. Dans le cas d'une polymérisation RAFT, un agent de transfert RAFT (généralement moléculaire) est aussi ajouté dans le milieu réactionnel. Ce CTA se trouve le plus souvent majoritairement dissous dans les gouttelettes de monomère et, en conséquence, doit aussi transiter par la phase aqueuse vers les micelles/particules pour y jouer son rôle d'agent de contrôle.

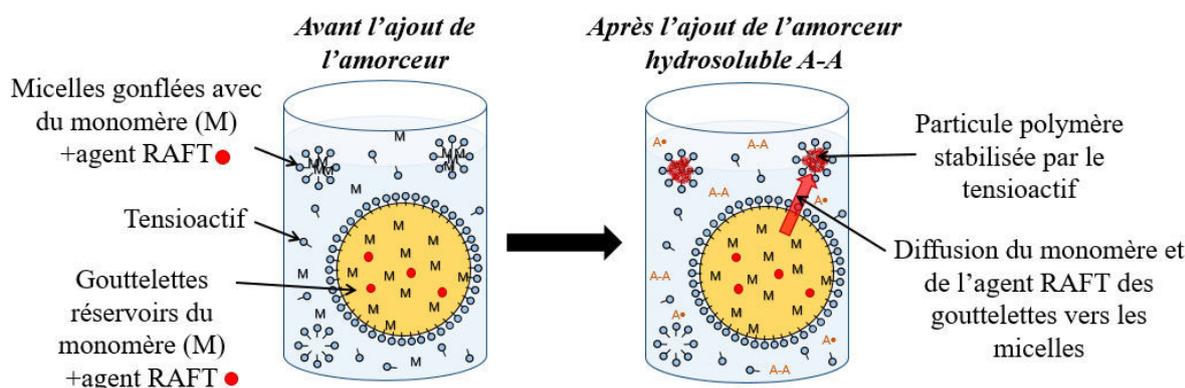


Figure I- 34 : Formation de NPs par polymérisation RAFT en émulsion.

Néanmoins, plusieurs auteurs ont observé que le caractère hydrophobe du CTA rend difficile sa diffusion vers les micelles/particules et qu'une partie de la polymérisation peut se dérouler directement dans les gouttelettes réservoirs du monomère [296], [297]. Ceci conduit à un mauvais contrôle (voire à une absence de contrôle) des masses molaires et des dispersités des polymères obtenus. Des effets de retard à la polymérisation ont également été observés et attribués à la sortie des radicaux R^\bullet (issus du CTA) de ces particules en croissance. En plus du caractère hydrophobe du CTA, sa réactivité (caractérisée par la constante de transfert C_{tr}) semble influencer le contrôle et l'étape de nucléation de la polymérisation en émulsion. Ainsi selon le type de CTA, diverses observations ont pu être faites [278]:

- Des CTA très hydrophobes et avec une faible C_{tr} n'influencent ni l'étape de nucléation ni la cinétique de polymérisation. Le même nombre de particules est obtenu en présence ou absence de CTA. En raison de leurs faibles C_{tr} , des chaînes polymères avec un \bar{X}_n important sont produites en début de polymérisation et peuvent former des particules assez rapidement. Par contre, en raison de la faible efficacité de transfert CTA/monomère, le contrôle des masses molaires s'avère difficile.
- Le caractère hydrophile des xanthates et de certains dithioesters est en général suffisant pour assurer leur diffusion à travers la phase aqueuse mais, en revanche, favorise la sortie des radicaux R^\bullet des particules. En raison de leurs faibles C_{tr} , les polymérisations en présence de ce type de CTA sont souvent menées en procédé semi-continu afin de favoriser les réactions de transfert par rapport à la propagation.
- Dans le cas des dithioesters qui possèdent une C_{tr} élevée et une certaine hydrophilicité, l'effet de retard et la perte de stabilité colloïdale sont favorisés. La vitesse des réactions

de transfert CTA/monomère provoque, en début de polymérisation, la formation de chaînes polymères très courtes incapables d'intervenir de manière appropriée à l'étape de nucléation.

Au final, une perte de stabilité colloïdale est aussi souvent observée dans de tels systèmes. Elle se traduit par l'apparition d'une phase organique à la surface de l'émulsion (constituée principalement par le CTA et des oligomères portant la fonction thiocarbonylthio) et/ou aux phénomènes de coagulation.

4.3.4.2. Polymérisation en miniémulsion

La transposition de la polymérisation RAFT aux systèmes en miniémulsion s'est en générale avérée plus efficace par rapport à celle en émulsion. En effet, dans un système en miniémulsion, la polymérisation se déroule directement dans les nanogouttelettes de monomère (voir Paragraphe 3.2) contenant aussi le CTA, ce qui limite les problèmes associés à la diffusion du CTA à travers la phase aqueuse.

Moad et al. [282] ont par exemple reporté la synthèse contrôlée du PS en miniémulsion en présence de dithiobenzoate de phényléthyle, de SDS et d'alcool cétylique comme CTA, tensioactif et co-stabilisant, respectivement. Un bon contrôle des \bar{M}_n , des \bar{D} inférieures à 1,2 et une bonne stabilité colloïdale ont été observés. Monteiro et ses collaborateurs [298] ont étudié la polymérisation en miniémulsion du Sty, du BMA et du méthacrylate de 2-éthylhexyle en présence de différents dithiobenzoates. Lorsque ces miniémulsions étaient stabilisées par des tensioactifs anioniques (SDS) ou cationiques (chlorure de cétyltriméthylammonium), les auteurs observaient une phase organique qui se séparait en surface de la miniémulsion juste après le démarrage de la polymérisation. Cette phase organique était principalement constituée par du monomère et par des chaînes polymères de faible \bar{X}_n . En revanche, des dispersions stables ont pu être obtenues en présence de tensioactifs non-ioniques tels que le Brij98 ou l'Igepal890. De plus, dans ce dernier cas, les \bar{D} étaient toujours inférieures à 1,4, et même en dessous de 1,1 en fin de polymérisation.

Luo et al. [299] ont proposé que la séparation d'une phase organique en surface de la miniémulsion est due à la forte proportion d'oligomères formés dans les premiers instants de la polymérisation (théorie du « superswelling »). D'après cette théorie, si la nucléation dans toutes les gouttelettes ne se fait pas au même moment, la concentration en oligomères entre les différentes gouttelettes de la miniémulsion varie. Une diffusion du monomère, des gouttelettes

moins concentrées en oligomères vers celles plus concentrées en oligomères aurait lieu à cause de la différence de potentiel chimique. La diffusion du monomère à travers la phase aqueuse expliquerait alors la perte de stabilité colloïdale. Dans la même étude, Luo et al. ont suggéré que l'augmentation de la quantité de co-stabilisant ou l'utilisation des tensioactifs polymères non-ioniques pouvaient aider à prévenir ce phénomène.

Vosloo et al. [300] ont aussi étudié la polymérisation RAFT du Sty dans des miniémulsions stabilisées par du SDS. Afin de limiter les problèmes de stabilité précédemment décrits, des oligomères de Sty préparées par polymérisation RAFT en masse en présence d'un dithiobenzoate ont été employés comme agents RAFT. Deux co-stabilisants (hexadécane et alcool cétylique) et deux oligomères-RAFT de \bar{M}_n différentes ont été testés. Aucun problème de stabilité colloïdale n'a été observé pour l'ensemble des miniémulsions préparées. Les meilleurs résultats en termes de contrôle des masses molaires et des dispersités ont été obtenus en utilisant l'HD et l'oligomère de plus faible masse molaire comme co-stabilisant et CTA, respectivement.

Lansalot et al. [301] ont pour leur part étudié l'influence de la structure du CTA sur la cinétique de polymérisation du Sty en miniémulsion. Trois agents RAFT ont été employés : le CDB, le phényléthane(dithioate) de 1-phényléthyle (PEPDTA) et le dithiobenzoate de phényléthyle. Dans tous les cas, un retard à la polymérisation a été observé par rapport à une polymérisation conventionnelle du Sty en miniémulsion (réalisée en absence de CTA). Les résultats obtenus semblent indiquer que la sortie des radicaux R^\bullet (issus du CTA) des nanogouttelettes/NPs est le facteur déterminant la vitesse de polymérisation. Cette assertion provient d'une expérience de polymérisation additionnelle menée en présence d'un oligomère-PEPDTA. Le radical R^\bullet issu de ce macroagent RAFT ne peut alors pas sortir dans la phase aqueuse et dans ce cas, l'effet de retard n'a pas été observé.

L'utilisation de tensioactifs réactifs permettant de confiner la polymérisation RAFT à l'interface liquide/liquide, s'est avéré une stratégie attractive pour l'obtention de systèmes stables et d'objets à morphologie contrôlée. Dans le Paragraphe 3.2.3, nous avons déjà cité les travaux sur l'élaboration de NPs (NCs et NSs) par polymérisation RAFT en miniémulsion à partir des transurfs. Dans ce cas, le facteur clé pour la réussite de la polymérisation RAFT est d'assurer l'activité interfaciale des transurfs, mais également des oligoradicaux R^\bullet issus de la première étape d'addition fragmentation (pré-équilibre, Schéma I- 7). Les propriétés interfaciales des oligoradicaux R^\bullet peuvent également avoir un impact sur la morphologie des objets finaux. A titre d'exemple, Lu et al. [264] ont étudié la fabrication des NCs de PS en utilisant un

macroagent RAFT de type trithiocarbonate : le poly(MAA-co-Sty)-RAFT (voir ligne 13, Tableau I- 10). Le copolymère poly(MAA-co-Sty) faisait partie du groupement R du macroagent RAFT et l'activité interfaciale des oligoradicaux R^\bullet ainsi que la morphologie des objets finaux étaient influencées par le degré de protonation des unités MAA. Dans un milieu basique (pH~8), l'oligoradical R^\bullet pouvait migrer dans la phase aqueuse du fait de la déprotonation des unités MAA. Dans ces conditions, la formation de NSs de PS était prédominante, avec une faible fraction de NCs (18%). La proportion de NSs a pu être limitée dans un domaine de pH légèrement acide (pH~6,4-6,9) où la protonation des unités MAA favorisait le confinement des oligoradicaux R^\bullet à l'interface liquide/liquide. Dans ces nouvelles conditions, 94% des objets synthétisés présentaient une morphologie cœur-écorce.

Des observations similaires ont été réalisées par Charleux et ses collaborateurs [255] lors de la préparation de NSs de PS en présence des macroagents RAFT dérivés du POE. En présence d'un POE-RAFT de type dithiobenzoate (ligne 3, Tableau I- 10) la polymérisation RAFT du Sty n'était pas bien contrôlée et une distribution massique large a été observée ($\bar{D}=1,9$). Ceci a été attribué au partage du POE-RAFT entre la phase aqueuse, les gouttelettes et l'interface. Dans une autre étude, des distributions massiques plus étroites ($\bar{D}=1,3$) ont été obtenues en employant un POE-RAFT de type trithiocarbonate (ligne 5, Tableau I- 10). Ce dernier était moins susceptible de migrer dans la phase aqueuse et donc de former des micelles, ce qui limitait alors une éventuelle nucléation secondaire.

Finalement, l'utilisation de macroagents RAFT tels que les transurfs n'est pas la seule stratégie possible pour confiner la polymérisation RAFT à l'interface monomère/eau. Van Zyl et al. [302] ont montré qu'il était possible d'obtenir des NSs ou des NCs de PS en choisissant le couple CTA (moléculaire)/amorçeur approprié. L'utilisation combinée d'un CTA qui ne provoque pas un effet de retard et qui facilite la croissance rapide des chaînes polymères, et d'un amorçeur activant la croissance des chaînes à l'interface (KPS), facilite la formation de NCs. Les oligomères issus de l'amorçage par le KPS dans la phase aqueuse restent fixés à l'interface liquide/liquide et propagent rapidement pour générer la morphologie cœur-écorce. En revanche, l'utilisation d'un amorçeur tel que l'AIBN, qui ne présente pas d'activité interfaciale, favorise l'obtention de NSs car les radicaux polymérisent dans tout le volume de la gouttelette.

5. CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Ces travaux de thèse se positionnent à la croisée de trois principales thématiques de recherche: la nanomédecine pour la thérapie cancéreuse, la polymérisation en miniémulsion et la polymérisation RAFT.

La conception de nanovecteurs (NVs) capables de protéger une substance active (SA) de sa dégradation *in vivo*, de l'adresser sélectivement vers le tissu ou la cellule cible et d'en contrôler la libération demeure un challenge pour les biologistes et les chimistes. Dans le cas des traitements anticancéreux administrés par voie intraveineuse, deux stratégies sont utilisées pour favoriser l'accumulation des NVs au sein des tissus malades : i) le ciblage passif qui tire profit de la perméabilité et de la rétention accrue des vaisseaux tumoraux pour provoquer l'accumulation naturelle du NV, ii) le ciblage actif qui consiste à introduire des ligands à la surface du NV capables d'interagir, de manière spécifique, avec les récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. Dans cette recherche bibliographique, nous avons présenté les réactions de couplage par Chimie « Click » susceptibles d'être utilisées pour l'introduction de tels ligands. Les cycloadditions azide-alcyne en présence ou en l'absence de catalyseur cuivreux sont toutefois particulièrement décrites car ce sont celles que nous emploierons pour évaluer la capacité de nos NVs à être post-modifiés par des ligands de reconnaissance. Les différents stimuli internes et externes qui peuvent être employés pour déclencher et/ou contrôler la libération de la SA au sein des tumeurs ont ensuite été présentés avec une attention particulière pour les systèmes pH-sensibles. Cette première partie se clôt avec la définition du cahier de charges d'un NV destiné à l'administration de médicaments par voie intraveineuse.

Parmi les différents types de NVs développés pour la thérapie cancéreuse, notre intérêt s'est majoritairement porté sur les nanoparticules (NPs) polymères. Après avoir différencié les deux morphologies possibles de ces NPs : i) les nanosphères (NSs) composées d'une matrice polymère et ii) les nanocapsules (NCs), systèmes de type cœur (liquide, solide ou vide)/écorce polymère ; notre étude s'est orientée vers les NCs à cœur liquide en raison de leurs nombreux avantages. Les différentes techniques d'élaboration de NCs à cœur liquide ont alors été évoquées. Celles-ci peuvent être classifiées en trois grands groupes : i) ségrégation de phases entre le cœur liquide et le polymère (préformé ou produit *in situ*) qui constituera l'écorce de la NC ii) dépôt des polymères préformés en surface d'un cœur sacrificiel, et iii) réactions confinées à l'interface liquide/liquide des nanogouttelettes d'une émulsion.

Parmi ces différentes techniques, la polymérisation en miniémulsion présente l'avantage de permettre l'incorporation de la SA, la synthèse du polymère qui constituera l'écorce et la fabrication de la NC dans une seule étape. De plus, l'utilisation combinée de la polymérisation en miniémulsion et d'un tensioactif réactif peut favoriser ou permettre exclusivement la formation du polymère à l'interface liquide/liquide, et ainsi éviter les problèmes de contrôle de la morphologie des nano-objets formés par simple ségrégation de phases entre le polymère et le cœur liquide.

Dans la suite de cette étude bibliographique, nous nous sommes donc intéressés aux travaux portant sur l'utilisation de tensioactifs réactifs dans un procédé en miniémulsion pour l'obtention de NPs polymères (NSs et NCs). Nous avons répertorié les tensioactifs réactifs de type inisurf et transurf utilisés pour mener une polymérisation radicalaire par désactivation réversible (PRDR) à l'interface liquide/liquide d'une miniémulsion. Les deux types de PRDR concernées étaient la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) et la polymérisation par Addition-Fragmentation-Transfert Réversible (Polymérisation RAFT). Cette étude bibliographique a montré l'intérêt de combiner la polymérisation en miniémulsion avec un tensioactif réactif et une PRDR pour fabriquer des NCs ayant une taille, morphologie et propriétés de surface bien définies, et pouvant être employées pour des applications variées (vectorisation, imagerie...).

Enfin, la polymérisation RAFT qui est la technique de PRDR choisie pour ces travaux a été présentée en détail : son principe de contrôle, les types et les critères de sélection des agents de contrôle utilisés et leurs aspects cinétiques. Des exemples de son application en milieu hétérogène ont permis d'identifier les points clés à prendre en compte pour assurer le contrôle de la polymérisation et la stabilité colloïdale de la (mini)émulsion.

Par la suite, nous allons donc chercher à développer des NCs à cœur huileux biocompatible, écorce polymère (hydrophobe ou pH-sensible) et recouvrement hydrophile en polysaccharide. Ces NCs, destinées à l'administration de SAs par voie intraveineuse, seront fabriquées en utilisant un transurf multifonctionnel dérivé du dextrane pour mener la polymérisation à l'interface liquide/liquide d'une miniémulsion.

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] O. M. Koo, I. Rubinstein, et H. Onyuksel, « Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2005**, 1 (3), 193-212.
- [2] J. Shi, A. R. Votruba, O. C. Farokhzad, et R. Langer, « Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications », *Nano Letters* **2010**, 10 (9), 3223-3230.
- [3] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, et R. Langer, « Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy », *Nature Nanotechnology* **2007**, 2 (12), 751-760.
- [4] Y. Min, J. M. Caster, M. J. Eblan, et A. Z. Wang, « Clinical Translation of Nanomedicine », *Chemical Reviews* **2015**, 115 (19), 11147-11190.
- [5] M. L. Etheridge, S. A. Campbell, A. G. Erdman, C. L. Haynes, S. M. Wolf, et J. McCullough, « The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2013**, 9 (1), 1-14.
- [6] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, et J. Huwyler, « Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications », *Journal of Controlled Release* **2015**, 200, 138-157.
- [7] M. A. W. Eaton, L. Levy, et O. M. A. Fontaine, « Delivering nanomedicines to patients: A practical guide », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2015**, 11 (4), 983-992.
- [8] J. H. Lee et Y. Yeo, « Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers », *Chemical Engineering Science* **2015**, 125, 75-84.
- [9] D. W. Kufe, J. F. Holland, E. Frei, et American Cancer Society, (Ed), « Cancer medicine », 6^{ème} édition. Hamilton, Ont. ; Lewiston, NY: BC Decker, **2003**.
- [10] M. Kanapathipillai, A. Brock, et D. E. Ingber, « Nanoparticle targeting of anti-cancer drugs that alter intracellular signaling or influence the tumor microenvironment », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, 79-80, 107-118.
- [11] C. M. Dawidczyk, C. Kim, J. H. Park, L. M. Russell, K. H. Lee, M. G. Pomper, et P. C. Searson, « State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines », *Journal of Controlled Release* **2014**, 187, 133-144.
- [12] H. Maeda, H. Nakamura, et J. Fang, « The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65 (1), 71-79.
- [13] H. Maeda, « Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond », *Journal of Controlled Release* **2012**, 164 (2), 138-144.
- [14] J. Fang, H. Nakamura, et H. Maeda, « The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, 63 (3), 136-151.
- [15] S. Ramachandran, J. Ient, E.-L. Göttgens, A. Krieg, et E. Hammond, « Epigenetic Therapy for Solid Tumors: Highlighting the Impact of Tumor Hypoxia », *Genes* **2015**, 6 (4), 935-956.
- [16] S. K. Parks, Y. Cormerais, I. Marchiq, et J. Pouyssegur, « Hypoxia optimises tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export », *Molecular Aspects of Medicine* **2016**, 47-48.
- [17] F. Q. Schafer et G. R. Buettner, « Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple », *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, 30 (11), 1191-1212.
- [18] J. Li, M. Huo, J. Wang, J. Zhou, J. M. Mohammad, Y. Zhang, Q. Zhu, A. Y. Waddad, et Q. Zhang, « Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel », *Biomaterials* **2012**, 33 (7), 2310-2320.
- [19] K. Engin, D. B. Leeper, J. R. Cater, A. J. Thistlethwaite, L. Tupchong, et J. D. McFarlane, « Extracellular pH distribution in human tumours », *International Journal of Hyperthermia* **1995**, 11 (2), 211-216.

- [20] M. Stubbs, P. M. . McSheehy, J. R. Griffiths, et C. L. Bashford, « Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment », *Molecular Medicine Today* **2000**, 6 (1), 15-19.
- [21] L. Yan, J. Zhang, C.-S. Lee, et X. Chen, « Micro- and Nanotechnologies for Intracellular Delivery », *Small* **2014**, 10 (22), 4487-4504.
- [22] T. Tejada-Berges, C. O. Granai, M. Gordinier, et W. Gajewski, « Caelyx/Doxil for the treatment of metastatic ovarian and breast cancer », *Expert Review of Anticancer Therapy* **2002**, 2 (2), 143-150.
- [23] E. Miele, G. P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, et S. Tomao, « Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer », *International Journal of Nanomedicine* **2009**, 4, 99-105.
- [24] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, et K. Kataoka, « Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size », *Nature Nanotechnology* **2001**, 6 (12), 815-823.
- [25] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, et F. Delie, « Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, 69 (1), 1-9.
- [26] X. Xu, W. Ho, X. Zhang, N. Bertrand, et O. Farokhzad, « Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy », *Trends in Molecular Medicine* **2015**, 21 (4), 223-232.
- [27] B. B. S. Cerqueira, A. Lasham, A. N. Shelling, et R. Al-Kassas, « Nanoparticle therapeutics: Technologies and methods for overcoming cancer », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, 97, 140-151.
- [28] E. Nogueira, A. C. Gomes, A. Preto, et A. Cavaco-Paulo, « Design of liposomal formulations for cell targeting », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, 136, 514-526.
- [29] R. van der Meel, L. J. C. Vehmeijer, R. J. Kok, G. Storm, et E. V. B. van Gaal, « Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: Current status », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65 (10), 1284-1298.
- [30] H. K. Patra et A. P. F. Turner, « The potential legacy of cancer nanotechnology: cellular selection », *Trends in Biotechnology* **2014**, 32 (1), 21-31.
- [31] E. Perrino, M. Steiner, N. Krall, G. J. L. Bernardes, F. Preto, G. Casi, et D. Neri, « Curative Properties of Noninternalizing Antibody-Drug Conjugates Based on Maytansinoids », *Cancer Research* **2014**, 74 (9), 2569-2578.
- [32] R. Danielli, R. Patuzzo, P. A. Ruffini, A. Maurichi, L. Giovannoni, G. Elia, D. Neri, et M. Santinami, « Armed antibodies for cancer treatment: a promising tool in a changing era », *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2015**, 64 (1), 113-121.
- [33] J. S. Poovassery, J. C. Kang, D. Kim, R. J. Ober, et E. S. Ward, « Antibody targeting of HER2/HER3 signaling overcomes heregulin-induced resistance to PI3K inhibition in prostate cancer: Targeting HER2/HER3 in prostate cancer », *International Journal of Cancer* **2015**, 137 (2), 267-277. vol. 137, no 2, p. 267-277.
- [34] W. Xie, D. Li, J. Zhang, Z. Li, D. O. Acheampong, Y. He, Y. Wang, Z. Chen, et M. Wang, « Generation and characterization of a novel human IgG1 antibody against vascular endothelial growth factor receptor 2 », *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2014**, 63 (9), 877-888.
- [35] A. P. Mann, A. Somasunderam, R. Nieves-Alicea, X. Li, A. Hu, A. K. Sood, M. Ferrari, D. G. Gorenstein, et T. Tanaka, « Identification of Thioaptamer Ligand against E-Selectin: Potential Application for Inflamed Vasculature Targeting », *PLoS ONE* **2010**, 5 (9), vol. 5, no 9, p. e13050.
- [36] L. Li, J. Hou, X. Liu, Y. Guo, Y. Wu, L. Zhang, et Z. Yang, « Nucleolin-targeting liposomes guided by aptamer AS1411 for the delivery of siRNA for the treatment of malignant melanomas », *Biomaterials* **2014**, 35 (12), 3840-3850.
- [37] H. Qi, Z. Li, K. Du, K. Mu, Q. Zhou, S. Liang, W. Zhu, X. Yang, et Y. Zhu, « Transferrin-targeted magnetic/fluorescence micelles as a specific bi-functional nanoprobe for imaging liver tumor », *Nanoscale Research Letters* **2014**, 9 (1), 595.

- [38] R. Nedaeinia, A. Avan, M. Manian, R. Salehi, et M. Ghayour-Mobarhan, « EGFR as a potential target for the treatment of pancreatic cancer: dilemma and controversies », *Current Drug Targets* **2014**, 15 (14), 1293-1301.
- [39] X. He, C. S. Alves, N. Oliveira, J. Rodrigues, J. Zhu, I. Bányai, H. Tomás, et X. Shi, « RGD peptide-modified multifunctional dendrimer platform for drug encapsulation and targeted inhibition of cancer cells », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, 125, 82-89.
- [40] A. Accardo, G. Mangiapia, L. Paduano, G. Morelli, et D. Tesaro, « Octreotide labeled aggregates containing platinum complexes as nanovectors for drug delivery: octreotide platinum complexes aggregates », *Journal of Peptide Science* **2013**, 19 (4), 190-197.
- [41] M. Laville, « Nanoparticules polymères de deuxième et troisième générations pour des applications thérapeutiques anti-cancer et anti-HIV ». **Thèse de doctorat**, Nancy : Université de Lorraine **2013**.
- [42] F. Zhang, Q. Wu, Z.-C. Chen, M. Zhang, et X.-F. Lin, « Hepatic-targeting microcapsules construction by self-assembly of bioactive galactose-branched polyelectrolyte for controlled drug release system », *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 317 (2), 477-484.
- [43] Y. G. Assaraf, C. P. Leamon, et J. A. Reddy, « The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment », *Drug Resistance Updates* **2014**, 17 (4-6), 89-95.
- [44] E. P. Diamandis et T. K. Christopoulos, « The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology », *Clinical Chemistry* **1991**, 37 (5), 625-636.
- [45] I. Cossu, G. Bottoni, M. Loi, L. Emionite, A. Bartolini, D. Di Paolo, C. Brignole, F. Piaggio, P. Perri, A. Sacchi, F. Curnis, M. C. Gagliani, S. Bruno, C. Marini, A. Gori, R. Longhi, D. Murgia, A. R. Sementa, M. Cilli, C. Tacchetti, A. Corti, G. Sambucetti, S. Marchiò, M. Ponzoni, et F. Pastorino, « Neuroblastoma-targeted nanocarriers improve drug delivery and penetration, delay tumor growth and abrogate metastatic diffusion », *Biomaterials* **2015**, 68, 89-99.
- [46] J. Rao, J. Lahiri, L. Isaacs, R. M. Weis, et G. M. Whitesides, « A trivalent system from vancomycin.D-alanine with higher affinity than avidin.biotin », *Science* **1998**, 280 (5364), 708-711.
- [47] W.-H. Chen, G.-F. Luo, Q. Lei, F.-Y. Cao, J.-X. Fan, W.-X. Qiu, H.-Z. Jia, S. Hong, F. Fang, X. Zeng, R.-X. Zhuo, et X.-Z. Zhang, « Rational design of multifunctional magnetic mesoporous silica nanoparticle for tumor-targeted magnetic resonance imaging and precise therapy », *Biomaterials* **2016**, 79, 87-101.
- [48] D. Zhu, W. Tao, H. Zhang, G. Liu, T. Wang, L. Zhang, X. Zeng, et L. Mei, « Docetaxel (DTX)-loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer », *Acta Biomaterialia* **2016**, 30, 144-154.
- [49] Y. Jiang, N. Yang, H. Zhang, B. Sun, C. Hou, C. Ji, J. Zheng, Y. Liu, et P. Zuo, « Enhanced in vivo antitumor efficacy of dual-functional peptide-modified docetaxel nanoparticles through tumor targeting and Hsp90 inhibition », *Journal of Controlled Release* **2016**, 221, 26-36.
- [50] H. Chen, L. Q. Xie, J. Qin, Y. Jia, X. Cai, W. Nan, W. Yang, F. Lv, et Q. Q. Zhang, « Surface modification of PLGA nanoparticles with biotinylated chitosan for the sustained in vitro release and the enhanced cytotoxicity of epirubicin », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, 138, 1-9.
- [51] Y. Meng, S. Wang, C. Li, M. Qian, Y. Zheng, X. Yan, et R. Huang, « TKD peptide as a ligand targeting drug delivery systems to memHsp70-positive breast cancer », *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, 498 (1-2), 40-48.
- [52] M. Shi, J. Lu, et M. S. Shoichet, « Organic nanoscale drug carriers coupled with ligands for targeted drug delivery in cancer », *Journal of Materials Chemistry* **2009**, 19 (31), 5485.
- [53] Y. Meng, S. Wang, C. Li, M. Qian, Y. Zheng, X. Yan, et R. Huang, « TKD peptide as a ligand targeting drug delivery systems to memHsp70-positive breast cancer », *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, 498 (1-2), 40-48.
- [54] R. Pola, A. Braunová, R. Laga, M. Pechar, et K. Ulbrich, « Click chemistry as a powerful and chemoselective tool for the attachment of targeting ligands to polymer drug carriers », *Polymer Chemistry* **2014**, 5 (4), 1340-1350.

- [55] Y. Huang, Y. Jiang, H. Wang, J. Wang, M. C. Shin, Y. Byun, H. He, Y. Liang, et V. C. Yang, « Curb challenges of the “Trojan Horse” approach: Smart strategies in achieving effective yet safe cell-penetrating peptide-based drug delivery », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65 (10), 1299-1315.
- [56] H. C. Kolb, M. G. Finn, et K. B. Sharpless, « Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions », *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40 (11), 2004-2021.
- [57] C. D. Hein, X.-M. Liu, et D. Wang, « Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences », *Pharmaceutical Research* **2008**, 25 (10), 2216-2230.
- [58] A. Michael, « Ueber die Einwirkung von Diazobenzolimid auf Acetylendicarbonsäuremethylester », *Journal für Praktische Chemie* **1893**, 48 (1), 94-95.
- [59] R. Huisgen, G. Szeimies, et L. Möbius, « 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen », *Chemische Berichte* **1967**, 100 (8), 2494-2507.
- [60] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, et K. B. Sharpless, « A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes », *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41 (14), 2596-2599.
- [61] C. W. Tornøe, C. Christensen, et M. Meldal, « Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides », *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67 (9), 3057-3064.
- [62] E. Haldón, M. C. Nicasio, et P. J. Pérez, « Copper-catalysed azide-alkyne cycloadditions (CuAAC): an update », *Organic & Biomolecular Chemistry* **2015**, 13 (37), 9528-9550.
- [63] P. Lundberg, C. J. Hawker, A. Hult, et M. Malkoch, « Click Assisted One-Pot Multi-Step Reactions in Polymer Science: Accelerated Synthetic Protocols », *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, 29 (12-13), 998-1015.
- [64] M. Meldal et C. W. Tornøe, « Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition », *Chemical Reviews* **2008**, 108 (8), 2952-3015.
- [65] R. Berg et B. F. Straub, « Advancements in the mechanistic understanding of the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition », *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2013**, 9, 2715-2750.
- [66] C. R. Bertozzi et Baskin J., « Copper-Free Click Chemistry: Bioorthogonal Reagents for Tagging Azides », *Aldrichimica ACTA* **2010**, 43 (1), 15-23.
- [67] M. M. J. Kamphuis, A. P. R. Johnston, G. K. Such, H. H. Dam, R. A. Evans, A. M. Scott, E. C. Nice, J. K. Heath, et F. Caruso, « Targeting of cancer cells using click-functionalized polymer capsules », *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (45), 15881-15883.
- [68] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, et G.-J. Boons, « Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions », *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47 (12), 2253-2255.
- [69] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, et C. R. Bertozzi, « Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging », *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, 104 (3), 16793-16797.
- [70] J. C. Jewett et C. R. Bertozzi, « Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology », *Chemical Society Reviews* **2010**, 39 (4), 1272, 2010.
- [71] P. Shieh et C. R. Bertozzi, « Design strategies for bioorthogonal smart probes », *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, 12 (46), 9307-9320.
- [72] E. M. Sletten et C. R. Bertozzi, « From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions », *Accounts of Chemical Research* **2011**, 44 (9), 666-676.
- [73] E. M. Sletten, H. Nakamura, J. C. Jewett, et C. R. Bertozzi, « Difluorobenzocyclooctyne: Synthesis, Reactivity, and Stabilization by β -Cyclodextrin », *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (33), 11799-11805.
- [74] J. C. Jewett, E. M. Sletten, et C. R. Bertozzi, « Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones », *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (11), 3688-3690.

- [75] N. J. Agard, J. A. Prescher, et C. R. Bertozzi, « A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems », *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126 (46), 15046-15047.
- [76] N. E. Mbuja, J. Guo, M. A. Wolfert, R. Steet, et G.-J. Boons, « Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloadditions (SPAAC) Reveal New Features of Glycoconjugate Biosynthesis », *ChemBioChem* **2011**, 12 (12), 1912-1921.
- [77] M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, et F. L. van Delft, « Aza-dibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition », *Chemical Communications* **2010**, 46 (1), 97-99.
- [78] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, et C. R. Bertozzi, « A comparative study of bioorthogonal reactions with azides », *ACS Chemical Biology* **2006**, 10 (1), 644-648.
- [79] E. M. Sletten et C. R. Bertozzi, « A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry », *Organic Letters* **2008**, 10 (14), 3097-3099.
- [80] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, et G.-J. Boons, « Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions », *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47 (12), 2253-2255.
- [81] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, et C. R. Bertozzi, « Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging », *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, 104 (43), 16793-16797.
- [82] H. Stöckmann, A. A. Neves, S. Stairs, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, et F. J. Leeper, « Development and evaluation of new cyclooctynes for cell surface glycan imaging in cancer cells », *Chemical Science* **2011**, 2 (5), 932-2011.
- [83] E. M. Sletten, H. Nakamura, J. C. Jewett, et C. R. Bertozzi, « Difluorobenzocyclooctyne: Synthesis, Reactivity, and Stabilization by β -Cyclodextrin », *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (33), 11799-11805.
- [84] Y. Zhang, H. F. Chan, et K. W. Leong, « Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65 (1), 104-120.
- [85] B. Felice, M. P. Prabhakaran, A. P. Rodríguez, et S. Ramakrishna, « Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective », *Materials Science and Engineering: C* **2014**, 41, 178-195.
- [86] D. Bennet et S. Kim, « Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery », in *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, A. D. Sezer, (Éd). InTech, **2014**.
- [87] A. Jhaveri, P. Deshpande, et V. Torchilin, « Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy », *Journal of Controlled Release* **2014**, 190, 352-370.
- [88] L. E. Gerweck, « Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics », *Molecular Cancer Therapeutics* **2006**, 5 (5), 1275-1279.
- [89] B. P. Mahoney, N. Raghunand, B. Baggett, et R. J. Gillies, « Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics », *Biochemical Pharmacology* **2003**, 66 (7), 1207-1218.
- [90] J. Liu, Y. Huang, A. Kumar, A. Tan, S. Jin, A. Mozhi, et X.-J. Liang, « pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy », *Biotechnology Advances* **2014**, 32 (4), 693-710.
- [91] N. Murthy, J. Campbell, N. Fausto, A. S. Hoffman, et P. S. Stayton, « Design and synthesis of pH-responsive polymeric carriers that target uptake and enhance the intracellular delivery of oligonucleotides », *Journal of Controlled Release* **2003**, 89 (3), 365-374.
- [92] B. Ríhová, T. Etrych, M. Pechar, M. Jelínková, M. Stastný, O. Hovorka, M. Kovár, et K. Ulbrich, « Doxorubicin bound to a HPMA copolymer carrier through hydrazone bond is effective also in a cancer cell line with a limited content of lysosomes », *Journal of Controlled Release* **2001**, 74 (1-3), 225-232.
- [93] T. Thambi, V. G. Deepagan, C. K. Yoo, et J. H. Park, « Synthesis and physicochemical characterization of amphiphilic block copolymers bearing acid-sensitive orthoester linkage as the drug carrier », *Polymer* **2011**, 52 (21), 4753-4759.

- [94] L. Zhou, R. Cheng, H. Tao, S. Ma, W. Guo, F. Meng, H. Liu, Z. Liu, et Z. Zhong, « Endosomal pH-Activatable Poly(ethylene oxide)-graft-Doxorubicin Prodrugs: Synthesis, Drug Release, and Biodistribution in Tumor-Bearing Mice », *Biomacromolecules* **2011**, 12 (5), 1460–1467.
- [95] A. Kakinoki, Y. Kaneo, Y. Ikeda, T. Tanaka, et K. Fujita, « Synthesis of Poly(vinyl alcohol)–Doxorubicin Conjugates Containing cis-Aconityl Acid-Cleavable Bond and Its Isomer Dependent Doxorubicin Release », *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2008**, 31 (1), 103–110.
- [96] M. Hrubý, Č. Koňák, et K. Ulbrich, « Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin », *Journal of Controlled Release* **2005**, 103 (1), 137–148.
- [97] J.-Z. Du, X.-J. Du, C.-Q. Mao, et J. Wang, « Tailor-Made Dual pH-Sensitive Polymer–Doxorubicin Nanoparticles for Efficient Anticancer Drug Delivery », *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (44), 17560–17563.
- [98] R. Savla, O. Taratula, O. Garbuzenko, et T. Minko, « Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer », *Journal of Controlled Release* **2011**, 153 (1), 16–22.
- [99] F. Wang, Y.-C. Wang, S. Dou, M.-H. Xiong, T.-M. Sun, et J. Wang, « Doxorubicin-Tethered Responsive Gold Nanoparticles Facilitate Intracellular Drug Delivery for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells », *ACS Nano* **2011**, 5 (5), 3679–3692.
- [100] K. M. Huh, H. C. Kang, Y. J. Lee, et Y. H. Bae, « pH-sensitive polymers for drug delivery », *Macromolecular Research* **2012**, 20 (3), 224–233.
- [101] P. Bawa, V. Pillay, Y. E. Choonara, et L. C. du Toit, « Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery », *Biomedical Materials* **2009**, 4 (2), 022001.
- [102] C. Y. Zhang, W. S. Wu, N. Yao, B. Zhao, et L. J. Zhang, « pH-sensitive amphiphilic copolymer brush Chol-g-P(HEMA-co-DEAEMA)-b-PPEGMA: synthesis and self-assembled micelles for controlled anti-cancer drug release », *RSC Advances* 4 (76), 40232.
- [103] E. Lee, « Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting », *Journal of Controlled Release* **2003**, 91 (1-2), 103–113.
- [104] J. Zhang, L. Wu, F. Meng, Z. Wang, C. Deng, H. Liu, et Z. Zhong, « pH and Reduction Dual-Bioresponsive Polymersomes for Efficient Intracellular Protein Delivery », *Langmuir* **2012**, 28 (4), 2056–2065.
- [105] H. Sun, F. Meng, R. Cheng, C. Deng, et Z. Zhong, « Reduction and pH dual-bioresponsive crosslinked polymersomes for efficient intracellular delivery of proteins and potent induction of cancer cell apoptosis », *Acta Biomaterialia* **2014**, 10 (5), 2159–2168..
- [106] M. Häuser, K. Langer, et M. Schönhoff, « pH-Triggered release from surface-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles », *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2015**, 6, 2504–2512.
- [107] X. Hu, X. Hao, Y. Wu, J. Zhang, X. Zhang, P. C. Wang, G. Zou, et X.-J. Liang, « Multifunctional hybrid silica nanoparticles for controlled doxorubicin loading and release with thermal and pH dually response », *Journal of Materials Chemistry B: Materials for biology and medicine* **2013**, 1 (8), 1109–1118.
- [108] S. R. Marek, C. A. Conn, et N. A. Peppas, « Cationic nanogels based on diethylaminoethyl methacrylate », *Polymer* **2010**, 51 (6), 1237–1243.
- [109] A. Pikabea, J. Ramos, et J. Forcada, « Production of Cationic Nanogels with Potential Use in Controlled Drug Delivery », *Particle & Particle Systems Characterization* **2014**, 31 (1), 101–109.
- [110] Y.-T. Chiang et C.-L. Lo, « pH-Responsive polymer-liposomes for intracellular drug delivery and tumor extracellular matrix switched-on targeted cancer therapy », *Biomaterials* **2014**, 35 (20), 5414–5424.
- [111] M. Zignani, D. C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, et J.-C. Leroux, « In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Biomembranes* **2000**, 1463 (2), 383–394.
- [112] T. Lu, T. Chen, Wang, Y. Ma, et Zhang, « Influence of polymer size, liposomal composition, surface charge, and temperature on the permeability of pH-sensitive liposomes containing lipid-anchored poly(2-ethylacrylic acid) », *International Journal of Nanomedicine* 2012, 7, p. 4917–4926

- [113] J. O. Kim, A. V. Kabanov, et T. K. Bronich, « Polymer micelles with cross-linked polyanion core for delivery of a cationic drug doxorubicin », *Journal of Controlled Release* **2009**, 138 (3), 197–204.
- [114] J.-T. Sun, C.-Y. Hong, et C.-Y. Pan, « Fabrication of PDEAEMA-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles and pH-Responsive Controlled Release », *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, 114 (29), 12481–12486.
- [115] R. A. Siegel, M. Falamarzian, B. A. Firestone, et B. C. Moxley, « pH-Controlled release from hydrophobic/polyelectrolyte copolymer hydrogels », *Journal of Controlled Release* **1988**, 8 (2), 179–182.
- [116] Y. Hu, T. Litwin, A. R. Nagaraja, B. Kwong, J. Katz, N. Watson, et D. J. Irvine, « Cytosolic Delivery of Membrane-Impermeable Molecules in Dendritic Cells Using pH-Responsive Core–Shell Nanoparticles », *Nano Letters* **2007**, 7 (10), 3056–3064.
- [117] H. Wang, L. Yang, et G. L. Rempel, « Preparation of pH-Responsive Polymer Core-Shell Nanospheres for Delivery of Hydrophobic Antineoplastic Drug Ellipticine », *Macromolecular Bioscience* **2014**, 14 (2), 166–172.
- [118] E. S. Lee, K. Na, et Y. H. Bae, « Super pH-Sensitive Multifunctional Polymeric Micelle », *Nano Letters* **2005**, 5 (2), 325–329.
- [119] P. Midoux, C. Pichon, J.-J. Yaouanc, et P.-A. Jaffrès, « Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers: Histidine-rich nucleic acids carriers », *British Journal of Pharmacology* **2009**, 157 (2), 166–178.
- [120] M. V. Risbud, A. A. Hardikar, S. V. Bhat, et R. R. Bhonde, « pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery », *Journal of Controlled Release* **2000**, 68 (1), 23–30.
- [121] J. I. Amalvy, E. J. Wanless, Y. Li, V. Michailidou, S. P. Armes, et Y. Duccini, « Synthesis and Characterization of Novel pH-Responsive Microgels Based on Tertiary Amine Methacrylates », *Langmuir* **2004**, 20 (21), 8992–8999.
- [122] K. E. Christodoulakis et M. Vamvakaki, « pH-Responsive Microgel Particles Comprising Solely Basic or Acidic Residues », *Macromolecular Symposia* **2010**, 291–292 (1), 106–114.
- [123] O. Z. Fisher et N. A. Peppas, « Polybasic Nanomatrices Prepared By UV-initiated Photopolymerization », *Macromolecules* **2009**, 42 (9), 3391–3398.
- [124] H. Hayashi, M. Iijima, K. Kataoka, et Y. Nagasaki, « pH-Sensitive Nanogel Possessing Reactive PEG Tethered Chains on the Surface », *Macromolecules* **2004**, 37 (37), 5389–5396.
- [125] B. H. Tan, P. Ravi, et K. C. Tam, « Synthesis and Characterization of Novel pH-Responsive Polyampholyte Microgels », *Macromolecular Rapid Communications* **2006**, 27 (7), 522–528.
- [126] B. H. Tan, P. Ravi, L. N. Tan, et K. C. Tam, « Synthesis and aqueous solution properties of sterically stabilized pH-responsive polyampholyte microgels », *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 309 (2), 453–463.
- [127] K. E. Christodoulakis et M. Vamvakaki, « Amphoteric Core–Shell Microgels: Contraphilic Two-Compartment Colloidal Particles », *Langmuir* **2010**, 26 (2), 639–647.
- [128] S. Biswas et V. P. Torchilin, « Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, 66, 26–41.
- [129] Y. Yamada, Y. Shinohara, T. Kakudo, S. Chaki, S. Futaki, H. Kamiya, et H. Harashima, « Mitochondrial delivery of mastoparan with transferrin liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide for selective cancer therapy », *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, 303 (1–2), 1–7.
- [130] M. Kester, Y. Heakal, T. Fox, A. Sharma, G. P. Robertson, T. T. Morgan, E. I. Altinoğlu, A. Tabaković, M. R. Parette, S. M. Rouse, V. Ruiz-Velasco, et J. H. Adair, « Calcium phosphate nanocomposite particles for in vitro imaging and encapsulated chemotherapeutic drug delivery to cancer cells », *Nano Letters* **2008**, 8 (12), 4116–4121.
- [131] F. Muhammad, M. Guo, Y. Guo, W. Qi, F. Qu, F. Sun, H. Zhao, et G. Zhu, « Acid degradable ZnO quantum dots as a platform for targeted delivery of an anticancer drug », *Journal of Materials Chemistry* **2011**, 21 (35), 13406.

- [132] C.-J. Ke, T.-Y. Su, H.-L. Chen, H.-L. Liu, W.-L. Chiang, P.-C. Chu, Y. Xia, et H.-W. Sung, « Smart Multifunctional Hollow Microspheres for the Quick Release of Drugs in Intracellular Lysosomal Compartments », *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50 (35), 8086–8089.
- [133] J. Liu, H. Ma, T. Wei, et X.-J. Liang, « CO₂ gas induced drug release from pH-sensitive liposome to circumvent doxorubicin resistant cells », *Chemical Communications* **2012**, 48 (40), 4869–4871.
- [134] D. E. Owens et N. A. Peppas, « Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles », *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 307 (1), 93–102.
- [135] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, et F. Delie, « Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, 69 (1), 1–9.
- [136] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, et O. C. Farokhzad, « Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, 66, 2–25.
- [137] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, et C. Yin, « Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles », *Biomaterials* **2010**, 31 (13), 3657–3666.
- [138] P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, et S. E. McNeil, « Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, 61 (6), 428–437.
- [139] M. Mahmoudi, I. Lynch, M. R. Ejtehadi, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli, et S. Laurent, « Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges », *Chemical Reviews* **2011**, 111 (9), 5610–5637.
- [140] E. Umut, « Surface Modification of Nanoparticles Used in Biomedical Applications », in *Modern Surface Engineering Treatments*, M. Aliofkhaeaei, (Éd) InTech, 2013.
- [141] M. M. de Villiers, P. Aramwit, et G. S. Kwon, Éd., *Nanotechnology in drug delivery*. New York, NY: Springer : AAPS Press, 2009, 662p.
- [142] J.-M. Rabanel, P. Hildgen, et X. Banquy, « Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation », *Journal of Controlled Release* **2014**, 185, 71–87.
- [143] J. V. Jokerst, T. Lobovkina, R. N. Zare, et S. S. Gambhir, « Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy », *Nanomedicine* **2011**, 6 (4), 715–728.
- [144] A. Kolate, D. Baradia, S. Patil, I. Vhora, G. Kore, et A. Misra, « PEG — A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems », *Journal of Controlled Release* **2014**, 192, 67–81
- [145] C. Lemarchand, R. Gref, et P. Couvreur, « Polysaccharide-decorated nanoparticles », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 58 (2), 327–341.
- [146] A. Doenicke, B. Grote, et W. Lorenz, « Blood and blood substitutes », *British Journal of Anaesthesia* **1977**, 49 (7), 681–688.
- [147] M. Naessens, A. Cerdobbel, W. Soetaert, et E. J. Vandamme, « Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications », *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2005**, 80 (8), 845–860.
- [148] F. Abir, S. Barkhordarian, et B. E. Sumpio, « Efficacy of dextran solutions in vascular surgery », *Vasc Endovascular Surg* **2004** 38 (6), 483–491.
- [149] O. Vittorio, V. Voliani, P. Faraci, B. Karmakar, F. Iemma, S. Hampel, M. Kavallaris, et G. Cirillo, « Magnetic catechin–dextran conjugate as targeted therapeutic for pancreatic tumour cells », *Journal of Drug Targeting* **2014** 22 (5), 408–415.
- [150] Y. Song, B. Lou, P. Zhao, et C. Lin, « Multifunctional Disulfide-Based Cationic Dextran Conjugates for Intravenous Gene Delivery Targeting Ovarian Cancer Cells », *Molecular Pharmaceutics* **2014**, 11 (7), 2250–2261.
- [151] A. O. Abioye, A. Kola-Mustapha, G. T. Chi, et S. Ilya, « Quantification of in situ granulation-induced changes in pre-compression, solubility, dose distribution and intrinsic in vitro release characteristics of ibuprofen–cationic dextran conjugate cristanules », *International Journal of Pharmaceutics* **2014**, 471 (1-2), 453–477.

- [152] E. Migianu-Griffoni, I. Chebbi, S. Kachbi, M. Monteil, O. Sainte-Catherine, F. Chaubet, O. Oudar, et M. Lecouvey, « Synthesis and Biological Evaluation of New Bisphosphonate–Dextran Conjugates Targeting Breast Primary Tumor », *Bioconjugate Chemistry* **2014**, 25 (2), 224–230.
- [153] R. Mateen et T. Hoare, « Injectable, in situ gelling, cyclodextrin–dextran hydrogels for the partitioning-driven release of hydrophobic drugs », *Journal of Materials Chemistry* **2014**, 2 (32), 5157–5167.
- [154] S. Pacelli, P. Paolicelli, et M. A. Casadei, « New biodegradable dextran-based hydrogels for protein delivery: Synthesis and characterization », *Carbohydrate Polymers* **2015**, 126, 208–214.
- [155] G. Mocanu et M. Nichifor, « Cationic amphiphilic dextran hydrogels with potential biomedical applications », *Carbohydrate Polymers* **2014**, 99, 235–241.
- [156] P. Liu, J.-Q. Situ, W.-S. Li, C.-L. Shan, J. You, H. Yuan, F.-Q. Hu, et Y.-Z. Du, « High tolerated paclitaxel nano-formulation delivered by poly (lactic-co-glycolic acid)-g-dextran micelles to efficient cancer therapy », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2015**, 11 (4), 855–866.
- [157] X. Chen, X. Yao, et L. Chen, « Intracellular pH-sensitive dextran-based micelles as efficient drug delivery platforms: Intracellular pH-sensitive dextran-based micelles », *Polymer International* **2015**, 64 (3), 430–436.
- [158] B. Lin, H. Su, R. Jin, D. Li, C. Wu, X. Jiang, C. Xia, Q. Gong, B. Song, et H. Ai, « Multifunctional dextran micelles as drug delivery carriers and magnetic resonance imaging probes », *Science Bulletin* **2015**, 60 (14), 1272–1280.
- [159] E. Yuba, N. Tajima, Y. Yoshizaki, A. Harada, H. Hayashi, et K. Kono, « Dextran derivative-based pH-sensitive liposomes for cancer immunotherapy », *Biomaterials* **2014**, 35 (9), 3091–3101.
- [160] S. Ning, Q. Huang, J. Li, Y. Zhang, et Y.-N. Liu, « Functionalized dextran-coated liposomes for doxorubicin loading », *Journal of Controlled Release* **2011**, 152, e49–e51.
- [161] J. Huang, G. Gou, B. Xue, Q. Yan, Y. Sun, et L.-E. Dong, « Preparation and characterization of “dextran-magnetic layered double hydroxide-fluorouracil” targeted liposomes », *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, 450 (1-2), 323–330.
- [162] M. Peng, H. Li, Z. Luo, J. Kong, Y. Wan, L. Zheng, Q. Zhang, H. Niu, A. Vermorken, W. Van de Ven, C. Chen, X. Zhang, F. Li, L. Guo, et Y. Cui, « Dextran-coated superparamagnetic nanoparticles as potential cancer drug carriers in vivo », *Nanoscale* **2015**, 7 (25), 11155–11162.
- [163] P. Li, Y. Zhang, H. Pan, M. Ji, N. Sheng, et Y. Ma, « Doxorubicin-loaded pH-sensitive dextran-retinal nanoparticles suppress tumor growth by inducing both apoptosis and cell senescence », *Journal of Controlled Release* **2015**, 213, e88–e89.
- [164] P. Toman, C.-F. Lien, Z. Ahmad, S. Dietrich, J. R. Smith, Q. An, É. Molnár, G. J. Pilkington, D. C. Górecki, J. Tsibouklis, et E. Barbu, « Nanoparticles of alkylglyceryl-dextran-graft-poly(lactic acid) for drug delivery to the brain: Preparation and in vitro investigation », *Acta Biomaterialia* **2015**, 23, 250–262.
- [165] A. K. Hauser, R. Mathias, K. W. Anderson, et J. Zach Hilt, « The effects of synthesis method on the physical and chemical properties of dextran coated iron oxide nanoparticles », *Materials Chemistry and Physics* **2015**, 160, 177–186.
- [166] E. Österberg, K. Bergström, K. Holmberg, T. P. Schuman, J. A. Riggs, N. L. Burns, J. M. Van Alstine, et J. M. Harris, « Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations: Comparison to PEG: protein-rejecting ability of dextran », *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, 29 (6), 741–747.
- [167] C. Vauthier, B. Persson, P. Lindner, et B. Cabane, « Protein adsorption and complement activation for diblock copolymer nanoparticles », *Biomaterials* **2011**, 32 (6), 1646–1656.
- [168] C. E. Mora-Huertas, H. Fessi, et A. Elaissari, « Polymer-based nanocapsules for drug delivery », *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, 385 (1-2), 113–142.
- [169] P. Couvreur, G. Barratt, E. Fattal, P. Legrand, et C. Vauthier, « Nanocapsule technology: a review », *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier System* **2002**, 19, 99–134.
- [170] W.-W. Yang et E. Pierstorff, « Reservoir-Based Polymer Drug Delivery Systems », *Journal of Laboratory Automation* **2012**, 17 (1), 50–58.

- [171] L. A. Frank, R. V. Contri, R. C. R. Beck, A. R. Pohlmann, et S. S. Guterres, « Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules: Improving drug effects by nanocapsules », *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2015**, 7 (5), 623–639.
- [172] M. Estanqueiro, M. H. Amaral, J. Conceição, et J. M. Sousa Lobo, « Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, 126, 631–648.
- [173] G. R. Rivera-Rodríguez, M. J. Alonso, et D. Torres, « Poly-L-asparagine nanocapsules as anticancer drug delivery vehicles », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2013**, 85 (3), 481–487.
- [174] F. A. Oyarzun-Ampuero, G. R. Rivera-Rodríguez, M. J. Alonso, et D. Torres, « Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery », *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, 49 (4), 483–490.
- [175] I. Youm, X. Y. Yang, J. B. Murowchick, et B. C. Youan, « Encapsulation of docetaxel in oily core polyester nanocapsules intended for breast cancer therapy », *Nanoscale Research Letters* **2011**, 6(1), 630
- [176] O. Bourdon, I. Laville, D. Carrez, A. Croisy, P. Fedel, A. Kasselouri, P. Prognon, P. Legrand, et J. Blais, « Biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin incorporated into surface-modified nanocapsules in tumor-bearing mice », *Photochemical & Photobiological Sciences* **2002**, 1 (9), 709–714.
- [177] K. . Traul, A. Driedger, D. . Ingle, et D. Nakhasi, « Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides », *Food and Chemical Toxicology* **2000** 38 (1), 79–98.
- [178] B. Marten, M. Pfeuffer, et J. Schrezenmeir, « Medium-chain triglycerides » *International Dairy Journal* **2006**, 16 (11), 1374–1382
- [179] H. Ulrich, S. M. Pastores, D. P. Katz, et V. Kvetan, « Parenteral use of medium-chain triglycerides: A reappraisal », *Nutrition* **1996**, 12 (4), 231–238.
- [180] A. Babu Dhanikula, N. Mohamed Khalid, S. D. Lee, R. Yeung, V. Risovic, K. M. Wasan, et J.-C. Leroux, « Long circulating lipid nanocapsules for drug detoxification », *Biomaterials* **2007**, 28 (6), 1248–1257.
- [181] R. Klippstein, J. T.-W. Wang, R. I. El-Gogary, J. Bai, F. Mustafa, N. Rubio, S. Bansal, W. T. Al-Jamal, et K. T. Al-Jamal, « Passively Targeted Curcumin-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules for Colon Cancer Therapy In Vivo », *Small* **2015**, 11, 4704–4722.
- [182] J. Pietkiewicz, K. Zielińska, J. Saczko, J. Kulbacka, M. Majkowski, et K. a Wilk, « New approach to hydrophobic cyanine-type photosensitizer delivery using polymeric oil-core nanocarriers: hemolytic activity, in vitro cytotoxicity and localization in cancer cells. », *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2010**, 39 (5), 322–35.
- [183] I. Youm, V. Agrahari, J. B. Murowchick, et B.-B. C. Youan, « Uptake and Cytotoxicity of Docetaxel-Loaded Hyaluronic Acid-Grafted Oily Core Nanocapsules in MDA-MB 231 Cancer Cells », *Pharmaceutical Research* **2014**, 31 (9), 2439–2452.
- [184] M. Teixeira, M. J. Alonso, M. M. M. Pinto, et C. M. Barbosa, « Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, 59 (3), 491–500.
- [185] G. Lollo, G. R. Rivera-Rodriguez, J. Bejaud, T. Montier, C. Passirani, J.-P. Benoit, M. García-Fuentes, M. J. Alonso, et D. Torres, « Polyglutamic acid-PEG nanocapsules as long circulating carriers for the delivery of docetaxel », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2014**, 87 (1), 47–54.
- [186] G. Lollo, P. Hervella, P. Calvo, P. Avilés, M. J. Guillén, M. Garcia-Fuentes, M. J. Alonso, et D. Torres, « Enhanced in vivo therapeutic efficacy of plitidepsin-loaded nanocapsules decorated with a new poly-aminoacid-PEG derivative », *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, 483 (1-2), 212–219.
- [187] T. Gonzalo, G. Lollo, M. Garcia-Fuentes, D. Torres, J. Correa, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, P. Calvo, P. Avilés, M. J. Guillén, et M. J. Alonso, « A new potential nano-oncological therapy based on polyamino acid nanocapsules », *Journal of Controlled Release* **2013**, 169 (1-2), 10–16.
- [188] M. V. Lozano, D. Torrecilla, D. Torres, A. Vidal, F. Domínguez, et M. J. Alonso, « Highly Efficient System To Deliver Taxanes into Tumor Cells: Docetaxel-Loaded Chitosan Oligomer Colloidal Carriers », *Biomacromolecules* **2008**, 9 (8), 2186–2193.

- [189] A. Bernardi, E. Braganhol, E. Jäger, F. Figueiró, M. I. Edelweiss, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, et A. M. O. Battastini, « Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model », *Cancer Letters* **2009**, 281 (1), 53–63.
- [190] T. Ameller, V. Marsaud, P. Legrand, R. Gref, et J.-M. Renoir, « In vitro and in vivo biologic evaluation of long-circulating biodegradable drug carriers loaded with the pure antiestrogen RU 58668 », *International Journal of Cancer* **2003**, 106 (3), 446–454.
- [191] S. Maillard, T. Ameller, J. Gauduchon, A. Gougelet, F. Gouilleux, P. Legrand, V. Marsaud, E. Fattal, B. Sola, et J.-M. Renoir, « Innovative drug delivery nanosystems improve the anti-tumor activity in vitro and in vivo of anti-estrogens in human breast cancer and multiple myeloma », *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2005**, 94 (1-3), 111–121.
- [192] J.-M. Renoir, B. Stella, T. Ameller, E. Connault, P. Opolon, et V. Marsaud, « Improved anti-tumoral capacity of mixed and pure anti-oestrogens in breast cancer cell xenografts after their administration by entrapment in colloidal nanosystems », *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2006**, 102 (1-5), 114–127.
- [193] M. V. Lozano, G. Lollo, M. Alonso-Nocelo, J. Brea, A. Vidal, D. Torres, et M. J. Alonso, « Polyarginine nanocapsules: a new platform for intracellular drug delivery », *Journal of Nanoparticle Research* **2013**, 15 (3), 1-14.
- [194] R. H. Utama, Y. Jiang, P. B. Zetterlund, et M. H. Stenzel, « Biocompatible Glycopolymer Nanocapsules via Inverse Miniemulsion Periphery RAFT Polymerization for the Delivery of Gemcitabine », *Biomacromolecules* **2015**, 16 (7), 2144–2156.
- [195] C. K. Weiss et K. Landfester, « Miniemulsion Polymerization as a Means to Encapsulate Organic and Inorganic Materials », in *Hybrid Latex Particles*, vol. 233, A. M. van Herk et K. Landfester, (Ed). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, p. 185-236.
- [196] K. Landfester et V. Mailänder, « Nanocapsules with specific targeting and release properties using miniemulsion polymerization », *Expert Opinion on Drug Delivery* **2013**, 10 (5), 593–609.
- [197] S. De Koker, R. Hoogenboom, et B. G. De Geest, « Polymeric multilayer capsules for drug delivery », *Chemical Society Reviews* **2012**, 41 (7), 2867-2884.
- [198] A. P. R. Johnston, C. Cortez, A. S. Angelatos, et F. Caruso, « Layer-by-layer engineered capsules and their applications », *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2006**, 11 (4), 203–209.
- [199] A. A. Antipov et G. B. Sukhorukov, « Polyelectrolyte multilayer capsules as vehicles with tunable permeability », *Advances in Colloid and Interface Science* **2004**, 111 (1-2), 49–61.
- [200] X. Gu, J. Wang, Y. Wang, Y. Wang, H. Gao, et G. Wu, « Layer-by-layer assembled polyaspartamide nanocapsules for pH-responsive protein delivery », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, 108, 205–211.
- [201] A. Raichur, Thomas, Radhakrishnan, Gnanadhas, et D. Chakravorty, « Intracellular delivery of doxorubicin encapsulated in novel pH-responsive chitosan/heparin nanocapsules », *International Journal of Nanomedicine* **2013**, 8, 267-273.
- [202] K. Szczepanowicz, U. Bazylińska, J. Pietkiewicz, L. Szyk-Warszyńska, K. A. Wilk, et P. Warszyński, « Biocompatible long-sustained release oil-core polyelectrolyte nanocarriers: From controlling physical state and stability to biological impact », *Advances in Colloid and Interface Science* **2015**, 222, 678–691.
- [203] J. Szafraniec, M. Janik, J. Odrobińska, et S. Zapotoczny, « Nanocapsules templated on liquid cores stabilized by graft amphiphilic polyelectrolytes », *Nanoscale* **2015**, 7 (12), 5525–5536.
- [204] J. Cui, M. P. van Koeven, M. Müllner, K. Kempe, et F. Caruso, « Emerging methods for the fabrication of polymer capsules », *Advances in Colloid and Interface Science* **2014**, 207, 14–31.
- [205] L. J. De Cock, S. De Koker, B. G. De Geest, J. Grooten, C. Vervaet, J. P. Remon, G. B. Sukhorukov, et M. N. Antipina, « Polymeric Multilayer Capsules in Drug Delivery », *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49 (39), 6954–6973.
- [206] D. Wu, C. Scott, C.-C. Ho, et C. C. Co, « Aqueous-Core Capsules via Interfacial Free Radical Alternating Copolymerization », *Macromolecules* **2006**, 39 (17), 5848–5853.

- [207] C. Scott, D. Wu, C.-C. Ho, et C. C. Co, « Liquid-Core Capsules via Interfacial Polymerization: A Free-Radical Analogy of the Nylon Rope Trick », *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127 (12), 4160–4161.
- [208] A. P. Romio, N. Bernardy, E. Lemos Senna, P. H. H. Araújo, et C. Sayer, « Polymeric nanocapsules via miniemulsion polymerization using redox initiation », *Materials Science and Engineering: C* **2009**, 29 (2), 514–518.
- [209] W. Li, K. Matyjaszewski, K. Albrecht, et M. Möller, « Reactive Surfactants for Polymeric Nanocapsules via Interfacially Confined Miniemulsion ATRP », *Macromolecules* **2009**, 42 (21), 8228–8233.
- [210] M. Ashaduzzaman, S. H. Kai, et M. Kunitake, « Investigation of Click Reaction at an Oil-Water Interface Using Hydrophobic and Hydrophilic Polymers », *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy* **2013**, 11, 31–39.
- [211] J. M. Siebert, G. Baier, A. Musyanovych, et K. Landfester, « Towards copper-free nanocapsules obtained by orthogonal interfacial “click” polymerization in miniemulsion », *Chemical Communications* **2012**, 48 (44), 5470.
- [212] K. Poltorak, A. Durand, M. Léonard, J.-L. Six, et C. Nouvel, « Interfacial click chemistry for improving both dextran shell density and stability of biocompatible nanocapsules », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2015**, 483, 8–17.
- [213] N. Anton, J.-P. Benoit, et P. Saulnier, « Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review », *Journal of Controlled Release* **2008**, 128 (3), 185–199.
- [214] F. R. Steinmacher, N. Bernardy, J. B. Moretto, E. I. Barcelos, P. H. H. Araújo, et C. Sayer, « Kinetics of MMA and VAc Miniemulsion Polymerizations Using Miglyol and Castor Oil as Hydrophobe and Liquid Core », *Chemical Engineering & Technology* **2010**, 33 (11), 1877–1887.
- [215] A. P. Romio, C. Sayer, P. H. H. Araújo, M. Al-Haydari, L. Wu, et S. R. P. da Rocha, « Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization with Biodegradable Surfactant and Hydrophobe », *Macromolecular Chemistry and Physics* **2009**, 210 (9), 747–751.
- [216] J. M. Asua, « Miniemulsion polymerization », *Progress in Polymer Science* **2002**, 27 (7), 1283–1346.
- [217] K. Landfester et V. Mailänder, « Nanocapsules with specific targeting and release properties using miniemulsion polymerization », *Expert Opinion on Drug Delivery* **2013**, 10 (5), 593–609.
- [218] N. Jagielski, S. Sharma, V. Hombach, V. Mailänder, V. Rasche, et K. Landfester, « Nanocapsules Synthesized by Miniemulsion Technique for Application as New Contrast Agent Materials », *Macromolecular Chemistry and Physics* **2007**, 208 (19-20), 2229–2241.
- [219] K. Landfester, N. Bechthold, S. Förster, et M. Antonietti, « Evidence for the preservation of the particle identity in miniemulsion polymerization », *Macromolecular Rapid Communications* **1999**, 20, 81–84.
- [220] F. R. Steinmacher, N. Bernardy, J. B. Moretto, E. I. Barcelos, P. H. H. Araújo, et C. Sayer, « Kinetics of MMA and VAc Miniemulsion Polymerizations Using Miglyol and Castor Oil as Hydrophobe and Liquid Core », *Chemical Engineering & Technology* **2010**, 33 (11), 1877–1887.
- [221] N. Bernardy, A. P. Romio, E. I. Barcelos, C. Dal Pizzol, C. L. Dora, E. Lemos-Senna, P. H. H. Araujo, et C. Sayer, « Nanoencapsulation of quercetin via miniemulsion polymerization », *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2010**, 6 (2), 181–186.
- [222] L. M. Forero Ramirez, J. Babin, A. Durand, J.-L. Six, et C. Nouvel « How inisurf improve control of atom transfer radical polymerization and facilitate nanocapsules production? ». *En préparation*.
- [223] C.-S. Chern et H.-T. Chang, « Particle nucleation and growth mechanisms in miniemulsion polymerization of styrene », *Polymer International* **2002**, 51 (12), 1428–1438.
- [224] E. Rix, G. Ceglia, J. Bajt, G. Chollet, V. Heroguez, E. Grau, et H. Cramail, « Hydrophobe-free miniemulsion polymerization: towards high solid content of fatty acid-based poly(urethane-urea) latexes », *Polymer Chemistry* **2015**, 6 (2), 213–217.
- [225] L. M. Ramirez, J. Babin, A. Durand, J.-L. Six, et C. Nouvel, « Biocompatible dextran-covered nanoparticles produced by Activator Generated by Electron Transfer Atom Transfer Radical

- Polymerization in miniemulsion », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2015**, 486, 60–68.
- [226] C. Liu, B. Liang, G. Shi, Z. Li, X. Zheng, Y. Huang, et L. Lin, « Preparation and characteristics of nanocapsules containing essential oil for textile application: Nanocapsules containing essential oil », *Flavour and Fragrance Journal* **2015**, 30 (4), 295–301.
- [227] F. Yu, Z.-H. Chen, X.-R. Zeng, X.-N. Gao, et Z.-G. Zhang, « Poly(methyl methacrylate) copolymer nanocapsules containing phase-change material (n -dodecanol) prepared via miniemulsion polymerization », *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, 132 (31), 42334.
- [228] S. Theisinger, K. Schoeller, B. Osborn, M. Sarkar, et K. Landfester, « Encapsulation of a Fragrance via Miniemulsion Polymerization for Temperature-Controlled Release », *Macromolecular Chemistry and Physics* **2009**, 210 (6), 411–420.
- [229] K. Landfester, A. Musyanovych, et V. Mailander, « From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using the miniemulsion process », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2010**, 48 (3), 493–515.
- [230] S. Torza et S. . Mason, « Three-phase interactions in shear and electrical fields », *Journal of Colloid and Interface Science* **1970**, 33 (1), 67–83.
- [231] F. Tiarks, K. Landfester, et M. Antonietti, « Preparation of Polymeric Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization », *Langmuir* **2001**, 17 (3), 908–918.
- [232] Y. Luo et X. Zhou, « Nanoencapsulation of a hydrophobic compound by a miniemulsion polymerization process », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, 42 (9), 2145–2154.
- [233] A. R. Shirin-Abadi, S. Khoei, M. M. Rahim-Abadi, et A. R. Mahdavian, « Kinetic and thermodynamic correlation for prediction of morphology of nanocapsules with hydrophobic core via miniemulsion polymerization », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2014**, 462, 18–26.
- [234] A. P. Romio, N. Bernardy, E. Lemos Senna, P. H. H. Araújo, et C. Sayer, « Polymeric nanocapsules via miniemulsion polymerization using redox initiation », *Materials Science and Engineering: C* **2009**, 29 (2), 514–518.
- [235] F. R. Steinmacher, N. Bernardy, J. B. Moretto, E. I. Barcelos, P. H. H. Araújo, et C. Sayer, « Kinetics of MMA and VAc Miniemulsion Polymerizations Using Miglyol and Castor Oil as Hydrophobe and Liquid Core », *Chemical Engineering & Technology* **2010**, 33 (11), 1877–1887.
- [236] A. J. P. van Zyl, R. D. Sanderson, D. de Wet-Roos, et B. Klumperman, « Core/Shell Particles Containing Liquid Cores: Morphology Prediction, Synthesis, and Characterization », *Macromolecules* **2003**, 36 (23), 8621–8629.
- [237] M. Wu, L. M. Forero Ramirez, A. Rodriguez Lozano, D. Quémener, J. Babin, A. Durand, E. Marie, J.-L. Six, et C. Nouvel, « First multi-reactive dextran-based inisurf for atom transfer radical polymerization in miniemulsion », *Carbohydrate Polymers* **2015**, 130, 141–148.
- [238] W. Li, J. A. Yoon, et K. Matyjaszewski, « Dual-Reactive Surfactant Used for Synthesis of Functional Nanocapsules in Miniemulsion », *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (23), 7823–7825.
- [239] B. T. T. Pham, D. Nguyen, C. J. Ferguson, B. S. Hawkett, A. K. Serelis, et C. H. Such, « Miniemulsion Polymerization Stabilized by Amphiphathic Macro RAFT Agents », *Macromolecules* **2003**, 36 (24), 8907–8909.
- [240] A. M. dos Santos, T. Le Bris, C. Graillat, F. D'Agosto, et M. Lansalot, « Use of a Poly(ethylene oxide) MacroRAFT Agent as Both a Stabilizer and a Control Agent in Styrene Polymerization in Aqueous Dispersed System », *Macromolecules* **2009**, 42 (4), 946–956.
- [241] W. Li et K. Matyjaszewski, « Cationic Surface-Active Monomers as Reactive Surfactants for AGET Emulsion ATRP of n -Butyl Methacrylate », *Macromolecules* **2011**, 44 (14), 5578–5585.
- [242] D. Crespy, A. Musyanovych, et K. Landfester, « Synthesis of polymer particles and nanocapsules stabilized with PEO/PPO containing polymerizable surfactants in miniemulsion », *Colloid and Polymer Science* **2006**, 284, 780–787.

- [243] B. Klumperman, « Styrene/Maleic Anhydride Macro-RAFT-Mediated Encapsulation », *Macromolecular Chemistry and Physics* **2006**, 207 (10), 861–863.
- [244] Y. Yu, Q. Zhang, X. Zhan, et F. Chen, « Interfacially confined RAFT miniemulsion copolymerization of styrene and butadiene », *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, 127 (4), 2557–2565.
- [245] H. Chen et Y. Luo, « Facile Synthesis of Nanocapsules and Hollow Nanoparticles Consisting of Fluorinated Polymer Shells by Interfacial RAFT Miniemulsion Polymerization », *Macromolecular Chemistry and Physics* **2011**, 212 (7), 737–743.
- [246] K. Tian, J. Zeng, X. Zhao, L. Liu, X. Jia, et P. Liu, « Synthesis of multi-functional nanocapsules via interfacial AGET ATRP in miniemulsion for tumor micro-environment responsive drug delivery », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, 134, 188–195.
- [247] X. Wang, G. Jiang, Z. Wei, X. Li, et B. Tang, « Preparation and drug release property of CO₂ stimulus-sensitive poly(N, N-dimethylaminoethyl methacrylate)-b-polystyrene nanoparticles », *European Polymer Journal* **2013**, 49 (10), 3165–3170.
- [248] C. Grazon, J. Rieger, R. Méallet-Renault, B. Charleux, et G. Clavier, « Ultrabright Fluorescent Polymeric Nanoparticles Made from a New Family of BODIPY Monomers », *Macromolecules* **2013**, 46 (13), 5167–5176.
- [249] C. Grazon, J. Rieger, R. Méallet-Renault, G. Clavier, et B. Charleux, « One-Pot Synthesis of Pegylated Fluorescent Nanoparticles by RAFT Miniemulsion Polymerization Using a Phase Inversion Process », *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, 32 (9-10), 699–705.
- [250] F. Stoffelbach, B. Belardi, J. M. R. C. A. Santos, L. Tessier, K. Matyjaszewski, et B. Charleux, « Use of an Amphiphilic Block Copolymer as a Stabilizer and a Macroinitiator in Miniemulsion Polymerization under AGET ATRP Conditions », *Macromolecules* **2007**, 40 (25), 8813–8816.
- [251] W. Li, K. Min, K. Matyjaszewski, F. Stoffelbach, et B. Charleux, « PEO-Based Block Copolymers and Homopolymers as Reactive Surfactants for AGET ATRP of Butyl Acrylate in Miniemulsion », *Macromolecules* **2008**, 41 (17), 6387–6392.
- [252] F. Stoffelbach, N. Griffete, C. Bui, et B. Charleux, « Use of a simple surface-active initiator in controlled/living free-radical miniemulsion polymerization under AGET and ARGET ATRP conditions », *Chemical Communication* **2008**, 39, 4807–4809.
- [253] B. T. T. Pham, H. Zondanos, C. H. Such, G. G. Warr, et B. S. Hawkett, « Miniemulsion Polymerization with Arrested Ostwald Ripening Stabilized by Amphiphilic RAFT Copolymers », *Macromolecules* **2010**, 43 (19), 7950–7957.
- [254] Y. Wang, G. Jiang, X. Sun, M. Ding, H. Hu, et W. Chen, « Preparation of shell cross-linked nanoparticles via miniemulsion RAFT polymerization », *Polymer Chemistry* **2010**, 1 (10), 1638.
- [255] T. Boursier, I. Chaduc, J. Rieger, F. D’Agosto, M. Lansalot, et B. Charleux, « Controlled radical polymerization of styrene in miniemulsion mediated by PEO-based trithiocarbonate macromolecular RAFT agents », *Polymer Chemistry* **2011**, 2 (2), 355–362.
- [256] Y. Yu, Q. Zhang, Z. Wang, X. Zhan, R. He, W. Zhang, et F. Chen, « Synthesis of Surface-Functionalized Poly(styrene- co -butadiene) Nanoparticles via Controlled/Living Radical Mini-emulsion Copolymerization Stabilized by Ammonolyzed Poly(styrene- alt -maleic anhydride) (SMA) RAFT Agent », *Journal of Macromolecular Science, Part A* **2012**, 49 (1), 60–66.
- [257] H. Minami, K. Shimomura, T. Suzuki, K. Sakashita, et T. Noda, « RAFT Polymerization in a Miniemulsion System Using a Novel Type of Amphiphilic RAFT Agent with Poly(ethylene glycol) Bound to a Dithiobenzoate Group », *Macromolecules* **2014**, 47 (1), 130–136.
- [258] L. Yang, P. Sun, H. Yang, D. Qi, et M. Wu, « A feasible method of preparation of block copolymer latex films with stable microphase separation structures », *Progress in Organic Coatings* **2014**, 77 (2), 305–314.
- [259] L. Yang, J. Xu, P. Sun, Y. Shen, et Y. Luo, « Ab Initio Emulsion and Miniemulsion Polymerization of Styrene Mediated by a Cyclohexenyl-Functionalized Amphiphilic RAFT Agent », *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2014**, 53 (28), 11259–11268.

- [260] Y. Luo et H. Gu, « A General Strategy for Nano-Encapsulation via Interfacially Confined Living/Controlled Radical Miniemulsion Polymerization », *Macromolecular Rapid Communications* **2006**, 27 (1), 21–25.
- [261] Y. Luo et H. Gu, « Nanoencapsulation via interfacially confined reversible addition fragmentation transfer (RAFT) miniemulsion polymerization » *Polymer* **2007**, 48 (11), 3262–3272.
- [262] Y. Yu, Q. Zhang, X. Zhan, et F. Chen, « Comparison of styrene reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization in a miniemulsion system stabilized by ammonolysis poly(styrene-alt-maleic anhydride) and sodium dodecyl sulfate », *Journal of Applied Polymer Science* **2012**, 124 (5), 4249–4258.
- [263] F. Lu, Y. Luo, et B. Li, « A Facile Route to Synthesize Highly Uniform Nanocapsules: Use of Amphiphilic Poly(acrylic acid)-block-polystyrene RAFT Agents to Interfacially Confine Miniemulsion Polymerization », *Macromolecular Rapid Communications* **2007**; 28 (7), 868–874.
- [264] F. Lu, Y. Luo, et B. Li, « pH Effects on the Synthesis of Nanocapsules via Interfacial Miniemulsion Polymerization Mediated by Amphiphilic RAFT Agent with the R Group of Poly(methyl acrylic acid- ran - styrene) », *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2010**, 49 (5), 2206–2212.
- [265] Y. Changhuai, L. Yingwu, et L. Xuesong, « Synthesis of non-collapsed hollow polymeric nanoparticles with shell thickness on the order of polymer gyration radius », *Polymer* **2011**, 52 (3), 683–693.
- [266] R. H. Utama, Y. Guo, P. B. Zetterlund, et M. H. Stenzel, « Synthesis of hollow polymeric nanoparticles for protein delivery via inverse miniemulsion periphery RAFT polymerization », *Chemical Communications* **2012**, 48 (90), 11103-11105.
- [267] R. H. Utama, M. H. Stenzel, et P. B. Zetterlund, « Inverse Miniemulsion Periphery RAFT Polymerization: A Convenient Route to Hollow Polymeric Nanoparticles with an Aqueous Core », *Macromolecules* **2013**, 46 (6), 2118–2127.
- [268] F. Ishizuka, R. H. Utama, S. Kim, M. H. Stenzel, et P. B. Zetterlund, « RAFT inverse miniemulsion periphery polymerization in binary solvent mixtures for synthesis of nanocapsules », *European Polymer Journal* **2015**, 73, 324–334.
- [269] Y. Wang, G. Jiang, M. Zhang, L. Wang, R. Wang, et X. Sun, « Facile one-pot preparation of novel shell cross-linked nanocapsules: inverse miniemulsion RAFT polymerization as an alternative approach », *Soft Matter* **2011**, 7 (11), 5348-5352.
- [270] K. Matyjaszewski et J. Spanswick, « Controlled/living radical polymerization », *Materials Today* **2005**, 8 (3), 26–33.
- [271] W. A. Braunecker et K. Matyjaszewski, « Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives », *Progress in Polymer Science* **2007**, 32 (1), 93–146.
- [272] N. V. Tsarevsky et B. S. Sumerlin, (Ed), « Fundamentals of controlled/living radical polymerization ». Cambridge: RSC Publ, **2013**, 364p.
- [273] K. Ferji, C. Nouvel, J. Babin, M.-H. Li, C. Gaillard, E. Nicol, C. Chassenieux, et J.-L. Six, « Polymersomes from Amphiphilic Glycopolymers Containing Polymeric Liquid Crystal Grafts », *ACS Macro Letters* **2015**, 4 (10), 1119–1122.
- [274] L. Dupayage, M. Save, E. Dellacherie, C. Nouvel, et J.-L. Six, « PMMA-grafted dextran glycopolymers by atom transfer radical polymerization », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, 46 (23), 7606–7620.
- [275] D. G. Hawthorne, G. Moad, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Living Radical Polymerization with Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (RAFT): Direct ESR Observation of Intermediate Radicals », *Macromolecules* **1999**, 32 (16), 5457–5459.
- [276] G. Moad, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Second Update », *Australian Journal of Chemistry* **2009**, 62 (11), 1402-1472.
- [277] M. F. Cunningham, « Controlled/living radical polymerization in aqueous dispersed systems », *Progress in Polymer Science* **2008**, 33 (4), 365–398.
- [278] J. Qiu, B. Charleux, et K. Matyjaszewski, « Controlled/living radical polymerization in aqueous media: homogeneous and heterogeneous systems », *Progress in Polymer Science* **2001**, 26 (10), 2083–2134.

- [279] C. Barner-Kowollik (Ed), « Handbook of RAFT polymerization ». Weinheim: Wiley-VCH, **2008**, 541p.
- [280] C. Boyer, V. Bulmus, T. P. Davis, V. Ladmiral, J. Liu, et S. Perrier, « Bioapplications of RAFT Polymerization », *Chemical Reviews* **2009**, 109 (11), 5402–5436.
- [281] M. Benaglia, J. Chiefari, Y. K. Chong, G. Moad, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Universal (Switchable) RAFT Agents », *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131 (20), 6914–6915.
- [282] G. Moad, J. Chiefari, (Bill) Y?K Chong, J. Krstina, R. T. Mayadunne, A. Postma, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Living free radical polymerization with reversible addition - fragmentation chain transfer (the life of RAFT) », *Polymer International* **2000**, 49 (9), 993–1001.
- [283] G. Litvinenko et A. H. E. Müller, « General Kinetic Analysis and Comparison of Molecular Weight Distributions for Various Mechanisms of Activity Exchange in Living Polymerizations », *Macromolecules* **1997**, 30 (5), 1253–1266.
- [284] M. Drache, G. Schmidt-Naake, M. Buback, et P. Vana, « Modeling RAFT polymerization kinetics via Monte Carlo methods: cumyl dithiobenzoate mediated methyl acrylate polymerization », *Polymer* **2005**, 46 (19), 8483–8493.
- [285] C. Barner-Kowollik, M. Buback, B. Charleux, M. L. Coote, M. Drache, T. Fukuda, A. Goto, B. Klumperman, A. B. Lowe, J. B. Mcleary, G. Moad, M. J. Monteiro, R. D. Sanderson, M. P. Tonge, et P. Vana, « Mechanism and kinetics of dithiobenzoate-mediated RAFT polymerization. I. The current situation », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2006**, 44 (20), 5809–5831.
- [286] G. Moad, J. Chiefari, R. T. A. Mayadunne, C. L. Moad, A. Postma, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Initiating free radical polymerization », *Macromolecular Symposia* **2002**, 182 (1), 65–80.
- [287] R. Plummer, Y.-K. Goh, A. K. Whittaker, et M. J. Monteiro, « Effect of Impurities in Cumyl Dithiobenzoate on RAFT-Mediated Polymerizations », *Macromolecules* **2005**, 38 (12), 5352–5355.
- [288] G. Moad, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Living Radical Polymerization by the RAFT Process », *Australian Journal of Chemistry* **2005**, 58 (6), 379.
- [289] C. Barner-Kowollik, J. F. Quinn, D. R. Morsley, et T. P. Davis, « Modeling the reversible addition-fragmentation chain transfer process in cumyl dithiobenzoate-mediated styrene homopolymerizations: Assessing rate coefficients for the addition-fragmentation equilibrium », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2001**, 39 (9), 1353–1365.
- [290] A. Feldermann, M. L. Coote, M. H. Stenzel, T. P. Davis, et C. Barner-Kowollik, « Consistent experimental and theoretical evidence for long-lived intermediate radicals in living free radical polymerization », *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126 (48), 15915–15923.
- [291] M. Buback, O. Janssen, R. Oswald, S. Schmatz, et P. Vana, « A Missing Reaction Step in Dithiobenzoate-Mediated RAFT Polymerization », *Macromolecular Symposia* **2007**, 248 (1), 158–167.
- [292] S. Perrier, C. Barner-Kowollik, J. F. Quinn, P. Vana, et T. P. Davis, « Origin of Inhibition Effects in the Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization of Methyl Acrylate », *Macromolecules* **2002**, 35 (22), 8300–8306.
- [293] M. F. Cunningham, « Living/controlled radical polymerizations in dispersed phase systems », *Progress in Polymer Science* **2002**, 27 (6), 1039–1067.
- [294] P. B. Zetterlund, Y. Kagawa, et M. Okubo, « Controlled/Living Radical Polymerization in Dispersed Systems », *Chemical Reviews* **2008**, 108 (9), 3747–3794.
- [295] P. B. Zetterlund, S. C. Thickett, S. Perrier, E. Bourgeat-Lami, et M. Lansalot, « Controlled/Living Radical Polymerization in Dispersed Systems: An Update », *Chemical Reviews*, **2015**, 115 (18), 9745–9800.
- [296] X. Zhou, P. Ni, et Z. Yu, « Comparison of RAFT polymerization of methyl methacrylate in conventional emulsion and miniemulsion systems », *Polymer* **2007**, 48 (21), 6262–6271.
- [297] S. W. Prescott, M. J. Ballard, E. Rizzardo, et R. G. Gilbert, « RAFT in Emulsion Polymerization: What Makes it Different? », *Australian Journal of Chemistry* **2002**, 55 (7), 415.
- [298] H. de Brouwer, J. G. Tsavalas, et F. J. Schork, « Living Radical Polymerization in Miniemulsion Using Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer », *Macromolecules* **2000**, 33 (25), 9239–9246.

- [299] Y. Luo, J. Tsavalas, et F. J. Schork, « Theoretical Aspects of Particle Swelling in Living Free Radical Miniemulsion Polymerization », *Macromolecules* **2001**, 34 (16), 5501–5507.
- [300] J. J. Vosloo, D. De Wet-Roos, M. P. Tonge, et R. D. Sanderson, « Controlled Free Radical Polymerization in Water-Borne Dispersion Using Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer », *Macromolecules* **2002**, 35 (13), 4894–4902.
- [301] M. Lansalot, T. P. Davis, et J. P. A. Heuts, « RAFT Miniemulsion Polymerization: Influence of the Structure of the RAFT Agent », *Macromolecules* **2002**, 35 (20), 7582–7591.
- [302] A. J. P. van Zyl, R. F. P. Bosch, J. B. McLeary, R. D. Sanderson, et B. Klumperman, « Synthesis of styrene based liquid-filled polymeric nanocapsules by the use of RAFT-mediated polymerization in miniemulsion », *Polymer* **2005**, 46 (11), 3607–3615.

PARTIE II

RESULTATS ET DISCUSSION

OBJECTIFS ET STRATEGIE DE SYNTHESE

OBJECTIFS ET STRATEGIE DE SYNTHÈSE

OBJECTIFS

L'objectif de ce doctorat consistait à développer une nouvelle plateforme de nanocapsules (NCs) polymères présentant une morphologie et des propriétés de surface contrôlées, dans le but de les employer comme systèmes de délivrance de principes actifs après injection par voie intraveineuse. Il s'agissait idéalement de développer un nouvel outil thérapeutique destiné au traitement du cancer et de répondre le plus favorablement possible aux critères requis pour une vectorisation efficace des anticancéreux *in vivo* (voir Partie I, paragraphe 2.5).

Ainsi, cette nouvelle plateforme de NCs (Figure II- 1) a été imaginée pour présenter une certaine furtivité vis-à-vis du système immunitaire, conduire au moins à un minimum de ciblage passif des tissus tumoraux via l'effet EPR et au contraire, à un ciblage actif optimisé. Les NCs envisagées (Figure II- 1) d'un diamètre moyen d'environ une centaine de nanomètres seront composées de :

- **Un cœur huileux hydrophobe et biocompatible en Miglyol®810 (M810)** qui devrait permettre dans le futur de solubiliser et d'encapsuler des SAs lipophiles ; idéalement des médicaments utilisés en chimiothérapie comme le paclitaxel, le docétaxel et la camptothécine [1].
- **Une écorce interne polyméthacrylate.** Initialement, cette écorce sera hydrophobe en PMMA mais nous envisageons à terme une écorce pH-sensible constituée d'un copolymère méthacrylique. Ainsi, dans ce dernier cas, les NCs pourraient relarguer leur

contenu après avoir été acheminées sur le site désiré, en réponse à l'environnement acide des cellules cancéreuses.

- **Une couronne externe hydrophile à base de dextrane** dont la fonction est d'assurer la stabilité colloïdale des objets et de minimiser l'adsorption des opsonines (protéines circulant dans le système sanguin) à la surface de l'écorce polyméthacrylate des NCs, et par là-même les phénomènes de reconnaissance de ces objets par le système immunitaire. Grâce à cette couronne hydrophile, ces NCs devraient 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). Cependant, à terme, la plateforme imaginée devrait nous permettre de fixer des ligands spécifiques sur cette couronne pour envisager un ciblage des cellules tumorales visées (ciblage actif).

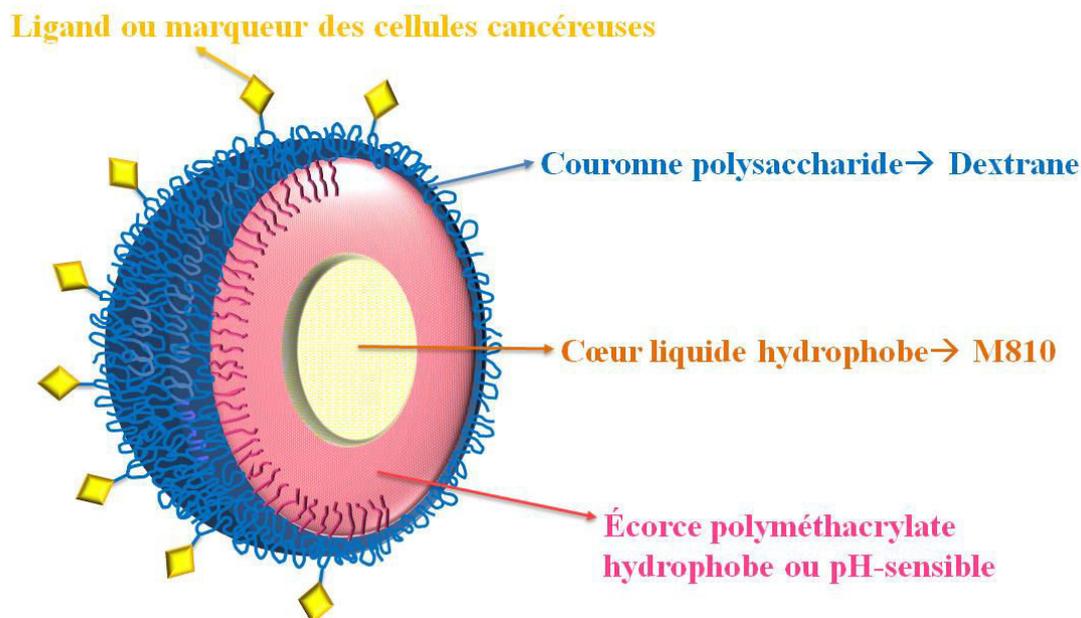


Figure II- 1 : Plateforme de NCs envisagées pour un ciblage actif des tissus tumoraux.

STRATEGIE DE SYNTHÈSE

En combinant astucieusement une polymérisation en miniémulsion, une technique avancée de polymérisation radicalaire par désactivation réversible (PRDR) et un tensioactif réactif, il est possible de former directement dans l'eau des NCs à écorce polymère, recouvertes de dextrane. Cette stratégie a déjà été employée au LCPM, notamment au cours de mon master et en début de cette thèse, dans le cas de l'ATRP du MMA [2] ou de l'acrylate de butyle [3] menée en

miniémulsion à partir d'un inisurf. Dans ce cas, un dérivé amphiphile du dextrane portant plusieurs groupements amorceurs de la polymérisation avait été employé comme inisurf multifonctionnel. L'utilisation combinée d'une PRDR et de tensioactifs réactifs permet de localiser la polymérisation du monomère hydrophobe à l'interface des nanogouttelettes et de favoriser la formation de NCs comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique (Partie I, Paragraphe 3.2.3). Dans le cadre de cette thèse, il s'agit donc d'étendre les travaux précédemment validés en ATRP à la polymérisation RAFT. Cette technique évite la présence du cuivre résiduel (provenant du catalyseur employée pour l'ATRP) à l'intérieur des objets finaux, condition souhaitable dans le cadre d'une application biomédicale.

Dans le cas de la polymérisation RAFT, nous avons envisagé d'employer un tensioactif réactif multifonctionnel, dérivé du dextrane, qui jouera le rôle de macroagent RAFT. Un tel composé sera donc un transurf. A notre connaissance, un tel macroagent RAFT tensioactif réactif et multifonctionnel n'a jamais encore été reporté dans la littérature, même si l'on peut citer toutefois un dérivé dextrane transurf (dextrane ω -xanthate) monofonctionnel [4] utilisé en émulsion. Plus précisément, il s'agit d'utiliser un tensioactif réactif multifonctionnel du type transurf, portant à la fois des groupements agents de transfert RAFT réactifs lors de la polymérisation et des groupements hydrophobes qui assureront le caractère tensioactif nécessaire pour assurer la stabilité de la miniémulsion initiale (Schéma II- 1). Ainsi, lors du procédé de polymérisation en miniémulsion, le transurf sera majoritairement localisé à la surface des nanogouttelettes obtenues après émulsification, ce qui permettra un confinement de la polymérisation à l'interface (monomère+huile)/eau (a, Schéma II- 1). Par croissance des chaînes macromoléculaires à partir des groupements agent de transfert RAFT localisés sur la dorsale du polysaccharide, un copolymère greffé sera formé à l'interface liquide/liquide (b, Schéma II- 1). Si les greffons formés ne sont pas solubles dans l'huile qui constituera le cœur des NCs, une ségrégation de phases se produira entre ces greffons et l'huile durant la polymérisation, ce qui conduira à la formation de l'écorce polymère en périphérie de l'objet. Grâce à la polymérisation RAFT qui permet de contrôler les paramètres macromoléculaires, la masse molaire moyenne des greffons polymères et par conséquent l'épaisseur de l'écorce interne de la NC pourraient être variées. Ceci devrait faciliter le contrôle de la morphologie des NCs, primordial pour *in fine* moduler la cinétique de libération des principes actifs pouvant y être encapsulés. Par ailleurs, le fait de fixer de façon covalente le recouvrement hydrophile dextrane en surface de l'objet, permet de l'ancrer de façon irréversible sur les particules et ainsi d'assurer leur stabilité colloïdale et éventuellement leur caractère furtif vis-à-vis du système immunitaire.

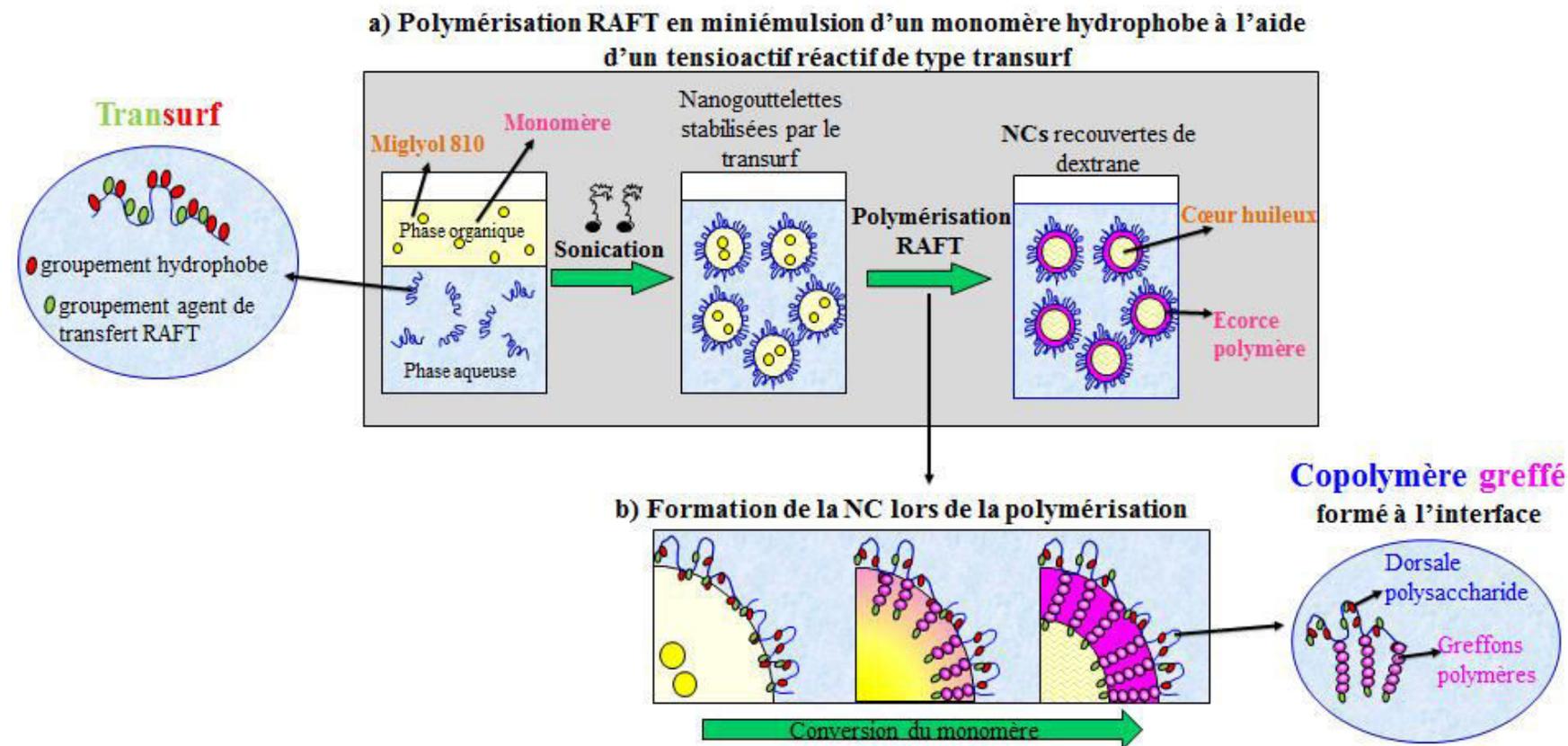


Schéma II- 1 : Stratégie de synthèse des NCs à cœur huileux (M810) et écorce polymère par ségrégation de phases lors d'un procédé de polymérisation RAFT en miniémulsion en présence d'un transurf dérivé du dextrane.

EVOLUTION DE LA PLATEFORME

Le premier monomère que nous utiliserons sera le MMA, ce qui nous permettra d'étudier la fabrication des NCs à écorce PMMA pouvant être testées pour un ciblage passif de cellules cancéreuses (a, Schéma II- 2). Mais la versatilité du procédé de fabrication envisagé devrait nous permettre de modifier la nature chimique de ces nano-objets, et ainsi d'envisager également la fabrication de NCs dites intelligentes capables de répondre à un stimulus externe tel que le pH.

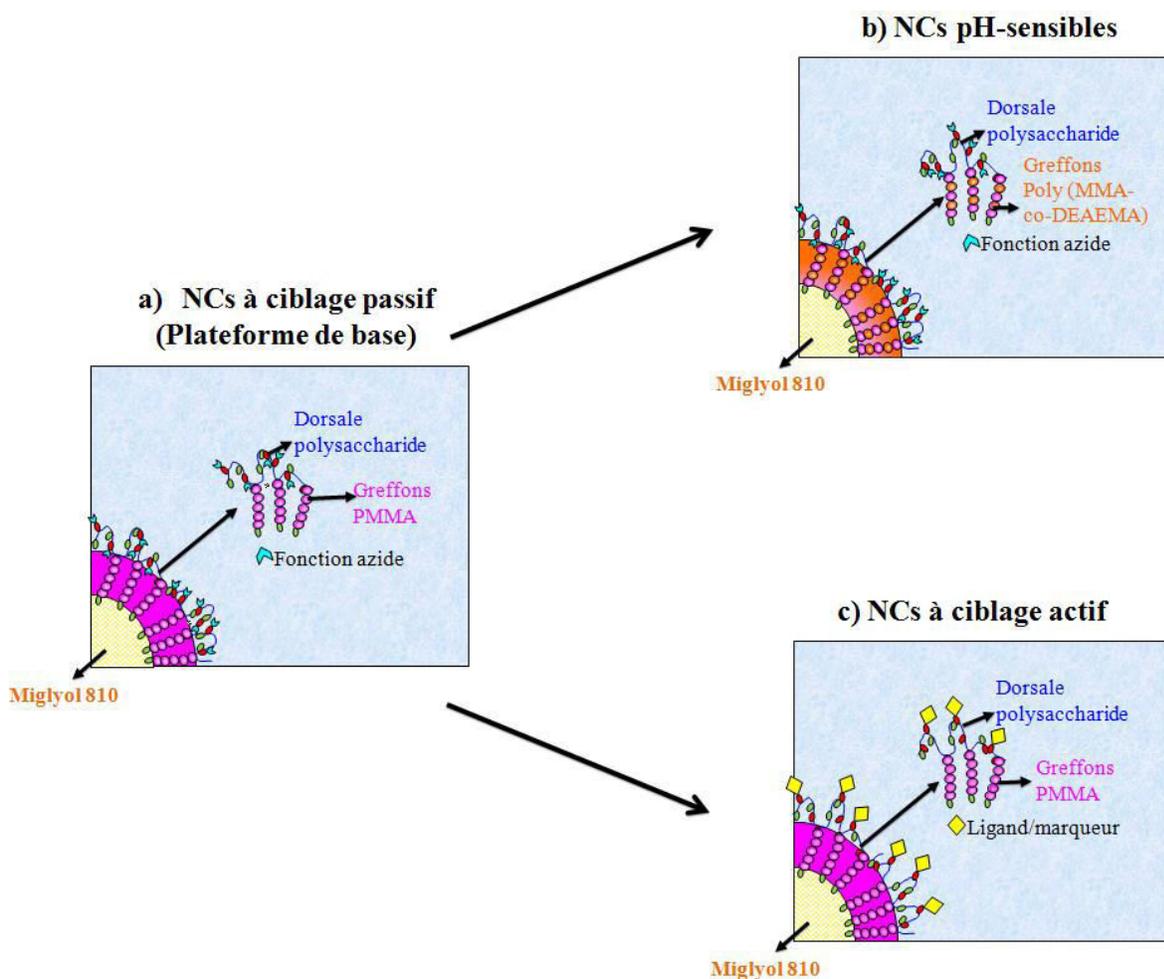


Schéma II- 2 : Possible évolution de la plateforme de NCs vers l'obtention des objets pH-sensibles permettant un ciblage actif des cellules cancéreuses.

Cette évolution de la plateforme a été envisagée de façon préliminaire à ce travail de thèse. Des NCs ayant une écorce pH-sensible (b, Schéma II- 2) ont été imaginées afin de tirer profit des différences

de pH existantes entre les cellules saines (légèrement alcalines) et les milieux extracellulaire et intracellulaire des cellules cancéreuses (caractérisés pour un pH plus acide pouvant atteindre pH=4 dans les lysosomes) [5]. Ainsi, par variation de pH, on peut imaginer déclencher la libération du principe actif dans ou aux environs des tissus malades. Pour ce faire, le MMA sera copolymérisé avec le méthacrylate de N,N-diéthylaminoéthyle (DEAEMA) suivant la stratégie de synthèse décrite dans le Schéma II- 1.

Enfin, dès la conception de la plateforme et en particulier la synthèse du transurf, on peut envisager la présence des groupements post-réactifs sur la couronne du polysaccharide des NCs. Pour cela, les groupements hydrophobes fixés sur la chaîne du dextrane (pour le rendre amphiphile) seront dotés de fonctions azoture qui nous permettront *in fine*, après formulation des NCs, de fixer des ligands ou autres marqueurs spécifiques de cellules cancéreuses à la surface de ces objets (c, Schéma II- 2). La possibilité de fonctionnaliser les NCs fabriquées au cours de cette thèse ne sera toutefois validée que par greffage d'une molécule fluorescente. Cependant, la possibilité de faire cette post-fonctionnalisation des NCs ouvrirait la voie à la fixation de ligands spécifiques pour atteindre un ciblage actif des cellules cancéreuses.

La fabrication de NCs pH-sensibles et la possible post-modification de la surface des NCs ne seront étudiées qu'à la fin de cette deuxième partie. Nous nous intéresserons dans un premier temps à l'élaboration de NCs à écorce hydrophobe en PMMA. Ainsi, le premier chapitre de cette partie expose la synthèse et caractérisation des transurfs dérivés du dextrane. Dans le deuxième chapitre, ces transurfs seront utilisés pour la fabrication de NCs par homopolymérisation du MMA en miniémulsion. Le troisième chapitre sera consacré à la caractérisation des objets obtenus en termes de distribution de taille, stabilité colloïdale et potentiel Zêta. Des analyses par microscopie électronique de transmission à basse température (Cryo-MET) nous permettront également de caractériser la morphologie des NCs et de vérifier l'existence d'une architecture cœur-écorce de nos objets. Enfin, le dernier chapitre présente l'extrapolation de la plateforme vers la fabrication des NCs à écorce pH-sensible, les études sur l'encapsulation et la libération d'une SA modèle, les premiers tests biologiques et la fonctionnalisation de la surface des NCs.

CHAPITRE I

Modifications chimiques du
dextrane : synthèse du transurf

| | |
|--|------------|
| 1. SYNTHÈSE DES DERIVES DU DEXTRANE..... | 107 |
| 1.1. GENERALITES SUR LE DEXTRANE..... | 107 |
| 1.2. LES DERIVES AMPHIPHILES DexN ₃ : INTRODUCTION DES GROUPEMENTS HYDROPHOBES..... | 109 |
| 1.2.1. Estimation du taux de modification par RMN ¹ H | 110 |
| 1.3. LES DERIVES REACTIFS DexN ₃ CTA : INTRODUCTION DES GROUPEMENTS AGENT DE TRANSFERT RAFT..... | 111 |
| 1.3.1. Choix des groupements agent de transfert RAFT. | 112 |
| 1.3.2. Choix des conditions opératoires..... | 116 |
| 1.3.3. Estimation du taux de modification par RMN ¹ H | 118 |
| 1.3.4. Influence des conditions de réaction sur le taux de modification..... | 119 |
| 2. CARACTERISATION DES DERIVES DU DEXTRANE..... | 123 |
| 2.1. CARACTERISATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (SEC)..... | 123 |
| 2.2. ETUDE DES PROPRIETES TENSIOACTIVES DES DERIVES DexN ₃ -τ ET DexN ₃ -τCTAγ ... | 124 |
| 3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE..... | 127 |
| 4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 128 |

CHAPITRE I

La conception du transurf est une des étapes cruciales de la synthèse de NCs, développée au cours de ce travail de thèse. Comme nous l'avons vu précédemment, les dérivés transurf du dextrane doivent jouer différents rôles lors de la polymérisation ou après élaboration des NCs. Lors de la polymérisation en miniémulsion, ce dérivé agit comme tensioactif pour stabiliser les nanogouttelettes de monomère, qui deviendront progressivement des NPs, et comme macroagent de transfert pour la polymérisation RAFT. C'est pourquoi ce dérivé est appelé transurf. Ce dernier doit également permettre la post-fonctionnalisation des objets produits. Pour cela, des fonctions post-réactives permettant le couplage avec des ligands seront introduites sur le transurf. Nous avons choisi de doter le dextrane de fonctions azoture permettant une modification ultérieure de la surface par Chimie « Click ».

Nous avons donc modifié le dextrane natif par deux types de groupements latéraux (Figure II- 2), d'une part des groupements réactifs agent de transfert RAFT (nommés CTA) et d'autre part, des chaînes hydrophobes comportant à leur extrémité d'une fonction azoture (nommées N₃). Cette chaîne hydrophobe permet, en plus de conférer un caractère tensioactif aux dérivés, de préserver la réactivité et l'accessibilité des fonctions N₃ à la surface des objets pour que celles-ci soient disponibles lors de la post-fonctionnalisation des NCs.

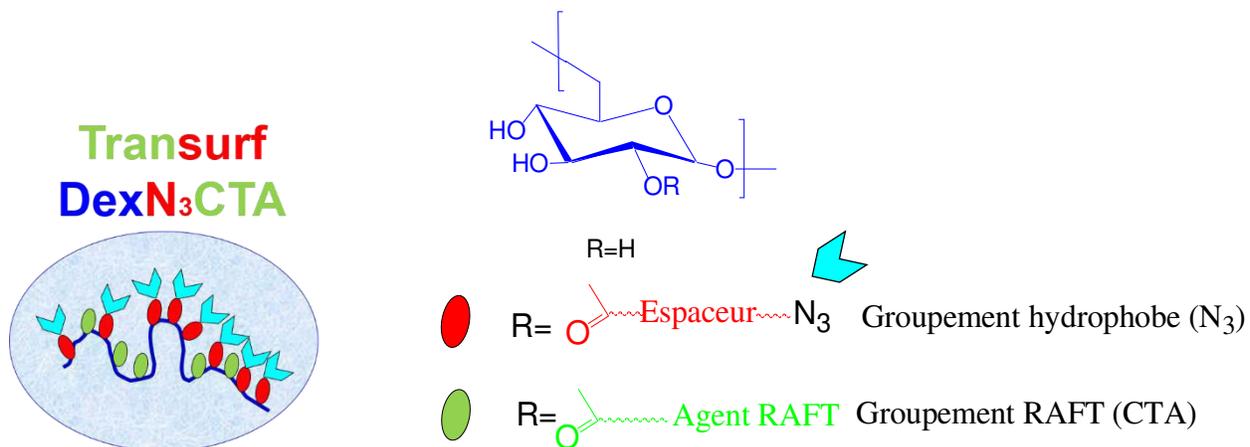


Figure II- 2 : Structure du tensioactif réactif de type transurf DexN₃CTA.

Les dérivés transurf seront nommés DexN₃CTA dans la suite du manuscrit, où N₃ et CTA représentent respectivement les groupements hydrophobes et agents de transfert RAFT introduits sur la dorsale du dextrane. Ces DexN₃CTA ont été synthétisés en deux étapes (Schéma II- 3). Tout d’abord, dans une première étape, le dextrane natif est modifié par l’acide 6-azidohéxanoïque pour fixer des chaînes alkyle hydrophobes fonctionnalisées par un groupe N₃ à leur extrémité, ce qui aboutit à un dérivé nommé DexN₃. Dans une seconde étape, des groupements RAFT du type dithiobenzoate seront introduits sur le DexN₃, par réaction avec l’acide 4-cyano-4 (phénylcarbonothioylthio)pentanoïque. La synthèse et la caractérisation des composés obtenus fait l’objet de ce chapitre.

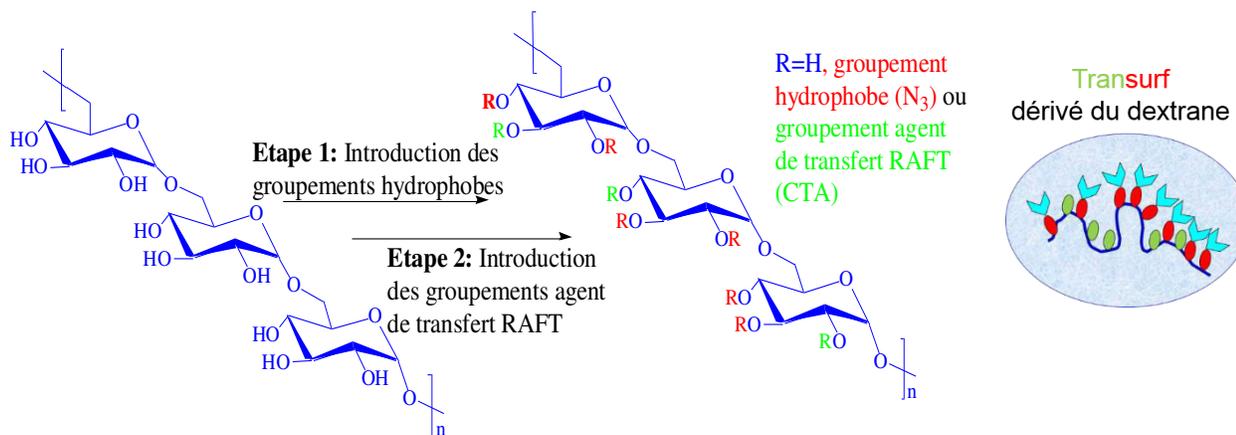


Schéma II- 3 : Stratégie de synthèse des transurfs dérivés du dextrane

1. SYNTHÈSE DES DERIVES DU DEXTRANE

1.1. GENERALITES SUR LE DEXTRANE

D'un point de vue chimique, le dextrane est un homopolysaccharide constitué d'un enchaînement d'unités glucopyranose liées majoritairement par des liaisons α -(1→6) (au minimum 50%). Des chaînes latérales provenant essentiellement de liaisons α -(1→3) et plus rarement, α -(1→2) et α -(1→4) [6], [7] (Figure II- 3).

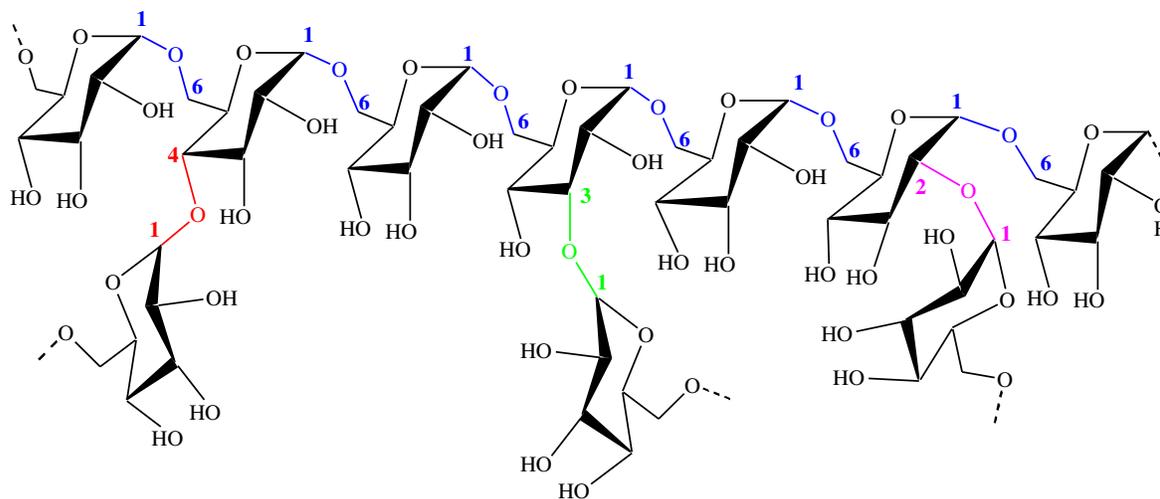


Figure II- 3 : Structure chimique du dextrane natif. Les unités glucopyranose sont essentiellement liées par des liaisons α -(1→6). Des chaînes latérales en α -(1→2), α -(1→3) et α -(1→4) peuvent être aussi présentes en moindre proportion.

Le dextrane est obtenu par l'action enzymatique de certaines bactéries sur les sucres et sa structure peut varier selon le type de bactérie utilisée. La « *Leuconostoc Mesenteroides* » (souche B512-F) est la variété microbienne la plus utilisée pour la production du dextrane à l'échelle industrielle [6]. La masse molaire du dextrane ainsi synthétisé, appelé couramment « dextrane natif », peut aller jusqu'à plusieurs millions de g/mol. C'est pourquoi il est soumis à un processus d'hydrolyse partielle en milieu acide, suivi d'un fractionnement par l'éthanol ou le méthanol [8], [9]. Ce procédé permet d'obtenir des chaînes dextrane plus courtes, essentiellement linéaires, ayant un nombre réduit de chaînes latérales par rapport au dextrane natif. Nous avons déjà montré dans des travaux précédents [10] que nous pouvions considérer la structure du dextrane commercial comme principalement

linéaire. C'est ce que nous admettrons dans la suite de ce manuscrit, en ne considérant que les liaisons glycosidiques du type α (1 \rightarrow 6) (Figure II- 4).

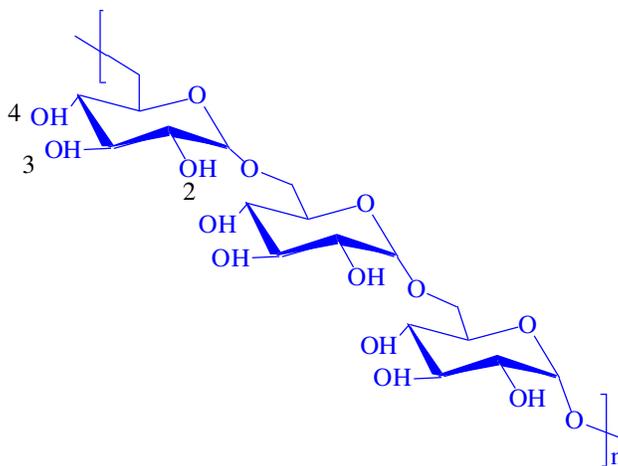


Figure II- 4: Structure linéaire du dextrane.

Les dextrans commerciaux sont en général désignés par l'intermédiaire de leur masse molaire moyenne en masse (\bar{M}_w), sous la forme générique $T_{\bar{M}_w}$ où la masse molaire est exprimée en kg/mol.

Les fractions de dextrane natif adaptées aux applications cliniques présentent des \bar{M}_w dans l'intervalle de 40 000-100 000 g/mol [6], [11]. En effet les macromolécules trop petites sont rapidement éliminées de l'organisme par clairance rénale, alors que les chaînes plus longues peuvent interférer avec le processus normal de coagulation du sang [12]. Ainsi, les dextrans commerciaux T70, T60 et T40 présentent un temps de circulation assez long dans l'organisme permettant par exemple leur utilisation efficace comme substituts du plasma sanguin lors de pertes modérées de sang [13].

D'autres applications cliniques du dextrane et de ses dérivés peuvent être listées comme par exemples : i) prévention des phénomènes thrombo-emboliques, ii) lubrifiant oculaire, iii) augmentation du niveau de glycémie, vi) conservation des organes pour une transplantation vii) anticoagulant, viii) fabrication de suppléments de fer [22]–[24]. Leur utilisation dans le domaine de la vectorisation de médicaments a aussi connue un grand essor ces dernières années. Plusieurs NVs à base de dextrane ou de dérivés de dextrane ont été reportés dans la littérature (voir Partie I, paragraphe 2.5.2).

En ce qui concerne les propriétés physicochimiques du dextrane, il s'agit d'un polymère très hydrophile qui est donc soluble dans l'eau et soluble que dans certains solvants organiques dont le DMSO, le formamide, l'éthylène glycol et le glycérol. Sa réactivité est liée à la présence des fonctions hydroxyle secondaires (OH-2, OH-3 et OH-4, Figure II- 4) sur les unités glucosidiques. Ces fonctions peuvent permettre le greffage des plusieurs groupements latéraux par l'intermédiaire de liaisons éther, ester ou encore amide [14]. Dans le cadre de cette thèse, la modification du dextrane est réalisée via des liaisons ester et sera détaillée ci-dessous.

1.2. LES DERIVES AMPHIPHILES DexN₃: INTRODUCTION DES GROUPEMENTS HYDROPHOBES.

Dans un premier temps, nous nous sommes inspirés des travaux réalisés par M. Laville [15] afin d'obtenir des dérivés hydrophobisés du dextrane T40 (appelé par la suite Dex) capables de jouer le rôle de tensioactifs, stabilisants d'interface liquide/liquide. Des chaînes linéaires hydrophobes à 6 carbones, dotées d'une fonction azoture terminale, ont été greffées sur le dextrane. Cette synthèse a été effectuée selon le protocole déjà établi au laboratoire (voir Partie III, Paragraphe 2.1). Brièvement, un dérivé activé de l'acide 6-azidohexanoïque (synthétisé à partir de l'acide 6-bromohéxanoïque commercial) réagit sur le dextrane, dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 50°C pendant 48 h (Schéma II- 4). Les dérivés ainsi obtenus seront nommés DexN₃- τ , avec τ le nombre des groupements hydrophobes introduits pour 100 unités glucopyranose.

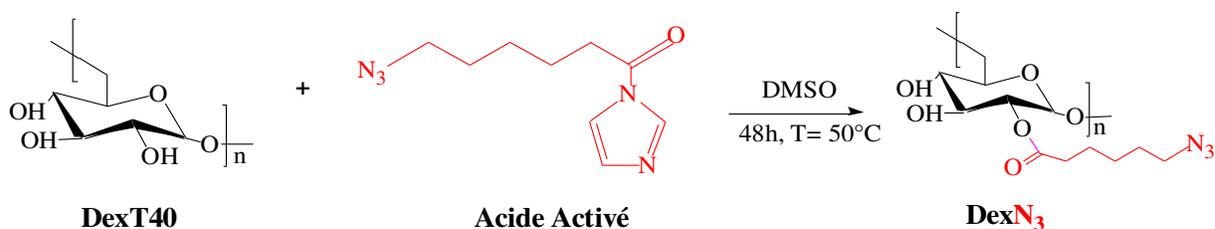


Schéma II- 4 : Synthèse des DexN₃. Introduction des groupements hydrophobes dotés d'une fonction azoture sur le dextrane.

1.2.1. Estimation du taux de modification par RMN ^1H

Les dérivés $\text{DexN}_{3,\tau}$ ont été caractérisés par RMN ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ après leur purification par de l'éthanol froid (Figure II- 5). Différents groupes de pics caractéristiques peuvent être identifiés :

- Les protons des trois fonctions hydroxyle (OH^2 , OH^3 , OH^4) et le proton anomère (H^α) de chaque unité glucopyranose résonnent entre 4,3 et 5,2 ppm. On nommera l'aire de cette zone A_{UG} .
- Certains protons méthyléniques de la chaîne alkyle greffée (b, c, d et e) sortent entre 1,2 et 2,4 ppm. Les 6 protons des pics c, e, d sortant entre 1,2 et 1,7 ppm sont particulièrement bien définis. L'aire de cette zone sera nommée A_{N_3} .
- Un massif entre 3,0 et 4,0 ppm correspondant aux 6 protons glucosidiques (H^2 à H^6) et aux 2 protons (f) de la chaîne alkyle proches de la fonction azoture terminale.

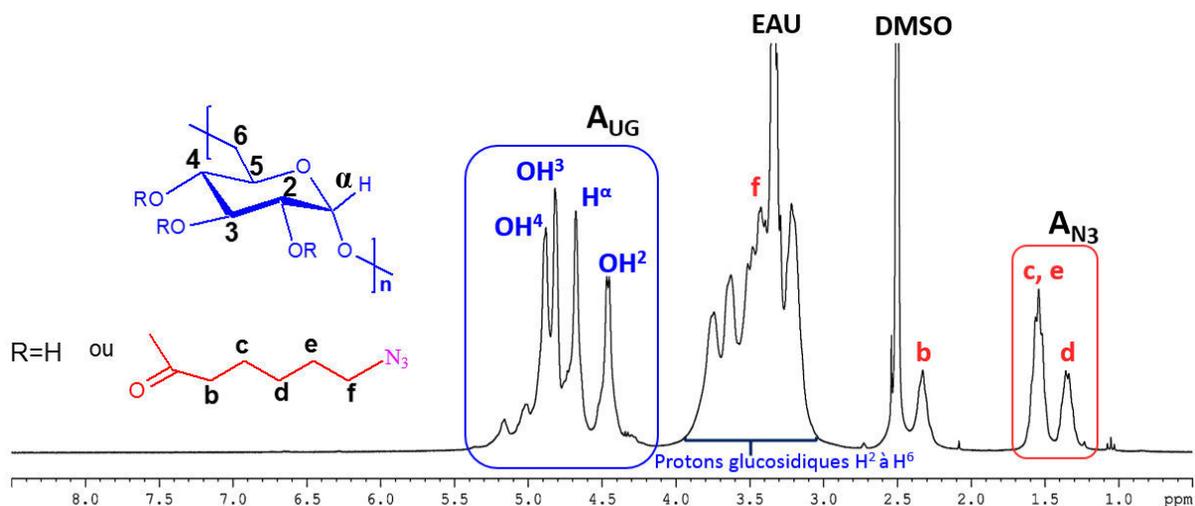


Figure II- 5 : Spectre RMN ^1H du dérivé $\text{DexN}_{3,20}$ dans le $\text{DMSO-}d_6$

Il est alors possible de calculer le degré de substitution en groupements hydrophobes (τ) du dextrane à l'aide de l'équation II- 1. τ correspond au nombre de fonctions hydroxyle modifiées par 100 cycles glucosidiques et peut varier entre 0-300% (chaque cycle comporte trois fonctions hydroxyle).

$$\tau = \frac{A_{N_3}/6}{A_{UG}/4} \times 100 \quad \text{II- 1}$$

Conformément aux travaux réalisés par M. Laville, nous avons observé que les taux de modification τ obtenus sont proportionnels à la quantité d'acide activé introduite dans le milieu réactionnel (Figure II- 6). Environ 84% de l'acide activé introduit réagit avec le dextrane. Pour que les DexN₃. τ puissent présenter des propriétés tensioactives suffisantes pour stabiliser les émulsions (MMA/eau), nous nous sommes volontairement limités à des degrés de modification τ compris entre 18 et 24%

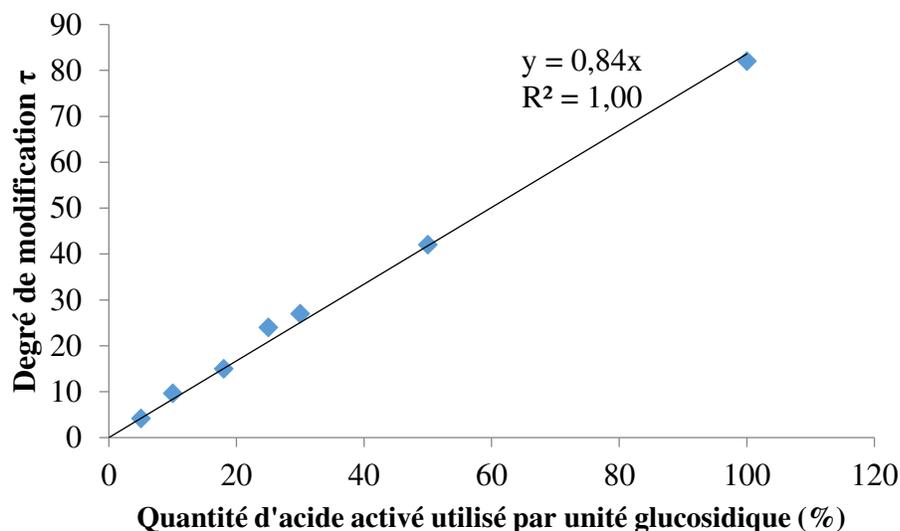
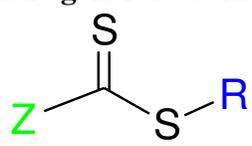
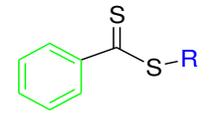
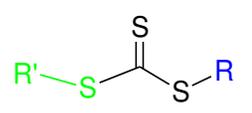
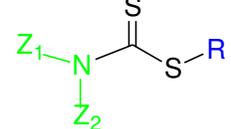
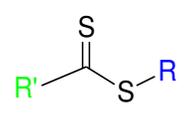
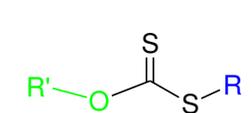


Figure II- 6 : Relation entre la quantité d'acide activée et le taux de modification τ des dérivés DexN₃. τ [15]

1.3. LES DERIVES REACTIFS DexN₃CTA : INTRODUCTION DES GROUPEMENTS AGENT DE TRANSFERT RAFT

Lors de cette deuxième étape de synthèse, les dérivés tensioactifs DexN₃. τ ont été modifiés afin d'introduire des groupements agents de transfert susceptibles de participer au contrôle de la polymérisation RAFT du MMA. Comme il s'agit du premier tensioactif réactif du type transurf synthétisé au LCPM, nous avons tout d'abord dû choisir des groupements agent de transfert RAFT appropriés à la polymérisation du MMA, puis nous avons cherché à optimiser les conditions de synthèse de ces nouveaux dérivés DexN₃CTA.

Tableau II- 1 : Agents de transfert RAFT (CTA) utilisés pour la polymérisation RAFT du MMA en solution ou en masse. Classification par nature chimique et par efficacité de contrôle de cette polymérisation.

| | | | | |
|--|---|---|---|--|
| $R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CN} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ [16]–[19] | $R' = \text{---CH}_3 \quad R = \begin{array}{c} \text{---} \\ \\ \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CN} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ [20] | Bon contrôle des masses molaires. Dispersités inférieures à 1,2. | | |
| $R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{---} \text{C}_6\text{H}_5$ [16], [17], [21] | $R' = \text{---C}_{12}\text{H}_{25} \quad R = \begin{array}{c} \text{---} \\ \\ \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CN} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ [22] | Formule générale d'un CTA  | | |
| $R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CO}_2\text{H} \end{array} \text{---} \text{C}_6\text{H}_5$ [16] | $R' = \text{---CH}_3 \quad R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CN} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ [18], [23] | $NZ_1Z_2 = \begin{array}{c} \text{---} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{---} \end{array}$ [24] | $R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CN} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ | |
| $R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \end{array} \text{---} \text{C}_6\text{H}_5$ [16] | $R' = \text{---C}_{12}\text{H}_{25} \quad R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CN} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ [25] | $NZ_1Z_2 = \begin{array}{c} \text{---} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{---} \end{array}$ [26] | $R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CN} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ | $R' = \text{---} \text{C}_6\text{H}_5 \quad R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ [27] |
| $R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ [16] | $R' = \text{---CH}_3 \quad R = \begin{array}{c} \text{---} \\ \\ \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CO}_2\text{H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ [28] | $NZ_1Z_2 = \begin{array}{c} \text{---} \\ \\ \text{N} \text{---} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \end{array}$ [26] | $R = \begin{array}{c} \text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$ | $R' = \text{---CH}_3 \quad R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ [17], [29] |
| | | | | $R' = \text{---C}_6\text{H}_5 \quad R = \begin{array}{c} \text{---} \\ \\ \text{C} \text{---} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ [30] |
| Dithiobenzoates | Trithiocarbonates | Dithiocarbamates | Dithioesters | Xanthates |
|  |  |  |  |  |

← Efficacité croissante pour le contrôle de la polymérisation du MMA

- Il a été montré qu'avec un choix approprié du groupement R, les dithiobenzoates (Z=phényle), les trithiocarbonates (Z=SR') et certains dithiocarbamates activés (Z=pyrrole) peuvent offrir un bon contrôle de la polymérisation RAFT du MMA [22], [31]. En revanche, l'utilisation de certains alkyl et arylalkyl dithioesters [17], [29] ne permet de contrôler les masses molaires des PMMA qu'à fortes conversions et donne lieu à de larges distributions massiques.
- En raison de leur capacité à stabiliser les espèces intermédiaires de l'équilibre RAFT, les dithiobenzoates sont les CTA les plus efficaces pour la polymérisation des monomères méthacryliques et styréniques [32]–[34]. En effet, la présence d'un groupement Z de type phényle favorise l'addition du MMA sur le groupe thiocarbonyle du CTA.
- Les dithiobenzoates ont attiré en particulier notre attention car ils ont déjà été employés avec succès pour la polymérisation RAFT du MMA en suspension[35], en émulsion [36], [37] et en miniémulsion [37]–[39].

Concernant les dithiobenzoates, on peut apporter quelques commentaires sur les groupements R :

- Chong et al. [16] ont étudié l'influence de la nature du groupement R de plusieurs dithiobenzoates sur leur efficacité à contrôler la polymérisation du MMA en solution à 60°C. Seuls les groupements R contenant des fonctions cumyle ou cyanoisopropyle (Figure II- 7) semblent capables de réamorcer efficacement la polymérisation du MMA, les constantes de transfert étant supérieures à 20. De plus, le substituant cyano du groupe R cyanoisopropyle permet d'accroître encore l'affinité des radicaux R• pour des doubles liaisons vinyliques riches en électrons telles que celles du MMA et donc son habilité comme groupement partant [32].

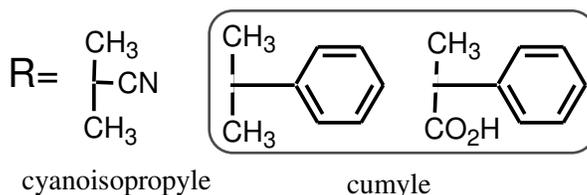


Figure II- 7 : Groupes R efficaces pour la polymérisation RAFT du MMA [16].

Avec ces informations, notre choix s'est porté sur un CTA du type dithiobenzoate comportant un groupe R de type cyanoisopropyle. Afin d'introduire ce type de CTA sur le dextrane partiellement modifié par des groupements hydrophobes (DexN_{3-τ}), il a été décidé de le lier au squelette polysaccharide par l'intermédiaire d'une liaison ester. Pour cela, il a été nécessaire d'utiliser un CTA portant une fonction acide capable de réagir avec les fonctions hydroxyle des unités glucopyranose. Dans ce but, nous avons sélectionné un des seuls dithiobenzoates acides commerciaux : l'acide 4-cyano-4-(phénylcarbonothioylthio)pentanoïque (CPADB) (Figure II- 8).

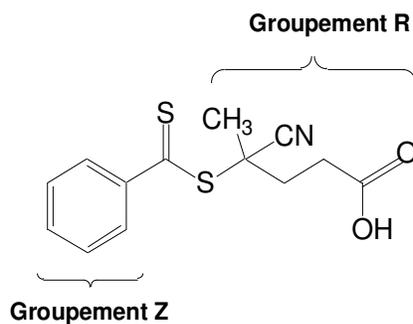


Figure II- 8 : Structure de l'agent RAFT acide commercial choisi pour la modification du dextrane : l'acide 4-cyano-4-(phénylcarbonothioylthio)pentanoïque (CPADB).

Le CPADB a également un autre avantage : la fonction acide est du côté du groupement partant R. Ainsi, après fixation du CPADB sur le dextrane par une fonction ester, la croissance des greffons PMMA se fera par une approche de type groupe R (« R-group approach »). En effet, après greffage du CTA de cette façon, le dextrane fera partie du groupement R du macroagent RAFT formé (Figure II- 9) à partir duquel la croissance de greffons s'effectuera. Les radicaux propageants seront alors localisés sur le polysaccharide après la première étape d'addition-fragmentation et les chaînes latérales grandiront directement à partir de la dorsale. La fonction thiocarbonyle, quant à elle, pourra se trouver attachée au bout soit des greffons, soit des chaînes libres en solution.

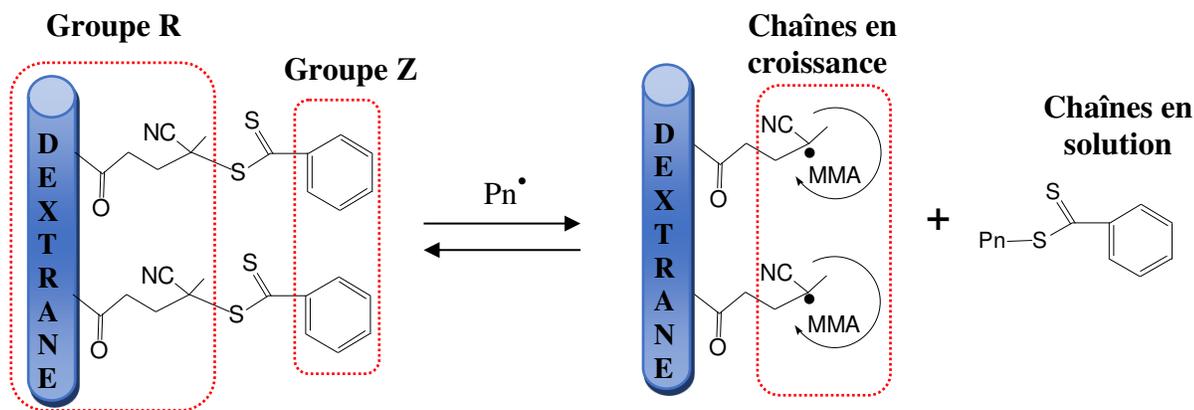


Figure II- 9 : Croissance des greffons PMMA à partir des groupements CTA greffés sur la dorsale du dextrane « R-group approach ».

La « R-group approach » a déjà été utilisée pour la synthèse de plusieurs glycopolymères greffés aux paramètres macromoléculaires contrôlés. Dans le cas particulier du MMA, cette stratégie a permis la croissance de greffons PMMA à partir de la cellulose, en utilisant des CTA de type dithiobenzoate [40], [41]. Li et al. [42] ont pour leur part réalisé la croissance contrôlée de greffons PMMA à partir des NPs de silice fonctionnalisées au préalable avec le CPADB via sa fonction acide. Ces travaux valident le choix du CPADB pour l'introduction des groupements CTA sur la dorsale du dextrane.

1.3.2. Choix des conditions opératoires

L'activation de la fonction carboxyle par les carbodiimides tels que l'hydrochlorure de N-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDC) ou la *N, N'*- dicylohexylcarbodiimide (DCC) combinée à une catalyse par la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) est une méthode courante pour faciliter la réaction des acides carboxyliques avec les alcools. Concernant les polysaccharides, et plus particulièrement la synthèse de macroagents RAFT ou de transurfs, il n'existe que très peu d'exemples dans la littérature utilisant cette voie de synthèse. La réaction de l'acide 3-(butylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl 2-méthylpropanoïque (PABTC) sur les fonctions hydroxyle de l'hydroxypropylcellulose en présence de DCC/DMAP a par exemple abouti à l'obtention d'un dérivé polysaccharide permettant la polymérisation RAFT du *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) et l'obtention d'un copolymère greffé [43]. Des groupements CTA issus du CPADB ont également été introduits sur le dextrane via une estérification avec le système DCC/DMAP. La réaction a été réalisée à 20°C dans le dichlorométhane sur un dextrane partiellement acétylé [44]. Le macroagent

RAFT obtenu a ensuite été employé pour la polymérisation en solution du méthacrylate d'oligo(éthylène glycol) (OEGMA). Finalement, le chitosane a également été modifié par l'acide 2-diméthyl-2-[(dodécylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]acétique (DDACT) grâce au système DCC/DMAP, puis utilisé pour contrôler la polymérisation RAFT de l'acide acrylique (AA) [45] ou du NIPAM [46], [47].

Dans notre cas, nous avons décidé d'introduire les groupements CTA sur les DexN₃.τ obtenus précédemment grâce à une réaction d'estérification avec le CPADB catalysée par le système EDC/DMAP. Notre choix s'est portée sur l'EDC au lieu de la DCC pour deux raisons : d'une part sa solubilité dans l'eau, ce qui permet une purification du produit final par simple lavage ; d'autre part, l'EDC se transforme en un dérivé urée hydrosoluble et non-toxique lors du couplage contrairement à la DCC. La réaction est menée en présence de DMAP en quantité catalytique (Schéma II- 6).

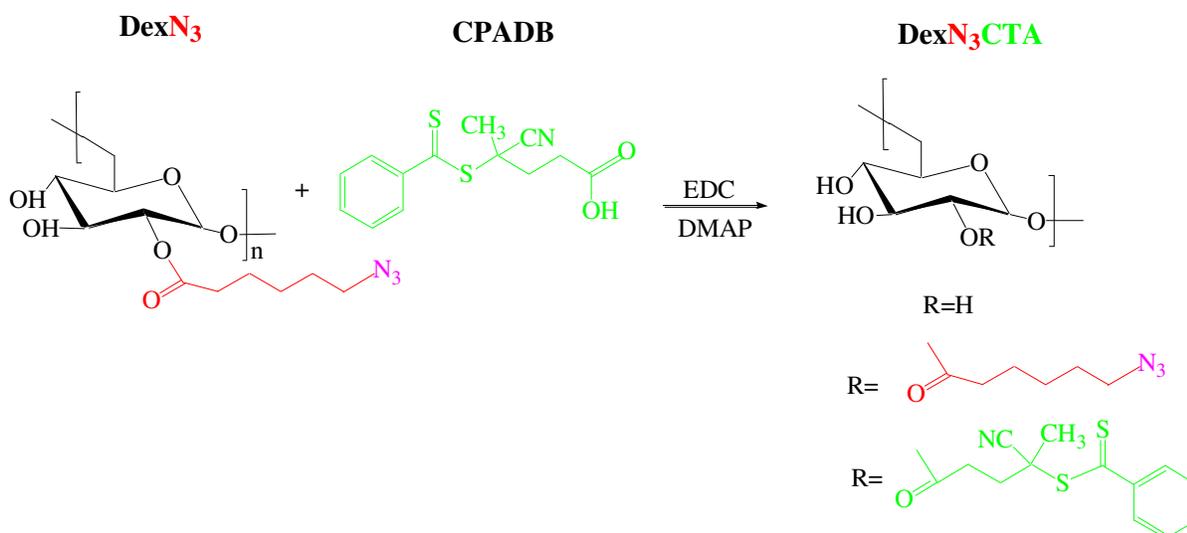


Schéma II- 6 : Introduction des groupements agents de transfert RAFT (CTA) sur les dérivés DexN₃.τ.

Les dérivés DexN₃.τ que nous avons utilisés au cours de cette deuxième étape de modification présentent un taux en groupements hydrophobes (τ) de l'ordre de 20%. Les composés obtenus sont partiellement modifiés par des chaînes alkyle et des groupements CTA de type dithiobenzoate. Ils présentent une couleur rose et ont été nommés DexN₃CTA ou, de façon plus précise DexN₃.τCTA_γ avec τ et γ respectivement les nombres moyens de groupements hydrophobes (N₃) et agents de transfert RAFT (CTA) pour 100 unités glucopyranose.

1.3.3. Estimation du taux de modification par RMN ^1H

Comme dans le cas des dérivés $\text{DexN}_{3,\tau}$, les taux en groupements agents de transfert RAFT (γ) des dérivés $\text{DexN}_{3,\tau}\text{CTA}_\gamma$ ont été déterminés à l'aide des spectres RMN ^1H de ces composés purifiés dans le $\text{DMSO-}d_6$.

Par comparaison avec un spectre du $\text{DexN}_{3,\tau}$ précurseur (exemples de DexN_{3-20} et $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$ à la Figure II- 10), on note l'apparition aux forts déplacements chimiques (entre 7,4 et 8,1 ppm) de pics correspondants aux protons du cycle aromatique du groupement CTA (10, 11 et 12), ce qui atteste du bon déroulement de la réaction. Les protons du groupement méthyle (9) du CTA, proches de la fonction thiocarbonylthio, résonnent quant à eux à 1,9 ppm, tandis que les pics des protons (7 et 8) se trouvent noyés dans le massif des protons glucosidiques du dextrane (entre 3 et 4 ppm). Les aires des protons (9) du groupement R et des protons (10, 11, 12) du groupement Z du CTA sont approximativement dans le rapport 3 : 5. Ceci suggère que le CPDB n'est pas dégradé au cours de la réaction et qu'il a donc été greffé dans son intégralité (groupes Z et R) sur la dorsale du dextrane.

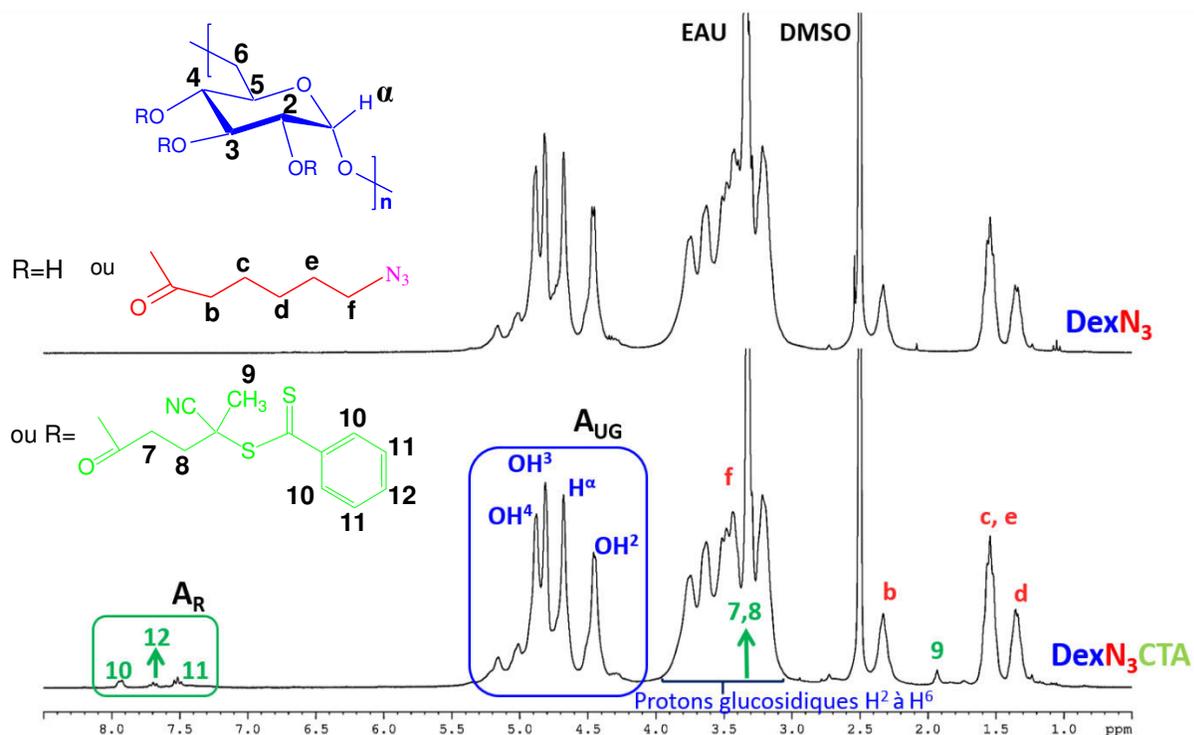


Figure II- 10 Spectres RMN ^1H des dérivés DexN_{3-20} et $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$ dans le $\text{DMSO-}d_6$.

Le taux de substitution en groupements CTA est calculé grâce à l'équation II- 2 où A_R correspond à l'aire des signaux caractéristiques des protons aromatiques 8, 9, 10 (entre 7,4 et 8,1 ppm) du CTA. A_{UG} est l'aire des 4 protons portés par l'unité glucopyranose du dextrane (OH^2 , OH^3 , OH^4 et H^a), entre 4,1 et 5,4 ppm.

$$\varphi = \frac{A_R/5}{A_{UG}/4} \times 100 \quad \text{II- 2}$$

1.3.4. Influence des conditions de réaction sur le taux de modification

Le Schéma II- 7 présente le mécanisme classique de l'activation d'une fonction acide carboxylique par le système EDC/DMAP [48], [49]. La première étape de ce mécanisme permet la formation d'un intermédiaire actif appelé O-acylisourée (A, Schéma II- 7) issu de l'addition de l'acide carboxylique (dans notre cas le CPADB) sur la double liaison C=N de la carbodiimide (dans notre cas l'EDC). Cet intermédiaire (A) peut à son tour réagir soit avec un carboxylate pour former un anhydride symétrique (C, Schéma II- 7) ; soit directement avec une fonction hydroxyle (présentes sur les unités glucopyranose du dextrane) pour générer l'ester désiré (D, Schéma II- 7); ou subir un réarrangement intramoléculaire et former une N-acylisourée (B, Schéma II- 7). La réaction de l'anhydride symétrique (C) avec un alcool permet également d'obtenir l'ester désiré (D). Au contraire, la formation de la N-acylisourée est une réaction à éviter car i) elle consomme des fonctions carboxyliques et ii) le dérivé amide formé est un produit secondaire instable. C'est pourquoi, l'addition de la DMAP comme agent nucléophile auxiliaire dans le milieu réactionnel s'avère cruciale pour le bon déroulement de la réaction. Etant un meilleur nucléophile que l'alcool, la DMAP réagit avec l'O-acylisourée (A) pour former l'ester (E) (Schéma II- 7). Contrairement à la N-acylisourée, ce composé (E) est encore un bon agent acylant qui ne peut pas former de sous-produits et qui réagit rapidement avec les alcools pour aboutir à l'ester désiré (D).

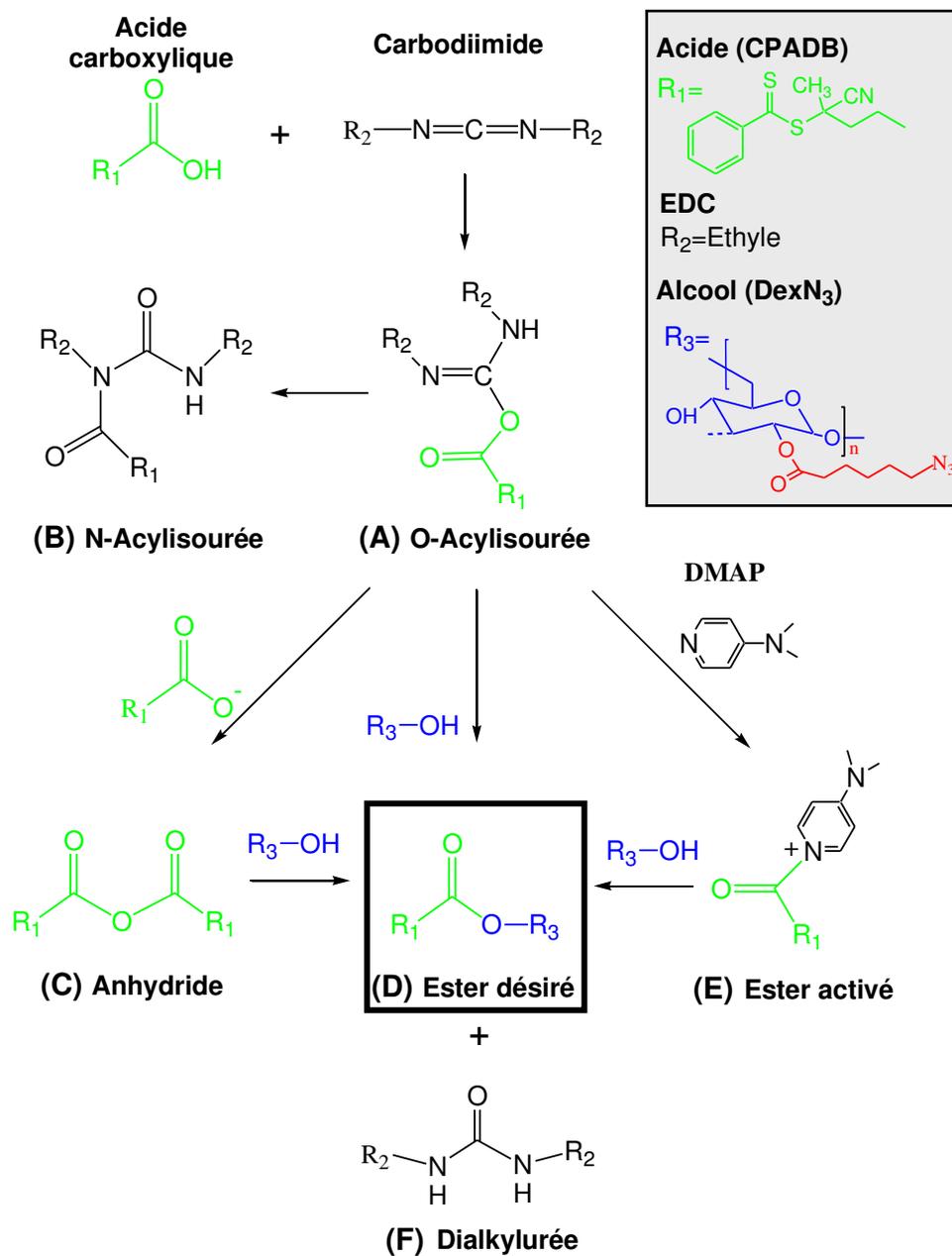


Schéma II- 7 : Mécanisme d'activation *in situ* de la fonction acide carboxylique par le système EDC/DMAP.

Il est connu que la formation des N-acylisourées (B) dépend fortement des conditions réactionnelles mises en jeu. La proportion de ce sous-produit est plus faible lorsque la réaction a lieu à basse température ou dans des solvants de faible constante diélectrique. Ainsi, l'utilisation du dichlorométhane (DCM) ou du chloroforme ($CHCl_3$) peut réduire au minimum cette réaction

latérale. Au contraire, des solvants plus polaires tels que le diméthylformamide (DMF), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'eau en favorisent la formation [49].

Néanmoins, les dérivés DexN₃₋₂₀ ($\tau = 20$) utilisés pour la synthèse des transurfs se sont avérés insolubles dans le DCM et le CHCl₃, mais solubles dans le DMSO, le DMF et le diméthylacétamide (DMAC). Ces trois derniers solvants, solubilisant aussi également le CPADB, ont donc été testés afin de réaliser l'introduction des groupements CTA sur les DexN₃₋₂₀ en milieu homogène. D'autres paramètres tels que la température de réaction (20°C ou 40°C), la quantité d'EDC (1,1, 3 ou 10 équivalents par rapport à la fonction acide du CPADB) et la concentration en CPADB dans le milieu réactionnel ont également été étudiés. L'ensemble des expériences réalisées est rassemblé dans le Tableau II- 2.

Tableau II- 2 : Synthèse des transurfs DexN₃ τ CTA γ par estérification catalysée par l'EDC/DMAP. Réactions menées pendant 48 heures avec [DMAP]₀/[CPADB]₀= 0,1 et [DexN₃₋₂₀]=0,05 g/L.

| Essai | Solvant | T (°C) | γ_{th} (%) (a)* | $\frac{[EDC]_0}{[CPADB]_0}$ | γ_{exp} (%) (b)* | f (%) (c) |
|-------|---------|--------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------|
| 1 | DMSO | 20 | 15 | 1,1 | 0,2 | 1,5 |
| 2 | DMAC | | | 1,1 | 2,3 | 7,5 |
| 3 | DMF | | | 1,1 | 2,4 | 8,0 |
| 4 | DMF | 40 | 30 | 1,1 | 1,7 | 6,0 |
| 5 | DMF | 20 | 30 | 3 | 3,7 | 12,0 |
| 6 | DMF | | | 10 | 1,3 | 4,5 |
| 7 | DMF | | | 60 | 3 | 7,5 |

(a) Taux de substitution théorique calculé par $\gamma_{th} = \frac{[CPADB]_0}{[N_{UG}]} \times 100$. $[N_{UG}]$ correspond au nombre d'unités glucopyranose par litre du milieu réactionnel, toujours égal à 0,26 mM dans nos conditions expérimentales.

(b) Taux de substitution estimés par les spectres RMN ¹H dans le DMSO-d₆ (Equation II- 2)

(c) Efficacité de la réaction en pourcentage : $f = \frac{\gamma_{exp}}{\gamma_{th}} \times 100$

* Exprimé en nombre de groupements CTA pour 100 motifs glucopyranose

D'après les résultats obtenus, les observations suivantes peuvent être réalisées :

- Le DMSO (essai 1) s'est avéré très mauvais solvant pour la réaction avec une efficacité de greffage (γ_{exp}/γ_{th}) très faible (environ 1,5 %). Sous les mêmes conditions expérimentales, mais dans le DMAC et le DMF (essais 2 et 3), la réaction s'est mieux déroulée. Pour ces

deux expériences, l'efficacité de la réaction est très similaire (8% du taux théorique). Cependant, pour la suite de nos expériences, nous avons choisi de poursuivre avec le DMF compte tenu de la meilleure solubilité des dérivés DexN₃₋₂₀ dans ce solvant.

- Augmenter la température de réaction (de 20 à 40°C) a un effet négatif sur l'efficacité de la réaction (essais 3 et 4). De plus, le dérivé obtenu à 40°C n'est plus rose mais jaune, ce qui suggère une possible dégradation de l'agent RAFT dans ces conditions.
- Augmenter la quantité d'EDC de 1,1 à 3 équivalents par fonction acide (essais 3 et 5) permet d'accroître le taux de substitution (de 2,4 à 3,7) et l'efficacité de la modification (de 8 à 12% du taux théorique). Néanmoins, on remarque qu'un trop large excès d'EDC (10 équivalents par fonction acide) ne favorise pas la réaction (essai 6). Ceci provient très probablement d'une formation plus importante des N-acylisourées (B) dans ces conditions [50], [51].
- Finalement, la concentration de l'agent RAFT dans le mélange réactionnel ne semble pas influencer l'efficacité de greffage mais uniquement le degré de substitution des dérivés synthétisés. Ainsi, en doublant la quantité du CPADB introduite, toutes conditions égales par ailleurs (essais 5 et 7), nous doublons la quantité de groupements CTA attachés sur le dextrane.

Au final, nous avons sélectionné pour la synthèse du transurf les conditions des expériences 5 et 7 qui sont les plus efficaces (12%) : DMF, 20°C et 3 équivalents d'EDC par rapport au CPADB. Même si cette modification n'est pas quantitative (probablement en raison d'une formation importante de dérivés N-acylisourées (B)), les taux de substitution en groupements CTA obtenus sont assez élevés pour l'utilisation des composés obtenus comme macroagents RAFT. Deux types de transurfs synthétisés dans ces conditions ont été par la suite employés lors des expériences de polymérisation en miniémulsion du MMA : le DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} ($\tau = 20$ et $\gamma = 3,7$) et le DexN₃₋₂₀CTA_{7,5} ($\tau = 20$ et $\gamma = 7,5$). Ces expériences de polymérisation sont détaillées dans le chapitre II de cette partie.

2. CARACTERISATION DES DERIVES DU DEXTRANE

2.1. CARACTERISATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (SEC)

Le dérivé amphiphile DexN₃₋₂₀ ainsi que les transurfs DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} et DexN₃₋₂₀CTA_{7,5} obtenus ont été caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière multi-angle (SEC-MALLS). Leurs traces SEC-MALLS ont été comparées à celle du dextrane natif (DexT40) (Figure II- 11). Le DMSO contenant 0,1 M NaNO₃ a été utilisé comme éluant lors de cette analyse. L'ajout de ce sel facilite la solubilisation des chaînes amphiphiles analysées et permet d'écranter les interactions hydrophobes. Cependant, comme on peut le voir sur la Figure II- 11, un épaulement du côté des fortes masses molaires est visible pour tous les dérivés synthétisés, ce qui semble suggérer que cette solubilisation n'est pas parfaite.

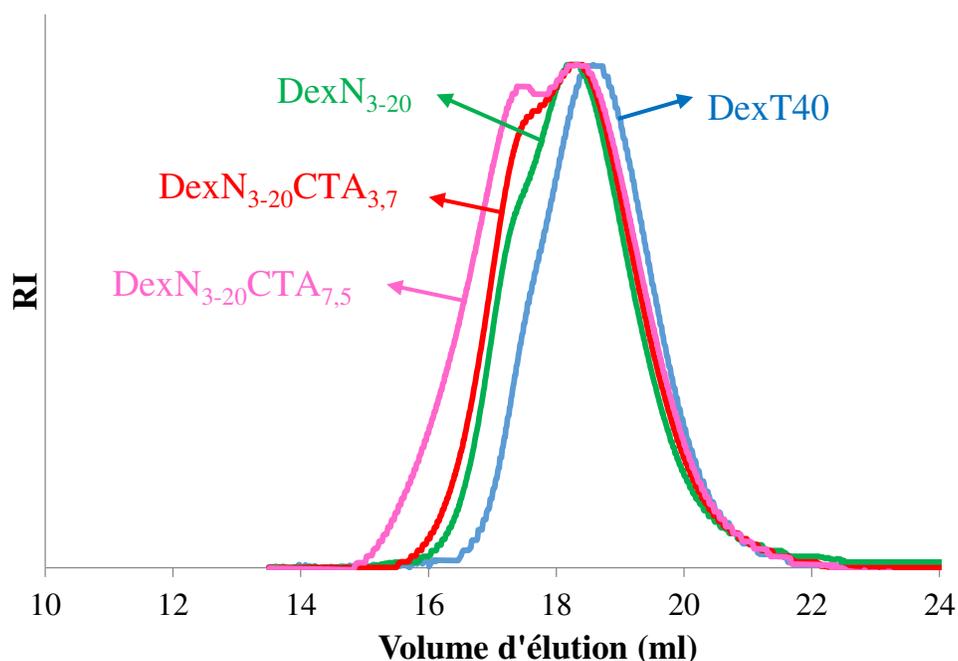


Figure II- 11 : Chromatogrammes SEC du dextrane natif (DexT40) et ses dérivés DexN_{3τ} et DexN_{3τ}CTA_γ (Signal RI), dans le DMSO/NaNO₃ (0,1 M) dn/dc=0,07 mL/g.

Les chromatogrammes obtenus des composés DexN₃ puis DexN₃CTA évoluent vers les faibles volumes d'élution, ce qui témoigne de l'augmentation du volume hydrodynamique des chaînes

polymères par rapport à celui du dextrane initial (DexT40). Cette évolution du volume hydrodynamique est cohérente avec l'augmentation du degré de substitution global ($\tau + \gamma$) entre les différents dérivés qui conduit à une augmentation des masses molaires des dérivés. Ainsi, plus la quantité de chaînes latérales greffées augmente plus les volumes d'élution de dérivés sont décalés vers la zone de fortes masses molaires.

Par ailleurs, les masses molaires moyennes en nombre déterminées expérimentalement par SEC-MALLS ($\bar{M}_{n\ exp}$) correspondent relativement bien aux masses molaires prévues par la théorie ($\bar{M}_{n\ th}$) (Tableau II- 3). L'absence de pics ou d'épaulements aux forts volumes d'élution suggère que la méthode de purification utilisée est adéquate. Tout ceci témoigne de la non dégradation du squelette de dextrane lors des réactions de modification qui ont conduit aux DexN₃ et DexN₃CTA.

Tableau II- 3: Caractéristiques des dérivés DexN₃ τ et DexN₃ τ CTA γ . Analyses SEC-MALLS (DMSO/NaNO₃ 0,1M).

| Dérivé | M _{UG} (g/mol) ^(a) | $\bar{M}_{n\ th}$ (g/mol) ^(b) | $\bar{M}_{n\ exp}$ (g/mol) ^(c) | \bar{D} ^(d) |
|---|--|--|---|--------------------------|
| DexT40 | 162 | - | 26 000 | 1,3 |
| DexN ₃₋₂₀ | 190 | 30 500 | 27 000 | 1,5 |
| DexN ₃₋₂₀ CTA _{3,7} | 199 | 40 700 | 35 000 | 1,6 |
| DexN ₃₋₂₀ CTA _{7,5} | 210 | 42 700 | 46 600 | 1,9 |

(a) Masse d'une unité glucopyranose modifiée, calculée par l'équation $M_{UG} = M_{DEX} + \frac{\tau}{100}M_{N_3} + \frac{\gamma}{100}M_{CTA}$ avec M_{DEX} , M_{N_3} et M_{CTA} les masses molaires d'une unité glucopyranose du DexT40 (162 g/mol), d'une chaîne azoture hydrophobe (139 g/mol) et d'un groupement CTA (261 g/mol) respectivement.

(b) Masse molaire moyenne en nombre théorique calculée avec l'équation $\bar{M}_{n\ th} = \frac{\bar{M}_{n\ DEX}}{M_{DEX}}M_{UG}$ où $\bar{M}_{n\ DEX}$ correspond à la masse molaire moyenne en nombre du DexT40 évaluée par SEC-MALLS.

(c) Masse molaire évaluée par SEC-MALLS dans le DMSO/NaNO₃ (0,1 M) avec $dn/dc=0,07$ ml/g.

(d) Dispersité des chaînes polymères évaluée par SEC-MALLS dans le DMSO/NaNO₃ (0,1 M).

2.2. ETUDE DES PROPRIETES TENSIOACTIVES DES DERIVES DexN_{3- τ} ET DexN_{3- τ} CTA γ

Afin que les dérivés du dextrane synthétisés (DexN_{3- τ} et DexN_{3- τ} CTA γ) puissent être utilisés comme stabilisants lors du procédé de polymérisation en miniémulsion du MMA, il est nécessaire

de vérifier qu'ils présentent des propriétés tensioactives suffisantes. Le caractère tensioactif d'une molécule caractérise sa capacité à diminuer la tension superficielle air/eau ou encore la tension interfaciale entre une phase aqueuse et un solvant organique. Dans notre cas, seule l'interface air/eau a été étudiée en utilisant la méthode de l'anneau de Noüy (voir Partie III, Paragraphe 5.4). Les isothermes de Gibbs obtenues en traçant la tension superficielle des solutions aqueuses de plusieurs dérivés en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes sont présentées dans la Figure II-12. Différents dérivés tensioactifs $\text{DexN}_{3-\tau}$ (τ variant entre 9 et 27%) et transurfs $\text{DexN}_{3-\tau}\text{CTA}\gamma$ ($\tau = 20\%$ et $\gamma = 3,7$ ou $7,5$) ont été étudiés. Dans le cas des transurfs, la concentration en groupements hydrophobes est évaluée par la contribution des deux types de groupements latéraux (taux de substitution global égal à $\tau + \gamma$).

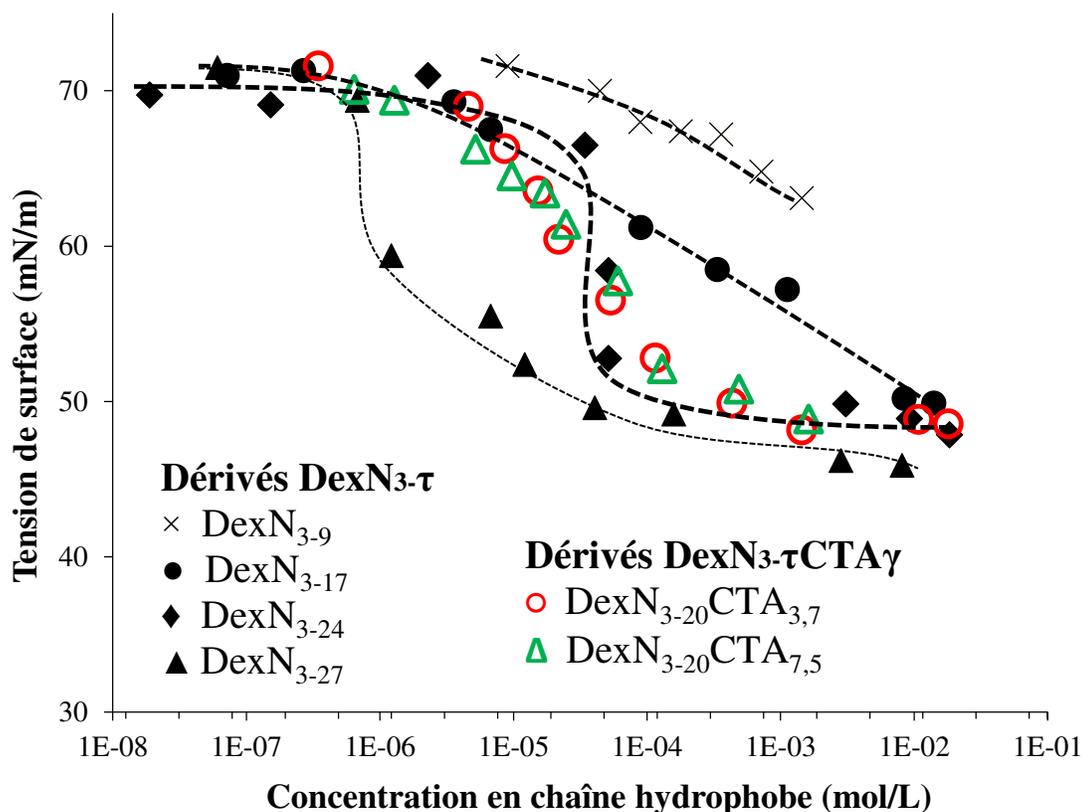


Figure II- 12 : Evolution de la tension superficielle des solutions aqueuses des $\text{DexN}_{3-\tau}$ et $\text{DexN}_{3-\tau}\text{CTA}\gamma$ en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes dans la phase aqueuse.

Nous constatons que contrairement au dextrane natif (DexT40) qui ne présente aucune propriété tensioactive, les dérivés $\text{DexN}_{3-\tau}$ et $\text{DexN}_{3-\tau}\text{CTA}\gamma$ sont capables de diminuer la tension de surface de solutions aqueuses de ces dérivés. Plusieurs points importants sont à souligner:

- Les isothermes de Gibbs de dérivés du dextrane étudiés présentent le comportement typique observé pour d'autres dextrans amphiphiles [15], [52] avec trois zones bien distinctes. Dans une première zone (faibles concentrations), la tension de surface diminue très lentement car la quantité des chaînes amphiphiles en solution n'est pas suffisante pour saturer complètement l'interface air/liquide. Au-delà d'une certaine concentration (caractéristique pour chaque dérivé), l'interface est saturée en motifs hydrophobes adsorbés (deuxième zone). La quantité de polymère en solution est alors suffisante pour stabiliser une interface d'aire plus élevée. Ainsi, plus la concentration en chaînes hydrophobes augmente, plus le travail à fournir pour augmenter la surface du système diminue. La tension de surface varie alors de façon linéaire avec le logarithme de la concentration. Une fois la concentration critique atteinte, la tension de surface ne varie plus (troisième zone). La concentration en chaînes amphiphiles libres reste constante et le travail à fournir pour augmenter la surface du système ne peut plus être diminué.
- L'aptitude des différents dérivés à s'adsorber à l'interface air/solution aqueuse est caractérisée par la pression de surface, c'est-à-dire par la réduction de tension de surface maximale par rapport à la tension de surface de l'eau. Comme l'atteste la Figure II- 12, la pression de surface des dérivés $\text{DexN}_{3-\tau}$ augmente avec le taux de substitution en groupements hydrophobes (τ) ce qui est conforme aux observations de M. Laville [15].
- La contribution des groupements CTA à la diminution de la tension de surface semble faible devant celle des chaînes alkyle dotées de fonctions N_3 . Ainsi, l'évolution de la tension de surface des transurfs $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$ ($\tau + \gamma = 23,7$) et $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{7,5}$ ($\tau + \gamma = 27,5$) est similaire à celle du dérivé DexN_{3-24} , alors que le DexN_{3-27} présente une pression de surface un peu plus élevée. Ce comportement est peut être dû à la présence des groupements thiocarbonylthio et cyano qui rendent les groupements CTA ($-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{CH}_3)\text{CN}-\text{S}-\text{C}(\text{Phényle})=\text{S}$) un peu plus polaires et moins hydrophobes que les chaînes aliphatiques à 6 carbones portant des fonctions N_3 ($-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{N}_3$).

L'ensemble de ces résultats montre que les dérivés amphiphiles et réactifs $\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{CTA}\gamma$ synthétisés présentent bien des propriétés tensioactives et que celles-ci dépendent principalement de la quantité de chaînes alkyle N_3 introduites sur la dorsale du dextrane. Ce caractère tensioactif permettra leur utilisation future comme stabilisants lors de la polymérisation du MMA en miniémulsion, comme nous le verrons dans le Chapitre II à suivre.

3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Des macroagents RAFT multifonctionnels à base de dextrane ($\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{CTA}\gamma$) ont été obtenus par modification du dextrane en milieu homogène via deux étapes. Dans un premier temps, des chaînes alkyle hydrophobes ont été greffées sur le dextrane par réaction avec un acide activé (obtenu à partir de l'acide 6-azidohéxanoïque) dans le DMSO. Ceci a permis l'obtention de dérivés nommés $\text{DexN}_3\text{-}\tau$. Dans un second temps, des groupements agents de transfert RAFT du type dithiobenzoate, appelés CTA, ont aussi été introduits directement sur les $\text{DexN}_3\text{-}\tau$ par réaction avec l'acide 4-cyano-4 (phénylcarbonothioylthio)pentanoïque, en présence du système catalytique EDC/DMAP. Concernant ces synthèses et la caractérisation des produits obtenus, un certain nombre de points peuvent être mentionnés :

- Pour chacune des étapes, les modifications effectives ainsi que les taux de substitution en groupements hydrophobes (τ) et réactifs (γ) ont été validées et estimés par des analyses RMN ^1H .
- Pour la modification chimique permettant l'introduction des groupements réactifs RAFT, les paramètres influençant la réaction ont été étudiés. Malgré la faible efficacité de la réaction (12% du taux théorique), il est possible de faire varier le taux en groupements CTA (γ) présents sur le polysaccharide entre 2 et 7,5%, en variant notamment le rapport agent RAFT/OH résiduel du dextrane.
- Pour la synthèse du $\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{CTA}\gamma$, nous avons volontairement limité γ à 7,5% et fixé une gamme pour τ comprise entre 18-24% afin d'obtenir des dérivés amphiphiles hydrosolubles du dextrane. De plus, nous avons pu vérifier que la dorsale du dextrane n'a pas été dégradée au cours des différentes étapes des synthèses.

- Nous avons également constaté que les dérivés obtenus possèdent des propriétés tensioactives effectives et que ces propriétés dépendent surtout de la quantité de groupements hydrophobes (N_3) introduits, représentée par τ .

Les sites réactifs introduits sur le dextrane vont permettre de mener la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion et de générer des greffons PMMA à partir de la dorsale dextrane localisée à l'interface liquide/liquide. L'étude de cette polymérisation fait l'objet du chapitre suivant.

4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. Estanqueiro, M. H. Amaral, J. Conceição, et J. M. Sousa Lobo, « Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, 126, 631-648.
- [2] L. M. Forero Ramirez, J. Babin, A. Durand, J.-L. Six, et C. Nouvel « How inisurf improve control of atom transfer radical polymerization and facilitate nanocapsules production? ». *En préparation*.
- [3] M. Wu, L. M. Forero Ramirez, A. Rodriguez Lozano, D. Quémener, J. Babin, A. Durand, E. Marie, J.-L. Six, et C. Nouvel, « First multi-reactive dextran-based inisurf for atom transfer radical polymerization in miniemulsion », *Carbohydrate Polymers* **2015**, 130, 141-148.
- [4] J. Bernard, M. Save, B. Arathoon, et B. Charleux, « Preparation of a xanthate-terminated dextran by click chemistry: Application to the synthesis of polysaccharide-coated nanoparticles via surfactant-free ab initio emulsion polymerization of vinyl acetate », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, 46 (8), 2845-2857.
- [5] A. Jhaveri, P. Deshpande, et V. Torchilin, « Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy », *Journal of Controlled Release* **2014**, 190, 352-370.
- [6] M. Naessens, A. Cerdobbel, W. Soetaert, et E. J. Vandamme, « Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications », *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2005**, 80 (8), 845-860.
- [7] T. Heinze, T. Liebert, B. Heublein, et S. Hornig, « Functional Polymers Based on Dextran », in Polysaccharides II, Advances in polymer science (205), Springer Berlin Heidelberg, **2006**, 199-291.
- [8] C. Neuchl et A. Mersmann, « Fractionation of polydisperse dextran using ethanol », *Chemical Engineering Science* **1995**, 50 (6), 951-958.
- [9] R. K. Purama, P. Goswami, A. T. Khan, et A. Goyal, « Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 », *Carbohydrate Polymers* **2009**, 76 (1), 30-35.
- [10] C. Nouvel, « Synthèse contrôlée de copolymères dextrane-g-poly lactide : de leur utilisation comme surfactifs biodégradables à la mise en œuvre de systèmes de vectorisation particuliers ». **Thèse de doctorat**, Nancy : Institute National Polytechnique de Lorraine, **2002**.
- [11] F. Abir, S. Barkhordarian, et B. E. Sumpio, « Efficacy of dextran solutions in vascular surgery », *Vasc Endovascular Surg* **2004**, 38 (6), 483-491.

- [12] J. Maia¹, M. B. Evangelista, H. Gil, J. M. Lino Ferreira, « Dextran-based materials for biomedical applications » in *Carbohydrates Applications in Medicine*, M. H. Gil. **2014**: 31-53, [en ligne], disponible sur: <[http://www.dextran.net/media/85014/t_1401190063gil-2 .pdf](http://www.dextran.net/media/85014/t_1401190063gil-2.pdf)>, (consulté le 10/10/2015).
- [13] A. Doenicke, B. Grote, et W. Lorenz, « Blood and blood substitutes », *BJA: British Journal of Anaesthesia* **1977**, 49 (7), 681-688.
- [14] A. Durand, J. P. Canselier, et Société chimique de France, « Procédés et formulation au service de la santé pharmacie, cosmétique, agroalimentaire, procédés industriels ». Les Ulis, France: EDP Sciences, **2011**, 188p.
- [15] M. Laville, J. Babin, I. Londono, M. Legros, C. Nouvel, A. Durand, R. Vanderesse, M. Leonard, et J.-L. Six, « Polysaccharide-covered nanoparticles with improved shell stability using click-chemistry strategies », *Carbohydrate Polymers* **2013**, 93 (2), 537-546.
- [16] Y. K. Chong, J. Krstina, T. P. T. Le, G. Moad, A. Postma, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Thiocarbonylthio Compounds [SC(Ph)S-R] in Free Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization). Role of the Free-Radical Leaving Group (R) », *Macromolecules* **2003**, 36 (7), 2256-2272.
- [17] G. Moad, J. Chiefari, R. T. A. Mayadunne, C. L. Moad, A. Postma, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Initiating free radical polymerization », *Macromolecular Symposia* **2002**, 182 (1), 65-80.
- [18] B. Chong, G. Moad, E. Rizzardo, M. Skidmore, et S. H. Thang, « Thermolysis of RAFT-Synthesized Poly(Methyl Methacrylate) », *Australian Journal of Chemistry* **2006**, 59 (10), 755, 2006.
- [19] G. Johnston-Hall, M. H. Stenzel, T. P. Davis, C. Barner-Kowollik, et M. J. Monteiro, « Chain Length Dependent Termination Rate Coefficients of Methyl Methacrylate (MMA) in the Gel Regime: Accessing k_t^{ii} Using Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization », *Macromolecules* **2007**, 40 (8), 2730-2736.
- [20] G. Moad, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Living Radical Polymerization by the RAFT Process—A First Update », *Australian Journal of Chemistry* **2006**, 59 (10), 669 -692.
- [21] D. Fan, J. He, J. Xu, W. Tang, Y. Liu, et Y. Yang, « Synthesis of SAN-containing block copolymers using RAFT polymerization », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2006**, 44 (7), 2260-2269.
- [22] E. Rizzardo, M. Chen, B. Chong, G. Moad, M. Skidmore, et S. H. Thang, « RAFT Polymerization: Adding to the Picture », *Macromolecular Symposia* **2007**, 248 (1), 104-116.
- [23] R. T. A. Mayadunne, E. Rizzardo, J. Chiefari, J. Krstina, G. Moad, A. Postma, et S. H. Thang, « Living Polymers by the Use of Trithiocarbonates as Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Agents: ABA Triblock Copolymers by Radical Polymerization in Two Steps », *Macromolecules* **2000**, 33 (2), 243-245.
- [24] R. T. A. Mayadunne, E. Rizzardo, J. Chiefari, Y. K. Chong, G. Moad, et S. H. Thang, « Living Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization) Using Dithiocarbamates as Chain Transfer Agents », *Macromolecules* **1999**, 32 (21), 6977-6980.
- [25] G. Moad, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Living Radical Polymerization by the RAFT Process », *Australian Journal of Chemistry* **2005**, 58 (6), 379-410, 2005.
- [26] M. Destarac, D. Charmot, X. Franck, et S. Z. Zard, « Dithiocarbamates as universal reversible addition-fragmentation chain transfer agents », *Macromolecular Rapid Communications* **2000**, 21 (15), 1035-1039.
- [27] C. Barner-Kowollik, J. F. Quinn, T. L. U. Nguyen, J. P. A. Heuts, et T. P. Davis, « Kinetic Investigations of Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerizations: Cumyl Phenylthioacetate Mediated Homopolymerizations of Styrene and Methyl Methacrylate », *Macromolecules* **2001**, 34 (22), 7849-7857.
- [28] S. Perrier, P. Takolpuckdee, J. Westwood, et D. M. Lewis, « Versatile Chain Transfer Agents for Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization to Synthesize Functional Polymeric Architectures », *Macromolecules* **2004**, 37 (8), 2709-2717.

- [29] K. Kubo, A. Goto, K. Sato, Y. Kwak, et T. Fukuda, « Kinetic study on reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) process for block and random copolymerizations of styrene and methyl methacrylate », *Polymer* **2005**, 46 (23), 9762-9768.
- [30] D. Hua, J. Xiao, R. Bai, W. Lu, et C. Pan, « Xanthate-Mediated Controlled/Living Free-Radical Polymerization under ^{60}Co γ -Ray Irradiation: Structure Effect of O-Group », *Macromolecular Chemistry and Physics* **2004**, 205 (13), 1793-1799.
- [31] C. Barner-Kowollik (Ed), « Handbook of RAFT polymerization ». Weinheim: Wiley-VCH, **2008**, 541p.
- [32] C. Boyer, V. Bulmus, T. P. Davis, V. Ladmiral, J. Liu, et S. Perrier, « Bioapplications of RAFT Polymerization », *Chemical Reviews* **2009**, 109 (11), 5402-5436.
- [33] D. J. Keddie, G. Moad, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « RAFT Agent Design and Synthesis », *Macromolecules*, **2012**, 45 (13), 5321-5342.
- [34] G. Moad, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Second Update », *Australian Journal of Chemistry* **2009**, 62 (11), 1402, 2009.
- [35] J. D. Biasutti, T. P. Davis, F. P. Lucien, et J. P. A. Heuts, « Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of methyl methacrylate in suspension », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2005**, 43 (10), 2001-2012.
- [36] Y. Luo et X. Cui, « Reversible addition–fragmentation chain transfer polymerization of methyl methacrylate in emulsion », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2006**, 44 (9), 2837-2847.
- [37] X. Zhou, P. Ni, et Z. Yu, « Comparison of RAFT polymerization of methyl methacrylate in conventional emulsion and miniemulsion systems », *Polymer* **2007**, 48 (21), 6262-6271.
- [38] S. E. Shim, H. Lee, et S. Choe, « Synthesis of Functionalized Monodisperse Poly(methyl methacrylate) Nanoparticles by a RAFT Agent Carrying Carboxyl End Group », *Macromolecules* **2004**, 37 (15), 5565-5571
- [39] H. Feng, Y. Zhao, M. Pelletier, Y. Dan, et Y. Zhao, « Synthesis of photo- and pH-responsive composite nanoparticles using a two-step controlled radical polymerization method », *Polymer* **2009**, 50 (15), 3470-3477.
- [40] J. Chen, J. Yi, P. Sun, Z.-T. Liu, et Z.-W. Liu, « Grafting from ramie fiber with poly(MMA) or poly(MA) via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization », *Cellulose* **2009**, 16 (6), 1133-1145.
- [41] C. Lin, H. Zhan, M. Liu, Y. Habibi, S. Fu, et L. A. Lucia, « RAFT synthesis of cellulose- g - polymethylmethacrylate copolymer in an ionic liquid », *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, 127 (6), 4840-4849.
- [42] C. Li, J. Han, C. Y. Ryu, et B. C. Benicewicz, « A Versatile Method To Prepare RAFT Agent Anchored Substrates and the Preparation of PMMA Grafted Nanoparticles », *Macromolecules* **2006**, 39 (9), 3175-3183.
- [43] M. Semsarilar, V. Ladmiral, et S. Perrier, « Synthesis of a cellulose supported chain transfer agent and its application to RAFT polymerization », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2010**, 48 (19), 4361-4365.
- [44] H. T. T. Duong, F. Hughes, S. Sagnella, M. Kavallaris, A. Macmillan, R. Whan, J. Hook, T. P. Davis, et C. Boyer, « Functionalizing Biodegradable Dextran Scaffolds Using Living Radical Polymerization: New Versatile Nanoparticles for the Delivery of Therapeutic Molecules », *Molecular Pharmaceutics* **2012**, 9 (11), 3046-3061.
- [45] D. Hua, J. Tang, J. Cheng, W. Deng, et X. Zhu, « A novel method of controlled grafting modification of chitosan via RAFT polymerization using chitosan-RAFT agent », *Carbohydrate Polymers* **2008**, 73 (1) 98-104.
- [46] J. Tang, D. Hua, J. Cheng, J. Jiang, et X. Zhu, « Synthesis and properties of temperature-responsive chitosan by controlled free radical polymerization with chitosan-RAFT agent », *International Journal of Biological Macromolecules* **2008**, 43 (4), 383-389.

- [47] J. Jiang, X. Pan, J. Cao, J. Jiang, D. Hua, et X. Zhu, « Synthesis and property of chitosan graft copolymer by RAFT polymerization with tosylic acid–chitosan complex », *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, 50 (3), 586-590.
- [48] M. Tsakos, E. S. Schaffert, L. L. Clement, N. L. Villadsen, et T. B. Poulsen, « Ester coupling reactions – an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products », *Natural Product Reports* **2015**, 32 (4), 605-632.
- [49] R. Brückner, J. Suffert, J.-J. Suffert, et J.-M. Lehn, « Mécanismes réactionnels en chimie organique: méthodes synthétiques, stéréochimie et réactions modernes ». Paris; Bruxelles: De Boeck Université, **1999**, 614p.
- [50] C. A. G. N. Montalbetti et V. Falque, « Amide bond formation and peptide coupling », *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827-10852.
- [51] N. Nakajima et Y. Ikada, « Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media », *Bioconjugate Chemistry* **1995**, 6 (1), 123-130.
- [52] C. Rouzes, M. Leonard, A. Durand, et E. Dellacherie, « Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, 32 (2), 125-135.

CHAPITRE II

Polymérisation du MMA en
miniémulsion à partir du transurf

| | |
|--|------------|
| 1. SELECTION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR LA POLYMERISATION RAFT DU MMA EN MINIEMULSION | 133 |
| 1.1. FORMULATION ENVISAGEE..... | 133 |
| 1.2. ETAPES DU PROCEDE DE POLYMERISATION | 136 |
| 1.3. CHOIX DU M810 COMME AGENT HYDROPHOBE ET CŒUR HUILEUX DES NCS..... | 137 |
| 1.3.1. Admissibilité pour une application biomédicale | 137 |
| 1.3.2. Rôle du M810 comme agent hydrophobe..... | 138 |
| 1.3.2.1. Etude de la stabilité de la miniémulsion..... | 138 |
| 1.3.2.2. Influence de la quantité de DexN ₃ .τ sur le diamètre des nanogouttelettes. | 140 |
| 1.3.3. Possibilité d'obtention d'une morphologie cœur-écorce : Rôle du M810 comme cœur huileux de la NC..... | 143 |
| 2. POLYMÉRISATION DU MMA AVEC LE SYSTÈME MODELE DexN₃.τ/CPDB..... | 146 |
| 2.1. POLYMERISATION RAFT DU MMA EN PRESENCE DU CPDB : ETAT DE L'ART | 146 |
| 2.1.1. Polymérisations en masse, solution et suspension..... | 147 |
| 2.1.2. Polymérisations en émulsion et miniémulsion | 148 |
| 2.1.3. Conclusion..... | 150 |
| 2.2. MISE AU POINT DES CONDITIONS DE POLYMERISATION..... | 151 |
| 2.2.1. Influence de la température | 152 |
| 2.2.2. Influence de la concentration en CPDB | 157 |
| 2.2.3. Influence de la teneur en M810..... | 162 |
| 3. POLYMÉRISATION RAFT DU MMA EN MINIÉMULSION À PARTIR DES TRANSURFS DÉRIVÉS DU DEXTRANE | 165 |
| 3.1. ETUDE CINÉTIQUE..... | 165 |
| 3.2. VÉRIFICATION DE LA CROISSANCE DES GREFFONS A PARTIR DES TRANSURFS. | 170 |
| 3.2.1. RMN ¹ H..... | 170 |
| 3.2.2. RMN 2D DOSY ¹ H..... | 171 |
| 3.2.3. SEC-MALLS..... | 173 |
| 3.3. ANALYSE DES GREFFONS PMMA | 176 |
| 3.3.1. Analyse SEC-MALLS des greffons | 177 |
| 3.3.2. Efficacité moyenne des groupements réactifs CTA | 179 |

4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE186

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....189

CHAPITRE II

Après avoir réalisé la synthèse des transurfs $\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{CTA}\gamma$ et des stabilisants $\text{DexN}_3\text{-}\tau$ à partir du dextrane, nous nous sommes fixés comme premier objectif de contrôler au mieux la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en employant ces dérivés. Cependant, avant d'effectuer la croissance des greffons PMMA à partir des groupements réactifs des $\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{CTA}\gamma$, les conditions réactionnelles ont tout d'abord été mises au point en utilisant un agent de transfert RAFT modèle associé aux stabilisants $\text{DexN}_3\text{-}\tau$. Ainsi, dans ce chapitre, les différents constituants du système de polymérisation RAFT en miniémulsion seront tout d'abord sélectionnés grâce à des études préliminaires. Ces études nous ont permis de vérifier la stabilité de l'émulsion dans les conditions de la polymérisation et de trouver la proportion adéquate d'huile à introduire dans le milieu réactionnel pour favoriser l'obtention d'une morphologie cœur-écorce. Les conditions de la polymérisation RAFT du MMA ont ensuite été optimisées en utilisant un système modèle, puis transposées pour la polymérisation à partir des transurf $\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{CTA}\gamma$.

1. SELECTION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR LA POLYMERISATION RAFT DU MMA EN MINIEMULSION

1.1. FORMULATION ENVISAGEE

Comme évoqué dans l'étude bibliographique (voir Partie I, Paragraphe 4.3.1), la polymérisation RAFT met en jeu un système de polymérisation radicalaire classique auquel est ajouté un agent thiocarbonylthio. Cependant, dans notre cas, puisque nous avons choisi de mener une

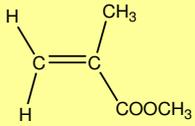
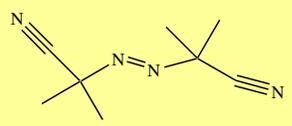
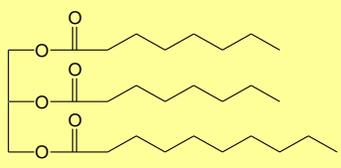
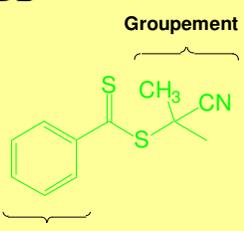
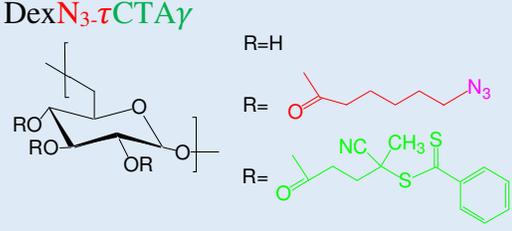
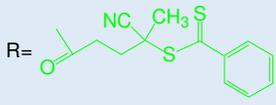
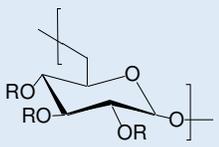
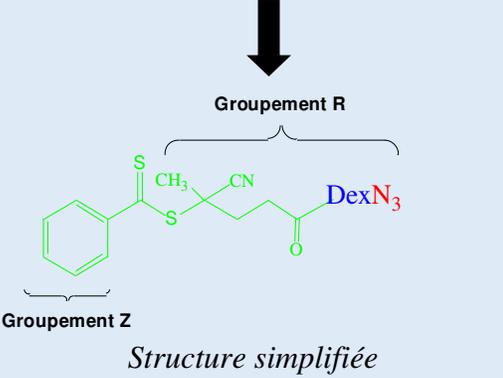
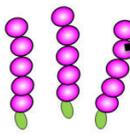
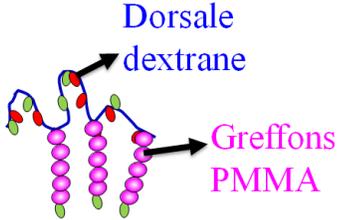
polymérisation en miniémulsion, il est nécessaire d'ajouter au système monomère/amorceur/agent RAFT un stabilisant et un agent hydrophobe, indispensables pour assurer la stabilité des nanogouttelettes/nano-objets durant la polymérisation. Le Tableau II- 4 présente l'ensemble des constituants utilisés dans notre étude pour mener la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion.

L'AIBN a été choisi comme amorceur. Il s'agit d'un amorceur thermique souvent employé pour des polymérisations réalisées entre 60 et 80 °C, et notamment des polymérisations RAFT [1]. A ces températures, la formation des radicaux à partir de l'AIBN est suffisamment lente pour garantir le bon déroulement de la polymérisation RAFT. De plus, dans le cas d'une polymérisation en miniémulsion directe (huile-dans-eau, O/W), l'AIBN se localise dans la phase dispersée c'est-à-dire au sein des gouttelettes de monomère, lieu où se déroule la polymérisation. Ceci permet alors de réduire les phénomènes de nucléation homogène (c'est-à-dire de croissance des chaînes polymères dans la phase aqueuse) [2].

L'agent de transfert modèle, le dithiobenzoate de 2-cyano-2-propyle (CPDB), présente une structure chimique similaire à celle des sites CTA présents sur les $\text{DexN}_{3,\tau}\text{CTA}\gamma$ et a déjà été utilisé pour contrôler efficacement la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion [3]–[5]. La nature chimique de ces sites CTA a d'ailleurs été justifiée dans le chapitre I de cette partie. Dans les expériences préalables où le CPDB est utilisé comme agent RAFT, les $\text{DexN}_{3,\tau}$, analogues aux $\text{DexN}_{3,\tau}\text{CTA}\gamma$ du point de vue de leurs propriétés tensioactives (voir Chapitre I, Paragraphe 2.2) sont employés pour stabiliser les miniémulsions. Au contraire, dans les expériences où les transurfs $\text{DexN}_{3,\tau}\text{CTA}\gamma$ ont été utilisés, ces derniers jouent le rôle de stabilisants et de macroagents RAFT.

Dans les deux cas, afin d'obtenir des NCs à cœur huileux, une huile a été mélangée au MMA dans la phase organique du départ. Cette huile joue un double rôle : en plus de constituer le cœur huileux des NCs finales, elle est également un agent hydrophobe (encore appelé co-stabilisant, voir Partie I Paragraphe 3.2.1) qui permet de limiter le mûrissement d'Ostwald.

Tableau II- 4 : Constituants de la polymérisation RAFT en miniémulsion du MMA. Cas du système modèle et du système en présence du transurf.

| | Composants | Système modèle (Homopolymérisation du MMA) | Système transurf (Croissance de greffons PMMA à partir du dextrane) |
|------------------------|---|--|--|
| Phase Organique | Monomère (MMA) | |  |
| | Amorceur (AIBN) | |  |
| | Agent hydrophobe/cœur huileux (M810) | |  <i>Structure basée sur la composition moyenne en acides gras (voir Partie III, Paragraphe 1)</i> |
| | Agent de transfert RAFT | CPDB  Groupement R Groupement Z | DexN ₃ -τCTAγ  R=H R=  R=  |
| Phase aqueuse | Tensioactif | DexN ₃ -τ  R= H ou  |  Groupement R Groupement Z <i>Structure simplifiée</i> |
| | Représentation schématique du polymère obtenu |  Chaînes PMMA |  Dorsale dextrane Greffons PMMA |

1.2. ETAPES DU PROCEDE DE POLYMERISATION

Les différentes étapes et conditions utilisées pour la préparation de NCs sont décrites brièvement dans la Figure II- 13. Quel que soit le système utilisé pour le contrôle de la polymérisation RAFT (système modèle CPDB/DexN₃.τ ou système transurf DexN₃.τCTAγ), les étapes sont les mêmes : i) Préparation de l'émulsion par sonication, ii) dégazage pendant 45 minutes et iii) polymérisation RAFT par amorçage thermique. Les protocoles sont détaillés dans la partie expérimentale (Partie III, Paragraphe 3.1).

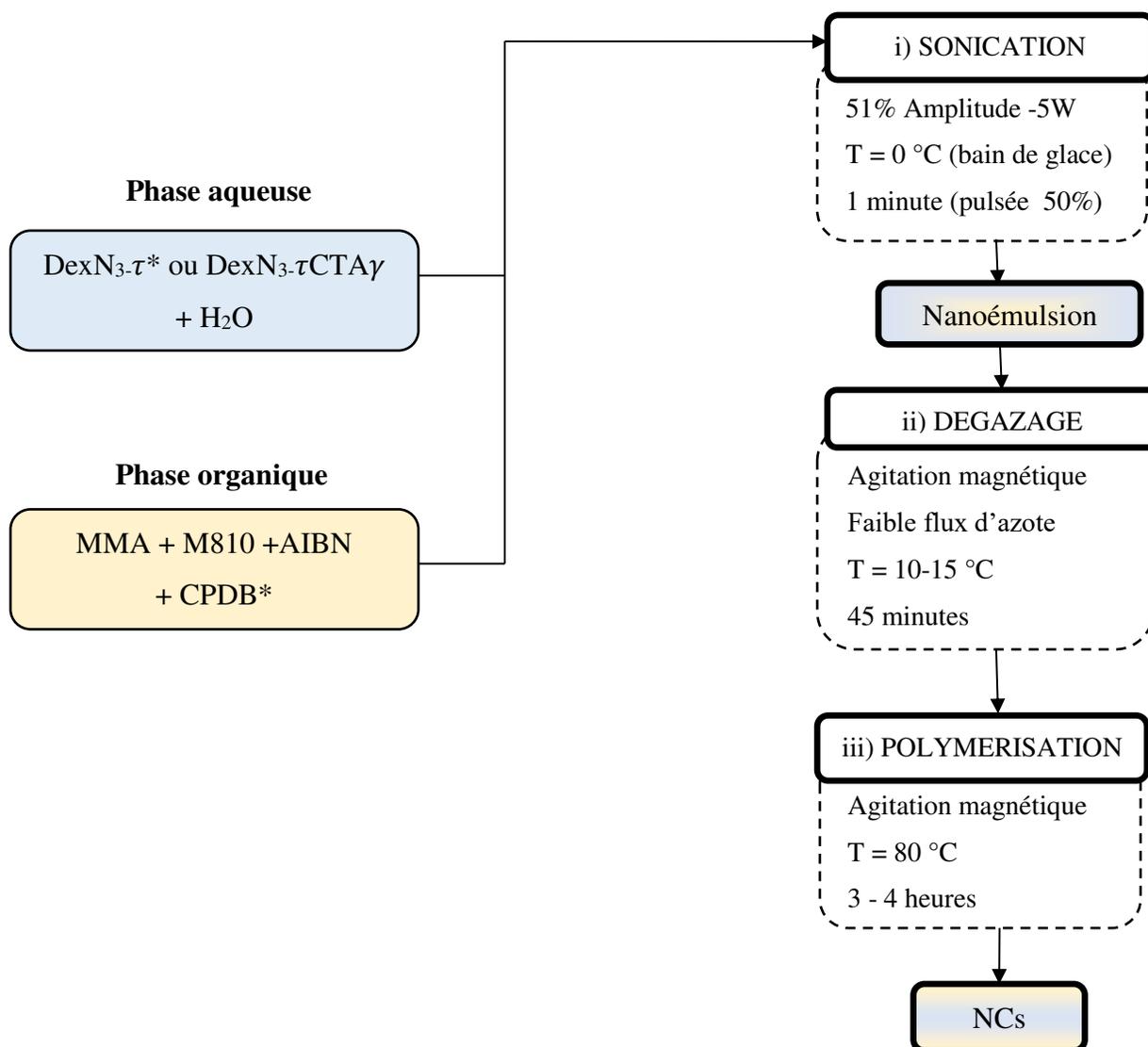


Figure II- 13 : Etapes et conditions utilisées pour la polymérisation RAFT en miniémulsion du MMA.

*Cas du système modèle

1.3. CHOIX DU M810 COMME AGENT HYDROPHOBE ET CŒUR HUILEUX DES NCS

Dans cette étude, nous avons utilisé, comme agent hydrophobe et cœur huileux des NCs, le Miglyol[®]810 (M810) produit par CREMER Oleo GmbH & Co. KG (sa composition et ses propriétés physico-chimiques sont données en détail dans la Partie III, Paragraphe 1). Des études précédentes menées au LCPM [6], [7] ont montré que le M810 peut être utilisé comme co-stabilisant pour la polymérisation radicalaire du MMA en miniémulsion. Ceci a notamment été vérifié dans le cas d'une ATRP réalisée à partir d'un inisurf dérivé du dextrane, porteur de groupements phénoxy et de sites d'amorçage ATRP.

Compte-tenu de l'application biomédicale envisagée pour les objets finaux, il convient de valider le choix du M810 en vérifiant différents points : i) l'admissibilité du M810 pour une application biomédicale, ii) l'efficacité du M810 comme agent hydrophobe en présence des stabilisants DexN₃. τ (système modèle) et DexN₃. τ CTA γ (système transurf) et iii) la possibilité d'obtenir une morphologie cœur-écorce.

1.3.1. Admissibilité pour une application biomédicale

Comme évoqué dans la partie I (paragraphe 2.6), les huiles riches en triglycérides caprylique/caprique sont biocompatibles, biodégradables et bioassimilables [8]–[10]. Approuvées par la FDA pour un usage clinique, elles sont largement utilisées en tant qu'excipients et vecteurs dans de nombreuses formulations pharmaceutiques et cosmétiques [11]–[13]. Nous pouvons citer par exemple leur utilisation i) dans la nutrition parentérale [11], [12], ii) comme agents facilitant la pénétration de médicaments par voie percutanée, à travers la peau [14], iii) comme émoullients ou constituants de la phase organique dans la formulation de produits cosmétiques destinés aux soins de la peau, du corps et des cheveux [15], et plus récemment iv) pour augmenter la solubilité de divers principes actifs lipophiles lors de la conception de vecteurs pour administrer des médicaments par voie intraveineuse (paclitaxel [16], docétaxel [16], [17], fisetine [18], sorafénib [19] et plitidepsine [20]).

1.3.2. Rôle du M810 comme agent hydrophobe.

1.3.2.1. Etude de la stabilité de la miniémulsion

Nous avons étudié la stabilité des émulsions O/W (MMA+M810)/eau dans les conditions opératoires de préparation des NCs (Figure II- 13) afin de vérifier l'efficacité du M810 comme co-stabilisant. Comme les propriétés tensioactives des DexN_{3-τ} sont très similaires de celles des transurfs DexN_{3-τ}CTAγ pour un même taux de modification en groupements hydrophobes N₃ (τ) (voir Chapitre I, Paragraphe 2.2), nous n'avons effectué cette étude de stabilité qu'avec les dérivés DexN_{3-τ}.

Les expériences menées pour étudier la stabilité de la nanoémulsion du système modèle ont consisté à suivre la taille des nanogouttelettes au cours des différentes étapes mais sans effectuer la polymérisation, c'est-à-dire en l'absence d'AIBN et du CPDB. Pour chaque essai, nous avons utilisé 15 mL de phase aqueuse contenant du DexN₃₋₂₀ à 10 g/L, tandis que la phase organique contenait 1,1 mL de MMA et des proportions volumiques variables de M810 (10, 25 et 50 % vol. par rapport au MMA). La distribution de taille des nanogouttelettes a été mesurée à l'aide d'un granulomètre laser (voir Partie III, Paragraphe 6.3.1). Le diamètre moyen en surface d[3 : 2] déterminé par l'appareil à partir de cette distribution a été utilisé comme diamètre moyen des nanogouttelettes. La Figure II- 14 présente l'évolution de ce diamètre au cours du test de stabilité après chaque étape du procédé : sonication, dégazage, 1h et 3h de chauffage à 80 °C.

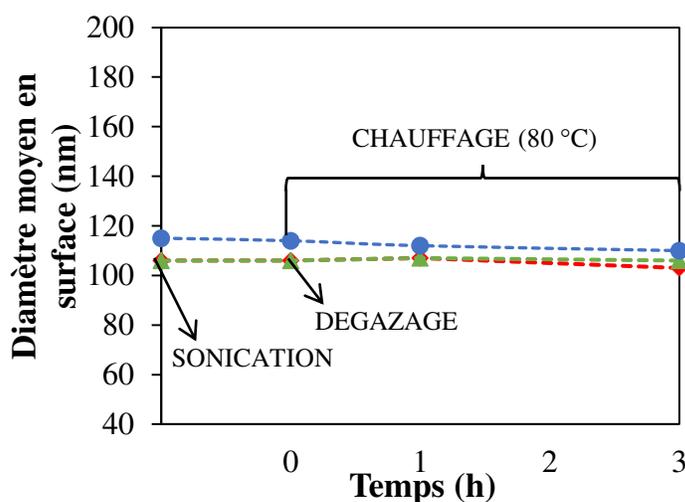


Figure II- 14 : Evolution du diamètre moyen en surface des nanogouttelettes (d[3 : 2]) lors du procédé de préparation des NCs. Miniémulsions préparées avec [DexN₃₋₂₀] = 10 g/L (phase aqueuse de 15 mL), 1,1 mL de MMA et différents ratios M810/MMA : (▲) 10, (◆) 25 et (●) 50 % vol..

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces expériences :

- La taille des nanogouttelettes formulées après sonication augmente très légèrement avec la quantité de M810 dans la phase organique. En effet, des diamètres de 104, 106 et 115 nm ont été obtenus pour des ratios M810/MMA égaux respectivement à 10, 25 et 50 % vol. Ceci s'explique par l'augmentation du volume de phase organique par rapport à la phase aqueuse quand la proportion de M810 augmente (le volume du MMA restant inchangé à 1,1 mL) et surtout par l'augmentation du rapport massique phase organique/DexN_{3-τ}. Cet effet sera discuté de façon approfondie dans le Paragraphe 1.3.2.2.
- Pour les trois expériences, le diamètre reste inchangé lors du dégazage et pendant la période de chauffage (qui simule la polymérisation). Il faut signaler que pour limiter la déstabilisation du système dans ces expériences, tout comme dans celles de polymérisation, le débit d'azote employé pour le dégazage a été ajusté pour être faible et le milieu réactionnel n'a été refroidi qu'à 10-15 °C lors de ce dégazage pour limiter l'évaporation du monomère. De façon plus approfondie, les distributions de taille obtenues après l'étape de sonication ont été comparées à celles observées après 3h de chauffage dans la Figure II- 15. Ces superpositions confirment bien que la miniémulsion est une copie très conforme aux nanogouttelettes initiales.

Ces résultats montrent la capacité du M810 à contrebalancer la pression de Laplace qui tend à faire diffuser le monomère des petites gouttelettes vers les grosses gouttelettes (voir partie I, paragraphe 3.2.1) et donc à limiter le vieillissement de la miniémulsion par mûrissement d'Ostwald. Ceci est valide pour une large gamme des rapports volumiques M810/MMA (10-50 % vol.). Il faut noter que cette stabilité de l'émulsion, valable dans les conditions expérimentales utilisées, est également due aux propriétés stabilisantes des DexN_{3-τ} qui permettent d'éviter le phénomène de coalescence des nanogouttelettes. C'est ce qui est d'ailleurs montré dans le paragraphe suivant.

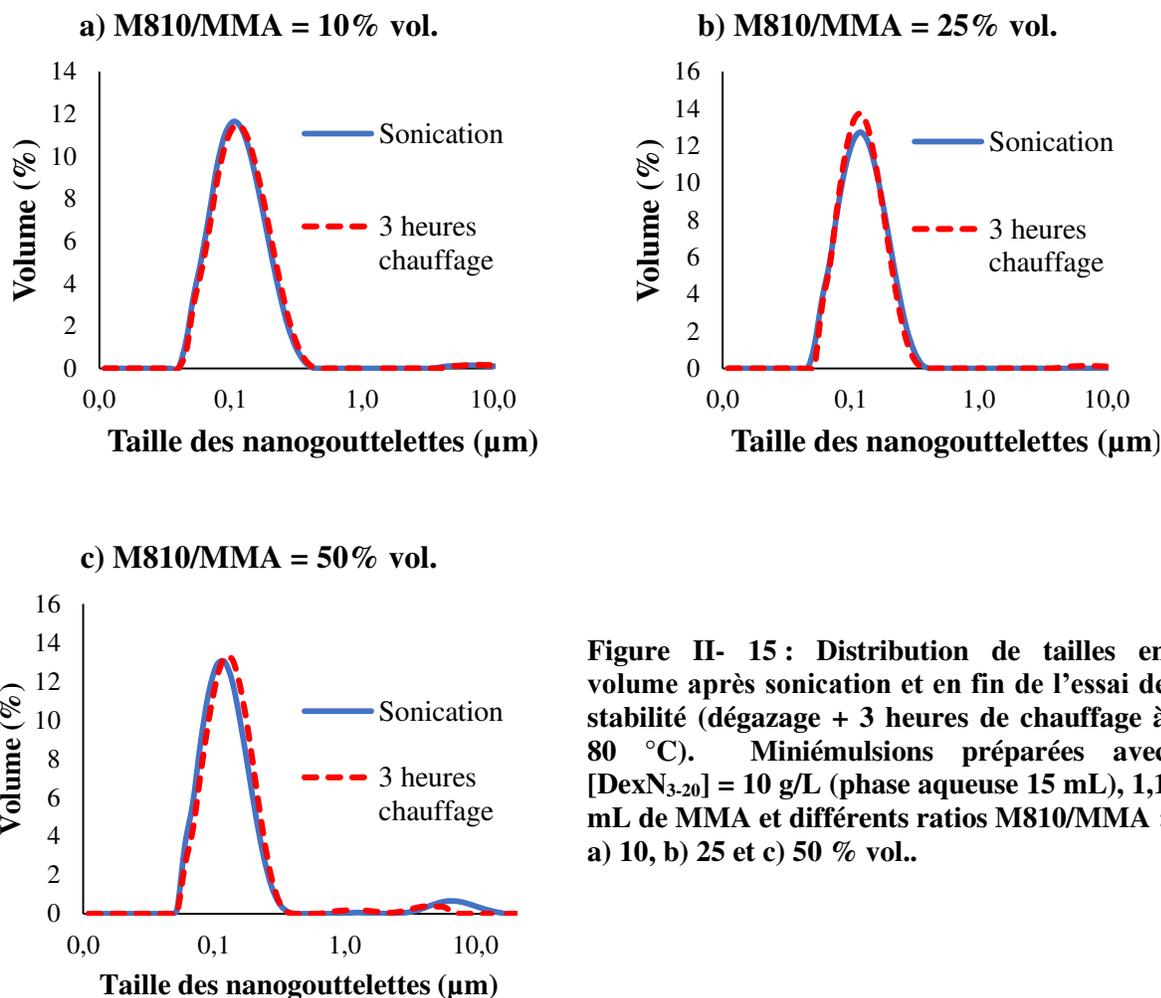


Figure II- 15 : Distribution de tailles en volume après sonication et en fin de l'essai de stabilité (dégazage + 3 heures de chauffage à 80 °C). Miniémulsions préparées avec [DexN₃₋₂₀] = 10 g/L (phase aqueuse 15 mL), 1,1 mL de MMA et différents ratios M810/MMA : a) 10, b) 25 et c) 50 % vol..

1.3.2.2. Influence de la quantité de DexN_{3.τ} sur le diamètre des nanogouttelettes.

Après avoir montré que le M810 assure bien son rôle de co-stabilisant (agent hydrophobe) dans les expériences préliminaires menées avec les tensioactifs DexN_{3.τ}, une étude plus poussée de l'étape d'émulsification a été menée afin d'étudier l'influence du rapport massique DexN_{3.τ}/phase organique (DexN₃₋₂₀/(MMA+M810)) qui sera appelé par la suite α . Plusieurs miniémulsions (MMA+M810)/eau ont été préparées en utilisant une concentration constante de DexN₃₋₂₀ dans la phase aqueuse (10 g/L) mais en faisant varier ce rapport α . Pour cela, nous avons modulé les volumes de MMA (de 0,4 à 2,4 mL) et M810 (M810/MMA variant entre 10 et 100 % vol.) utilisés dans la phase organique initiale. Ces études ont été réalisées en l'absence d'amorceur et d'agent

RAFT pour ne pas mener une polymérisation. Nous avons ainsi pu étudier l'influence du ratio α sur la taille initiale des nanogouttelettes au travers du $d[3 : 2]$ (Figure II- 16). Chaque courbe est représentative des phases organiques préparées à ratio volumique M810/MMA constant (10, 25, 50 et 100 % vol.). A titre d'informations complémentaires, les points correspondant aux conditions précédemment utilisées pour mener les études de stabilité et pour lesquels le volume de MMA est de 1,1 mL, ont été encerclés sur la Figure II- 16.

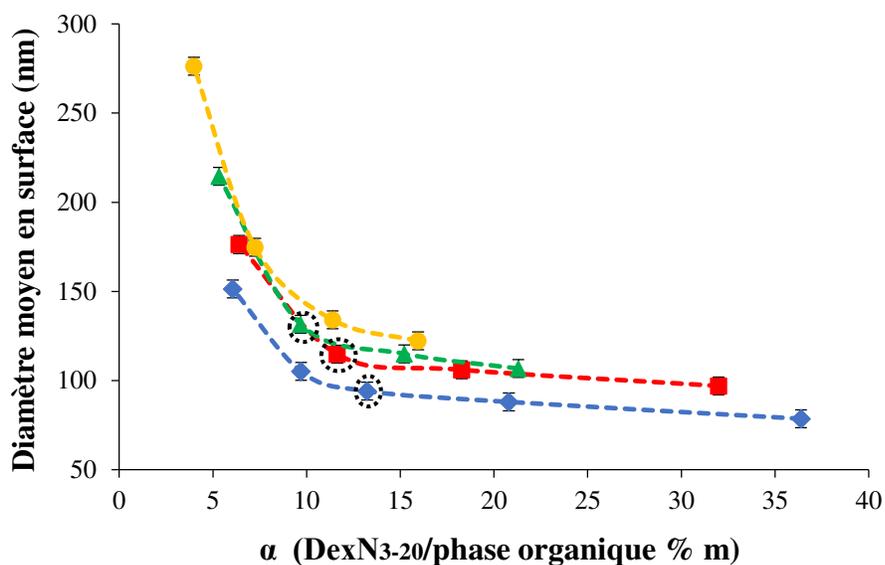


Figure II- 16 : Diamètre moyen des nanogouttelettes ($d[3 : 2]$) des émulsions obtenues en dispersant une phase organique de MMA et de M810 dans une solution aqueuse de DexN₃₋₂₀ à 10 g/L, en fonction du ratio massique tensioactif/phase organique (α). Chaque courbe correspond à un ratio volumique M810/MMA constant : (♦) 10, (■) 25, (▲) 50 et (●) 100 % vol..

Plusieurs observations peuvent être faites :

- Le ratio massique α semble être le paramètre critique le plus important déterminant la taille des nanogouttelettes obtenues après l'étape de sonication : quel que soit le ratio volumique M810/MMA, le diamètre moyen des nanogouttelettes diminue lorsque l'on augmente α . Il s'agit d'un comportement classique déjà observé dans notre équipe dans le cas des miniémulsions styrène/hexadécane [21], acrylate de butyle/hexadécane [6] et MMA/M810 [22] préparées en utilisant d'autres dérivés amphiphiles du dextrane.
- Si on compare les différentes courbes obtenues et que l'on fixe une valeur de α constante, on observe une légère augmentation de la taille des nanogouttelettes lorsque le ratio volumique

M810/MMA passe de 10 à 100 % vol. Les densités volumiques du MMA et du M810 étant identiques (0,94 g/mL), le volume total de phase organique est le même à α constante quel que soit le ratio M810/MMA bien que la teneur en M810 augmente avec ce ratio. Dans ces conditions, la variation de $d[3 : 2]$ peut être expliquée par une augmentation de la viscosité de la phase organique avec la proportion croissante de M810, qui rend plus difficile la rupture des gouttelettes pendant l'étape de sonication : la viscosité du M810 (~ 30 mPa.s à 20 °C) est en effet 50 fois supérieure à celle du MMA (0,6 mPa.s à 20 °C).

- La diminution des diamètres moyens des nanogouttelettes atteint dans tous les cas une valeur minimale qui n'évolue plus beaucoup au-delà d'un ratio α d'environ 13 % m. La valeur de $d[3 : 2]$ est plus limitée par le procédé lui-même que par les capacités émulsifiantes du DexN₃₋₂₀. De fait, pour des ratios α inférieurs à 13 % m, le tensioactif supplémentaire accumulé à l'interface permet d'augmenter l'aire interfaciale eau/phase organique ce qui tend à réduire la taille des gouttelettes. Des études précédentes, réalisées avec des dextrans modifiés par des groupements phénoxy, ont démontré que la quantité de polymère adsorbé à l'interface eau/phase organique est constante et égale à environ 1 mg/m² lorsque α est inférieur à une valeur critique (dans notre cas 13 % m.) [23]. Cependant, pour des quantités de stabilisant supérieures ($\alpha > 13$ % m), une taille minimale des nanogouttelettes est observée car elles sont saturées à leur surface de DexN_{3- τ} . L'excédent de DexN_{3- τ} s'adsorbe alors sur la couche de DexN_{3- τ} déjà localisée à la surface de la gouttelette ou reste en solution sur la forme d'agrégats micellaires.

Pour conclure, cette étude nous a permis d'identifier les valeurs optimales de α qui ne conduisent pas ou très peu à la formation d'agrégats de stabilisant en solution. En effet, limiter leur quantité permet de garantir que la polymérisation ait lieu quasi-exclusivement au sein des gouttelettes de monomère et de limiter tout phénomène de nucléation homogène. Pour cela α doit, dans notre étude, rester inférieur au ratio limite de 13 % m mais sa valeur doit être suffisante pour obtenir des tailles des nanogouttelettes proches de 100 nm. Ainsi les valeurs de α correspondants aux points encadrés sur la Figure II- 16, c'est-à-dire égales à 13,2, 11,6 et 9,7 % m. pour des ratios volumiques M810/MMA de 10, 25 et 50 % vol. respectivement, semblent donc adéquates pour réaliser la polymérisation en miniémulsion du MMA. Ce sont ces conditions que nous utiliserons par la suite.

1.3.3. Possibilité d'obtention d'une morphologie cœur-écorce : Rôle du M810 comme cœur huileux de la NC.

Le processus d'élaboration des NCs lors de la polymérisation peut être subdivisé en trois périodes qui diffèrent par la constitution chimique nanogouttelettes/nano-objets (Figure II- 17).

- **Période I (avant la polymérisation, $t \leq 0$) :** juste après l'étape de sonication, les nanogouttelettes sont constituées par le mélange binaire contenant le monomère et l'huile (MMA+M810). A ce stade, le MMA n'a pas encore polymérisé.
- **Période II (période polymérisation, $0 < t < t_f^1$) :** une fois la polymérisation amorcée, du PMMA est formé et les nanogouttelettes sont composées d'un système ternaire (MMA+M810+PMMA). Au cours de la polymérisation la concentration massique en M810 dans la phase organique reste constante tandis que le MMA est consommé au fur et à mesure de l'avancement de la polymérisation pour former des chaînes polymères PMMA.
- **Période III (fin de la polymérisation, $t = t_f$) :** une fois la polymérisation achevée (conversion en monomère totale), nous avons à nouveau un système binaire. Les nano-objets sont alors composés du mélange polymère/huile (PMMA+M810).

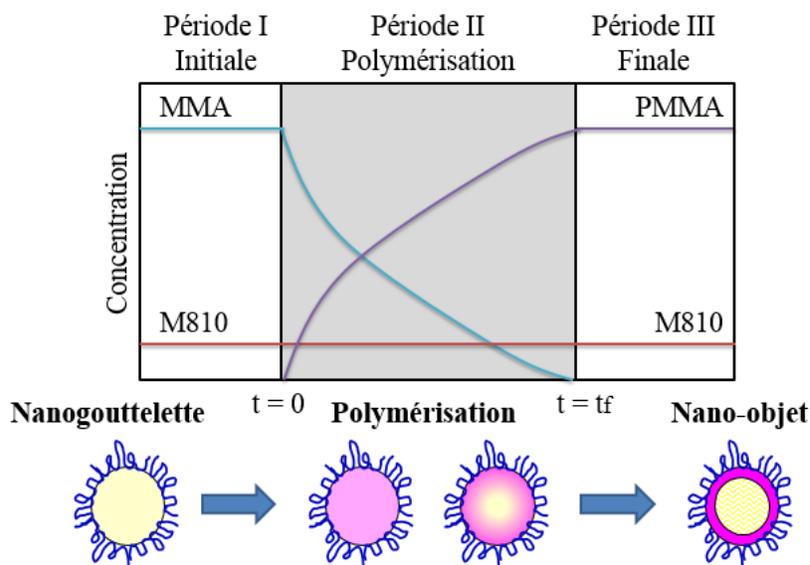


Figure II- 17 : Evolution de la composition des nanogouttelettes/nano-objets au cours du procédé de préparation des NCs.

¹ t_f temps final de la polymérisation qui correspond à une conversion totale en monomère.

Le mélange liquide initial (MMA+M810) (Période I) étant homogène (quel que soit le ratio M810/MMA [6]), la séparation de phases entre le PMMA qui forme l'écorce et l'huile qui constitue le cœur de la NC se produit au cours de la polymérisation (deuxième période). Cette séparation de phase se produit au-delà d'une certaine conversion en monomère qui dépend de la quantité du M810 initialement introduite. Cette ségrégation de phases n'est possible que si le polymère formé est immiscible avec l'huile. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'étude de la miscibilité du système binaire (PMMA+M810) pour nous assurer qu'une ségrégation de phases ait bien lieu au fur et à mesure de l'avancement de la polymérisation. Cependant, il aurait été intéressant de déterminer précisément à quelle conversion se produit cette ségrégation en étudiant les mélanges ternaires (PMMA+M810+MMA). Faute de temps, cela n'a pas pu être réalisé.

Pour étudier la miscibilité du PMMA et du M810, l'influence de la teneur en M810 sur la température de transition vitreuse (T_g) du PMMA dans le mélange binaire PMMA/M810 a été évaluée par calorimétrie différentielle à balayage modulée (MDSC). Des mélanges PMMA/M810 contenant de 2 à 34 % m. d'huile ont été analysés en variant la température de -70 °C à 250 °C (voir Partie III, Paragraphe 6.1). Les valeurs de T_g des différents mélanges étudiés sont données à la Figure II- 18.

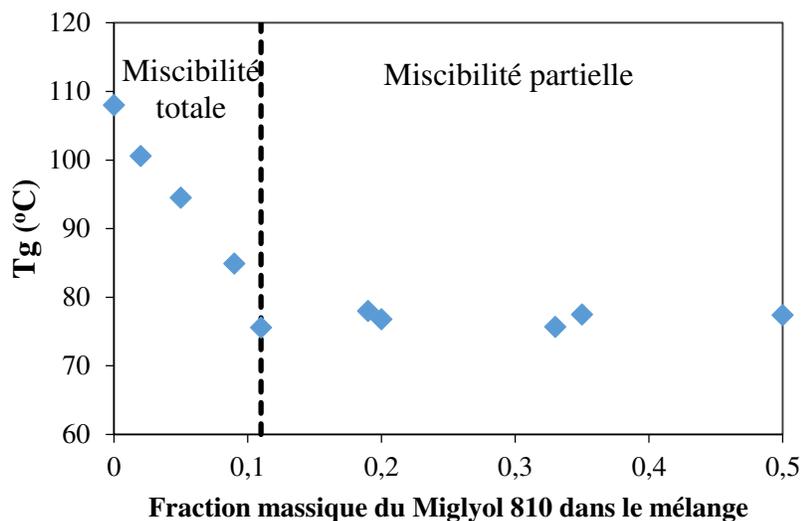


Figure II- 18: Evolution de la T_g du PMMA en fonction de la teneur massique en M810.

Une diminution de la T_g est observée quand la teneur en M810 augmente de 0 à 11 % m., ce qui démontre l'effet plastifiant du M810 sur le PMMA. Sur les thermogrammes (a, Figure II- 19), seule

la température de transition vitreuse de PMMA est observée pour les mélanges M810/MMA contenant moins de 11 % m. de M810, ce qui témoigne d'une miscibilité totale des deux composants dans ces conditions. Au-delà de cette fraction massique en M810 (b, Figure II- 19), la T_g ne diminue plus et les thermogrammes comportent également un pic de fusion. La T_g de 77,5 °C correspond au mélange homogène composé de 11 % m. du M810 dans le PMMA qui est amorphe. La seconde phase ne contient que du M810 et est caractérisée par un pic de fusion vers -4 °C, qui correspond à la température de fusion du M810 pur.

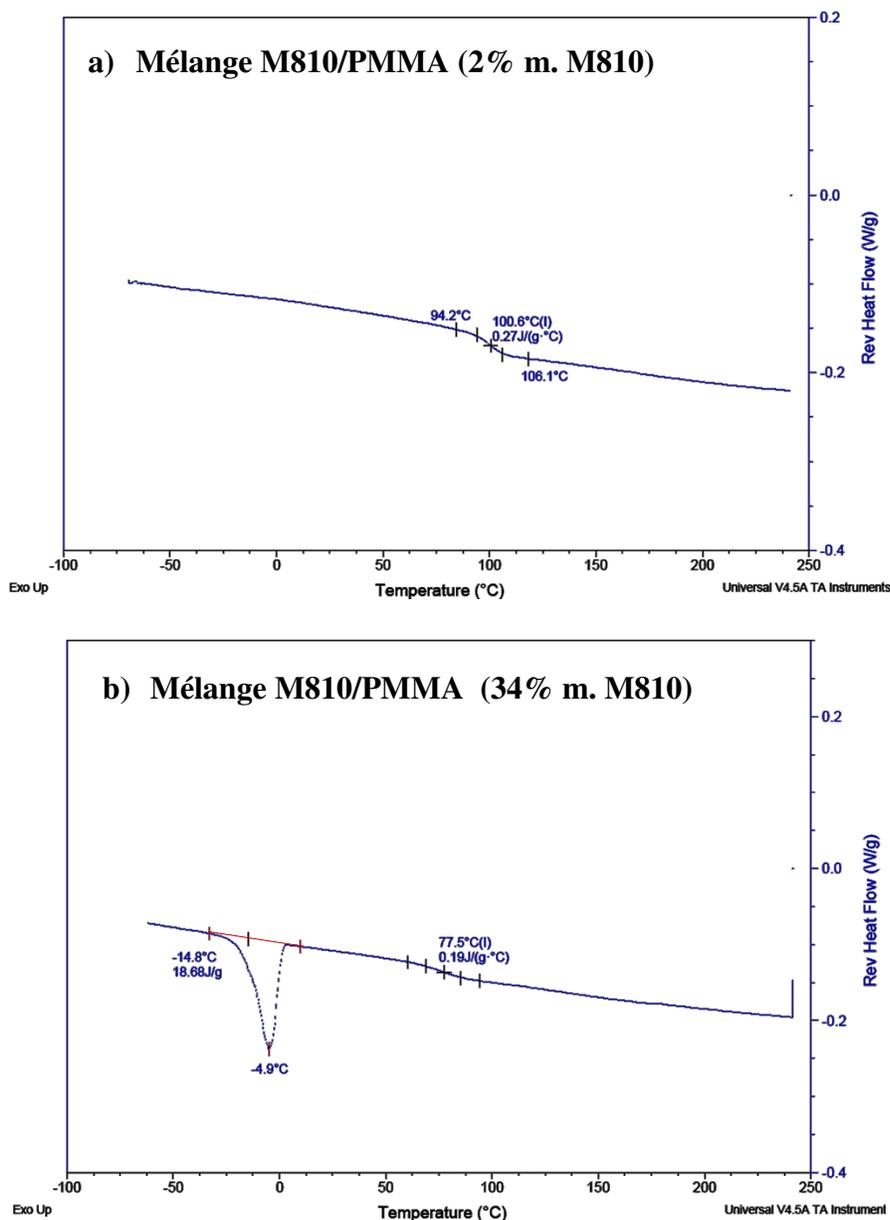


Figure II- 19 : Thermogrammes MDSC (flux inversible) des mélanges PMMA/M810 avec a) 2% m. M810 et b) 34% m. M810

Ces résultats indiquent que la miscibilité du M810 et du PMMA est limitée à 11% m. en M810 et donc qu'une ségrégation de phases se produit pour des mélanges contenant plus de M810. Il est donc envisageable de préparer des systèmes cœur-écorce avec le système M810/PMMA pour des teneurs de M810 supérieures à 11 % m. par rapport au PMMA. Ceci correspond à un ratio volumique M810/MMA initial supérieur à 12 % vol.

2. POLYMÉRISATION DU MMA AVEC LE SYSTÈME MODELE DexN_{3.τ}/CPDB

Les résultats présentés précédemment nous ont permis de valider l'utilisation du DexN_{3.τ} comme stabilisant et du M810 comme agent hydrophobe et huile non-miscible au PMMA lors de la polymérisation en miniémulsion du MMA. Ce système permet d'obtenir des miniémulsions stables, susceptibles d'être polymérisées afin de préparer des nano-objets à morphologie cœur-écorce.

Dans cette section, les tests préliminaires de polymérisation du MMA en miniémulsion avec le système CPDB/AIBN et les dérivés DexN_{3.τ} comme stabilisants seront présentés. Ces polymérisations ont permis la synthèse d'homopolymères PMMA bien définis qui constituent au final la couronne des NCs, recouvertes d'une surface de DexN_{3.τ} et emprisonnant du M810 au centre de NCs. Au cours de ces expériences préliminaires, différents paramètres ont été variés afin de trouver les conditions optimales pour la polymérisation et les transposer aux expériences qui seront menées avec le transurf.

2.1. POLYMERISATION RAFT DU MMA EN PRESENCE DU CPDB : ETAT DE L'ART

Nous nous proposons ici de faire un rapide état de l'art sur la polymérisation RAFT du MMA en présence du CPDB comme agent de contrôle, en examinant plus particulièrement les conditions expérimentales employées. Le Tableau II- 5 présente les travaux reportés dans la littérature pour des systèmes de polymérisation en milieu homogène et hétérogène. Nous avons résumé les ratios molaires $[MMA]_0/[CPDB]_0$ et $[CPDB]_0/[amorceur]_0$ ainsi que les températures de polymérisation,

utilisés. Nous examinerons successivement le cas des procédés en masse, solution et suspension. Les problématiques propres aux systèmes de polymérisation en émulsion et miniémulsion ont été listées par la suite.

Tableau II- 5 : Conditions de réaction utilisées dans la littérature pour la polymérisation RAFT du MMA en présence du CPDB : rapports molaires $[MMA]_o/[CPDB]_o$, $[CPDB]_o/[amorceur]_o$ et température de réaction.

| Procédé * | T (°C) | $\frac{[MMA]_o}{[CPDB]_o}$ | | | | | $\frac{[CPDB]_o}{[Amorceur]_o}$ | | | | | Ref. |
|-----------------------|--------|----------------------------|-----|------|------|------|---------------------------------|---|---|---|---|--------------|
| | | 0 | 500 | 1000 | 1500 | 2000 | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | |
| M (a) | 60 | [Bar chart: 0-2000 ratio] | | | | | [Bar chart: 0-10 ratio] | | | | | [24] |
| | 80 | [Bar chart: 0-2000 ratio] | | | | | [Bar chart: 0-10 ratio] | | | | | [25] [26] |
| Sol. (a) | 60 | [Bar chart: 0-2000 ratio] | | | | | [Bar chart: 0-10 ratio] | | | | | [27] |
| Sus. (a)(b) | 70 | [Bar chart: 0-2000 ratio] | | | | | [Bar chart: 0-10 ratio] | | | | | [24] |
| E (c) | 70 | [Bar chart: 0-2000 ratio] | | | | | [Bar chart: 0-10 ratio] | | | | | [4] [24] |
| ME (c)(d) | 60 | [Bar chart: 0-2000 ratio] | | | | | [Bar chart: 0-10 ratio] | | | | | [3] |
| | 70 | [Bar chart: 0-2000 ratio] | | | | | [Bar chart: 0-10 ratio] | | | | | [4] |
| | 80 | [Bar chart: 0-2000 ratio] | | | | | [Bar chart: 0-10 ratio] | | | | | [25] |

(a) Amorceur=AIBN.

(b) Agents dispersants= orthophosphate diacide de sodium et poly (méthacrylate de sodium).

(c) Amorceurs=AIBN ou KPS. Tensioactif=SDS

(d) Agent hydrophobe= Hexadécane

* Polymérisation en **M** : Masse, **Sol.** : Solution, **Sus.** : Suspension, **E** : Emulsion, **ME** : Miniémulsion

2.1.1. Polymérisations en masse, solution et suspension.

Si on s'intéresse tout d'abord au ratio $[MMA]_o/[CPDB]_o$, la polymérisation RAFT du MMA en présence du CPDB a pu être contrôlée de façon satisfaisante en solution [27], en masse [24], [25], [26] et en suspension [24], pour des rapports molaires $[MMA]_o/[CPDB]_o$ variant de 100 à 1700.

Ceci a permis aux auteurs de produire des PMMA avec de faibles dispersités, sur une large gamme de masses molaires.

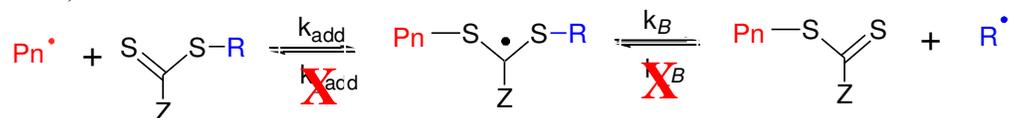
Plusieurs auteurs ont d'ailleurs fait une estimation de la constante de transfert apparente (C_{tr})² du CPDB au MMA dans des systèmes de polymérisation en masse. Des valeurs de 8 [24], 15 [25] et 13 [27] ont été estimées. D'après la modélisation cinétique de Müller et Litvinenko [30], [31] ces valeurs de constante de transfert sont assez élevées pour permettre un bon contrôle des grandeurs macromoléculaires au cours de la polymérisation (voir partie I, paragraphe 4.3.3.1). De plus, il a été montré que le CPDB est presque complètement consommé dès le début de la polymérisation (conversions en monomère inférieures à 20%) [27], ce qui favorise l'obtention des distributions de masses molaires étroites.

Aucun effet de retard n'a été reporté pour les systèmes en masse, en solution et en suspension. La concentration en CPDB ne semble pas influencer la cinétique de polymérisation par rapport à celle d'un système sans CTA. En revanche, comme on pouvait s'y attendre pour une polymérisation radicalaire contrôlée, l'autoaccélération par effet de gel typiquement observée dans un système radicalaire conventionnel en masse, est moindre en présence du CPDB. Enfin, plus la concentration en CPDB augmente, plus les masses molaires visées sont faibles et coïncident avec les masses molaires théoriques.

2.1.2. Polymérisations en émulsion et miniémulsion

Au cours de ces polymérisations en milieu hétérogène, seul le SDS a été utilisé comme stabilisant. Cependant, la concentration de SDS nécessaire pour assurer une bonne stabilité colloïdale des systèmes initiaux (7,5-26 g/L) est très supérieure (jusqu'à 20 fois) à celle utilisée dans les polymérisations radicalaires conventionnelles du MMA en émulsion et en miniémulsion [28]. L'AIBN et le KPS sont deux amorceurs qui ont été testés pour la polymérisation du MMA en émulsion. Tandis que le KPS permet d'obtenir des émulsions stables, l'AIBN provoque la perte de

² La constante de transfert apparente est calculée en considérant que la réaction de consommation de l'agent de transfert moléculaire, ici le CPDB, (premier équilibre du mécanisme RAFT) est irréversible, autrement dit $C_{-tr} = 0$ (voir Partie I, paragraphe 4.3.3.1)



stabilité colloïdale. Aussi l'AIBN et le KPS peuvent être tous les deux employés pour la polymérisation en miniémulsion du MMA, à condition d'ajuster la quantité du tensioactif employée pour maintenir la stabilité colloïdale du système pendant toute la polymérisation[4].

Tous les travaux de polymérisation RAFT en miniémulsion cités dans le Tableau II- 5 reportent l'emploi de l'HD en faible proportion (entre 0,5 et 7 % vol. par rapport au MMA) comme agent hydrophobe. A notre connaissance, l'utilisation du M810 lors d'une polymérisation RAFT en miniémulsion n'a jamais été relatée. De fait, il n'a été utilisé qu'à quelques occasions lors de polymérisations radicalaires en miniémulsion [32]–[35] et plus récemment par notre équipe pour mener des ATRP du MMA en miniémulsion [6], [7].

Dans le cas de la polymérisation en émulsion, la stabilité colloïdale est influencée par la masse molaire visée du PMMA [28]. Une perte de stabilité colloïdale a par exemple été obtenue lorsque les masses molaires visées sont faibles ($[MMA]_o/[CPDB]_o = 100$), si bien qu'aucun contrôle de la polymérisation n'est possible. Pour des masses molaires plus élevées ($[MMA]_o/[CPDB]_o = 800$), l'émulsion est stable mais de larges distributions massiques sont obtenues aux fortes conversions ($\bar{D} \approx 1,6$). A des ratios $[MMA]_o/[CPDB]_o$ intermédiaires (200 et 400), les problèmes de stabilité colloïdale ne sont pas complètement éliminés et une faible proportion de coagulum est régulièrement obtenue. Cependant, la polymérisation est mieux contrôlée et les dispersités obtenues dans ce cas sont inférieures à 1,3 en fin de polymérisation. La polymérisation en miniémulsion, quant à elle, a permis l'obtention de chaînes PMMA aux paramètres macromoléculaires relativement contrôlés pour des ratios $[MMA]_o/[CPDB]_o$ compris entre 100 et 600. Dans ces cas, la formation d'un coagulum n'est pas reportée, même si une démixtion est parfois observée en surface de la miniémulsion en début de la polymérisation.

Les températures de polymérisation utilisées sont souvent comprises entre 60 et 80 °C. L'effet de la température a uniquement été étudié dans le cas de la polymérisation du MMA en miniémulsion par Yang et al. [3]. Ils ont observé une diminution de l'effet de gel aux fortes conversions et un meilleur contrôle pour une polymérisation conduite avec $[MMA]_o/[CPDB]_o = 192$, $[CPDB]_o/[KPS]_o = 5$, en augmentant la température de 60 °C à 80 °C.

Enfin, un effet de compartimentalisation de la polymérisation du MMA en miniémulsion en présence de CPDB a été décrit [3]. En effet, pour de faibles conversions, la cinétique de

polymérisation est similaire à celle d'une polymérisation en masse réalisée dans les mêmes conditions. Cependant, au-delà d'une certaine conversion, la vitesse de réaction de polymérisation en miniémulsion augmente par rapport à celle du système en masse. Cette augmentation est d'autant plus marquée que la taille des nanogouttelettes diminue (de 120 à 89 nm), toutes conditions égales par ailleurs. L'interprétation proposée est qu'à faible conversion les radicaux issus du CPDB ainsi que les radicaux monomères peuvent probablement s'échanger entre les nanogouttelettes à cause de leur petite taille. Cependant, une fois que tout l'agent RAFT s'est transformé en espèces dormantes, la diffusion du CTA d'une nanogouttelette à l'autre n'est plus possible. De même, la diffusion des radicaux monomères est réduite à forte conversion en monomère, à cause de la forte viscosité au sein des objets.

2.1.3. Conclusion

Pour conclure, la polymérisation RAFT du MMA a déjà pu être contrôlée en présence du CPDB comme agent de transfert RAFT. Elle a déjà été réalisée en solution, en masse, en dispersion, en émulsion et en miniémulsion et a conduit à la fabrication de PMMA de faibles dispersités, sur une large gamme de masses molaires. Le rapport $[CTA]_0/[amorceur]_0$ normalement suggéré par la littérature pour une polymérisation RAFT est de 10, voire supérieur [1]. Cependant, un bon contrôle de la polymérisation RAFT du MMA en milieu homogène et hétérogène a été obtenu avec des ratios moins importants, variant entre 2 et 10. Aucun effet de retard n'a été reporté pour les polymérisations en masse, en solution et en suspension tandis qu'un effet de compartimentalisation a été mis en évidence pour les polymérisations en miniémulsion. La stabilité colloïdale semble être l'un des problèmes majeurs dans la mise en œuvre de la polymérisation RAFT du MMA en milieu hétérogène. Cette problématique est cependant moindre en miniémulsion qu'en émulsion. Il faut également signaler que la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion avec le CPDB comme CTA n'a jamais été réalisée en utilisant un polysaccharide amphiphile (DexN_{3.τ}) comme stabilisant ou avec une huile biocompatible (M810) comme agent hydrophobe.

2.2. MISE AU POINT DES CONDITIONS DE POLYMERISATION

Afin d'optimiser le contrôle de la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence de CPDB, l'effet de différents paramètres tels que la température, la concentration en agent RAFT et la teneur en M810 dans la phase organique a été étudié. Pour ce faire, un certain nombre d'études cinétiques ont été réalisées (voir Partie III, Paragraphe 3.1.1). Pour chaque expérience, les analyses effectuées sont les suivantes :

- Détermination du taux de conversion par gravimétrie (voir Partie III, Paragraphe 3.1.1).
- Mesure de la distribution de la taille des nanogouttelettes/nano-objets présents dans le système à l'aide d'un granulomètre laser (voir Partie III, Paragraphe 6.3.1). Comme pour les essais de stabilité, le diamètre moyen en surface ($d[3 : 2]$) estimé par l'appareil a été utilisé comme diamètre moyen. Nous ne montrerons pas ici les distributions de taille obtenues mais nous donnerons les valeurs des Span calculées par le granulomètre laser grâce à l'équation II- 3. Dans cette équation, $d[0,1]$, $d[0,5]$ et $d[0,9]$ représentent les diamètres de particules en dessous desquels se trouvent respectivement 10, 50 et 90 % du volume total des particules de l'échantillon.

$$Span = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad \text{II- 3}$$

Le Span peut être utilisé comme indicateur de la largeur de la distribution de taille des objets. Idéalement sa valeur devrait être la plus petite possible et inférieure à 1 (Span = 0 correspond à un échantillon parfaitement monodisperse). Néanmoins, des valeurs de Span jusqu'à 1,5 reflètent une distribution de taille relativement étroite.

- Estimation de la distribution massique et des masses molaires moyennes en nombre (\bar{M}_n) des homopolymères PMMA grâce à des analyses SEC-MALLS dans le THF (voir Partie III, paragraphe 5.3). Les masses molaires théoriques ($\bar{M}_{n\ th}$) seront calculées grâce à l'équation II- 4 avec $M_{CPDB} = 221\text{g/mol}$, $M_{MMA} = 100\text{g/mol}$ et x la conversion.

$$\bar{M}_{n\ th} = M_{CPDB} + \frac{[MMA]_0}{[CPDB]_0} M_{MMA} x \quad \text{II- 4}$$

Les ratios molaires $[\text{CPDB}]_o/[\text{AIBN}]_o$, $[\text{MMA}]_o/[\text{CPDB}]_o$ ainsi que le rapport volumique M810/MMA peuvent varier d'une expérience à l'autre. En revanche, dans tous les cas, la phase aqueuse de 15 mL contenait du DexN₃₋₂₀ à 10 g/L, et la phase organique, 1,1 mL de MMA.

2.2.1. Influence de la température

Nous nous sommes basés sur les travaux référencés dans la littérature et discutés précédemment [3] pour choisir un premier ensemble de conditions expérimentales : $[\text{MMA}]_o/[\text{CPDB}]_o = 195$, $[\text{CPDB}]_o/[\text{AIBN}]_o = 3$, M810/MMA = 10% vol. ($\alpha = 13,2\% \text{ m.}$)³. La polymérisation a été étudiée à 70 °C et à 80 °C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau II- 6, tandis que les évolutions de la conversion et du $\ln([M]_o/[M]_t)$ en fonction du temps sont présentées dans la Figure II- 20.

Tableau II- 6 : Influence de la température de polymérisation sur les caractéristiques des PMMA et des objets obtenus avec $[\text{MMA}]_o/[\text{CPDB}]_o = 195$, $[\text{CPDB}]_o/[\text{AIBN}]_o = 3$, $[\text{AIBN}]_o = 12,6 \text{ mM}$, M810/MMA = 10 % vol., $[\text{DexN}_{3-20}] = 10 \text{ g/L}$ (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA.

| Exp | T (°C) | $x^{(a)}$ (%) | Temps (min) | $\bar{M}_{n \text{ th}}^{(b)}$ (g/mol) | $\bar{M}_n^{(c)}$ (g/mol) | $\bar{D}^{(c)}$ | Taille initiale ^(d) (nm) | Taille finale ^(d) (nm) | Teneur en solide (% m.) |
|-------|--------|---------------|-------------|--|---------------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| MOD-1 | 70 | 84 | 363 | 16 600 | 20 000 | 1,16 | 101 (1,15) | 109 (1,22) | 7 |
| MOD-2 | 80 | 100 | 300 | 19 700 | 20 300 | 1,11 | 100 (1,51) | 108 (1,24) | 8 |

(a) Conversion estimée par gravimétrie.

(b) Calculées grâce à l'équation II- 4, voir page 151.

(c) Obtenues par SEC-MALLS dans le THF avec $dn/dc = 0,087 \text{ mL/g}$.

(d) Diamètre moyen en surface ($d[3:2]$) des gouttelettes, mesuré par granulométrie laser après dégazage et en fin de polymérisation. Valeurs de Span données entre parenthèses et obtenues par granulométrie laser grâce à l'équation II- 3, voir page 151.

Le $\ln([M]_o/[M]_t)$ croit linéairement avec le temps jusqu'à 82 % de conversion quelle que soit la température de l'expérience. Ceci indique que la concentration des espèces actives en croissance

³ Pour rappel (voir paragraphe 1.3.2.2) $\alpha = \% \text{ m. de DexN}_{3-20}/\text{phase organique}$

reste pratiquement constante pendant la période de temps correspondante. Si l'on considère les distributions massiques des polymères observées par SEC-MALLS (Figure II-21), on peut voir que les pics monomodaux évoluent vers les faibles volumes d'élution au fur et à mesure de la

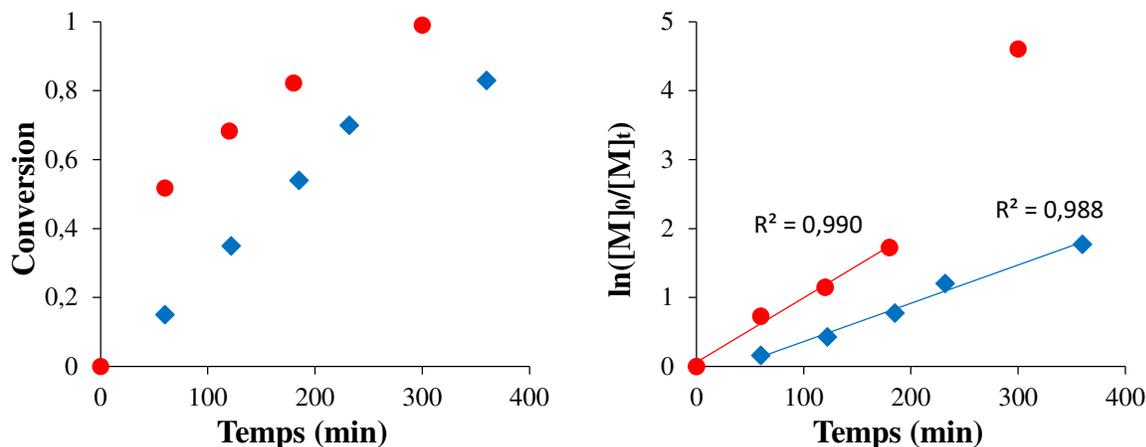


Figure II- 20 : Evolution de la conversion et du $\ln([M]_0/[M]_t)$ en fonction du temps : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à (◆) 70 °C et (●) 80 °C avec $[MMA]_0/[CPDB]_0 = 195$, $[CPDB]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[AIBN]_0 = 12,6$ mM, M810/MMA = 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L, (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA.

polymérisation. Cependant, un léger épaulement est visible du côté des fortes masses molaires pour des conversions supérieures à 70 % quelle que soit la température de la polymérisation. Ceci pourrait être le témoin de réactions de terminaison irréversibles conduisant à la recombinaison de chaînes de polymères à forte conversion, ce qui entrainerait l'accumulation de chaînes mortes de masse molaire plus élevée. Cependant, cette explication est peu satisfaisante puisque le mode de terminaison prépondérant de la polymérisation radicalaire du MMA est la dismutation (67% et 73% respectivement à 25 °C et 60°C [36]). En s'appuyant sur les travaux de Johnston et al. [26] qui traitent de l'effet de la longueur des chaînes PMMA sur les coefficients de terminaison de la polymérisation RAFT du MMA, on peut dire qu'en fin de polymérisation RAFT, lorsque la viscosité du milieu est importante, les réactions de terminaison et d'addition deviennent contrôlées par diffusion des macroradicaux de grande longueur. Au contraire, l'étape de propagation est moins affectée par la viscosité du milieu. Ainsi, les macroradicaux consomment rapidement du monomère pour donner des macroradicaux plus longs mais sans une régulation efficace par le mécanisme d'addition-transfert réversible. Ceci conduit à une perte partielle du contrôle de la polymérisation et à un élargissement de la distribution des masses molaires.

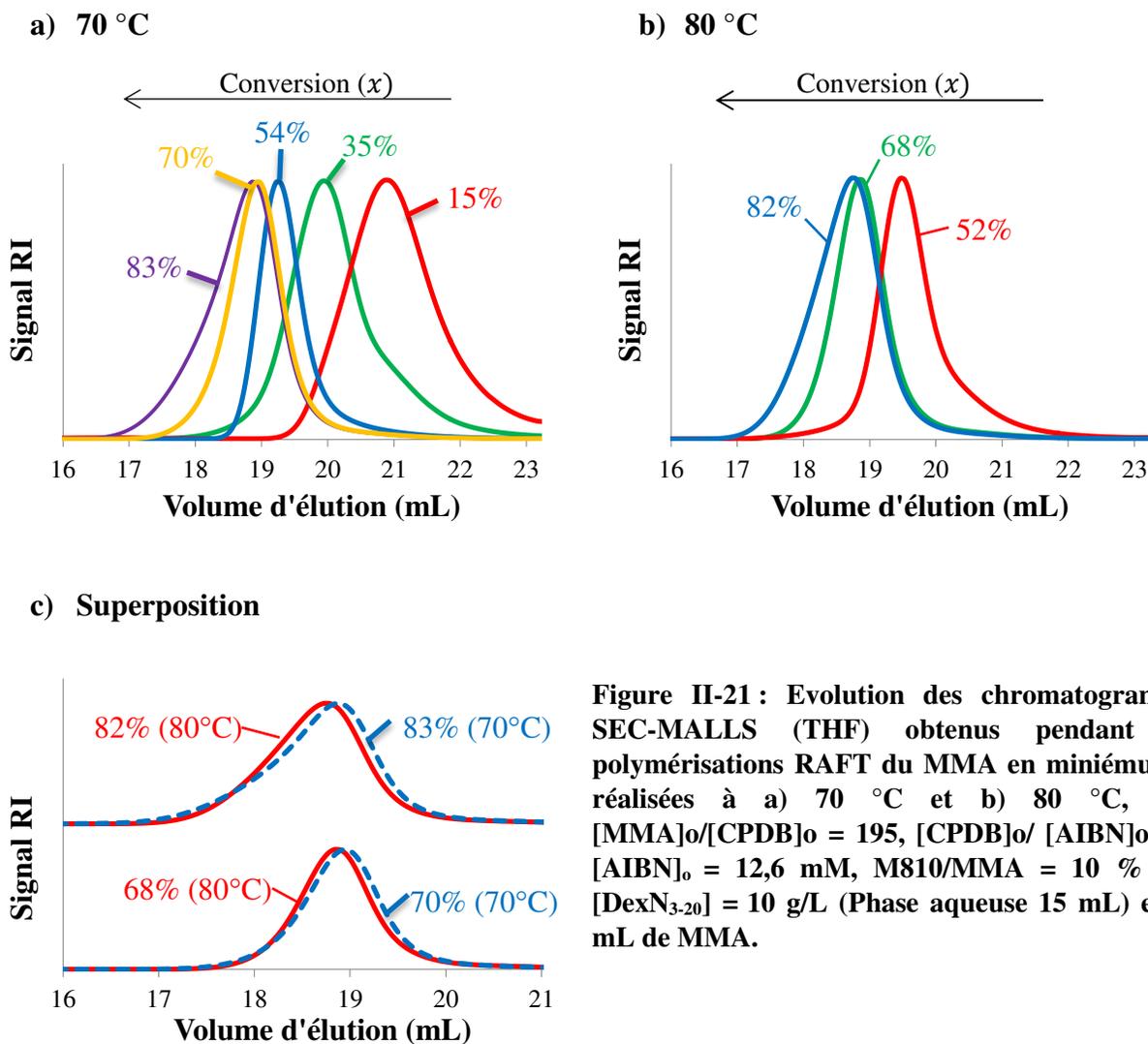


Figure II-21 : Evolution des chromatogrammes SEC-MALLS (THF) obtenus pendant des polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à a) 70 °C et b) 80 °C, avec $[MMA]_o/[CPDB]_o = 195$, $[CPDB]_o/[AIBN]_o = 3$, $[AIBN]_o = 12,6$ mM, M810/MMA = 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA.

Cependant, malgré la présence de cet épaulement, l'évolution linéaire des masses molaires en fonction de la conversion, les faibles dispersités obtenues (inférieures à 1,2 tout au long de la réaction) et le bon accord entre les masses molaires expérimentales et les prédictions théoriques (ligne pointillée) (Figure II- 22) témoignent du contrôle de ces polymérisations. Les masses molaires théoriques ont été calculées en négligeant la proportion des chaînes polymères issues de l'amorceur, selon l'équation II- 4 et malgré le faible ratio $[CPDB]_o/[AIBN]_o = 3$. Ces résultats démontrent que la faible quantité de CPDB introduite est suffisante pour contrôler la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion dans les conditions étudiées, ce qui confirme les résultats relatés dans la littérature (voir paragraphe 2.1).

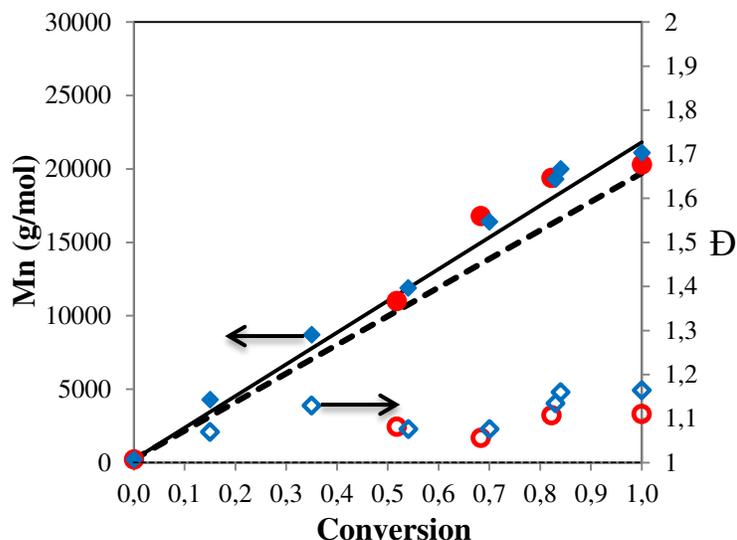


Figure II- 22 : Evolutions des \bar{M}_n (symboles pleins) et des \bar{D} (symboles creux) en fonction de la conversion. Polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à (♦) 70 °C, (●) 80 °C, avec $[MMA]_0/[CPDB]_0 = 195$, $[CPDB]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[AIBN]_0 = 12,6$ mM, M810/MMA = 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. Les lignes pointillée et pleine correspondent aux \bar{M}_{n-th} calculées selon l'équation II- 4 avec des ratios $[MMA]_0/[CPDB]_0$ de 195 et 216, respectivement.

La légère déviation positive des masses molaires expérimentales par rapport aux valeurs théoriques que l'on peut observer pour chaque conversion, peut traduire une efficacité du CPDB inférieure à 100%. Un ratio $[MMA]_0/[CPDB]_0 = 216$ (ligne pleine, Figure II- 22) donne le meilleur ajustement des données expérimentales et on peut alors estimer l'efficacité du CTA à 90%. Il faut aussi noter que, contrairement au MMA et à l'AIBN qui ont été purifiés avant leur utilisation, le CPDB a été utilisé tel quel. Des impuretés résiduelles peuvent fausser la valeur de la quantité réellement introduite dans le milieu réactionnel et conduire à une sous-estimation du ratio $[MMA]_0/[CPDB]_0$. Ceci pourrait aussi expliquer l'écart entre les données théoriques et expérimentales. D'ailleurs, les agents de transfert RAFT de type dithiobenzoate sont plus sensibles à l'hydrolyse par rapport à d'autres types d'agent de transfert [1], ce qui pourrait aussi conduire à une diminution de la quantité d'agent RAFT disponible pendant la polymérisation.

Comme attendu dans le cas d'une polymérisation radicalaire, la vitesse de polymérisation augmente avec la température de 70 à 80 °C (Figure II- 20). Ceci est dû à l'augmentation de la constante de propagation de la polymérisation. Une période d'inhibition d'environ 30 minutes est cependant observée pour l'expérience à 70 °C. Si des périodes d'inhibition sont souvent reportées pour la

polymérisation RAFT en présence des agents de transfert de type dithiobenzoate [1], cela ne l'a jamais été dans le cas du CPDB utilisé pendant la polymérisation RAFT du MMA (voir page 147). Dans notre cas, ce retard à la polymérisation pourrait traduire un effet cinétique de l'agent RAFT ou tout simplement la présence d'oxygène résiduel dans le milieu réactionnel, au début de la polymérisation. Cependant, malgré plusieurs expériences réalisées dans les mêmes conditions, nous avons toujours observé la même période d'inhibition. Ainsi, cette inhibition est probablement due à la présence du CPDB dans le milieu réactionnel. A 70 °C, l'équilibre de la RAFT nécessite plus de temps à se mettre en place à cause d'une décomposition plus lente de l'amorceur dans ces conditions ($t_{1/2 \text{ AIBN}}=6,3$ heures vis-à-vis $t_{1/2 \text{ AIBN}}=1,9$ heures à 80 °C). La superposition de chromatogrammes SEC-MALLS des homopolymères obtenus aux différentes températures mais à des conversions similaires (Figure II-21, c) montre que la température n'a pas une influence significative ni sur le contrôle ni sur la distribution massique des PMMA synthétisés.

Enfin, nous avons vérifié la stabilité des miniémulsions et suivi l'évolution de la taille des nanogouttelettes/nano-objets pendant la polymérisation. La courbe issue des essais de stabilité à 80 °C est aussi tracée pour comparaison (Figure II- 23).

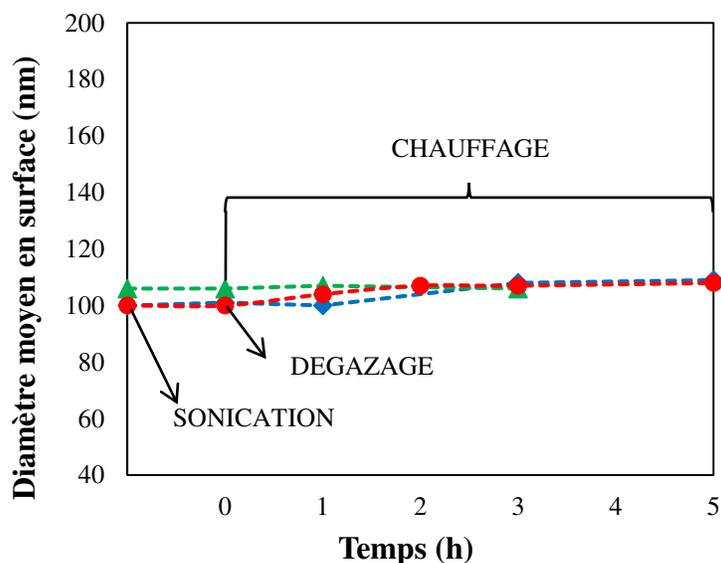


Figure II- 23 : Evolution du diamètre moyen en surface des nanogouttelettes/nano-objets ($d[3 : 2]$) au cours des différentes étapes du processus de préparation des NCs et au cours de la polymérisation. Polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à (◆) 70 °C, (●) 80 °C, avec $[MMA]_0/[CPDB]_0 = 195$, $[CPDB]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[AIBN]_0 = 12,6$ mM, M810/MMA= 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. L'essai de stabilité à ratio M810/MMA de 10% vol. est donné comme référence (▲), (voir Figure II- 14, page 138).

Le diamètre moyen en surface ($d[3:2]$) des nanogouttelettes/nano-objets demeure pratiquement invariant tout au long de la préparation des nano-objets, ceci pour les deux températures étudiées. Les distributions de tailles sont assez étroites comme l'attestent les valeurs de Span toujours inférieures à 1,5 (voir Tableau II- 6). Dans le cas de l'expérience à 80 °C, on note cependant la présence d'un agrégat après sonication qui explique l'évolution des Span obtenus au fur et à mesure de la polymérisation. De plus, aucun des problèmes de stabilité mentionnés dans la littérature (formation d'une couche liquide à la surface de l'émulsion ou d'un coagulum au fond du réacteur) n'a été observé.

Les conditions choisies permettent donc une polymérisation relativement contrôlée, tout en assurant une bonne stabilité du système et la production d'objets ayant un diamètre moyen de 108 nm avec un teneur en solide de 8 % m.

Au vue de l'ensemble de ces résultats, nous avons choisi de réaliser toutes les futures polymérisations suivantes du MMA à 80 °C pour des raisons pratiques : la conversion obtenue est plus élevée pour la même durée de polymérisation.

2.2.2. Influence de la concentration en CPDB

Nous venons de montrer que la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence du CPDB peut être contrôlée jusqu'à 82% de conversion. Ce caractère contrôlé nous permet alors d'envisager de faire varier le degré de polymérisation moyen en nombre (\bar{X}_n). Pour rappel, dans le cadre de ce projet, varier le \bar{X}_n permet d'envisager de préparer des NCs ayant des écorces PMMA d'épaisseur variable. Le \bar{X}_n peut être ajusté en variant le ratio $[MMA]_o/[CPDB]_o$ qui fixe la longueur des chaînes à une conversion donnée à condition que la contribution de l'amorceur à la création des chaînes soit négligeable (équation II- 4, p. 151). On peut également envisager de fixer le ratio $[MMA]_o/[CPDB]_o$ et de stopper la réaction à différents taux de conversion. Cependant, dans le cadre de l'application biomédicale visée, la première méthode semble la plus convenable afin de réduire au minimum la quantité de monomère résiduel à l'intérieur des objets finaux. C'est pourquoi nous avons cherché à varier la concentration en CPDB dans la phase organique, et tout particulièrement à étudier l'impact de cette variation sur le contrôle de la polymérisation RAFT. Pour ce faire, deux nouvelles expériences à des ratios $[MMA]_o/[CPDB]_o$ de 86 et 295 ont été réalisées en gardant constante la concentration en AIBN (12,6 mM) mais en faisant varier le rapport $[CPDB]_o/[AIBN]_o$.

d'une expérience à l'autre (Tableau II- 7). Une polymérisation radicalaire conventionnelle (notée PR dans le Tableau II- 7) du MMA en miniémulsion (en absence du CPDB) avec la même concentration en amorceur a également été menée afin d'étudier l'influence du CTA sur la cinétique de polymérisation.

Tableau II- 7 : Influence de la concentration en CPDB sur les caractéristiques des PMMA et des objets obtenus à 80 °C avec [AIBN] = 12,6 mM, M810/MMA = 10 % vol., [DexN₃₋₂₀] = 10 g/L (Phase aqueuse de 15 mL) et 1,1 mL de MMA. PR correspond à un essai réalisé en absence de CPDB. La teneur en solide est dans tous le cas de 8 % m..

| Exp | $\frac{[MMA]_0}{[CPDB]_0}$ | $\frac{[CPDB]_0}{[AIBN]_0}$ | $x^{(a)}$ (%) | Temps (min) | $\bar{M}_{n\ th}^{(b)}$ (g/mol) | $\bar{M}_n^{(c)}$ (g/mol) | $\bar{D}^{(c)}$ | Taille initiale ^(d) (nm) | Taille finale ^(d) (nm) |
|-------------|----------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------|---|---|
| MOD3 | 86 | 7,7 | 86 | 241 | 7 600 | 8 500 | 1,03 | 102 (1,49) | 111 (1,41) |
| MOD2 | 195 | 3,0 | 100 | 300 | 19 700 | 20 300 | 1,11 | 100 (1,53) | 108 (1,10) |
| MOD4 | 295 | 2,2 | 96 | 180 | 28 500 | 28 300 | 1,16 | 98 (1,25) | 109 (0,94) |
| PR | - | - | 93 | 20 | - | - | - | 96 (0,80) | 110 (1,24) |

(a) Conversion estimée par gravimétrie.

(b) Calculées grâce à l'équation II- 4 (voir page 151).

(c) Obtenues par SEC-MALLS dans le THF avec $dn/dc = 0,087$ mL/g.

(d) Diamètre moyen en surface ($d[3:2]$) des gouttelettes, mesuré par granulométrie laser après dégazage et en fin de polymérisation. Valeurs de Span données entre parenthèses et obtenues par granulométrie laser grâce à l'équation II- 3, voir page 151.

Les études cinétiques présentées dans la Figure II- 24 mettent en évidence un effet de retard dans le cas du système en miniémulsion. En effet, plus la concentration en CPDB est importante (masses molaires visées plus petites), plus la polymérisation est ralentie, la vitesse de réaction étant dans tous les cas inférieure à celle d'un système sans CTA (Figure II- 24, a). On rappelle qu'aucun effet de la concentration en CPDB sur la cinétique de polymérisation n'avait été observé pour les systèmes en masse et en suspension du MMA [24], [26]. Mais ce retard à la polymérisation avait déjà été observé par Shim et al. [37] lorsqu'ils avaient étudié la polymérisation RAFT du MMA en émulsion avec de l'acide 4-[(benzoylthiocarbonyl)sulfanylméthyl]benzoïque utilisé comme agent de transfert RAFT;

et par Ma et al. [38] lors de la polymérisation RAFT du MMA en microémulsion en présence de l'acide 2-[(carboxy-isopropylthiocarbonyl)sulfanyl]-2-méthyl propanoïque employé comme agent de transfert. Par ailleurs, à la lecture de nombreux articles dans la littérature cet effet de retard semble être inhérent aux systèmes RAFT en miniémulsion et être lié à la compartimentalisation du système au sein des gouttelettes de monomère, contrairement au cas d'une polymérisation RAFT en masse. Une des hypothèses proposées dans la littérature est qu'à faible conversion, les radicaux R' issus de l'agent RAFT puis les oligoradicaux qui commencent à se former au sein de nanogouttelettes/nano-objets (siège de la polymérisation) peuvent migrer hors de ces objets assez facilement à cause de leur petite taille, entraînant une diminution de la concentration en radicaux à l'intérieur des particules et donc de la vitesse de polymérisation [39], [40]. Cet effet retard serait donc plus marqué à forte concentration en agent de transfert RAFT puisque les radicaux en croissance à faible masse molaire seraient présents sur une plus longue période de polymérisation (les masses molaires de polymères synthétisés diminuent pour la même conversion en monomère à plus faible ratio $[MMA]_0/[CPDB]_0$). Il est aussi proposé que les radicaux migrant dans la phase aqueuse, peuvent y subir des réactions de terminaison alors que les radicaux qui rentrent dans une particule peuvent à leur tour réagir avec les radicaux intermédiaires issus de l'équilibre RAFT. Ces deux réactions secondaires peuvent également contribuer à l'effet de retard observé sur la polymérisation en miniémulsion [39].

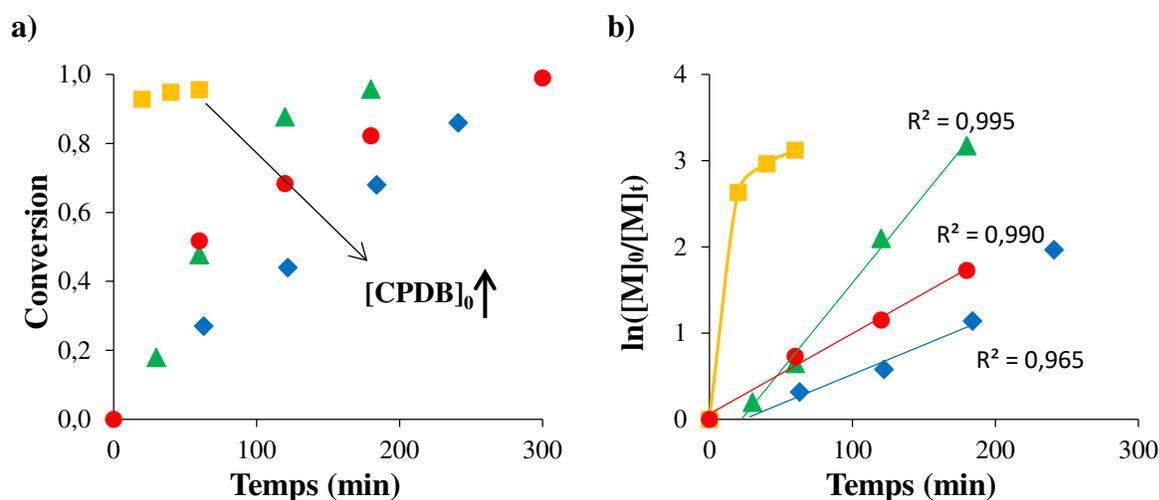


Figure II- 24 : Evolution de la conversion (a) et du $\ln([M]_0/[M]_t)$ (b) en fonction du temps : polymérisations RAFT du MMA réalisées à 80 °C avec $[MMA]_0/[CPDB]_0$: (♦) 86, (●) 195, (▲) 295, $[AIBN]_0 = 12,6$ mM, M810/MMA = 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse de 15 mL) et 1,1 mL de MMA. Polymérisation en absence de CPDB pour comparaison (■).

Si à première vue on peut penser qu'un effet d'inhibition est aussi présent (Figure II- 24, b), celui-ci ne présente pas la tendance attendue. En effet, la période d'inhibition n'est pas d'autant plus marquée que la concentration en CTA dans le milieu augmente. De plus, dans la présente étude, la concentration intermédiaire en CTA utilisée ($[MMA]_0/[CPDB]_0 = 195$) n'entraîne pas ce phénomène. Ainsi, ceci nous laisse penser que les périodes d'inhibition observés dans les cas $[MMA]_0/[CPDB]_0 = 86$ et 295 sont plutôt dus à un dégazage partiel de la miniémulsion, contrairement à ce que nous pensions au paragraphe 2.2.1 précédent. Des points supplémentaires dans la première période de la polymérisation seraient nécessaires pour vérifier ces hypothèses.

Concernant les masses molaires, un bon contrôle est observé quel que soit le ratio $[MMA]_0/[CPDB]_0$ utilisé (Figure II- 25). Les masses molaires évoluent linéairement avec la conversion et les dispersités restent toujours inférieures à 1,2.

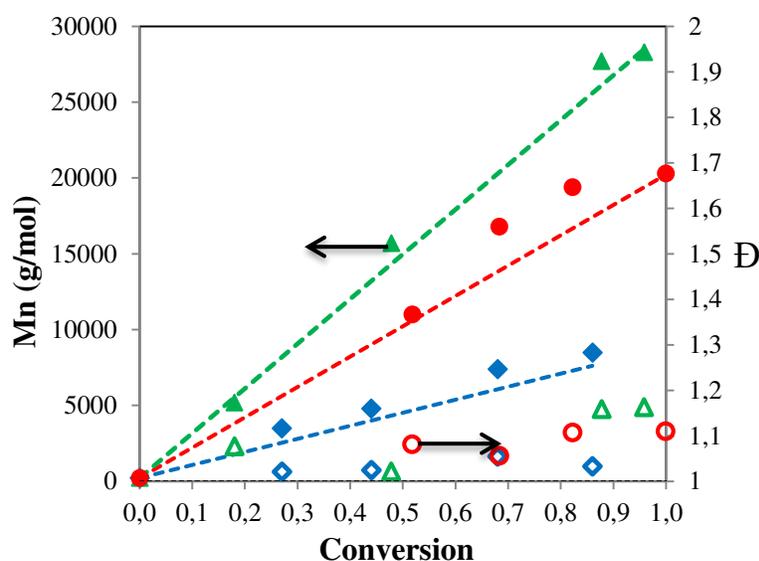


Figure II- 25 : Evolutions des \bar{M}_n (symboles pleins) et des \bar{D} (symboles creux) en fonction de la conversion : polymérisations RAFT du MMA réalisées à 80 °C avec des ratios $[MMA]_0/[CPDB]_0$ de (◆) 86, (●) 195, (▲) 295, $[AIBN] = 12,6$ mM, $M810/MMA = 10$ % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse de 15 mL) et 1,1 mL de MMA. Les lignes pointillées correspondent aux droites théoriques calculées grâce à l'équation II- 4.

Malgré ces faibles dispersités, un épaulement au niveau des fortes masses molaires est encore une fois décelable en raison de l'effet de gel (voir plus haut, section 2.2.1), sauf pour l'expérience menée à plus forte concentration en CPDB ($[MMA]_0/[CPDB]_0 = 86$) (a, Figure II-26). Cependant dans ce

dernier cas, un léger épaulement au niveau des faibles masses molaires est visible à partir de 68% de conversion et est probablement le résultat de réactions de transfert irréversible. Comme observé précédemment (paragraphe 2.2.1), les \bar{M}_n sont toutefois légèrement supérieures aux prédictions théoriques. Des efficacités du CPDB de 90%, 92% et 96% ont pu être estimées pour des ratios $[MMA]_0/[CPDB]_0$ de 86, 195 et 295, respectivement.

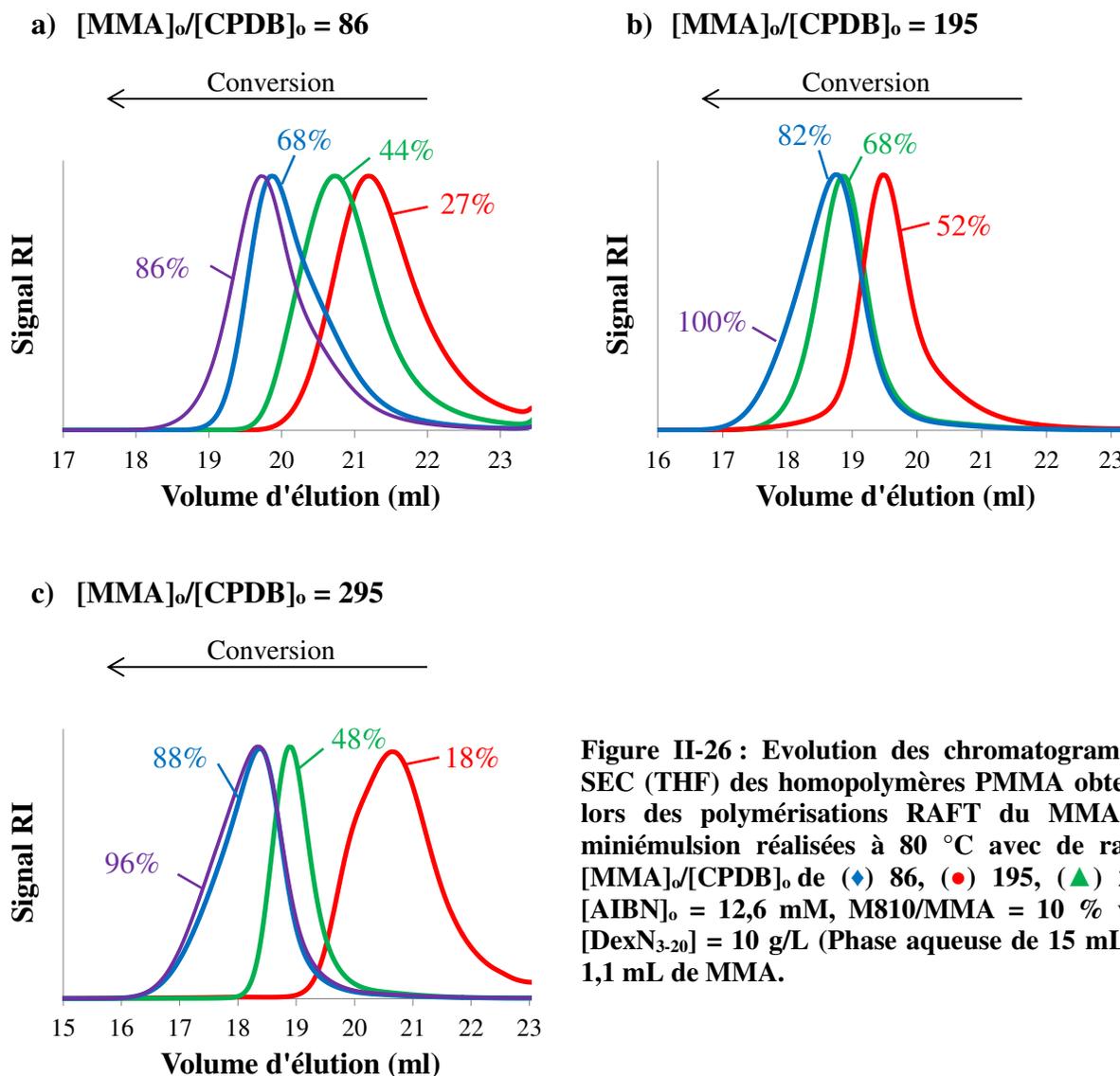


Figure II-26 : Evolution des chromatogrammes SEC (THF) des homopolymères PMMA obtenus lors des polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à 80 °C avec de ratios $[MMA]_0/[CPDB]_0$ de (♦) 86, (●) 195, (▲) 295, $[AIBN]_0 = 12,6$ mM, M810/MMA = 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse de 15 mL) et 1,1 mL de MMA.

En conclusion, la polymérisation RAFT du MMA est relativement bien contrôlée dans la gamme des ratios $[MMA]_0/[CPDB]_0$ utilisés. Ceci permet d'envisager la fabrication d'objets avec des chaînes

polymères de différentes longueurs et des paramètres macromoléculaires bien définis. Cette possibilité de varier le ratio $[MMA]_0/[CPDB]_0$ sera également étudiée dans le cas du transurf.

2.2.3. Influence de la teneur en M810

Dans l'objectif de synthétiser des objets avec une forte capacité d'encapsulation de principes actifs et de favoriser l'obtention d'une morphologie cœur écorce, nous avons décidé d'utiliser des rapports volumiques M810/MMA supérieurs ou égaux à 10 % vol. L'influence de ce rapport sur la cinétique de polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion a été étudiée. Deux expériences ont été réalisées avec des rapports M810/MMA de 10 et 25 % vol. toutes conditions égales par ailleurs, notamment la quantité de MMA fixée à 1,1 mL (Tableau II- 7). Compte tenu du fait que le ratio $[MMA]_0/[CPDB]_0$ peut être modulé, celui utilisé dans ces expériences (398) a été ajusté pour correspondre au ratio $[MMA]_0/[CTA]_0$ théorique que nous utiliserons lors des expériences avec le transurf DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} solubilisé à 10 g/L dans la phase aqueuse (voir Tableau II- 9, p. 166).

Tableau II- 8 : Influence de la teneur en M810 sur les caractéristiques des PMMA et des objets obtenus avec $[MMA]_0/[CPDB]_0 = 398$, $[CPDB]_0/[AIBN]_0 = 3$ et $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA, 90 minutes de polymérisation à 80 °C.

| Exp | $\frac{[M810]_0}{[MMA]_0}$ % vol. | $[AIBN]_0$ (mM) | $\alpha^{(a)}$ (% m.) | $x^{(b)}$ (%) | $\bar{M}_{n th}^{(c)}$ (g/mol) | $\bar{M}_n^{(d)}$ (g/mol) | $\mathcal{D}^{(d)}$ | Taille initiale (e) (nm) | Taille Finale (e) (nm) |
|-------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| MOD5 | 10 | 7,1 | 13,5 | 80 | 31 000 | 32 000 | 1,10 | 108 (1,07) | 111 (1,00) |
| MOD6 | 25 | 6,3 | 11,6 | 67 | 27 000 | 29 500 | 1,12 | 119 (1,19) | 109 (0,85) |

(a) Pour rappel (voir page 140) $\alpha = \% m.$ de DexN₃₋₂₀/phase organique.

(b) Conversion estimée par gravimétrie.

(c) Calculées grâce à l'équation II- 4, voir page 151.

(d) Obtenues par SEC-MALLS dans le THF avec $dn/dc = 0,087$ mL/g.

(e) Diamètre moyen en surface ($d[3 : 2]$) des gouttelettes, mesuré par granulométrie laser après dégazage et en fin de polymérisation. Valeurs de Span données entre parenthèses et obtenues par granulométrie laser grâce à l'équation II- 3, voir page 151.

Augmenter le rapport M810/MMA de 10 à 25 % vol. diminue légèrement la concentration en AIBN dans les nanogouttelettes : 7,1 mM (pour MOD5), et 6,3 mM (pour MOD6). Cependant, comme on peut le voir sur la Figure II- 27, cette différence de concentration n'a pas une influence significative sur la cinétique de polymérisation. La vitesse de polymérisation est pratiquement la même jusqu'à 40% de conversion, quel que soit le ratio M810/MMA utilisé. Pour des conversions supérieures à 40 %, une autoaccélération est ensuite décelable pour les deux expériences. Probablement en raison des plus fortes masses molaires visées, celle-ci est plus marquée dans ces expériences que dans les précédentes (l'autoaccélération n'était alors observée qu'à plus forte conversion en monomère). Néanmoins, quel que soit le rapport volumique M810/MMA utilisé, la polymérisation est relativement bien contrôlée comme l'attestent l'évolution linéaire des masses molaires en fonction de la conversion et les distributions massiques étroites obtenues ($\mathcal{D} < 1,2$ à forte conversion) (Figure II- 28). Les masses molaires expérimentales correspondent bien aux valeurs théoriques (Equation II- 4, p. 151).

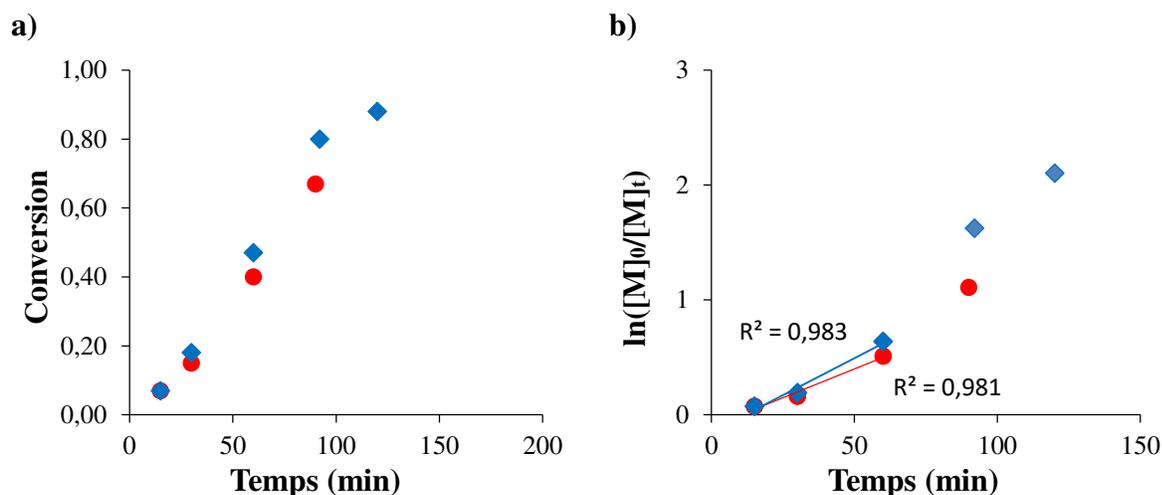


Figure II- 27 : Evolution de la conversion (a) et du $\ln([M]_0/[M]_t)$ (b) en fonction du temps : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à 80 °C avec des ratios volumiques M810/MMA de (♦) 10 et (●) 25 % vol., $[MMA]_0/[CPDB]_0 = 398$, $[CPDB]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA.

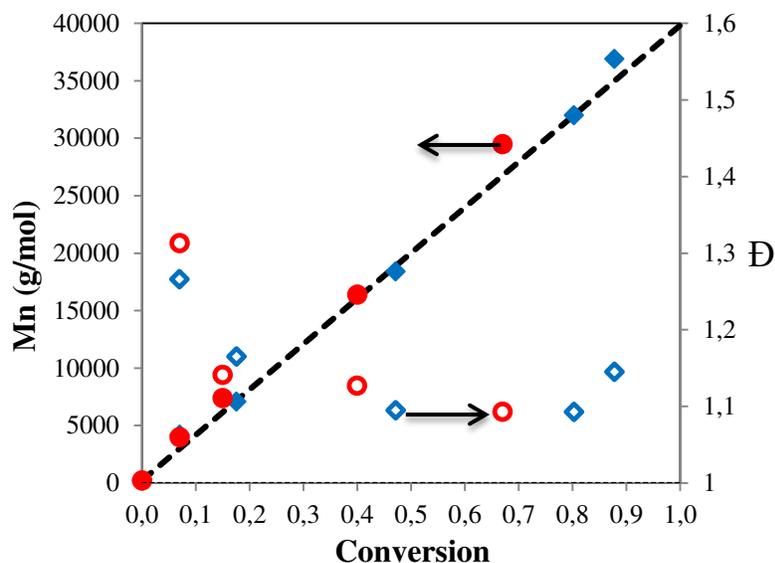


Figure II- 28 : Evolutions des \bar{M}_n (symboles pleins) et des \bar{D} (symboles creux) en fonction de la conversion : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à 80 °C avec des ratios volumiques M810/MMA de (♦) 10 et (●) 25 % vol., $[MMA]_0/[CPDB]_0 = 398$, $[CPDB]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. La ligne pointillée correspond à la droite théorique calculée grâce à l'équation II- 4.

Pour conclure, la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion, en présence de CPDB comme agent de transfert RAFT, peut être réalisée dans une large gamme de conditions. Des ratios $[MMA]_0/[CPDB]_0$ compris entre 89 et 398 et $[CPDB]_0/[AIBN]_0$ variant entre 2 et 8 ont permis d'obtenir des PMMA bien définis à forte conversion en monomère. Des diamètres de gouttelettes d'environ 110 nm ont été obtenus et la polymérisation peut être réalisée à 80 °C, sans problème de perte de stabilité colloïdale sur une durée raisonnable. L'étude ici réalisée montre que le CPDB induit un effet de retard à la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion, retard d'autant plus marqué que la concentration en CPDB augmente. Des quantités importantes de M810 peuvent être utilisées sans un effet notable sur le contrôle de la polymérisation.

Le but principal des essais réalisés avec le système modèle DexN₃₋₂₀/CPDB était de déterminer les conditions adéquates pour mener la polymérisation RAFT du MMA à partir des transurfs DexN_{3-τ}CTAγ. Parmi celles-ci, la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion à 80 °C, l'emploi de l'AIBN comme amorceur, l'emploi d'un ratio $[CPDB]_0/[AIBN]_0 = 3$ et du M810 comme agent hydrophobe avec M810/MMA supérieurs ou égaux à 10 % vol. ont été retenues pour faire croître des chaînes PMMA à partir des macroagents RAFT dérivés du dextrane. L'étude de cette polymérisation fait l'objet de la section suivante.

3. POLYMÉRISATION RAFT DU MMA EN MINIÉMULSION À PARTIR DES TRANSURFS DÉRIVÉS DU DEXTRANE

Dans cette section, nous examinerons la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion à partir des macroagents RAFT dérivés du dextrane précédemment préparés. Les conditions expérimentales de polymérisation déterminées lors des essais modèles à partir du CPDB ont été appliquées dans le but de générer des greffons PMMA à partir de ces macroagents RAFT. Nous nous intéresserons particulièrement au contrôle des paramètres macromoléculaires des glycopolymères greffés obtenus.

3.1. ETUDE CINÉTIQUE

Les deux transurfs, DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} et DexN₃₋₂₀CTA_{7,5}, ont été employés comme macroagents RAFT pour conduire la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion à 80 °C. Ainsi, 4 expériences ont été réalisées (Tableau II- 9) et pour chacune d'entre elles nous avons évalué le ratio molaire initial théorique $[MMA]_o/[CTA]_o$, (donné dans le Tableau II- 9). $[CTA]_o$ correspond à la concentration initiale en agent de transfert CTA dans la phase organique. Pour la calculer, nous avons tout d'abord évalué la quantité de transurf située à la surface des nano-objets finaux, après centrifugation des nano-objets, par dosage indirect à l'antrone du dextrane modifié restant dans le surnageant obtenu (pour plus de détails voir Partie III, Paragraphe 6.2.2). Cette quantité adsorbée a pu être comparée à celle initialement introduite dans la phase aqueuse, et exprimée en pourcentage molaire (Tableau II- 9, colonne 5). Nous démontrerons plus tard la validité de ce dosage indirect par rapport à un dosage direct du dextrane contenu dans les nano-objets finaux (Chapitre III, Paragraphe 3.2). Une fois la quantité de transurf à la surface des nano-objets estimée, nous avons considéré que cette quantité était celle localisée à l'interface phase organique/eau initiale. De plus, nous avons également supposé que tous les groupements CTA attachés au transurf étaient disponibles à cette interface et pouvaient tous participer à la croissance des greffons PMMA à partir du transurf. Au final, $[CTA]_o$ a été déterminée à partir de la quantité de groupements agent de transfert RAFT portés par le transurf employé.

Tableau II- 9: Polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion en présence des transurfs DexN₃- τ CTA γ réalisées à 80 °C, avec [CTA]_o/[AIBN]_o = 3, [DexN₃- τ CTA γ] = 10 g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. PR1 a été réalisée avec DexN₃₋₂₀.

| Exp. (Stabilisant utilisé) | $\alpha^{(a)}$ % m | [AIBN] _o (mM) | $\frac{[M810]_o}{[MMA]_o}$ % vol. | Transurf adsorbé à l'interface ^(b) % m | $\frac{[MMA]_o}{[CTA]_o}$ Interfacial ^(c) | Taille initiale ^(d) (nm) | Taille finale ^(d) (nm) |
|--|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--|---|--|--|
| CTA1 DexN ₃₋₂₀ CTA _{3,7} | 13,2 | 6,7 | 10 | 94 | 393 | 102 (1,00) | 102 (0,83) |
| CTA2 DexN ₃₋₂₀ CTA _{3,7} | 11,6 | 5,7 | 25 | 94 | 393 | 112 (1,49) | 109 (1,30) |
| CTA3 DexN ₃₋₂₀ CTA _{3,7} | 9,7 | 3,5 | 50 | 92 | 402 | 117 (1,37) | 119 (1,14) |
| CTA4 DexN ₃₋₂₀ CTA _{7,5} | 11,6 | 11,9 | 25 | 94 | 204 | 105 (1,31) | 110 (1,30) |
| PR1 DexN ₃₋₂₀ | 13,2 | 6,7 | 10 | - | - | 113 (1,30) | 110 (1,10) |

(a) Pour rappel (voir page 140) α = % m. de DexN₃₋₂₀/phase organique

(b) % Molaire du transurf estimé localisé à la surface des objets. Déterminé après centrifugation des nano-objets, par dosage à l'anthrone du dextrane modifié restant dans le surnageant. Valeur moyenne estimée pour deux durées de polymérisation, à forte conversion.

(c) Ratio molaire théorique calculé en supposant que tous les groupements CTA du transurf situé à la surface des objets participent à la croissance des chaînes PMMA.

(d) Diamètre moyen en surface (d[3 : 2]) des gouttelettes, mesuré par granulométrie laser, après dégazage et en fin de polymérisation. Valeurs de Span données entre parenthèses et obtenues par granulométrie laser grâce à l'équation II- 3, voir page 151.

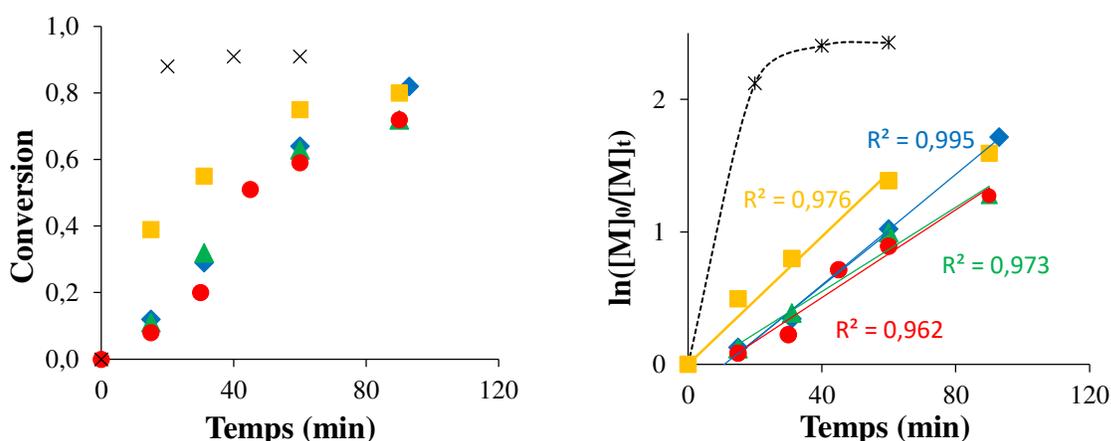


Figure II- 29 : Evolution de la conversion et du ln([M]_o/[M]_t) en fonction du temps : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion à partir des transurfs DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}: (●, CTA1), (▲, CTA2), (◆, CTA3) et DexN₃₋₂₀CTA_{7,5}: (■, CTA4). réalisées à 80 °C avec [CTA]_o/[AIBN]_o = 3, [DexN₃- τ CTA γ] = 10 g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. Une expérience de polymérisation radicalaire conventionnelle dans les mêmes conditions que l'essai CTA1 est donnée pour comparaison (×, PR1).

La concentration en transurf dans la phase aqueuse et le volume de MMA dans la phase organique étant fixés à 10 g/L et 1,1 mL respectivement, le ratio $[MMA]_o/[CTA]_o$ varie selon le taux de substitution en groupements CTA (γ) des dérivés $DexN_{3-20}CTA_{\gamma}$ utilisés (expériences CTA2 et CTA4 réalisées respectivement avec le $DexN_{3-20}CTA_{3,7}$ et le $DexN_{3-20}CTA_{7,5}$). Dans le cas des expériences menées avec $DexN_{3-20}CTA_{3,7}$, nous avons également voulu examiner l'influence de la teneur en M810 dans la phase organique sur le contrôle de la polymérisation RAFT, tout en conservant un ratio $[CTA]_o/[AIBN]_o$ égal à 3 (expériences CTA1, 2 et 3). Une expérience de polymérisation radicalaire conventionnelle en miniémulsion (PR1) a été menée dans les mêmes conditions que l'essai CTA1, mais en utilisant du $DexN_{3-20}$ au lieu du $DexN_{3-20}CTA_{3,7}$ comme stabilisant, afin d'étudier l'influence des groupements CTA sur la cinétique de polymérisation. Comme dans le cas des essais modèles, l'évolution des taux de conversion (Figure II- 29) a été étudiée par suivi gravimétrique des miniémulsions obtenues après différentes durées de polymérisation.

Plusieurs observations peuvent être tirées des données rassemblées dans le Tableau II- 9 :

- Il apparaît une différence de vitesse de polymérisation entre les expériences CTA1 et PR1, bien que celles-ci aient été réalisées avec la même concentration en AIBN. L'utilisation du macroagent RAFT $DexN_{3-20}CTA_{3,7}$ semble ralentir la polymérisation. Cet effet a également été observé lors des expériences menées en présence de l'agent RAFT modèle CPDB (voir Paragraphe 2.2.2). Ceci suggère que les groupements CTA présents sur le transurf participent bien à la croissance des chaînes polymères PMMA.
- En ce qui concerne les expériences réalisées avec le transurf $DexN_{3-20}CTA_{3,7}$ (CTA1, 2 et 3), menées avec de teneurs croissantes en M810 (10, 25 et 50 % vol.) et concentrations décroissantes en AIBN dans les nanogouttelettes (6,7, 5,7, et 3,5 mM), nous observons des cinétiques de polymérisation très similaires avec une période d'inhibition d'environ 10 minutes. Ce comportement cinétique pourrait provenir de l'augmentation du nombre de nanogouttelettes dans le système, qui compense l'effet de la diminution de la concentration en amorceur. De fait, augmenter le ratio volumique M810/MMA doit accroître le nombre des nano-objets, du fait d'un volume de phase organique plus important pour une taille des nanogouttelettes quasi-constante.

- A propos des expériences réalisées en variant le type de transurf (CTA2 (DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}) et CTA4 (DexN₃₋₂₀CTA_{7,5})) nous observons, comme attendu, une accélération de la vitesse de polymérisation dans le cas de CTA4. En effet, le DexN₃₋₂₀CTA_{7,5} est plus substitué en groupements CTA réactifs. Ainsi, pour garder le ratio $[CTA]_0/[AIBN]_0$ constant et égal à 3, nous avons doublé la concentration en AIBN dans le cas de l'expérience CTA4 (11,9 mM), par rapport à celle de l'expérience CTA2 (5,7 mM). La cinétique de l'expérience CTA4 reste cependant plus lente que celle du système radicalaire conventionnel réalisée à une concentration inférieure en AIBN (6,7 mM, PR1). Ainsi, le DexN₃₋₂₀CTA_{7,5} tout comme le DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} semble ralentir la polymérisation. En revanche, aucune période d'inhibition n'est observée probablement à cause de la plus forte concentration en amorceur utilisée dans cette expérience.
- Dans le cas des expériences réalisées en présence de transurfs, on peut observer une évolution linéaire de la conversion logarithmique en fonction du temps qui indique une concentration constante en centres actifs jusqu'à environ 70% de conversion, quels que soient le transurf et le ratio volumique M810/MMA utilisés.
- Après formulation des objets à l'aide des transurfs, puis centrifugation, le dosage à l'antrone du surnageant obtenu montre qu'environ 94% du transurf introduit dans la phase aqueuse au départ de la polymérisation s'est retrouvé localisé à la surface des nano-objets finaux. Pour comparaison, nous avons aussi analysé les surnageants des suspensions colloïdales préparées avec le système modèle DexN_{3- τ} /CPDB. Pour ces expériences, discutées dans la section précédente, environ 60% du stabilisant DexN_{3- τ} se trouvait adsorbé à la surface des particules en fin de polymérisation. Ce dernier résultat est étonnant car les conditions de préparation des miniémulsions, notamment le ratio DexN_{3- τ} /Phase organique, avaient été choisies de façon à limiter la présence de tensioactif dans la phase aqueuse et éviter une nucléation homogène. On peut alors penser qu'une désorption du DexN_{3- τ} , uniquement adsorbé en surface, peut avoir lieu au cours de la polymérisation ou lors des lavages. En revanche, dans le cas des DexN_{3- τ} CTA γ , les chaînes dextrane sont ancrées chimiquement à la surface de particules dès le début de la polymérisation (à condition que les dérivés DexN_{3- τ} CTA γ jouent effectivement leur rôle de macroagents RAFT). La formation de liaisons covalentes entre l'écorce PMMA des NCs et la dorsale du dextrane

immobilise alors le stabilisant dérivé du dextrane à la surface de l'objet et limite sa désorption, ce qui explique que le DexN₃.τCTAγ initialement introduit soit presque quantitativement présent à la surface des nano-objets finaux.

- Comme observé dans la section précédente où les dérivés DexN₃.τ étaient utilisés comme stabilisants, les miniémulsions préparées en présence des DexN₃.τCTAγ restent stables tout au long du procédé de préparation des objets comme l'atteste l'évolution du diamètre moyen des nanogouttelettes/nano-objets tracée sur la Figure II- 30. Les valeurs de Span obtenues restent inférieures à 1,5, ce qui témoigne de l'obtention des distributions de taille étroites.

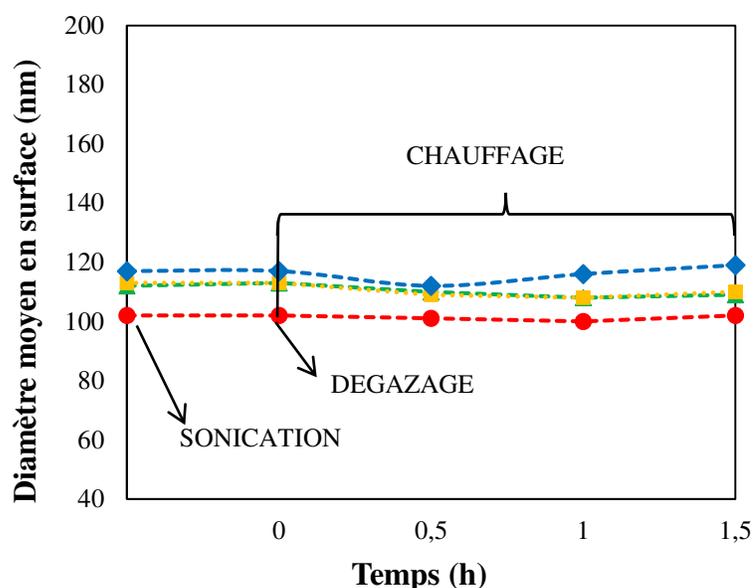


Figure II- 30 : Evolution du diamètre moyen en surface des nanogouttelettes (d[3 :2]) au cours des différentes étapes du processus de préparation des NCs : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion à partir des transurfs DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}: (●, CTA1), (▲, CTA2), (◆, CTA3) et DexN₃₋₂₀CTA_{7,5}: (■, CTA4). réalisées à 80 °C avec [CTA]₀/[AIBN]₀ = 3, [DexN₃.τCTAγ] = 10 g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA.

L'ensemble de ces résultats constituent une première preuve du caractère contrôlé de la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence des deux transurfs DexN₃.τCTAγ utilisés. Pour confirmer ce contrôle, nous nous sommes par la suite intéressés à la caractérisation des glycopolymères Dex-g-PMMA obtenus, puis à celle des greffons PMMA.

3.2. VERIFICATION DE LA CROISSANCE DES GREFFONS A PARTIR DES TRANSURFS.

Après purification des NCs, nous avons confirmé la croissance effective des greffons PMMA à partir des macroagents RAFT DexN₃- τ CTA γ en les solubilisant dans du DMSO-*d*₆ et en menant des analyses multiples (RMN ¹H, RMN 2D DOSY ¹H et SEC-MALLS). Les glycopolymères seront nommés par la suite DexN₃- τ -g-*n*PMMA \bar{M}_n , avec τ le taux des groupements hydrophobes introduits sur le dextrane, *n* le nombre des greffons PMMA par chaîne de dextrane et \bar{M}_n la masse molaire moyenne en nombre des greffons déterminée par SEC-MALLS après clivage volontaire des chaînes PMMA de la dorsale du dextrane (cette étape de clivage sera détaillée dans le paragraphe 3.3). Ces deux derniers paramètres seront davantage explicités dans le paragraphe 3.3.2.

Pour information, les glycopolymères sont purifiés en deux étapes (voir Partie III, Paragraphe 3.1.2). Dans une première étape les NPs obtenues en fin de polymérisation sont lavées plusieurs fois à l'eau MilliQ afin d'enlever le transurf restant dans la phase aqueuse puis séchées à l'étuve sous vide à 50°C. Dans une deuxième étape, les NPs sèches sont lavées plusieurs fois au THF afin d'éliminer le M810 et les éventuels homopolymères PMMA, tous les deux solubles dans ce solvant. A l'issue de ces opérations, les DexN₃- τ -g-*n*PMMA \bar{M}_n sont séchés à l'étuve sous vide à 50 °C puis analysés.

3.2.1. RMN ¹H

Par comparaison avec le spectre RMN ¹H du macroagent RAFT précurseur (exemples des DexN₃-₂₀CTA_{3,7} et DexN₃-₂₀-g-3,6PMMA₇₈₀₀ à la Figure II- 31), nous observons l'apparition de pics caractéristiques des greffons PMMA. Ainsi, le spectre RMN ¹H d'un DexN₃- τ -g-*n*PMMA \bar{M}_n comporte les pics correspondants aux protons méthyle (B', entre 0,5 et 1,0 ppm), aux protons méthylène (A', entre 1,5 et 2,0 ppm) et aux protons des groupements O-CH₃ (C', 3,6 ppm) de chaque unité répétitive du PMMA. Certains protons de la chaîne dextrane tels que les OH résiduels (OH², OH³, OH⁴) et le proton anomère (H^a) (entre 4,1 et 5,4 ppm) ainsi que les protons méthylène b et c des groupements hydrophobes N₃ (à 1,6 ppm) et que les protons du cycle aromatique des groupements dithiobenzoate au bout des greffons (10, 11, 12 entre 7,0 et 8,0 ppm) sont également observés. En revanche, les pics correspondant aux protons glucosidiques H²-H⁶ (sortant entre 3,0 et 4,0 ppm), aux protons d du groupement N₃ (1, 3 ppm) et aux protons 7, 8 (3,4

ppm) et 9 (1,9 ppm) des groupements CTA se confondent avec le reste de signaux, en raison de leur faible intensité relative.

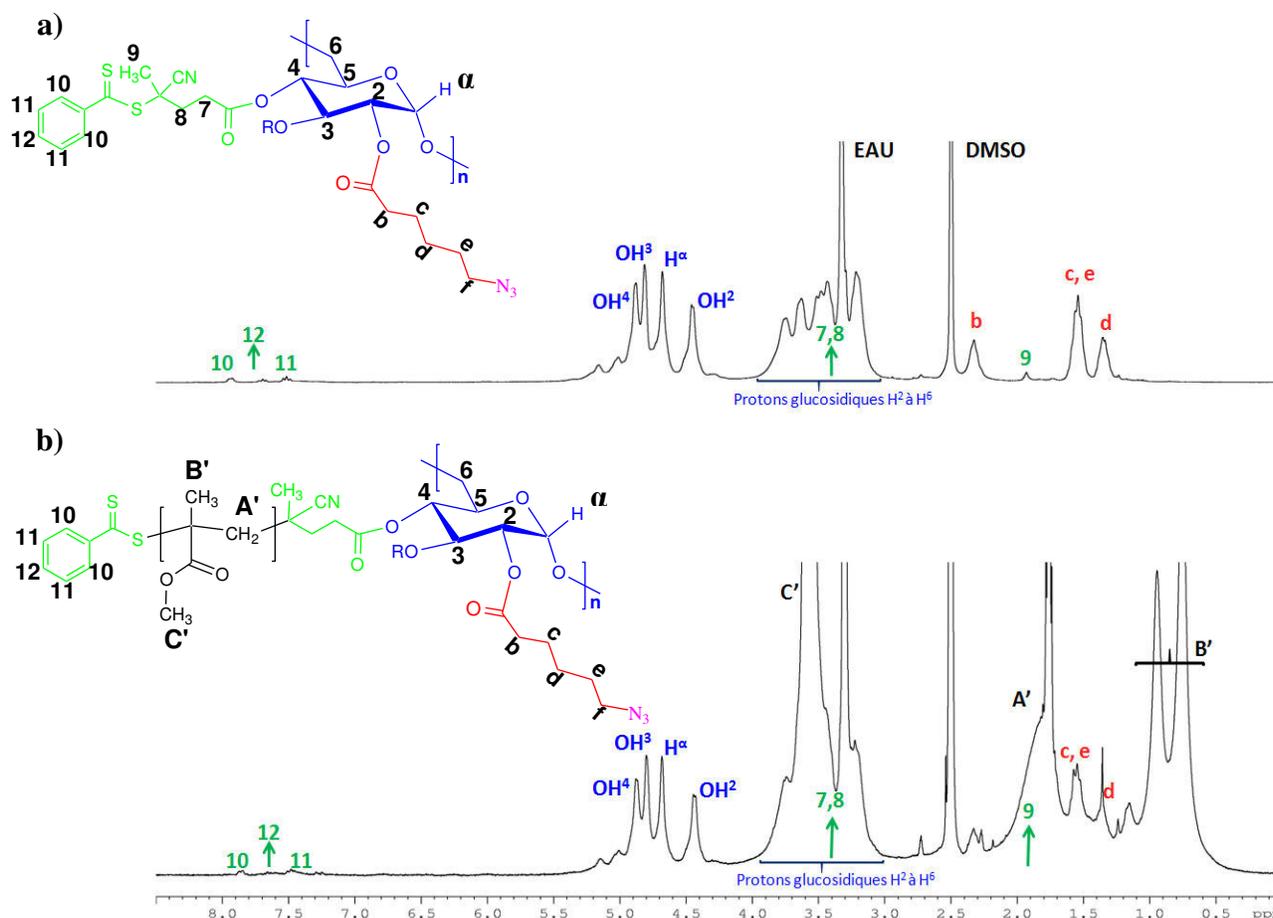


Figure II- 31 : Spectres RMN ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ du glycopolymère $\text{DexN}_{3-20}\text{-g-3,6PMMA}_{7800}$ issu du macroagent RAFT $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$.

3.2.2. RMN 2D DOSY ^1H

Dans le but de vérifier que les chaînes PMMA sont effectivement liées de façon covalente à la dorsale du dextrane, les glycopolymères purifiés ont aussi été analysés par RMN 2D DOSY ^1H . Cette technique permet de séparer virtuellement les composés d'un échantillon à analyser selon leur coefficient de diffusion. Dans notre cas, elle devrait nous permettre de discriminer entre un copolymère $\text{DexN}_{3-\tau}\text{-g-nPMMA}_{\bar{M}_n}$ et un mélange de transurf $\text{DexN}_{3-\tau}\text{CTA}_\gamma$ et d'homopolymère $\text{PMMA}_{\bar{M}_n}$.

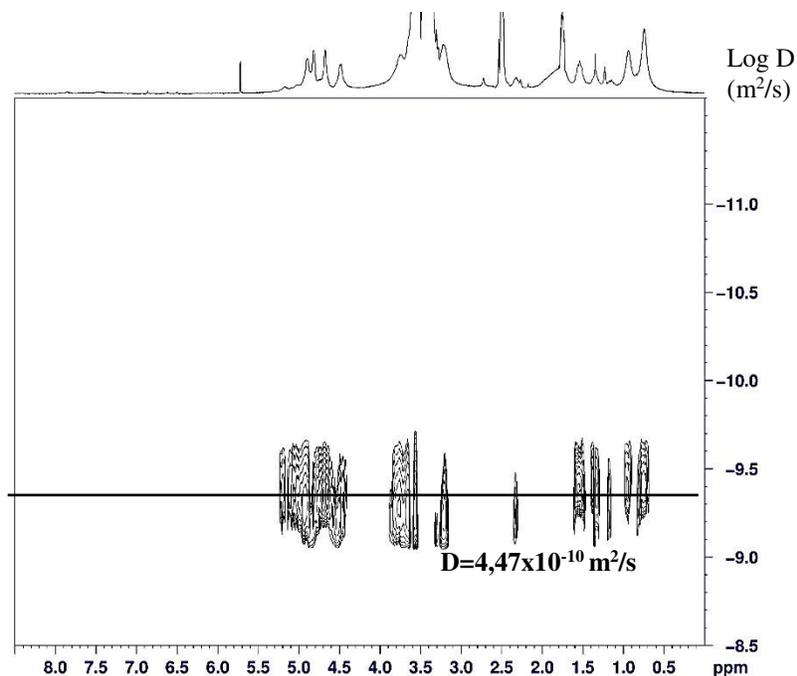


Figure II- 32: Spectre RMN 2D DOSY ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ du glycopolymère $\text{DexN}_{3-20}\text{-g-}3,6\text{PMMA}_{7800}$ issu du macroagent RAFT $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$.

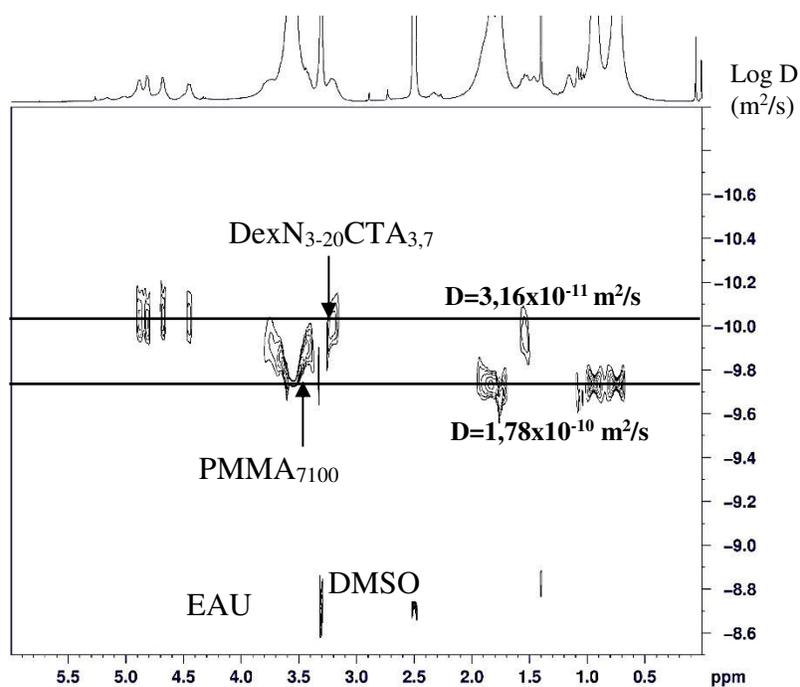


Figure II- 33: Spectre RMN 2D DOSY ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ d'un mélange $\text{PMMA}_{7100}/\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$ avec la même composition massique que le copolymère $\text{DexN}_{3-20}\text{-g-}3,6\text{PMMA}_{7800}$.

La Figure II- 32 présente le spectre RMN 2D DOSY ^1H du $\text{DexN}_{3-20}\text{-g-3,6PMMA}_{7800}$ dans le $\text{DMSO-}d_6$. Un seul coefficient de diffusion est observé pour tous les protons du dextrane et des greffons PMMA ($D = 4,47 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). En parallèle de cette analyse, un mélange de PMMA_{7100} ($\bar{M}_n = 7100 \text{ g/mol}$) et du transurf précurseur $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$, ayant la même composition massique du $\text{DexN}_{3-20}\text{-g-3,6PMMA}_{7800}$, a été aussi analysé par RMN 2D DOSY ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ (Figure II- 33). Deux coefficients de diffusion différents sont alors clairement observés ($D = 3,16 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ et $D = 1,78 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) pour le transurf et le PMMA, respectivement. La présence de deux coefficients dans le mélange physique $\text{PMMA}_{7100}/\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$, alors qu'un seul est observé dans le cas du glycopolymère $\text{DexN}_{3-20}\text{-g-3,6PMMA}_{7800}$, indique que des copolymères sont effectivement formés lors de la polymérisation RAFT en miniémulsion et que des greffons PMMA sont attachés de façon covalente à la dorsale du dextrane. La polymérisation a donc bien eu lieu à partir des groupements agent de transfert RAFT (CTA) présents sur le transurf.

3.2.3. SEC-MALLS

Après purification, les glycopolymères ont également été étudiés par SEC-MALLS. Trois solvants ont été testés afin de trouver l'éluant le plus adéquat pour solubiliser à la fois le dextrane et les greffons PMMA qui ne sont pas compatibles :

- DMSO
- DMSO/ NaNO_3 (0,1 M)
- DMF/LiCl (2 g/L)

Dans chacun de ces solvants, nous avons injecté le dextrane natif T40, le stabilisant DexN_{3-20} , le transurf $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$, des étalons PMMA et certains $\text{DexN}_{3-\tau}\text{-g-nPMMA}_{\bar{M}_n}$. Un tableau récapitulatif des composés analysés et des observations réalisées est donné à suivre.

Tableau II- 10 : Comparaison des différents solvants en tant qu'éluants pour la SEC-MALLS du dextrane, des dérivés DexN_{3-τ}, DexN_{3-τ}CTA_γ et des copolymères à une [Polymère] = 10 g/L.

| Polymère/ Solvant | DMSO | DMF/LiCl (2g/l) | DMSO/NaNO ₃ (0,1M) |
|---|------|-----------------|-------------------------------|
| Dextrane | ✓ | ✓/✗ | ✓ |
| DexN ₃₋₂₀ | ✓ | ✓/✗ | ✓ |
| DexN ₃₋₂₀ CTA _{3,7} | ✓/✗ | ✓/✗ | ✓ |
| PMMA | ✓ | ✓ | ✗ |
| Copolymères | ✓/✗ | ✓/✗ | ✓/✗ |

✓ Il est soluble/Les distributions de masses molaires sont bien définies.

✗ Il n'est pas soluble.

✓/✗ Il est partiellement soluble/Le pic n'est pas bien défini ou présente des épaulements.

Alors que les transurfs précurseurs DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} et DexN₃₋₂₀CTA_{7,5} ont pu être analysés par SEC-MALLS dans le DMSO/NaNO₃ (0,1 M) (Chapitre I, Paragraphe 2.1), les homopolymères PMMA ne sont pas solubles dans ce solvant et les copolymères DexN_{3-τ}-g-nPMMA_{M_n} ne donnent pas des pics bien définis. En fait, aucun des solvants que nous avons pu tester ne permet une bonne solubilisation des DexN_{3-τ}-g-nPMMA_{M_n}. Ceci ne permet guère l'exploitation des chromatogrammes pour le calcul des masses molaires expérimentales et des dispersités des glycopolymères. Malgré ces difficultés, les chromatogrammes RI obtenus pour certains DexN_{3-τ}-g-nPMMA_{M_n} issus du transurf DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} (Expérience CTA1, Tableau II- 9) dans le DMF/LiCl (2 g/L), après la première et deuxième étapes de purification, nous permettent de tirer certaines conclusions et sont présentés à titre d'exemple (Figure II- 34).

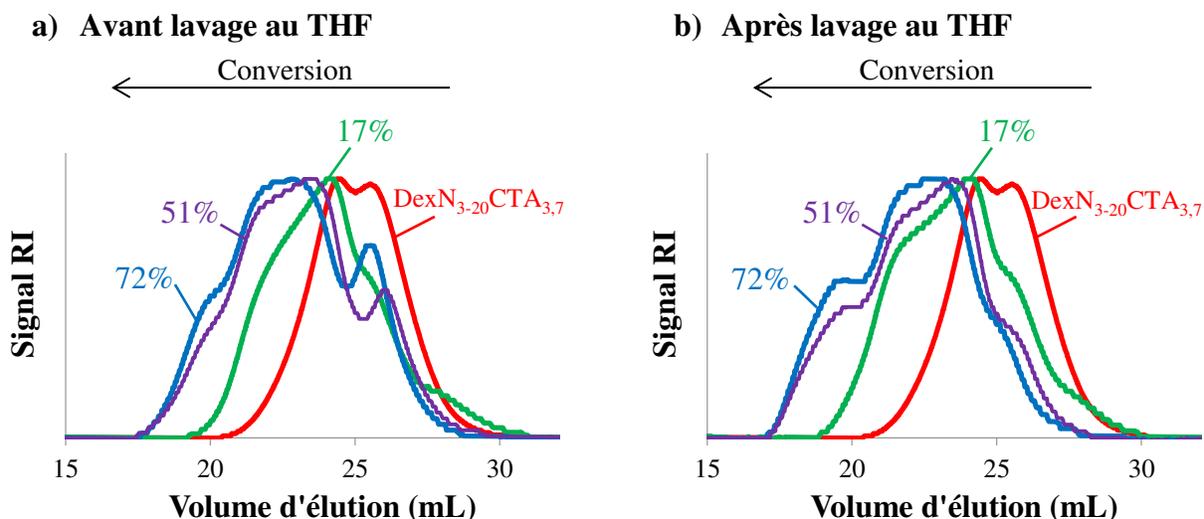


Figure II- 34 : Suivi de chromatogrammes SEC-MALLS (DMF/LiCl (2 g/L)) des copolymères obtenus à partir du macroagent RAFT DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}, (Tableau II- 9, expérience CTA1), en fonction de la conversion avant et après lavage des copolymères au THF.

Les chromatogrammes obtenus pour le transurf DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} dans le DMF/LiCl (2 g/L) montrent la présence de deux populations. Ceci indique bien que la solubilisation des dérivés de dextrane dans ce solvant n'est pas parfaite. Des résultats similaires avaient été observés en utilisant le DMSO/NaNO₃ (0,1 M) comme éluant (voir chapitre I, Paragraphe 2.1). Concernant les échantillons obtenus après polymérisation, deux populations peuvent être bien distinguées à l'issue de la première étape de purification (lavage des NPs à l'eau) et ce, quel que soit le taux de conversion (Figure II- 34, a). Il faut noter que cette première étape ne permet pas de séparer les glycopolymères DexN_{3-τ}-g-nPMMA_{M_n} des éventuels homopolymères PMMA. Ainsi, le pic présent aux forts volumes d'élution peut correspondre à la formation des chaînes PMMA non-attachées à la dorsale du polysaccharide. Cette hypothèse est confirmée par les chromatogrammes des DexN_{3-τ}-g-nPMMA_{M_n} purs (b, Figure II- 34) observés après lavage au THF où le pic aux forts volumes d'élution n'est plus visible. De plus, après évaporation du THF utilisé pour laver les NPs, nous avons récupéré un produit solide qui a été analysé par RMN ¹H dans le DMSO-*d*₆. Le spectre obtenu confirme qu'il s'agit bien d'un mélange PMMA/M810. Il faut noter, que la formation d'homopolymères PMMA est inhérente à la technique RAFT puisque l'amorçage des chaînes PMMA a lieu au sein des gouttelettes via l'AIBN. Par conséquent, en plus des chaînes issues du réamorçage par les groupements CTA du transurf qui croîtront à partir de l'interface monomère/eau, il existe toujours une faible proportion des chaînes libres dont la propagation se fait au sein de la phase organique. De

plus, dans le cas où il existe des réactions de transfert irréversible, celles-ci peuvent aussi aboutir à la formation de tels homopolymères.

Malgré les problèmes de solubilité qui expliquent les épaulements observés aux faibles volumes d'éluion, tous les chromatogrammes des $\text{DexN}_{3-20}\text{-g-nPMMA}_{\overline{M}_n}$ purs obtenus à partir du même macroagent RAFT $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$ évoluent vers des volumes d'éluion plus faibles lorsque la conversion augmente. Ceci témoigne de l'augmentation du volume hydrodynamique des glycopolymères greffés, associée à la croissance progressive des greffons PMMA.

3.3. ANALYSE DES GREFFONS PMMA

Les différentes analyses faites sur les glycopolymères nous ont permis de vérifier que la croissance des chaînes PMMA a bien lieu, du moins en partie, à partir des groupements CTA présents sur la dorsale du dextrane, ce qui conduit à l'obtention de copolymères greffés. Cependant, ces analyses ne permettent pas de conclure ni sur le nombre de ces greffons, ni sur le contrôle de la polymérisation, ou encore sur la distribution massique des greffons.

Dans le but de vérifier le contrôle de la polymérisation RAFT du MMA à partir des macroagents RAFT $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$, il nous est apparu indispensable de déterminer la distribution massique des greffons PMMA. Pour cela, il a été nécessaire de séparer ces greffons du tronc polysaccharide (Figure II- 35). Ceci a été réalisé par hydrolyse basique volontaire des fonctions ester reliant les greffons au dextrane, par une solution de KOH/MeOH (1 M) (voir Partie III, Paragraphe 4). Dans des travaux précédemment menés au LCPM, il avait été montré que les chaînes PMMA ne subissent aucun dommage dans ces conditions [41], [42]. Une fois décrochés de la dorsale, les greffons PMMA sont analysés par SEC-MALLS dans le THF.



Figure II- 35: Degreffage des chaînes PMMA de la dorsale du dextrane par hydrolyse basique des fonctions ester reliant les greffons au polysaccharide.

3.3.1. Analyse SEC-MALLS des greffons

Les copolymères obtenus à différentes conversions lors des expériences CTA1-4 ont été soumis au protocole de dégreffage. Les distributions massiques des greffons issus des glycopolymères DexN₃₋₂₀-g-nPMMA \bar{M}_n (expérience CTA1, Tableau II- 9) sont présentés à titre d'exemple dans la Figure II- 36. Chaque chromatogramme révèle la présence d'un pic à distribution massique monomodale et relativement étroite. A partir de 51% de conversion, nous pouvons cependant observer un petit épaulement de masse molaire double vers les faibles volumes d'élution. Celui-ci indique que des réactions de terminaison irréversible par couplage radicalaire de deux macroradicaux en croissance ou plus probablement d'un greffon et un homopolymère PMMA ont lieu, mais en faible proportion. De plus, on observe un déplacement de la population vers les fortes masses molaires en fonction de la conversion, ce qui démontre l'absence de réactions de terminaison ou de transfert notables.

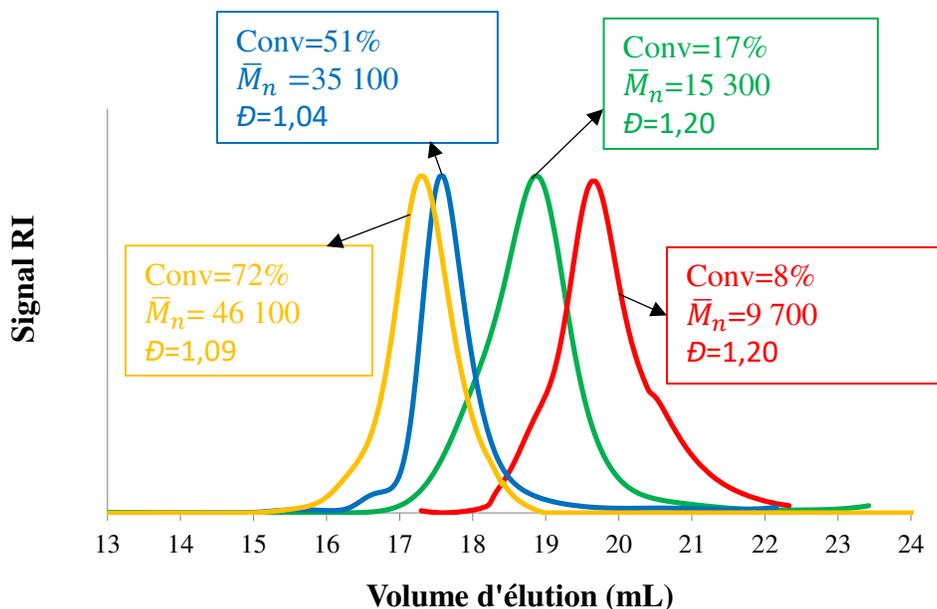


Figure II- 36 : Evolutions des chromatogrammes SEC-MALLS (THF) des greffons PMMA issus des glycopolymères DexN₃₋₂₀-g-nPMMA \bar{M}_n (Tableau II- 9, expérience CTA1) en fonction de la conversion (x).

La Figure II- 37, présente pour sa part, les chromatogrammes RI des greffons issus des glycopolymères obtenus lors des expériences CTA1, 2 et 3, à des conversions similaires (environ

60%). Ces $\text{DexN}_{3-20}\text{-g-nPMMA}_{\bar{M}_n}$ ont tous été synthétisés à partir du même macroagent RAFT $\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}_{3,7}$ mais dans des systèmes en miniémulsion comportant différents ratios volumiques M810/MMA (voir Tableau II- 9). Des distributions massiques très similaires sont obtenues indiquant que la teneur en M810 ne semble pas avoir d'influence significative sur le contrôle de la polymérisation RAFT. Le même comportement avait d'ailleurs été observé dans nos études précédentes portant sur l'ATRP du MMA en miniémulsion à partir des macroamorceurs dérivés du dextrane en présence du M810 comme agent hydrophobe [7].

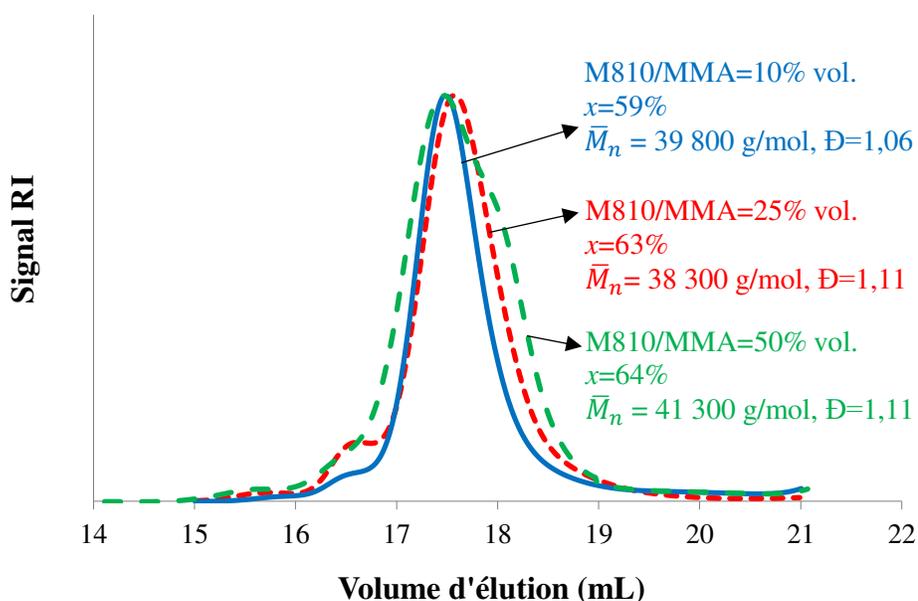


Figure II- 37 : Chromatogrammes SEC-MALLS (THF) des greffons PMMA issus des glycopolymères $\text{DexN}_{3-20}\text{-g-nPMMA}_{\bar{M}_n}$ synthétisés dans des systèmes en miniémulsion à différents teneurs M810/MMA, (Tableau II- 9, expériences CTA1, 2 et 3), à des conversions (x) voisines de 60%.

Finalement, nous avons aussi analysé la distribution massique des homopolymères PMMA formés directement lors de la polymérisation et récupérés lors de l'étape de lavage des NCs par le THF. Ces homopolymères PMMA ont alors été comparés aux greffons PMMA décrochés du dextrane par l'étape basique vue précédemment. La Figure II- 38 donne un exemple des chromatogrammes RI obtenus et montre que la distribution massique de chaînes non-accrochées au dextrane correspond assez bien à celle des greffons qui se forment à la même conversion. Ces résultats montrent donc que l'échange du groupement thiocarbonylthio des groupements CTA entre les chaînes greffées et les chaînes libres est assez efficace pour permettre le contrôle des paramètres macromoléculaires

des deux types de chaînes PMMA. De plus, ces résultats semblent montrer l'absence des réactions de terminaison et transfert notables, excepté une faible proportion de terminaison par recombinaison des greffons PMMA. La réaction de terminaison biomoléculaire entre un greffon et un homopolymère PMMA libre, est certainement favorisée à plus forte conversion et à plus forte teneur en M810 dans la phase organique. En effet, l'augmentation de la quantité de M810 favorise la ségrégation de phases entre le cœur huileux et l'écorce polymère et donc la proximité géographique entre les homopolymères formés dans la phase organique et les greffons fixés sur le macroagent RAFT. Ainsi, il est probable qu'il s'agisse de ce type de réaction plutôt que d'une réaction de terminaison entre deux greffons (qu'ils soient situés sur un même macroagent RAFT ou sur deux macroagents RAFT différents) ce qui induirait une réticulation du système, réticulation que nous n'avons jamais observé.

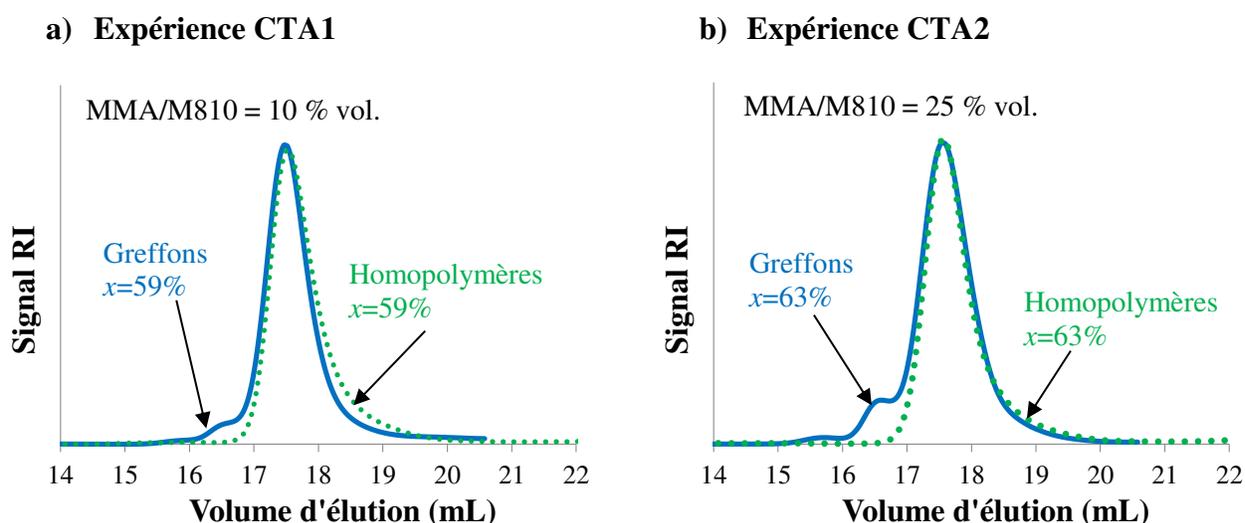
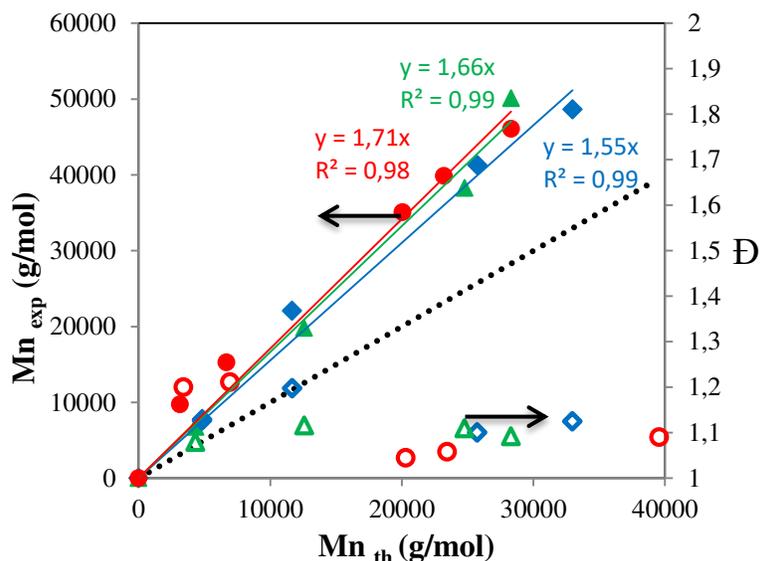


Figure II- 38 : Comparaison de chromatogrammes SEC-MALLS (THF) des greffons et homopolymères PMMA obtenus à la même conversion (x) à partir du macroagent RAFT DexN₃.₂₀CTA_{3,7} a) CTA1 , et b) CTA2 (Tableau II- 9).

3.3.2. Efficacité moyenne des groupements réactifs CTA

Grâce aux analyses SEC-MALLS précédentes, nous avons pu suivre l'évolution des masses molaires moyennes en nombre expérimentales ($\bar{M}_{n \text{ exp}}$) et de la dispersité (\mathfrak{D}) des greffons en fonction de la conversion (Figure II- 39). Ces valeurs de $\bar{M}_{n \text{ exp}}$ ont été comparées aux masses

a) Expériences avec DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}



b) Expériences avec DexN₃₋₂₀CTA_{7,5}

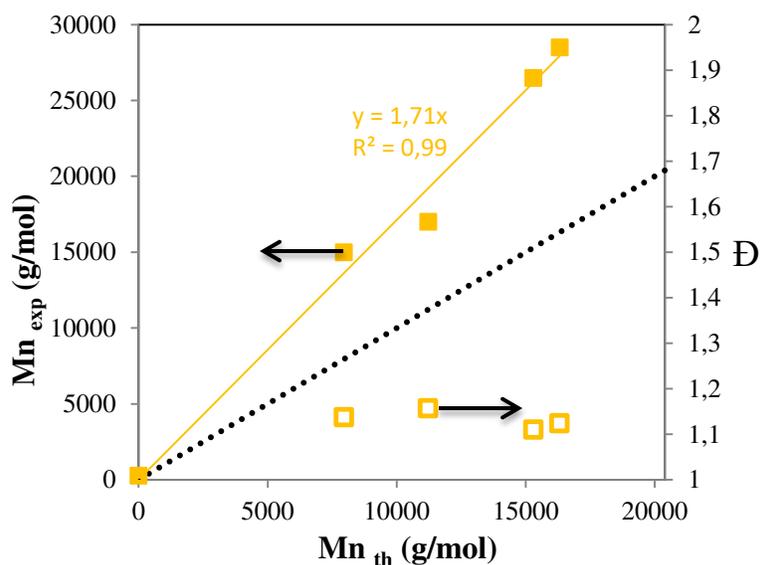


Figure II- 39 : Evolutions des \bar{M}_n (symboles pleins) et des \bar{D} (symboles creux) des greffons PMMA : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à 80 °C à partir des transurfs a) DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}: (●, CTA1), (▲, CTA2), (◆, CTA3) et b) DexN₃₋₂₀CTA_{7,5}: (■, CTA4), avec $[CTA]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[DexN_{3-20}CTA\gamma] = 10$ g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. Les lignes pointillées représentent l'évolution des \bar{M}_n théoriques (équation II- 4).

molaires théoriques ($\bar{M}_{n\ th}$) calculées à l'aide de l'équation II- 4 (p. 151). Une évolution linéaire est observée tout au long de la polymérisation et les dispersités restent toujours inférieures à 1,2. Ceci témoigne que la polymérisation du MMA à partir des groupements CTA des transurfs est relativement bien contrôlée et que les réactions de terminaison et de transfert restent négligeables. Cependant, pour toutes les expériences réalisées (CTA 1-4), les $\bar{M}_{n\ exp}$ sont supérieures à celles prévues par la théorie. Un écart d'environ 60% a été déterminée pour toutes les expériences (CTA1-4) grâce à la pente des droites $\bar{M}_{n\ exp}$ versus $\bar{M}_{n\ th}$ (Figure II- 39), grâce à l'équation II- 5. Cet écart peut être assimilé à une efficacité apparente du système de polymérisation (f_{app}). Lorsque la formation d'homopolymères issus de l'amorceur est négligeable, cet écart correspond à l'efficacité des groupements CTA du transurf ($Ef f_{CTA}$)

$$f_{app} = \frac{\bar{M}_{n\ exp}}{\bar{M}_{n\ th}} (\%) = \left(\frac{1}{pente} \right) \times 100 \quad \text{II- 5}$$

De plus, grâce aux analyses RMN ^1H des glycopolymères DexN₃₋₂₀-g-nPMMA $_{\bar{M}_n}$ (Figure II- 31), aux valeurs de conversion estimées par gravimétrie au cours de la polymérisation et aux masses molaires des greffons PMMA déterminées par SEC-MALLS (Figure II- 36 et Figure II- 37), la fraction massique expérimentale du PMMA (F_{PMMA}) dans les glycopolymères et le nombre moyen de greffons présents par chaîne de dextrane ($N_{greffons}$) ont été calculés grâce aux équations II- 6 et II- 7, respectivement. Ces grandeurs sont reportées dans le Tableau II- 11 (colonnes 7 et 8). Pour le calcul du $N_{greffons}$ nous avons supposé que le nombre d'unités glucopyranose des chaînes des transurfs DexN₃₋₂₀CTA γ , correspondait à celui des chaînes du dextrane natif T₄₀ conformément à la non-dégradation des chaînes observée dans le Chapitre I, paragraphe 2.1.

II- 6

$$N_{greffons} = \frac{\frac{m_{PMMAg}}{\bar{X}_n PMMA}}{\frac{m_{DexN_{3-20}CTA\gamma}}{\bar{X}_n DEX}} = \frac{A_{A'B'}/5}{A_{UG}/4} \times \frac{\bar{M}_{n(SEC)DEX}}{162} \quad \text{II- 7}$$

Avec :

m_{PMMAg} = Masse totale du PMMA attachée à la dorsale du dextrane (g)

$m_{DexN_{3-20}CTA\gamma}$ = Masse du transurf située à l'interface eau/monomère (g).

$\bar{X}_n PMMA$ = Degré de polymérisation moyen en nombre des greffons PMMA, déterminé par SEC-MALLS dans le THF.

$\bar{X}_n DEX$ = Degré de polymérisation moyen des chaînes de dextrane natif déterminé par SEC-MALLS (DMSO/NaNO₃ (0,1M)).

$A_{A'B'}$ = Aire des protons A' et B' des greffons polymères entre 0,4 et 2,1 ppm (Figure II- 31, b).

A_{UG} = Aire des OH résiduels et du H anomère des unités glucopyranose du dextrane entre 4,1 et 5,4 ppm (OH², OH³, OH⁴ et H^α, Figure II- 31, p. 171).

$\bar{M}_{n(SEC)DEX}$ = Masse molaire du dextrane natif T₄₀, déterminée par SEC-MALLS (DMSO/NaNO₃ (0,1M)) (g/mol).

M_{MMA} = Masse molaire d'une unité monomère du PMMA (g/mol).

M_{UG} = Masse molaire d'une unité glucopyranose du DexN₃₋₂₀CTA γ (g/mol).

Ainsi, pour chaque expérience de polymérisation, nous avons également estimé l'efficacité moyenne réelle de groupements CTA (Eff_{CTA}). Pour cela, le $N_{greffons}$ est comparé au nombre de sites réactifs CTA présents sur une chaîne de DexN₃₋₂₀CTA γ , grâce à l'équation II- 8. Enfin, la proportion d'homopolymères PMMA non-accrochés à la dorsale du dextrane par rapport au PMMA total synthétisé (% $PMMA_{homo}$), a été estimée à partir du $N_{greffons}$ et de la conversion grâce à l'équation II- 9.

$$Eff_{CTA} = \frac{N_{greffons}}{N_{CTA/DEX}} \times 100 = \frac{N_{greffons}}{\frac{\bar{M}_n(SEC)DEX}{162} \times \frac{\gamma}{100}} \times 100 \quad \text{II- 8}$$

$$\% PMMA_{homo} = \frac{m_{PMMA libre}}{m_{PMMA total}} \times 100 \quad \text{II- 9}$$

$$\% PMMA_{homo} = 1 - \frac{N_{DexN_{3-20}CTA\gamma} \times N_{greffons} \times \bar{M}_n(SEC)greffons}{n_{MMA(t=0)}x} \times 100$$

Avec :

$N_{greffons}$ = Nombre de greffons par copolymère calculée par l'équation II- 7.

$N_{CTA/DEX}$ = Nombre de groupements CTA initialement présent par chaîne de DexN₃₋₂₀CTA γ .

$N_{DexN_{3-20}CTA\gamma}$ = Nombre des chaînes DexN₃₋₂₀CTA γ localisées à l'interface eau/monomère.

$m_{PMMA libre}$ = Quantité des homopolymères PMMA non-attachés au dextrane (g)

$m_{PMMA totale}$ = Quantité totale de PMMA synthétisé à une conversion donnée (g)

$\bar{M}_n(SEC)DEX$ = Masse molaire du dextrane natif T₄₀, déterminée par SEC-MALLS (DMSO/NaNO₃ (0,1M)) (g/mol).

$\bar{M}_n(SEC)Greffons$ = Masse molaire des greffons PMMA, déterminée par SEC-MALLS (THF) (g/mol).

γ = Taux de substitution du DexN₃₋₂₀CTA γ exprimé en nombre de groupements CTA par 100 unités glucopyranose.

$m_{MMA(t=0)}$ = Masse de MMA dans la phase organique du départ.

x = Conversion en monomère

Tableau II- 11 : Caractéristiques des glycopolymères DexN₃₋₂₀-g-nPMMA \bar{M}_n synthétisés par polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion à 80 °C avec [CTA]₀/[AIBN]₀ = 3, [DexN₃₋₂₀CTA]₀ = 10 g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA.

| Exp | Transurf utilisé | Conversion en MMA (%) | Greffons PMMA | | | $F_{PMMA}^{(c)}$ | $N_{greffons}^{(d)}$ | $Eff_{CTA}^{(e)}$ (%) | % PMMA _{homo} ^(f) |
|------|---|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| | | | $\bar{M}_{nth}^{(a)}$ (g/mol) | $\bar{M}_{nexp}^{(b)}$ (g/mol) | $\bar{D}^{(b)}$ | | | | |
| CTA1 | DexN ₃₋₂₀ CTA _{3,7} | 51 | 20 300 | 35 100 | 1,04 | 0,76 | 3,6±0,3 | 48 | 20 |
| | | 72 | 39 600 | 46 100 | 1,09 | 0,79 | | | |
| CTA2 | DexN ₃₋₂₀ CTA _{3,7} | 11 | 4 300 | 6 700 | 1,08 | 0,38 | 3,4±0,3 | 45 | 25 |
| | | 72 | 39 600 | 50 100 | 1,09 | 0,78 | | | |
| CTA3 | DexN ₃₋₂₀ CTA _{3,7} | 12 | 7 800 | 7 800 | 1,12 | 0,43 | 3,6±0,3 | 48 | 25 |
| | | 29 | 11 600 | 22 100 | 1,20 | 0,70 | | | |
| | | 82 | 33 000 | 48 600 | 1,12 | 0,80 | | | |
| CTA4 | DexN ₃₋₂₀ CTA _{7,5} | 39 | 7 900 | 15 000 | 1,13 | 0,71 | 7,1±0,3 | 47 | 17 |
| | | 55 | 11 200 | 17 000 | 1,16 | 0,76 | | | |
| | | 80 | 16 300 | 28 600 | 1,11 | 0,82 | | | |

(a) Estimées grâce à l'équation II- 4, (p. 151)

(b) Obtenues par SEC-MALLS dans le THF avec $dn/dc = 0,087$ mL/g.

(c) Fraction massique expérimentale du PMMA dans le copolymère calculée par RMN ¹H grâce à l'équation II- 6 (p. 182).

(d) Nombre moyen des greffons PMMA par chaîne de dextrane, calculé grâce à l'équation II- 7 (p. 182).

(e) Efficacité moyenne des groupements CTA obtenue par l'équation II- 8 (p. 183).

(f) Proportion d'homopolymères (PMMA non-accroché) par rapport au polymère total synthétisé calculé grâce à l'équation II- 9 (p. 183)

Il faut noter que les valeurs d'efficacité réelle des groupements CTA (Eff_{CTA}) calculées par l'équation II- 8 (p. 183) et reportés dans le Tableau II- 11 sont inférieures à l'efficacité apparente (f_{app}) de 60% estimée par la pente des droites $\bar{M}_{n_{exp}}$ versus $\bar{M}_{n_{th}}$ (Figure II- 39). Cette différence provient de la formation d'une proportion d'homopolymères PMMA ($\% PMMA_{homo}$) non-négligeable. Cette dernière, évaluée à hauteur de 20 % (CTA1), 25 % (CTA 2 et 3) et 17 % m. (CTA 4), reste cependant assez faible. Nous pouvons ainsi espérer qu'elle n'aura pas une influence significative sur le contrôle de la morphologie cœur-écorce désirée.

Environ la moitié des groupements CTA attachés au dextrane participent alors réellement à la croissance des chaînes polymères. Cette faible efficacité à générer des greffons à partir d'une dorsale polysaccharide contenant des groupements réactifs a déjà été observée dans le cas des polymérisations ATRP [42], [43] ou RAFT en milieu homogène [44]. Elle pourrait *a priori* être expliquée par une diminution de l'accessibilité des sites réactifs (ici agent de transfert RAFT), situés sur la chaîne polysaccharide. Deux cas peuvent être envisagés : i) un effet d'encombrement stérique à proximité des groupements CTA à faible conversion en monomère, ce qui limite l'accès des (macro)radicaux en croissance à la fonction C=S, et ii) la présence de réactions de terminaison intramoléculaire en tout début de polymérisation conduisant à la disparition des radicaux R^\bullet (issus du pré-équilibre de la RAFT) incapables de réamorcer la croissance des greffons PMMA [45]–[48]. Dans notre cas, la réaction ayant lieu à l'interface phase organique/eau d'autres facteurs peuvent aussi intervenir. De fait, il est possible que tous les groupements CTA du transurf ne soient pas localisés à l'interface ou dirigés vers la phase organique. En effet, certains groupements CTA pourraient être dirigés vers la phase aqueuse. Ceci réduirait alors la quantité effective de fonctions réactives disponibles pour la polymérisation. Enfin, comme vu précédemment (Partie I, paragraphe 4.3.2), les dithiobenzoates sont sensibles à l'hydrolyse. La perte des groupements agent de transfert RAFT par ce biais serait favorisée dans le cas des transurfs (dissous dans la phase aqueuse) par rapport au CPDB (dissous dans la phase organique), puisque les groupements CTA attachés au dextrane se trouvent directement en contact avec l'eau lors de la préparation de la miniémulsion.

Finalement, on observe que l'efficacité des groupements CTA n'est pas très influencée par la quantité de M810 et reste très similaire pour les deux transurfs employées (DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} et DexN₃₋₂₀CTA_{7,5}). Ces résultats sont conformes à ceux observés lors de l'ATRP du MMA en miniémulsion à partir des macroamorceurs dérivés du dextrane, pour lesquels l'efficacité des

groupements amorceurs était d'environ 54% pour tous les ratios volumiques M810/MMA employés (5, 10 et 50 % vol.) [7].

4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Nous avons montré dans ce chapitre qu'il est possible de localiser et contrôler la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion à l'interface O/W grâce à l'utilisation d'un transurf dérivé du dextrane. Cette stratégie, permettant la fabrication des NCs recouvertes de dextrane, formées d'une écorce PMMA d'épaisseur variable et contenant différents teneurs en M810, fait l'objet d'une publication en cours de rédaction.

Dans la première partie de ce chapitre nous avons validé le choix du M810 comme agent hydrophobe et cœur huileux des NCs :

- Des études de stabilité des émulsions (MMA+M810)/eau dans les conditions opératoires de préparation des NCs nous ont permis de vérifier la capacité du M810 à limiter le vieillissement de la miniémulsion par Mûrissement d'Ostwald et des dérivés DexN_{3-τ} à éviter le phénomène de coalescence.
- La possibilité d'obtenir une morphologie cœur-écorce a été aussi vérifiée par MDSC. Il est envisageable de préparer des systèmes cœur-écorce avec le couple M810/PMMA pour des teneurs supérieures à 11% m. de M810 par rapport au PMMA, puisque ces derniers ne sont alors pas miscibles.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons cherché à établir les conditions réactionnelles permettant le contrôle de la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion. Ceci a été réalisé grâce à un agent de transfert RAFT modèle, le CPDB, de structure similaire à celle des groupements CTA présents sur les dérivés DexN_{3-τ}CTAγ et en utilisant les dérivés DexN_{3-τ} comme stabilisant de la miniémulsion. A partir des travaux relatés dans la littérature, nous avons choisi un premier ensemble des conditions de polymérisation puis nous avons varié certains paramètres. Pour ce système un certain nombre d'observations ont été réalisées :

- La polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence de CPDB comme CTA peut être contrôlée dans une large gamme de conditions. Ainsi, des ratios $[MMA]_0/[CPDB]_0$ compris entre 89 et 398, $[CPDB]_0/[AIBN]_0$ variant entre 2 et 8 et des températures de 70 °C et 80 °C nous ont permis d'obtenir des PMMA bien définis ($\bar{M}_w < 1,2$), et ce jusqu'à de forte conversion.
- La polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion peut être réalisée à 70 ou 80°C sans problèmes de stabilité colloïdale. La température de polymérisation influence uniquement la vitesse de polymérisation (plus élevée à 80 °C) alors que les polymères PMMA synthétisés présentent les mêmes paramètres macromoléculaires aux deux températures.
- Un élargissement de la distribution de masses molaires est observé en fin de polymérisation (conversions supérieures à 80%) pour des ratios $[MMA]_0/[CPDB]_0 \geq 195$. Ceci a été attribué à un effet de gel limitant la mise en place du mécanisme de contrôle de la polymérisation RAFT en raison du fort degré de polymérisation des chaînes impliquées.
- Le CPDB induit un effet de retard à la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion et ce retard est d'autant plus marqué que la concentration en CPDB augmente.
- La teneur en M810 dans la phase organique n'a pas une influence sur le contrôle de la polymérisation RAFT.

Dans la troisième partie de ce chapitre, des glycopolymères greffés dextrane-*g*-PMMA aux paramètres macromoléculaires contrôlés ont été synthétisés par polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion à partir de deux macroagents RAFT, DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} et DexN₃₋₂₀CTA_{7,5}. Les conditions réactionnelles déterminées lors de l'homopolymérisation du MMA en présence du système modèle DexN_{3- π} /CPDB ont été appliquées et se sont également avérées adaptées pour contrôler cette polymérisation en miniémulsion. Différentes observations expérimentales ont pu être réalisées:

- Les cinétiques de polymérisation montrent une concentration constante de centres actifs tout au long de la polymérisation, et ce jusqu'à une conversion d'environ 70%.
- Les deux macroagents RAFT utilisés, induisent un effet de retard à la polymérisation par rapport à un système de polymérisation radicalaire conventionnelle.

- Aucun problème de stabilité colloïdale n'a été observé. Les conditions choisies permettent de garder constante la distribution de taille des nanogouttelettes/nano-objets lors de la polymérisation, si bien que des objets de taille relativement homogène et de diamètre d'environ 110 nm ont été obtenus.
- La croissance effective de greffons à partir du dextrane a pu être vérifiée grâce à des études RMN ^1H et RMN 2D DOSY ^1H dans le DMSO- d_6 ainsi que par SEC-MALLS (DMF/LiCl (2 g/L) des glycopolymères $\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{-g-nPMMA}_{\overline{M}_n}$.
- Après une étape d'hydrolyse basique des fonctions ester reliant le tronc dextrane aux greffons PMMA, nous avons pu étudier la distribution massique de ces derniers. Une évolution linéaire des masses molaires de ces greffons avec la conversion et des dispersités inférieures à 1,2 ont été observées.
- La formation d'une proportion d'homopolymères PMMA a été mise en évidence par des analyses SEC-MALLS (DMF/LiCl (2g/L)) des copolymères non-purifiés. Les chaînes PMMA non-accrochées au dextrane représentent entre 17 et 25 % m. du PMMA total synthétisé.
- Pour les deux transurfs utilisés, nous avons pu calculer une efficacité moyenne des groupements CTA d'environ 50%.
- Les études cinétiques réalisées en changeant le ratio volumique M810/MMA dans la phase organique suggèrent que cette huile peut être utilisée en forte proportion dans la formulation des nano-objets sans aucun effet ni sur la croissance contrôlée des chaînes polymères ni sur l'efficacité des groupements réactifs (de type agent RAFT) introduits sur le dextrane. Ceci a permis la fabrication de nano-objets à forte teneur en M810 (10-37% m.) qui devrait permettre d'encapsuler des quantités de principe actif importantes et trouver des applications dans le domaine de la délivrance de médicaments.

Grâce à l'utilisation combinée de la polymérisation en miniémulsion et d'un macroagent RAFT dérivé du dextrane ($\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{CTA}\gamma$), des objets à cœur huileux, écorce polymère (aux paramètres macromoléculaires bien définis) et recouvrement hydrophile, ont été élaborés. Dans le chapitre suivant, la caractérisation physico-chimique de ces objets sera présentée. Il s'agira notamment de vérifier leur stabilité colloïdale pendant leur stockage et dans un milieu simulant le milieu

physiologique. Le recouvrement hydrophile en dextrane sera caractérisé en termes d'épaisseur, de taux de recouvrement et de stabilité en présence d'un tensioactif compétitif. Des études préliminaires de la morphologie des objets seront également présentées.

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. Barner-Kowollik (Ed), « Handbook of RAFT polymerization ». Weinheim: Wiley-VCH, **2008**, 541p.
- [2] Landfester K., « Miniemulsions for Nanoparticle Synthesis », *Topics in Current Chemistry* **2003**, 227, 75-123.
- [3] L. Yang, Y. Luo, X. Liu, et B. Li, « RAFT miniemulsion polymerization of methyl methacrylate », *Polymer* **2009**, 50 (18), 4334-4342.
- [4] X. Zhou, P. Ni, et Z. Yu, « Comparison of RAFT polymerization of methyl methacrylate in conventional emulsion and miniemulsion systems », *Polymer* **2007**, 48 (21), 6262-6271.
- [5] H. Feng, Y. Zhao, M. Pelletier, Y. Dan, et Y. Zhao, « Synthesis of photo- and pH-responsive composite nanoparticles using a two-step controlled radical polymerization method », *Polymer* **2009**, 50 (15), 3470-3477.
- [6] L. M. Ramirez, J. Babin, A. Durand, J.-L. Six, et C. Nouvel, « Biocompatible dextran-covered nanoparticles produced by Activator Generated by Electron Transfer Atom Transfer Radical Polymerization in miniemulsion », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2015**, 486, 60-68.
- [7] L. M. Forero Ramirez, J. Babin, A. Durand, J.-L. Six, et C. Nouvel « How inisurf improve control of atom transfer radical polymerization and facilitate nanocapsules production? ». *En préparation*.
- [8] K. . Traul, A. Driedger, D. Ingle, et D. Nakhasi, « Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides », *Food and Chemical Toxicology* **2000**, 38 (1), 79-98.
- [9] B. Marten, M. Pfeuffer, et J. Schrezenmeir, « Medium-chain triglycerides », *International Dairy Journal* **2006**, 16 (11), 1374-1382.
- [10] H. Ulrich, S. M. Pastores, D. P. Katz, et V. Kvetan, « Parenteral use of medium-chain triglycerides: A reappraisal », *Nutrition* **1996**, 12 (4), 231-238.
- [11] K. Hippalgaonkar, S. Majumdar, et V. Kansara, « Injectable Lipid Emulsions—Advancements, Opportunities and Challenges », *AAPS PharmSciTech* **2010**, 11 (4), 1526-1540.
- [12] R. G. Strickley, « Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations », *Pharmaceutical Research* **2004**, 21 (2), 201-230.
- [13] J. A. Heydinger et D. K. Nakhasi, « Medium chain triacylglycerols », *Journal of Food Lipids* **1996**, 3 (4), 251-257.
- [14] A. Kogan et N. Garti, « Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles », *Advances in Colloid and Interface Science* **2006**, 123-126, 369-385.
- [15] E. W. Flick, « Cosmetic and toiletry formulations ». Park Ridge, New Jersey: Noyes Publications, **1989**, 401p.
- [16] A. Babu Dhanikula, N. Mohamed Khalid, S. D. Lee, R. Yeung, V. Risovic, K. M. Wasan, et J.-C. Leroux, « Long circulating lipid nanocapsules for drug detoxification », *Biomaterials* **2007**, 28 (6), 1248-1257.
- [17] K. Gao, J. Sun, K. Liu, X. Liu, et Z. He, « Preparation and Characterization of a Submicron Lipid Emulsion of Docetaxel: Submicron Lipid Emulsion of Docetaxel », *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2008**, 34 (11), 1227-1237.

- [18] H. Ragelle, S. Crauste-Manciet, J. Seguin, D. Brossard, D. Scherman, P. Arnaud, et G. G. Chabot, « Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice », *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, 427 (2), 452-459.
- [19] M. L. Bondi, C. Botto, E. Amore, M. R. Emma, G. Augello, E. F. Craparo, et M. Cervello, « Lipid nanocarriers containing sorafenib inhibit colonies formation in human hepatocarcinoma cells », *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, 193 (1-2), 75-85.
- [20] G. Lollo, P. Hervella, P. Calvo, P. Avilés, M. J. Guillén, M. Garcia-Fuentes, M. J. Alonso, et D. Torres, « Enhanced in vivo therapeutic efficacy of plitidepsin-loaded nanocapsules decorated with a new poly-aminoacid-PEG derivative », *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, 483 (1-2), 212-219.
- [21] E. Marie, E. Rotureau, E. Dellacherie, et A. Durand, « From polymeric surfactants to colloidal systems », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, 308, (1-3), 25-32.
- [22] M. Wu, L. M. Forero Ramirez, A. Rodriguez Lozano, D. Quémener, J. Babin, A. Durand, E. Marie, J.-L. Six, et C. Nouvel, « First multi-reactive dextran-based inisurf for atom transfer radical polymerization in miniemulsion », *Carbohydrate Polymers* **2015**, 130, 141-148.
- [23] A. Durand, E. Marie, E. Rotureau, M. Leonard, et E. Dellacherie, « Amphiphilic Polysaccharides: Useful Tools for the Preparation of Nanoparticles with Controlled Surface Characteristics », *Langmuir* **2004**, 20 (16), 6956-6963.
- [24] J. D. Biasutti, T. P. Davis, F. P. Lucien, et J. P. A. Heuts, « Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of methyl methacrylate in suspension », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2005**, 43 (10), 2001-2012.
- [25] G. Johnston-Hall, A. Theis, M. J. Monteiro, T. P. Davis, M. H. Stenzel, et C. Barner-Kowollik, « Accessing Chain Length Dependent Termination Rate Coefficients of Methyl Methacrylate (MMA) via the Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Process », *Macromolecular Chemistry and Physics* **2005**, 206 (20), 2047-2053.
- [26] G. Johnston-Hall, M. H. Stenzel, T. P. Davis, C. Barner-Kowollik, et M. J. Monteiro, « Chain Length Dependent Termination Rate Coefficients of Methyl Methacrylate (MMA) in the Gel Regime: Accessing k_t^{ii} Using Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization », *Macromolecules* **2007**, 40 (8), 2730-2736.
- [27]) Y. K. Chong, J. Krstina, T. P. T. Le, G. Moad, A. Postma, E. Rizzardo, et S. H. Thang, « Thiocarbonylthio Compounds [SC(Ph)S-R] in Free Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization). Role of the Free-Radical Leaving Group (R) », *Macromolecules* **2003**, 36 (7), 2256-2272.
- [28] Y. Luo et X. Cui, « Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of methyl methacrylate in emulsion », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2006**, 44 (9), 2837-2847.
- [29] T. S. Moreira, M. A. M. de Oliveira, L. M. T. da Rocha e Lima, M. N. de Souza, et J. C. C. da Silva Pinto, « Synthesis of Nanoparticles Loaded with Tamoxifen by in Situ Miniemulsion RAFT Polymerization », *Macromolecular Symposia* **2014**, 344 (1), 101-107.
- [30] A. H. E. Mueller, R. Zhuang, D. Yan, et G. Litvinenko, « Kinetic Analysis of “Living” Polymerization Processes Exhibiting Slow Equilibria. 1. Degenerative Transfer (Direct Activity Exchange between Active and “Dormant” Species). Application to Group Transfer Polymerization », *Macromolecules* **1995**, 28 (12), 4326-4333.
- [31] G. Litvinenko et A. H. E. Müller, « General Kinetic Analysis and Comparison of Molecular Weight Distributions for Various Mechanisms of Activity Exchange in Living Polymerizations », *Macromolecules* **1997**, 30 (5), 1253-1266.
- [32] M. Bathfield, C. Graillat, et T. Hamaide, « Encapsulation of High Biocompatible Hydrophobe Contents in Nonionic Nanoparticles by Miniemulsion Polymerization of Vinyl Acetate or Styrene: Influence of the Hydrophobe Component on the Polymerization », *Macromolecular Chemistry and Physics* **2005**, 206 (22), 2284-2291.

- [33] F. R. Steinmacher, N. Bernardy, J. B. Moretto, E. I. Barcelos, P. H. H. Araújo, et C. Sayer, « Kinetics of MMA and VAc Miniemulsion Polymerizations Using Miglyol and Castor Oil as Hydrophobe and Liquid Core », *Chemical Engineering & Technology* **2010**, 33 (11), 1877-1887.
- [34] N. Bernardy, A. P. Romio, E. I. Barcelos, C. Dal Pizzol, C. L. Dora, E. Lemos-Senna, P. H. H. Araujo, et C. Sayer, « Nanoencapsulation of quercetin via miniemulsion polymerization », *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2010**, 6 (2), 181-186.
- [35] A. P. Romio, N. Bernardy, E. Lemos Senna, P. H. H. Araújo, et C. Sayer, « Polymeric nanocapsules via miniemulsion polymerization using redox initiation », *Materials Science and Engineering: C* **2009**, 29 (2), 514-518.
- [36] C. . Bamford, G. . Eastmond, et D. Whittle, « Network formation III—Influence of organometallic initiator on network structure », *Polymer* **1969**, 10, 771-783.
- [37] S. E. Shim, H. Lee, et S. Choe, « Synthesis of Functionalized Monodisperse Poly(methyl methacrylate) Nanoparticles by a RAFT Agent Carrying Carboxyl End Group », *Macromolecules* **2004**, 37 (15), 5565-5571.
- [38] J. Ma, C. Yang, J. Luo, T. Shen, et M. Lu, « Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization of Methyl Methacrylate in Microemulsion: The Influence of Reaction Conditions on Polymerization », *Journal of Macromolecular Science, Part A* **2012**, 49 (4), 321-329.
- [39] M. F. Cunningham, « Living/controlled radical polymerizations in dispersed phase systems », *Progress in Polymer Science* **2002**, 27 (6), 1039-1067.
- [40] J. B. McLeary et B. Klumperman, « RAFT mediated polymerisation in heterogeneous media », *Soft Matter* **2006**, 2 (1), 45-53.
- [41] L. Dupayage, « Elaboration contrôlée de glycopolymères amphiphiles à partir de polysaccharide: synthèse de Dextrane-g-PMMA par polymérisation radicalaire par transfert d'atome ». **Thèse de doctorat**, Nancy : Institut National Polytechnique de Lorraine, **2009**.
- [42] L. Dupayage, M. Save, E. Dellacherie, C. Nouvel, et J.-L. Six, « PMMA-grafted dextran glycopolymers by atom transfer radical polymerization », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, 46 (23), 7606-7620.
- [43] K. Ferji, C. Nouvel, J. Babin, M.-H. Li, C. Gaillard, E. Nicol, C. Chassenieux, et J.-L. Six, « Polymersomes from Amphiphilic Glycopolymers Containing Polymeric Liquid Crystal Grafts », *ACS Macro Letters* **2015**, 4 (10), 1119-1122.
- [44] J. Chen, J. Yi, P. Sun, Z.-T. Liu, et Z.-W. Liu, « Grafting from ramie fiber with poly(MMA) or poly(MA) via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization », *Cellulose* **2008**, 16 (6), 1133-1145.
- [45] M. Hernández-Guerrero, T. P. Davis, C. Barner-Kowollik, et M. H. Stenzel, « Polystyrene comb polymers built on cellulose or poly(styrene-co-2-hydroxyethylmethacrylate) backbones as substrates for the preparation of structured honeycomb films », *European Polymer Journal* **2005**, 41 (10), 2264-2277.
- [46] R. Fleet, J. B. McLeary, V. Grumel, W. G. Weber, H. Matahwa, et R. D. Sanderson, « RAFT mediated polysaccharide copolymers », *European Polymer Journal* **2008**, 44 (9), 2899-2911.
- [47] J. Bernard, A. Favier, T. P. Davis, C. Barner-Kowollik, et M. H. Stenzel, « Synthesis of poly(vinyl alcohol) combs via MADIX/RAFT polymerization », *Polymer* **2006**, 47 (4), 1073-1080.
- [48] M. H. Stenzel, L. Zhang, et W. T. S. Huck, « Temperature-Responsive Glycopolymer Brushes Synthesized via RAFT Polymerization Using the Z-group Approach », *Macromolecular Rapid Communications* **2006**, 27 (14), 1121-1126.

CHAPITRE III

Caractérisation des nano-objets

| | |
|---|------------|
| 1. RAPPEL DES OBJETS ÉTUDIÉS..... | 193 |
| 2. STABILITÉ COLLOÏDALE DES OBJETS LORS DE LEUR STOCKAGE | 195 |
| 2.1. EN SUSPENSION COLLOÏDALE | 195 |
| 2.2. A L'ETAT SOLIDE | 196 |
| 3. CARACTÉRISATION DE LA COURONNE DE DEXTRANE EN SURFACE DES NCS..... | 197 |
| 3.1. POTENTIEL ZETA ET MISE EN EVIDENCE DU RECOUVREMENT HYDROPHILE EN DEXTRANE..... | 197 |
| 3.2. DETERMINATION DE L'ÉPAISSEUR DE LA COURONNE DE DEXTRANE ET DU TAUX DE RECOUVREMENT | 203 |
| 4. STABILITE COLLOIDALE DE NANO-OBJETS..... | 206 |
| 4.1. STABILITE COLLOÏDALE EN FONCTION DE LA FORCE IONIQUE. | 207 |
| 4.2. STABILITE DE LA COURONNE DE DEXTRANE EN PRESENCE DU SDS. | 209 |
| 5. MORPHOLOGIE DES NANO-OBJETS..... | 212 |
| 5.1. ANALYSE THERMIQUE (MDSC)..... | 212 |
| 5.2. Cryo-MET | 213 |
| 6. CONCLUSIONS DU CHAPITRE | 214 |
| 7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 216 |

CHAPITRE III

Dans le chapitre précédent nous avons validé la stratégie de synthèse des NCs. Des nano-objets à cœur huileux en M810, écorce PMMA et recouverts de dextrane ont ainsi été obtenus par polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion. Cependant, avant de pouvoir tester ces NCs *in vivo*, ces vecteurs doivent être caractérisés sur le plan de leurs propriétés physico-chimiques, de leur morphologie et de leur potentiel à être utilisés pour la délivrance de principes actifs par voie intraveineuse. Les caractérisations physico-chimiques et morphologiques feront l'objet de ce chapitre. Elles incluront d'une part, la mesure de la taille des objets et de leur distribution, leur stabilité dans les conditions de stockage et lors du conditionnement final, l'évaluation de leur charge électrostatique et la caractérisation de la couche superficielle de dextrane en termes d'épaisseur et de taux de recouvrement. D'autre part, nous étudierons également la stabilité colloïdale de ces objets en fonction de la force ionique ainsi que la stabilité de la couronne de dextrane en présence d'un tensioactif compétitif. Ce chapitre sera clôturé par une étude préliminaire de la morphologie de NCs formulées par Cryo-Microscopie Electronique à Transmission à basse température (cryo-TEM).

1. RAPPEL DES OBJETS ÉTUDIÉS

Deux types d'objets ont été synthétisés lors des expériences de polymérisation RAFT en miniémulsion discutées dans le chapitre précédent. Premièrement, les NCs issues des polymérisations modèles réalisées en présence du couple tensioactif/CTA (DexN₃₋₂₀/CPDB) qui seront appelées par la suite NCs-MOD (a, Figure II- 40) ; deuxièmement celles produites à l'aide des transurfs qui seront nommées NCs-CTA (b, Figure II- 40). Pour rappel, dans le cas des NCs-MOD, le tensioactif DexN₃₋₂₀ est simplement adsorbé à la surface des objets, alors que dans le cas des NCs-CTA, le transurf DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} initialement introduit dans le milieu réactionnel se

retrouve *in fine* lié de façon covalente aux chaînes PMMA qui constituent l'écorce de la NC. Les conditions de synthèse et les caractéristiques des NCs étudiées sont rassemblées dans le Tableau II- 12. Des expériences conduisant à des PMMA de masses molaires voisines ont été volontairement sélectionnées pour faciliter la comparaison.

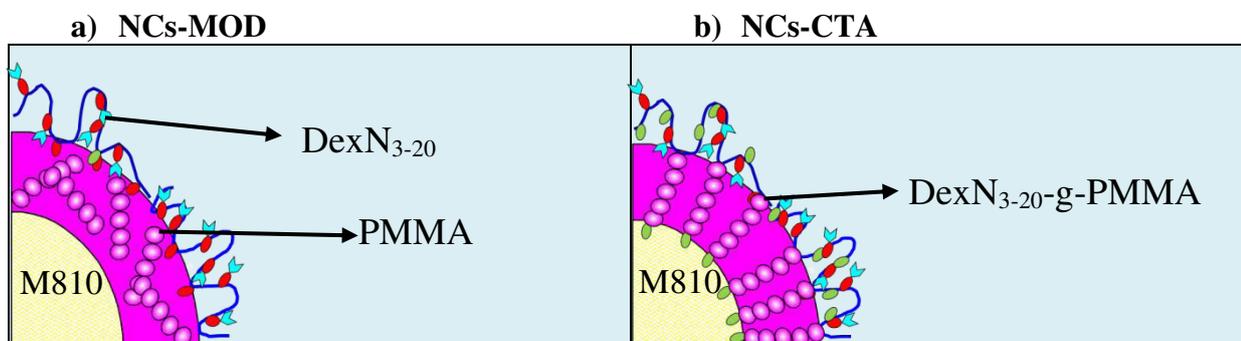


Figure II- 40 : NCs fabriquées par polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence du système modèle DexN₃₋₂₀/CPDB (a, NCS-MOD) et du transurf (b, NCS-CTA).

Tableau II- 12 : Conditions de synthèse et caractéristiques des NCs utilisées pour les caractérisations physico-chimiques.

| NCs | Dérivé du dextrane adsorbé à l'interface ^(a) (% m.) | $\frac{[MMA]_0}{[CPDB]_0}$ | $\frac{[CPDB]_0}{[AIBN]_0}$ | $\frac{M810}{MMA}$ (% vol.) | $x^{(b)}$ (%) | $\bar{M}_n^{(c)}$ (g/mol) | \bar{D} | Taille ^(d) (nm) |
|------|---|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------|------------------------------|-----------|-------------------------------|
| MOD | 65 | 700 | 2 | 25 | 97 | 55 300 | 1,11 | 111 (1,28) |
| CTA* | 94 | 393 | 3 | 25 | 93 | 58 700 | 1,20 | 102 (1,45) |

(a) % massique du dérivé dextrane initialement introduit (DexN₃₋₂₀ ou DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}) localisé à la surface des objets finaux. Déterminé après centrifugation des nano-objets, par dosage à l'antrone du dextrane modifié restant dans le surnageant (voir Chapitre II, Paragraphe 3.1)

(b) Conversion estimée par gravimétrie.

(c) Masses molaires moyennes en nombre des chaînes PMMA obtenues par SEC-MALLS dans le THF avec $dn/dc = 0,087$ mL/g. Dans le cas des NCS-CTA, ces chaînes PMMA ont été volontairement clivées du dextrane avant analyse.

(d) Diamètre moyen en surface ($d[3 :2]$) des NCs, mesuré par granulométrie laser en fin de polymérisation. Valeurs de Span données entre parenthèses et obtenues par granulométrie laser grâce à l'équation II-3 (Chapitre II, Paragraphe 2.2).

* Les ratios $[MMA]_0/[CPDB]_0$ et $[CPDB]_0/[AIBN]_0$ correspondent aux ratios théoriques calculés en supposant que tous les groupements CTA du transurf à la surface des nanogouttelettes participent à la croissance des chaînes PMMA.

2. STABILITÉ COLLOÏDALE DES OBJETS LORS DE LEUR STOCKAGE

La stabilité du diamètre des objets au cours du procédé d'élaboration (de la nanogouttelette à la NC) a été vérifiée dans le chapitre précédent. Cependant, il convient aussi d'examiner la capacité de ces NCs à maintenir leur taille à long terme, sous différentes conditions de stockage : suspension colloïdale ou sous forme sèche.

2.1. EN SUSPENSION COLLOÏDALE

Après élaboration, les NCs (suspension colloïdale à 8% m.) sont lavées par centrifugation afin d'enlever le tensioactif (DexN₃₋₂₀ ou DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}) non adsorbé à leur surface puis redispersées dans l'eau MilliQ. Les suspensions ainsi obtenues présentent un taux de solide d'environ 6% m.. Elles sont classiquement stockées à 4 °C avant d'être utilisées pour d'autres analyses, notamment pour leur évaluation biologique. Nous avons donc étudié la stabilité colloïdale des NCs-MOD et NCs-CTA (Tableau II- 12) dans ces conditions de stockage afin de garantir des délais d'utilisation. Pour cela, la taille de ces objets a été suivie pendant 5 semaines. Les distributions de taille obtenues en fin de polymérisation et à l'issue de 5 semaines de stockage à 4 °C sont comparées dans la Figure II- 41. Elles confirment qu'il est possible de conserver les particules NCS-MOD et NCs-CTA sous forme dispersée pendant au moins cette durée de temps.

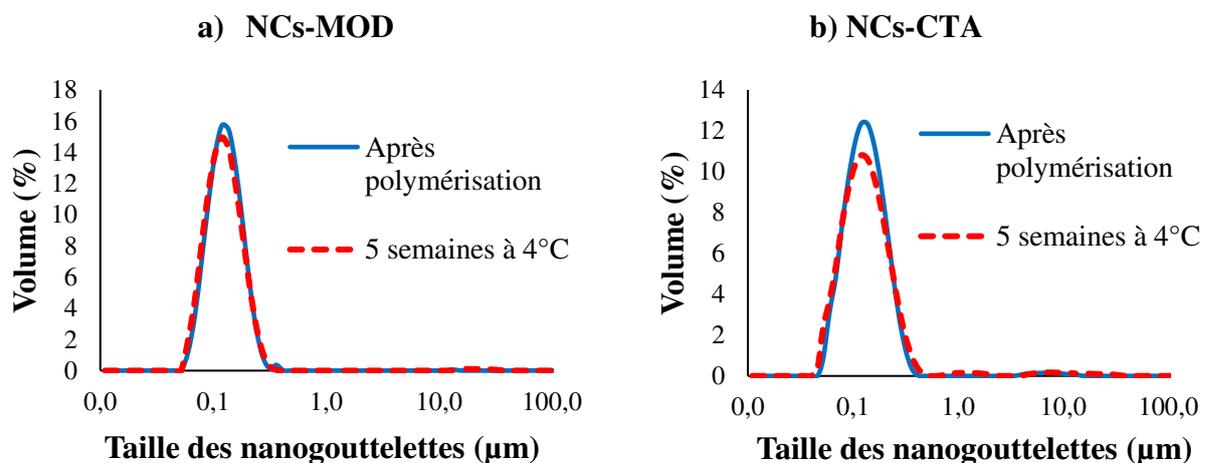


Figure II- 41 : Distribution de tailles en volume en fin de polymérisation et à l'issue de 5 semaines de stockage à 4 °C de NCs-MOD et NCs-CTA.

2.2. A L'ETAT SOLIDE

Malgré la bonne stabilité des NCs sous forme de suspension colloïdale, la conservation à long terme des suspensions aqueuses de nano-objets contenant un principe actif est difficilement envisageable. En effet, un des risques principaux est la diffusion du principe actif à partir des nano-objets dans le surnageant. La prolifération bactérienne dans l'eau est également un risque à éviter. C'est pourquoi, la conservation des nanoparticules (NCs-MOD) après leur lyophilisation a également été étudiée. Cependant, comme montré lors des travaux précédents au LCPM [1], il est nécessaire d'ajouter un cryoprotecteur tel que le tréhalose (260 mg/mL de suspension, Figure II- 42) pour éviter l'agrégation des nanoparticules recouvertes d'une couronne de dextrane lors de leur congélation. Ce cryoprotecteur permet d'obtenir une bonne redispersion des NCs après leur lyophilisation (Figure II- 43) et ne représente pas d'inconvénient pour l'utilisation finale des objets. En effet, des solutions de glucose (Figure II- 42) sont souvent utilisées comme transporteur et diluant lors de l'administration de différents médicaments par voie intraveineuse [2], [3]. 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 [4]. Dans ce cas, il suffirait de trouver les proportions optimales de glucose à ajouter pour assurer la stabilité des objets.

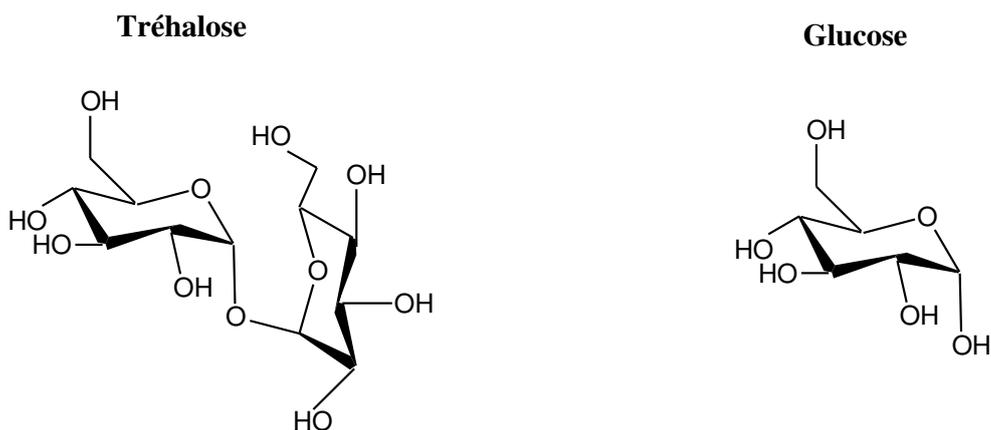


Figure II- 42 : Structure chimique du tréhalose et du glucose.

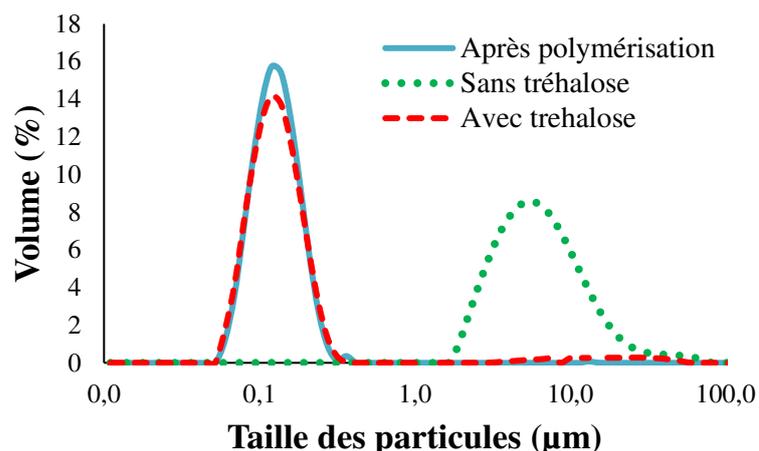


Figure II- 43 : Distribution de tailles en volume en fin de polymérisation et après lyophilisation en présence et en absence de tréhalose.

3. CARACTÉRISATION DE LA COURONNE DE DEXTRANE EN SURFACE DES NCS

3.1. POTENTIEL ZETA ET MISE EN EVIDENCE DU RECOUVREMENT HYDROPHILE EN DEXTRANE

Les valeurs de potentiel Zêta (ζ) permettent d'estimer la charge de surface d'objets en suspension et sont un bon indicateur de leur stabilité colloïdale (pour plus de détails voir Partie III, Paragraphe 6.4). Dans le cadre de ce travail, le potentiel Zêta nous a également permis de montrer de façon indirecte la présence d'une couche hydrophile de dextrane à la surface des NPs (NCs-MOD et NCs-CTA). Dans ce but, l'évolution du potentiel ζ des NCs dispersées dans des solutions de NaCl à différentes forces ioniques (10^{-6} – 1 M) a été étudiée.

La Figure II- 44 présente les résultats obtenus pour les NCs-MOD et NCs-CTA. Dans un premier temps nous avons comparé ces objets à des nanosphères de PMMA non-recouvertes ou nues (NSs nues) préparées par la méthode d'émulsion-évaporation de solvant (voir Partie III, Paragraphe 3.3) en utilisant du cholate de sodium comme tensioactif et un PMMA préformé (obtenu par polymérisation RAFT en masse du MMA en présence de CPDB puis purifié par précipitation par de l'éther de pétrole). Après préparation, ces NSs ont été lavées plusieurs fois afin de retirer le tensioactif en surface et l'absence de ce dernier a été confirmée par analyse RMN ^1H dans le DMSO- d_6 d'où le terme de NSs nues. Si l'on compare les valeurs de potentiel ζ

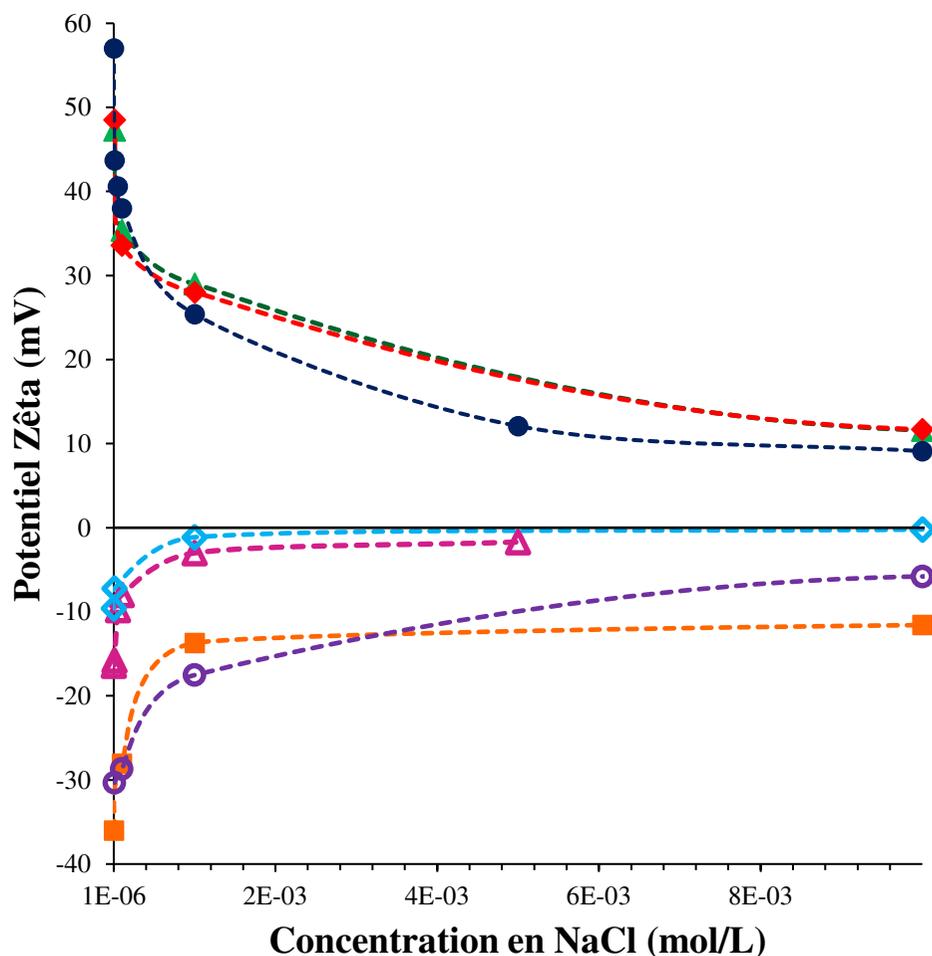
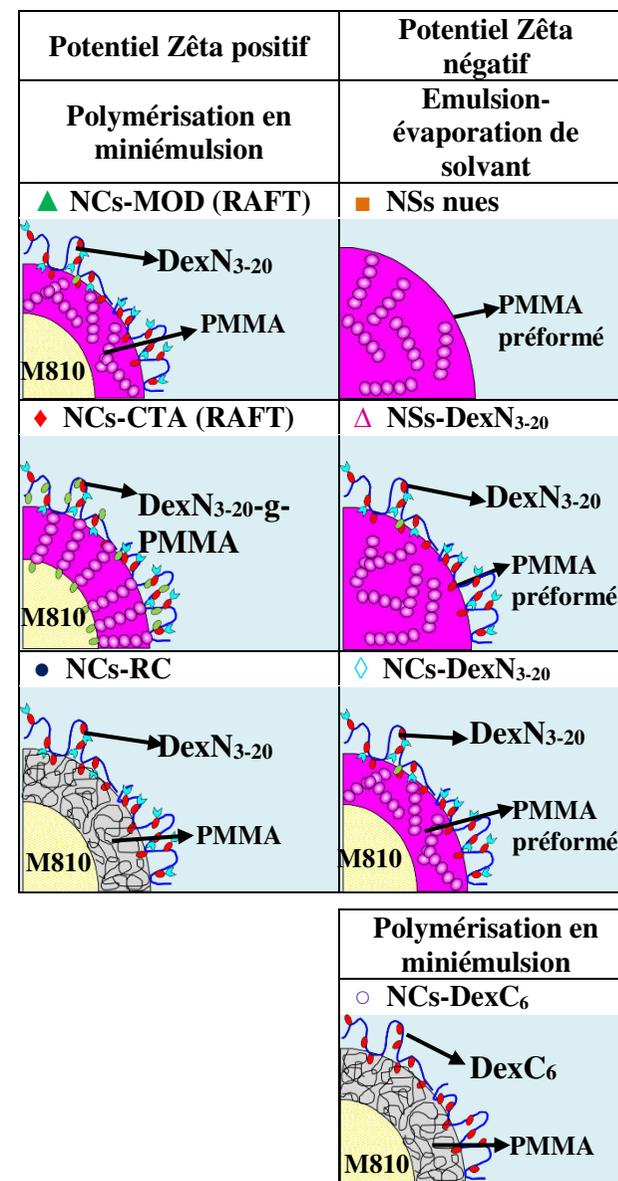


Figure II- 44 : Evolution de potentiel Zêta de nano-objets dispersés dans une phase aqueuse de NaCl de 10^{-6} à 1 mol/l. Cas des NPs préparées par polymérisation RAFT en miniémulsion : (\blacktriangle) NCs-MOD et (\blacklozenge) NCs-CTA ; par polymérisation radicalaire classique en utilisant un stabilisant non-réactif : (\bullet) NCs-RC et (\circ) NCs-DexC₆ et par émulsion-évaporation de solvant : (\blacksquare) NSs nues, (\blacktriangle) NSs-DexN₃₋₂₀ et (\blacklozenge) NCs-DexN₃₋₂₀.



de tous ces objets, on observe que les charges de surface de NCs-MOD et NCs-CTA sont positives alors que celles de NSs-nues sont négatives. Ce résultat a pu être vérifié à de nombreuses reprises. Ces valeurs de potentiel ζ positives sont *a priori* surprenantes car la littérature rapporte des charges de surface négatives pour des nanosphères de PMMA élaborées par nanoprécipitation à partir des polymères préformés synthétisés par RAFT [5], [6]. Afin d'expliquer cette différence dans la charge à la surface, un certain nombre de nano-objets ont été fabriqués et leur potentiel ζ mesuré. Pour le confort du lecteur, la Figure II- 44 est accompagnée d'une représentation schématique des différents objets analysés classés selon leur charge (positive ou négative) et leur procédé d'élaboration.

Plusieurs constatations peuvent être faites à partir de la Figure II- 44 :

- Lorsque des NSs ou des NCs (à cœur en M810) sont fabriquées par émulsion évaporation de solvant en utilisant le DexN₃₋₂₀ comme stabilisant et un PMMA préformé (NSs-DexN₃₋₂₀ et NCs-DexN₃₋₂₀), des objets chargés négativement sont obtenus. Néanmoins, les potentiels ζ (en valeurs absolues) sont plus faibles que ceux des NSs nues. Ceci met en évidence de façon indirecte, la présence d'une couche de dextrane neutre en surface des NSs-DexN₃₋₂₀ et NCs-DexN₃₋₂₀, permettant d'atténuer la charge négative du PMMA en surface.
- La fabrication de particules de PMMA par polymérisation radicalaire classique en miniémulsion réalisée en présence d'AIBN comme amorceur, de M812 comme agent hydrophobe et de la lécithine comme stabilisant a été relatée dans la littérature [7]. Les objets alors synthétisés par ces auteurs présentent une charge de surface négative, ce qui suggère que ni le procédé de préparation utilisé (polymérisation en milieu hétérogène), ni l'amorceur ni l'huile employés ne sont à l'origine du potentiel ζ positif que nous observons pour les NCs-MOD et NCs-CTA. Nous avons alors supposé que ce potentiel ζ ne pouvait provenir que de l'utilisation d'un agent RAFT. C'est pourquoi des NCs supplémentaires ont été préparées par polymérisation radicalaire classique en miniémulsion en présence de DexN₃₋₂₀, d'AIBN et de M810 (NCs-RC). Cependant, celles-ci sont également avérées chargées positivement. La présence d'un agent RAFT n'est donc pas une explication valable.
- Dans un second temps, nous avons supposé que le potentiel ζ positif pouvait trouver son origine dans l'utilisation des stabilisants DexN_{3- τ} et DexN_{3- τ} CTA γ lors d'une polymérisation en miniémulsion. Comme nous avons montré précédemment que la

polymérisation RAFT (groupes CTA) n'était pas à l'origine du potentiel ζ positif, nous avons pensé que les fonctions azoture étaient responsables de ce surprenant résultat. Pour démontrer cela, nous avons mesuré le potentiel ζ de nouvelles NCs de PMMA synthétisées cette fois-ci par polymérisation radicalaire classique en miniémulsion en présence d'un autre dérivé amphiphile non-réactif du dextrane, appelé DexC₆, au lieu du DexN_{3- τ} (NCs-DexC₆). Le DexC₆ est un dextrane modifié par des chaînes alkyle hydrophobes à 6 carbones qui, contrairement à celles des DexN_{3- τ} ou DexN_{3- τ} CTA γ , ne comportent pas une fonction azoture au bout de chaîne (Figure II- 45).

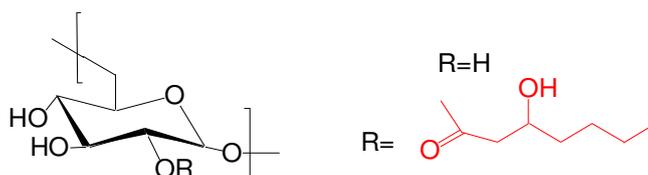


Figure II- 45 : Structure des dérivés DexC₆. Dextranes modifiés avec des chaînes alkyles à 6 carbones.

On constate sur la Figure II- 44, que les NCs-DexC₆ sont chargées négativement. Le potentiel ζ positif des NCs-MOD et NCs-CTA semble donc bien être lié à la présence de fonctions azoture situé à l'extrémité des groupements hydrophobes en C₆ fixés sur les chaînes de dextrane. D'ailleurs, certains travaux indiquent que les groupements N₃ peuvent réagir au cours d'une polymérisation radicalaire et conduire à des dérivés qui soient à l'origine du potentiel ζ positif. Huisgen a démontré que les fonctions azoture peuvent réagir avec des alcènes selon la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire aussi connue sous le nom de cycloaddition de Huisgen, (analogue à la réaction entre les fonctions azoture et alcyne dont nous avons parlé dans la Partie I, Paragraphe 2.3.1, Schéma II- 8).

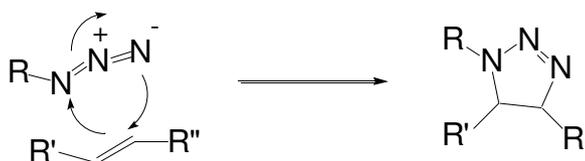


Schéma II- 8 : Mécanisme de la réaction de cycloaddition de Huisgen entre N₃ et C=C

Cette réaction a été mise en évidence par Ladmiral et al. [8] lors de la polymérisation RAFT du NIPAAM à 60 °C en présence d'un agent RAFT comportant un groupement

N₃. La réaction Huisgen entre la fonction azoture et la double liaison C=C du monomère se produit effectivement, mais d'autres réactions secondaires s'en suivent aboutissant à des produits secondaires (Schéma II- 9).

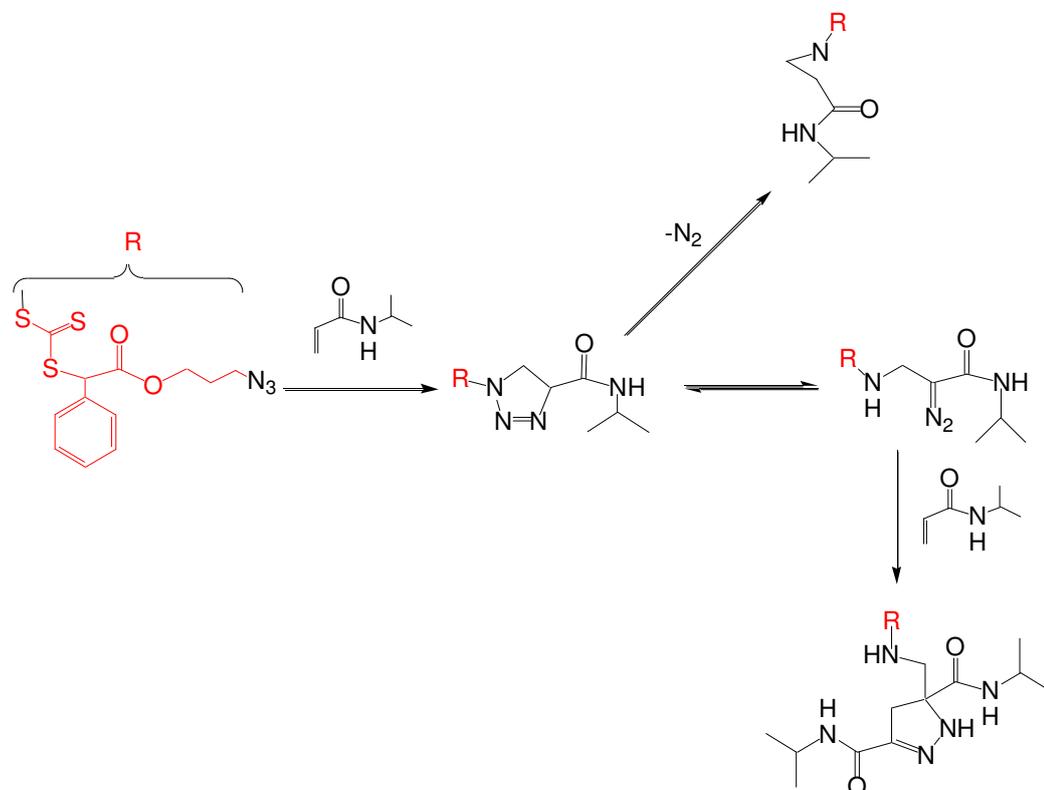


Schéma II- 9 : Mécanisme réactionnel proposé par Ladmiral et al. [8] pour la décomposition du NIPAAM en présence de fonctions N₃.

Bien qu'il soit rapporté que la réaction de Huisgen est très lente, Ladmiral et ses collègues constatent la perte de 13% des fonctions N₃ après seulement 2 h de réaction. Dans nos expériences, la polymérisation RAFT est réalisée à 80 °C pendant 3 h. Ainsi, il est possible que des réactions secondaires de ce type aient lieu entre les fonctions N₃ et le MMA. Afin de mieux explorer cette piste, nous avons fait réagir le DexN₃₋₂₀ avec le MMA en reproduisant les conditions opératoires du procédé de polymérisation RAFT en miniémulsion (3 heures de chauffage à 80 °C sous agitation mais sans amorceur et sans agent RAFT). La réaction est alors réalisée dans le DMSO, solvant commun aux deux réactifs puis le milieu réactionnel a été précipité par de l'éthanol afin de récupérer un composé qu'on dénommera dans la suite DexN₃(MMA) qui est purifié du MMA et des oligomères de PMMA éventuellement produits. Ensuite, le DexN₃₋₂₀ initial et le DexN₃(MMA) ont été analysés par spectroscopie infra-rouge par réflexion totale atténuée communément appelée ATR-FTIR (« Attenuated Total Reflection-Fourier

Transformation Infra red ») (voir Partie III, Paragraphe 5.2). Cette technique de mesure permet l'étude de la surface d'un échantillon avec une profondeur de pénétration de l'ordre de 1 à 2 μm . Les spectres du DexN₃₋₂₀ et du DexN₃(MMA) (Figure II- 46) montrent des bandes d'absorption caractéristiques des groupements fonctionnels composant les unités glucopyranose du dextrane et les groupements hydrophobes alkyle N₃ greffés sur sa dorsale. Bien que l'ATR-FTIR soit une technique qualitative et difficilement quantitative, nous avons comparé en première approximation l'aire des pics correspondants aux groupements C-N₃. Pour cela, nous avons sélectionné le pic de la fonction carbonyle (C=O) qui est peu susceptible de réagir selon le Schéma II- 9 pour normaliser les chromatographes.

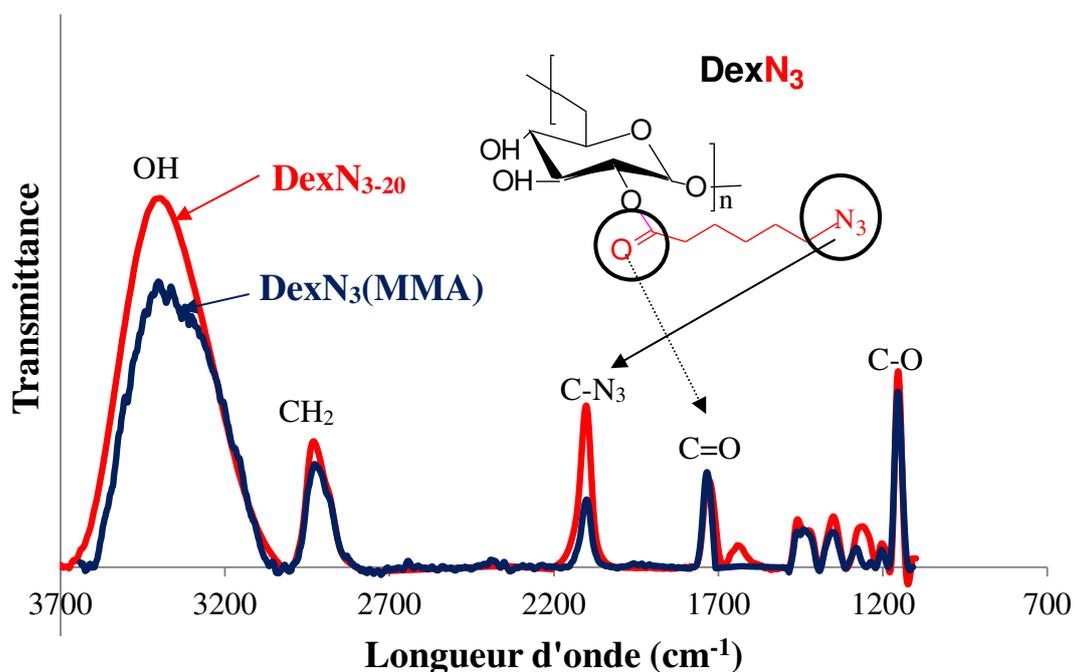


Figure II- 46 : Spectres ATR-FTIR du DexN₃₋₂₀ et du DexN₃(MMA) (produit purifié obtenu après réaction du DexN₃ avec le MMA).

On constate que toutes les principales bandes du DexN₃(MMA) présentant une transmittance assez élevée se superposent quasiment avec celles du DexN₃₋₂₀, sauf celle caractérisant le groupement azoture. En effet, l'aire de cette bande pour le DexN₃(MMA) est clairement réduite par rapport à celle du DexN₃₋₂₀. Ceci semble bien montrer qu'il y a une perte partielle des fonctions azoture par réaction avec le MMA. Cette réaction produit, comme illustré dans le Schéma II- 9, des fonctions amine qui pourraient être à l'origine des charges positives. Cependant, d'autres techniques d'analyse seraient nécessaires afin de déterminer et quantifier les produits secondaires issues de la réaction

entre la fonction N_3 et le MMA. Malgré cette possible perte des fonctions azoture, des fonctions N_3 semblent cependant être toujours présentes à la surface des NCs-MOD et NCs-CTA comme le témoignent les analyses par ATR-FTIR de ces objets (Figure II- 47). La disponibilité des fonctions N_3 à la surface des NCs sera vérifiée plus loin lors des expériences de fonctionnalisation de la surface des NCs par Chimie « Click ».

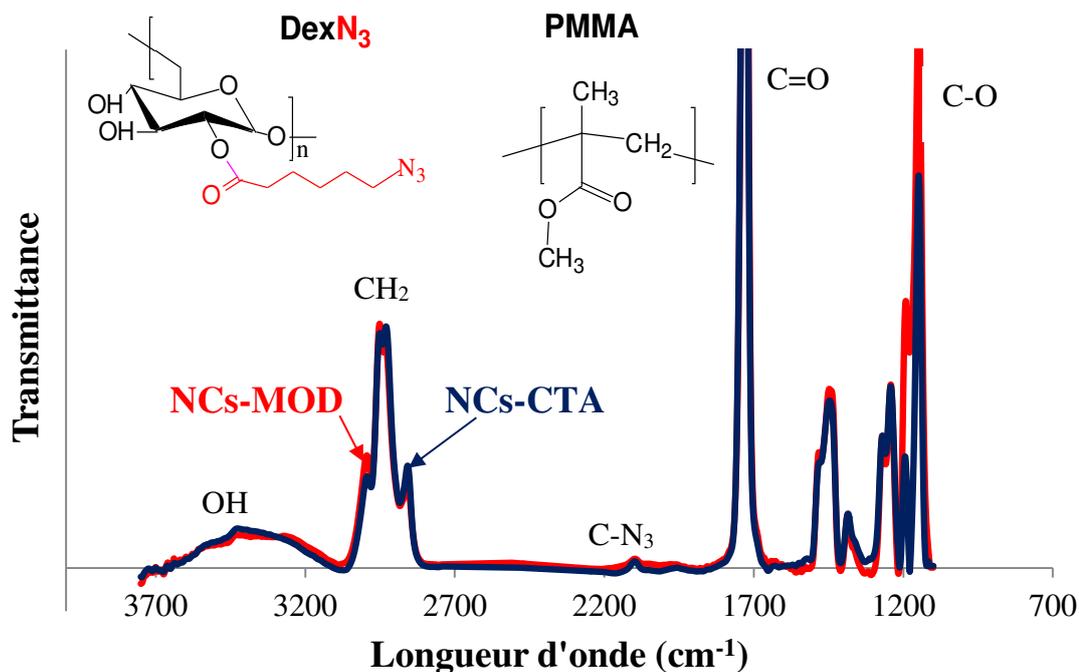


Figure II- 47 : Spectre ATR-FTIR des NCs-MOD et NCs-CTA déposées à l'état solide.

Bien que le potentiel ζ des NCs-MOD et NCs-CTA soit positif à faible concentration en NaCl (Figure II- 44), il devient presque neutre lorsque la force ionique du milieu atteint la valeur correspondante à celle du sang (0,148 M). Une valeur de 2,4 mV a ainsi été mesurée pour les deux nano-objets à une concentration en NaCl de 0,1 M. On peut donc penser qu'aucune force électrostatique attractive ni répulsive ne sera présente lorsque ces NCs seront administrées par voie intraveineuse.

3.2. DETERMINATION DE L'ÉPAISSEUR DE LA COURONNE DE DEXTRANE ET DU TAUX DE RECOUVREMENT

Grâce à la détermination préalable du potentiel ζ à différentes forces ioniques, il a été possible de caractériser l'épaisseur électrocinétique (Δ_{PZ}) de la couche hydrophile de dextrane localisée à la

surface des NCs qui permet d'écranter les charges. L'équation d'Eversole et de Boardman [9] propose une relation exprimant l'évolution du potentiel ζ en fonction du paramètre de Debye-Hückel (k_H) et de l'épaisseur de la couche polymère en surface (Δ_{PZ}) (pour plus de détails voir partie III, Paragraphe 6.4). Pour des faibles forces ioniques, cette évolution est linéaire et la valeur absolue de la pente peut être assimilée à l'épaisseur Δ_{PZ} (Tableau II- 13). L'épaisseur de la couronne de dextrane des NCs-DexN₃₋₂₀ (fabriquées par émulsion-évaporation de solvant en utilisant un PMMA préformé) a été comparée à celle des NCs obtenues par polymérisation RAFT en miniémulsion à partir du système modèle (NCs-MOD) et à partir des transurfs (NCs-CTA). On remarque que la valeur de Δ_{PZ} est la même pour les NCs-MOD et NCs-CTA, alors que celle de NCs-DexN₃₋₂₀ est environ 5 fois plus importante.

Tableau II- 13 : Caractéristiques de la couronne de dextrane en surface des objets. Cas de NCs fabriquées par polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence du système modèle DexN₃₋₂₀/CPDB (NCs-MOD) et du transurf (NCs-CTA) (conditions voir Tableau II- 12). Les NCs-DexN₃ ont été préparées par émulsion-évaporation du solvant (voir page III, Paragraphe 3.3) à l'aide d'un PMMA préformé.

| NCs | d[3 :2] ^(a) (nm) | Δ_{PZ} ^(b) (nm) | Γ_{dex} (Dosage indirect) ^(c) (mg/m ²) | Γ_{dex} (Dosage direct) ^(d) (mg/m ²) |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| NCs-MOD | 111 (1,28) | 5±1 | 1,2±0,1 | 1,3±0,2 |
| NCs-CTA | 102 (1,45) | 5±1 | 1,8±0,1 | 1,8±0,1 |
| NCs-DexN ₃₋₂₀ | 140 (1,25) | 23±1,5 | - | 2,7±0,2 |

(a) Diamètre moyen en surface (d[3 :2]) des particules, mesuré par granulométrie laser .Valeurs de Span données entre parenthèses et obtenues par granulométrie laser grâce à l'équation II-3 (Chapitre II, Paragraphe 2.2).

(b) Epaisseur de la couche hydrophile en dextrane à la surface de NCs obtenue à partir des mesures de potentiel Zêta grâce à l'équation d'Eversole et Boardman (partie III, Paragraphe. 6.4).

(c) Taux de recouvrement des NCs en dextrane estimé par dosage à l'antrone du dérivé du dextrane restant dans le surnageant après centrifugation des objets. Calculé grâce à l'équation III-6 (Partie III, Paragraphe 6.2).

(d) Taux de recouvrement des NCs en dextrane évalué par analyse RMN ¹H réalisée directement sur les objets après séchage dans le DMSO-d₆. Calculé grâce aux équations III-6 et III-10 (Partie III, Paragraphe 6.2).

Nous avons également estimé le taux de recouvrement (Γ_{dex}) pour ces trois types d'objets (Tableau II- 13), correspondant à la masse de dextrane présent par unité de surface des NCs. Pour le calculer, la masse de dextrane à la surface des objets a d'abord été évaluée par deux méthodes : i) soit comme précédemment (voir Chapitre II, Paragraphe 3.1) par dosage à l'antrone du dérivé du dextrane restant dans le surnageant après centrifugation des nano-objets obtenus (méthode indirecte), ii) soit par analyse RMN ^1H des NCs après séchage (méthode directe), puis Γ_{dex} a été calculé grâce à l'équation III-6 (voir Partie III, Paragraphe 6.2). Les deux techniques employées donnent des Γ_{dex} similaires. En revanche, le taux de recouvrement des NCs-MOD est légèrement inférieur à celui des NCs-CTA. Cet écart provient de la perte de stabilisant DexN_{3-τ} lors de la préparation de NCs-MOD. En effet, comme nous en avons discuté dans le Chapitre II de cette partie (paragraphe 3.1), environ 95% de dérivé du dextrane DexN_{3-τ}CTAγ introduit initialement reste accroché aux NCs préparées à partir du transurf (NCs-CTA), tandis que seulement 60% du DexN_{3-τ} initial reste à la surface des NCs préparées avec le système modèle (NCs-MOD) après polymérisation et purification. Dans le cas de la polymérisation avec le transurf, l'ancrage chimique du dérivé dextrane à la surface des NCs-CTA empêche certainement sa désorption lors de la polymérisation et du lavage de ces objets, d'où un taux de recouvrement plus important pour une même épaisseur de couche.

D'ailleurs, on observe que les NCs-DexN₃₋₂₀ préparées par émulsion-évaporation de solvant présentent une couche de dextrane 1,8 et 1,5 fois plus dense que celle des NCs-MOD et NCs-CTA, respectivement. Cette différence est associée aux conditions expérimentales utilisées et plus particulièrement à la quantité relative de stabilisant par rapport au PMMA lors de la préparation de ces NCs. Pour les NCs-DexN₃₋₂₀, le ratio massique DexN₃₋₂₀/PMMA est égal à 2,4, tandis que le ratio DexN₃₋₂₀/PMMA ou DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}/PMMA est de l'ordre de 0,16 pour les NCs-MOD et NCs-CTA. Ainsi, pour augmenter le Γ_{dex} de NCs-MOD et NCs-CTA, il serait sans doute nécessaire d'augmenter la quantité de stabilisant DexN_{3-τ} ou DexN_{3-τ}CTAγ de la formulation des miniémulsions. Cependant, augmenter la quantité des stabilisants pourrait favoriser dans ces conditions la nucléation homogène comme indiqué dans le Chapitre II (Paragraphe. 1.3.2.2), car le ratio massique stabilisant/phase organique serait alors supérieur à la valeur limite de 13 %m.

Finalement, si on compare les deux paramètres précédents (Γ_{dex} et Δ_{PZ}), deux remarques peuvent être faites :

- Bien que le taux de recouvrement des NCs-CTA soit légèrement plus important que celui de NCs-MOD, l'épaisseur du recouvrement de dextrane est la même pour les deux types des NCs. Notons qu'un Δ_{PZ} similaire de la couche polysaccharide avait déjà été observée au LCPM dans le cas de nanoparticules de polystyrène préparées par polymérisation radicalaire classique en miniémulsion, en présence de dérivés dextrane comportant des chaînes latérales hydrophobes de type phénoxy [10]. Alors que le taux de modification en groupements phénoxy, le ratio massique stabilisant/phase organique et le taux de recouvrement des objets finaux variaient de 15 à 28%, 0,015 à 0,15 %m. et 2 à 4,5 mg/m², respectivement, un Δ_{PZ} d'environ 5 nm avait toujours été obtenue pour ces nanoparticules de polystyrène. Il avait alors été proposé que ces dérivés amphiphiles du dextrane subissaient des réactions de transfert, via leurs fonctions OH résiduelles, lorsqu'ils étaient employés comme stabilisant d'une polymérisation en miniémulsion. Ces réactions de transfert conduiraient à la création de nouveaux points d'ancrage entre le dextrane et la surface des particules, ce qui expliquerait pourquoi Δ_{PZ} reste constant.
- Dans les cas de NCs-DexN₃₋₂₀, les valeurs Δ_{PZ} et Γ_{dex} reportées dans le Tableau II- 13 sont cohérentes avec celles obtenues précédemment au LCPM pour des NSs et NCs de PLA formulées par le procédé d'émulsion-évaporation de solvant en présence de dérivés amphiphiles DexN_{3- τ} [11]. Dans ce cas, la valeur plus importante de Δ_{PZ} (par rapport à celles de NCs-MOD et NCs-CTA) est probablement liée à la quantité plus élevée de dextrane en surface et au plus petit nombre de points d'ancrage (car absence d'ancrage covalent). Un effet d'encombrement stérique des chaînes de dextrane peut expliquer leur arrangement sous la forme de boucles plus longues et donc l'augmentation de l'épaisseur du recouvrement.

4. STABILITE COLLOIDALE DE NANO-OBJETS

Le recouvrement hydrophile et neutre de dextrane à la surface des NCs devrait d'une part assurer la stabilisation stérique de ces objets en dispersion colloïdale et d'autre part limiter l'adsorption en surface de certaines protéines circulantes dans le sang. D'ailleurs, après injection intraveineuse, l'équilibre d'adsorption des chaînes de dextrane à la surface des nano-objets peut être déplacé en milieu physiologique par adsorption compétitive d'autres molécules tensioactives. Ceci peut conduire à la perte de ce revêtement hydrophile par désorption, ce qui a

pour effet de favoriser la reconnaissance des objets par le système immunitaire voire de conduire à leur agrégation.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'étude de la stabilité colloïdale des NCs-MOD et NCs-CTA à différentes forces ioniques (dont celle du sang) mais aussi à la stabilité de leur recouvrement hydrophile en présence de SDS, employé ici comme tensioactif compétitif.

4.1. STABILITE COLLOÏDALE EN FONCTION DE LA FORCE IONIQUE.

Parmi les méthodes permettant d'évaluer la stabilité colloïdale des nano-objets, nous avons choisi la turbidimétrie. Grâce à cette technique, la variation de la taille des NCs étudiées et éventuellement leur floculation peut être évaluée en mesurant la densité optique des dispersions colloïdales par spectroscopie UV-Visible (entre 450 nm et 600 nm) [12]. La densité optique (DO) peut être ensuite reliée à la turbidité de la dispersion (voir partie III, paragraphe 6.5 pour plus de détails). Celle-ci a donc été suivie dans des solutions de NaCl à différentes forces ioniques (10^{-5} – 2 M) après 1 heure de mise en suspension à température ambiante.

La Figure II- 48 montre l'évolution du paramètre $|n|$ en fonction de la concentration saline des suspensions pour les NCs-MOD, NCs-CTA, NSs nues et NCs-DexN₃₋₂₀. $|n|$ est représentatif de la DO des suspensions et est inversement proportionnel à l'évolution de la taille de NCs : plus la taille des objets est grande, plus la valeur de $|n|$ diminue (voir Partie III, Paragraphe 6.5). $|n|$ constitue donc un indicateur de la stabilité colloïdale des objets. On constate que dans le cas de NCs-DexN₃₋₂₀, NCs-CTA et NCs-MOD, les suspensions sont stables ($|n|$ demeure constant) et aucune floculation n'est observée jusqu'à 2 M en NaCl après 1 heure en contact avec la solution saline. En revanche, une chute de $|n|$ est observée pour les NSs nues (non-recouvertes) à partir d'une concentration en NaCl de 10^{-4} M, ce qui correspond à une augmentation de la turbidité et donc à une floculation de ces objets. Cette perte de stabilité est associée à l'écrantage des charges négatives de la surface de PMMA et donc de la force de répulsion électrostatique par les charges du milieu lorsque la force ionique augmente. Dans le cas des NCs-DexN₃₋₂₀, NCs-MOD et NCs-CTA, une force de répulsion stérique supplémentaire vient s'ajouter à la force de répulsion électrostatique grâce à la présence de dextrane neutre à la surface des objets ce qui permet d'assurer une stabilité à la dispersion. Ce comportement a déjà été observé pour des NSs et NCs de PLA recouvertes de dextrane [11], [13] et permet de confirmer la présence du polysaccharide

en surface des objets. D'après ces résultats, les NCs-MOD et NCs-CTA devraient pouvoir être injectées dans le sang, dont la force ionique avoisine 0,15.

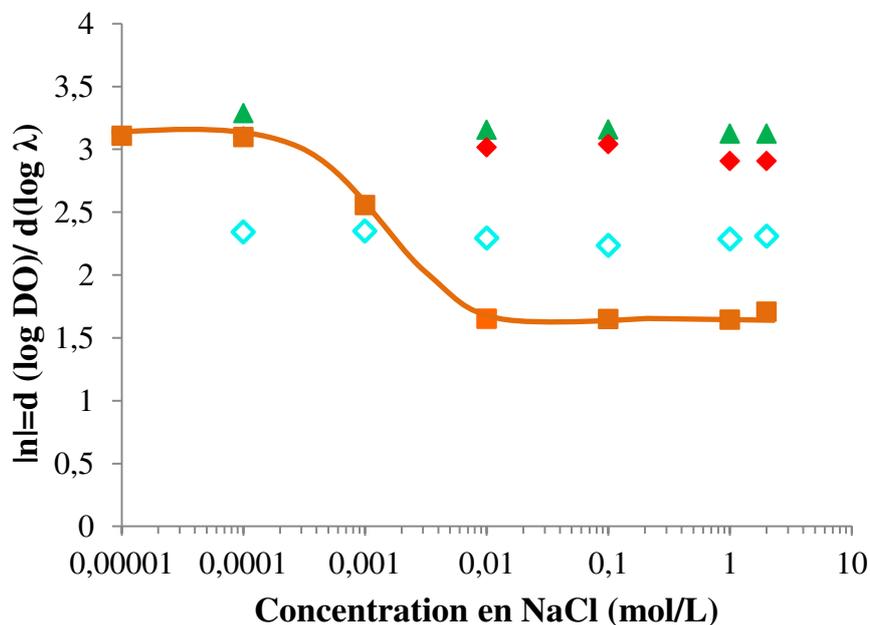


Figure II- 48 : Stabilité colloïdale de NCs en présence de NaCl. Cas des NPs préparées par polymérisation RAFT en miniémulsion : (▲) NCs-MOD et (◆) NCs-CTA, et par émulsion-évaporation de solvant : (■) NSs nues et (◇) NCs-DexN₃₋₂₀.

Les tests biologiques ayant été réalisés en milieu tampon PBS (0,148 M, pH = 7,4) et pouvant durer jusqu'à 24 heures (voir Chapitre IV), il était également important de vérifier la stabilité des NCs dans ce milieu salin sur une telle durée. La Figure II- 49 montre à la fois l'évolution du paramètre $|\eta|$ et l'évaluation visuelle de la stabilité colloïdale des NCs-MOD et NCs-CTA dans des tampons PBS (pH = 7,4) à différentes concentrations en sel ($1,48 \times 10^{-2}$, 0,148 et 1,48 M). Comme on peut clairement le voir, quelle que soit la concentration du milieu salin aucune floculation n'a eu lieu après 24 heures. Cette stabilité est également visible à l'œil nu.

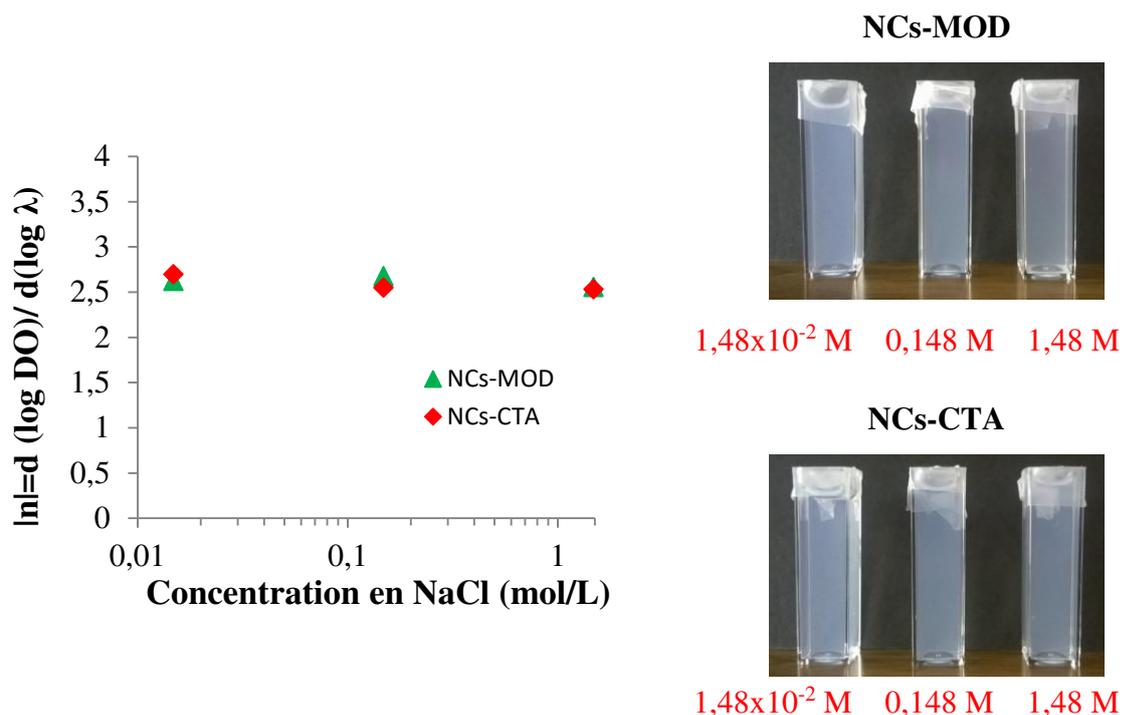


Figure II- 49 : Stabilité colloïdale de (▲) NCs-MOD et (◆) NCs-CTA en milieu tampon PBS à différentes concentrations en sel après 24 heures.

4.2. STABILITE DE LA COURONNE DE DEXTRANE EN PRESENCE DU SDS.

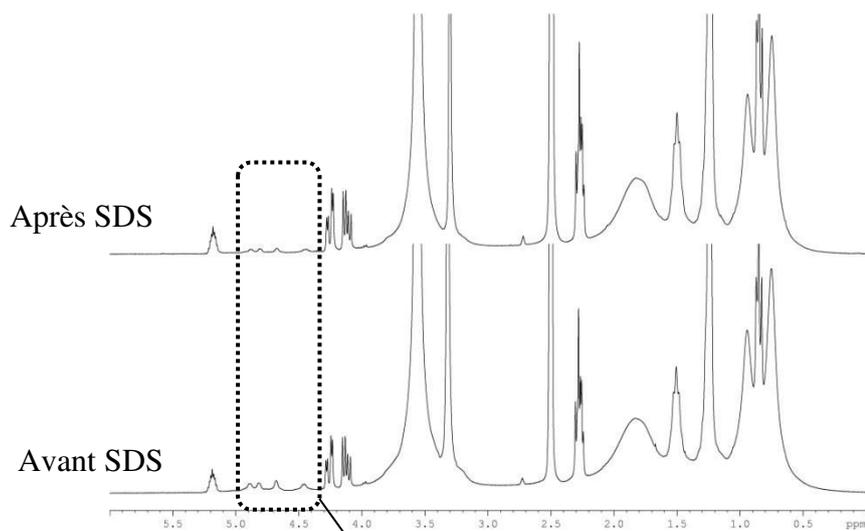
La stabilité des particules en présence d'un tensioactif compétitif a également été étudiée. Le SDS, tensioactif ionique, a déjà été utilisé dans la littérature pour la désorption des couches de polymère en surface [14], [15]. C'est pourquoi nous l'avons choisi. Après élaboration et lavage des objets, 1 %m. 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 amphiphile du dextrane ($\text{DexN}_{3-\tau}$ ou $\text{DexN}_{3-\tau}\text{CTA}\gamma$) désorbée est déterminée indirectement par RMN ^1H à partir des particules solubilisées dans le $\text{DMSO-}d_6$ grâce à l'équation III-10 (voir Partie III, Paragraphe 6.2.1), qui compare l'aire de pics des protons « -OH et H anomère » de l'unité glucopyranose du dextrane (entre 4,3 et 5,0 ppm) avant et après traitement avec du SDS. Les spectres des NCs-MOD et NCs-CTA sont présentés dans la Figure II- 50.

Dans le cas de NCs-MOD (a, Figure II- 50), on constate que la couche de DexN_{3-20} à la surface de ces NCs est instable en présence de SDS puisque 50% de ce stabilisant se désorbe après 24 heures de contact avec le SDS. Le SDS en raison de son affinité par la surface hydrophobe du PMMA déplace les chaînes de DexN_{3-20} par adsorption compétitive. Néanmoins, d'autres

travaux menées au LCPM sur des particules cœur PLA/couronne DexC₆ [16], cœur PLA/couronne DexN₃₋₇ [13] ou encore des NCs cœur M810/écorce PLA/couronne DexN₃₋₇ [11] avaient montré que la totalité de la couronne de dextrane se désorbait totalement en présence de SDS, dans les mêmes conditions expérimentales. Il est possible que dans le cas de NCs-MOD, une partie des groupements hydrophobes N₃ soit enchevêtrée plus profondément et de façon plus stable dans l'écorce de PMMA (que dans une écorce PLA) ce qui expliquerait qu'une partie du DexN₃₋₂₀ reste ancrée sur les NCs-MOD après contact avec du SDS. D'ailleurs, il est aussi probable qu'une partie du DexN₃₋₂₀ soit attachée de façon covalente au PMMA à cause des réactions secondaires entre les fonctions azoture du DexN₃₋₂₀ et le MMA ou des réactions de transfert impliquant les fonctions OH des unités glucopyranose du DexN₃₋₂₀ lors de la polymérisation, comme discuté plus haut (Paragraphe 3).

Enfin, on observe que dans le cas de NCs préparées en utilisant le transurf DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} (NCs-CTA) (b, Figure II- 50), le recouvrement de dextrane est beaucoup plus stable. Seulement 6% du dérivé dextrane initialement présent à la surface des objets se désorbe en présence de SDS. Dans ce cas, une grande proportion de dextrane est fixé de façon covalente par les greffons PMMA produits par la polymérisation RAFT et constituant l'écorce des NCs et ne peut se désorber. Cependant, il est probable que ce soient les rares chaînes de transurf adsorbées de façon physique à la surface des NCs-CTA qui soient éliminées. Ceci montre que la quasi-totalité de dextrane est immobilisé de façon covalente et irréversible à la surface des NCs-CTA alors produites. Pour rappel, ce recouvrement correspond à environ 90% du dextrane mise dans la phase aqueuse du départ. Ces résultats valident la méthode de préparation choisie (polymérisation RAFT en miniémulsion à partir d'un tensioactif réactif) pour la fabrication de NCs ayant une couronne hydrophile en polysaccharide fixée de façon permanente à leur surface. En effet, la fixation covalente de la couronne de dextrane permet d'assurer sa stabilité et aussi la stabilisation de tels nano-objets après 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 le chapitre suivant en étudiant l'interaction des différentes NPs produites avec certaines protéines plasmatiques.

a) NCs-MOD



b) NCs-CTA

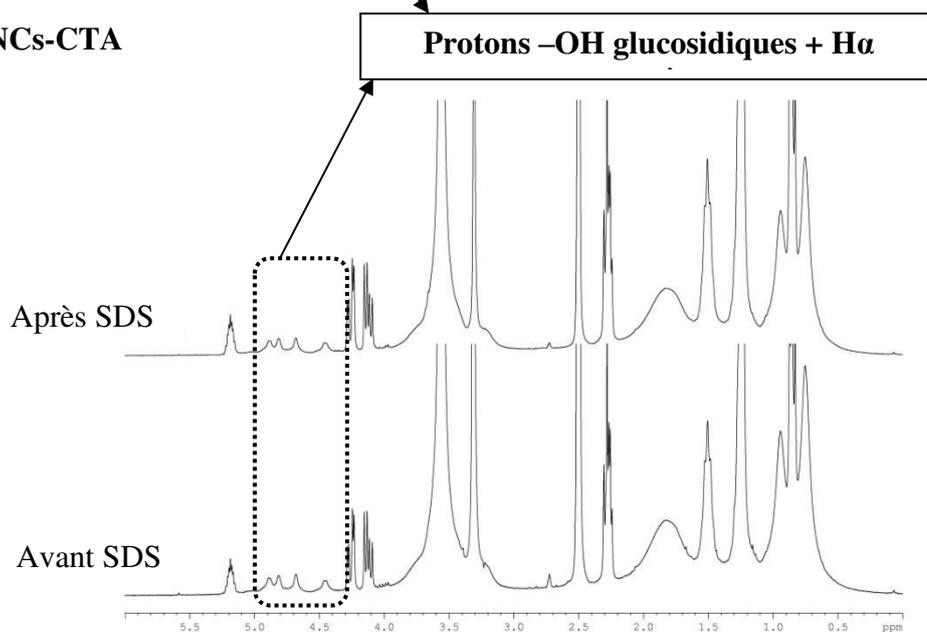


Figure II- 50 : Comparaison des spectres RMN ¹H dans le DMSO-*d*₆ des NCs étudiées avant et après traitement avec le SDS. Cas des NCs fabriquées par polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence du système modèle DexN₃₋₂₀/CPDB a) NCs-MOD et du transurf b) NCs-CTA.

5. MORPHOLOGIE DES NANO-OBJETS

5.1. ANALYSE THERMIQUE (MDSC)

Dans le Chapitre II de cette partie (Paragraphe 1.3.3), nous avons évalué la miscibilité du système PMMA/M810 par MDSC. Nous avons observé que lorsque le M810 est mélangé au PMMA à une teneur massique supérieure à 11 % m. deux phases coexistent, l'une contenant du M810 pur ($T_f = -4$ °C) et l'autre contenant du PMMA plastifié par le M810 ($T_g = 77$ °C). La T_g du PMMA pur avait également été évaluée à 108 °C.

Les NCs-MOD et NCs-CTA ayant été formulées avec une teneur massique en M810 de 21 % m. dans la phase organique (M810+MMA), la formation des deux phases précédentes est attendue. Pour le vérifier, les NCs-MOD et NCs-CTA ont été lyophilisées puis analysées par MDSC. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau II- 14.

Tableau II- 14 : Comparaison des résultats des analyses MDSC de NCs-MOD et NCs-CTA avec ceux du PMMA (8 300 g/mol), du M810 et de leurs mélanges.

| Echantillon | $F_{PMMA}^{(a)}$ | $F_{M810}^{(a)}$ | T_g (°C) | T_f (°C) |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------|------------|
| M810 | 0 | 100 | - | -4 |
| PMMA (8 300 g/mol) | 100 | 0 | 108 | - |
| PMMA (8 300 g/mol)/M810 | <89 | >11 | 77 | -4 |
| MOD | 79 | 21 | 92 | -4 |
| CTA | 78 | 22 | 98 | -5 |

(a) Fractions massiques

Les thermogrammes des NCs lyophilisées confirment bien la miscibilité partielle du système PMMA/M810. Cependant, les valeurs de T_g obtenues sont supérieures à celle du mélange PMMA (8 300 g/mol)/M810 à la même composition. Cette différence peut provenir de la masse molaire moyenne en nombre des chaînes PMMA constituant l'écorce de NCs-MOD et NCs-CTA (environ 55 000 g/mol). En effet, la T_g d'un polymère augmente avec sa masse molaire moyenne en nombre car la concentration en bouts de chaînes diminue. Dans le cas de NCs-CTA, le fait d'accrocher le PMMA au dextrane entraîne davantage une augmentation de la T_g par rapport au

NCs-MOD du fait de la moindre mobilité des chaînes PMMA dans les copolymères DexN₃-g-PMMA obtenus.

Pour conclure, les résultats MDSC confirment qu'il y a bien une ségrégation de phases entre les différents constituants de nos objets. Cette ségrégation devrait conduire, *a priori*, à l'obtention de la morphologie cœur-écorce désirée. Cependant, ces résultats étant que des preuves indirectes, nous avons également caractérisé les NCs par Microscopie Electronique à Transmission à basse température (Cryo-MET).

5.2. Cryo-MET

Pour obtenir une information supplémentaire sur la structure de NCs-MOD et NCs-CTA, nous avons effectué quelques observations de ces objets par Cryo-MET. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec Marc Schmutz et Dr. Meriem Er-Rafik de l'Institut Charles Sadron (ICS) à Strasbourg. La Figure II- 51 donne quelques exemples typiques des micrographies obtenues.

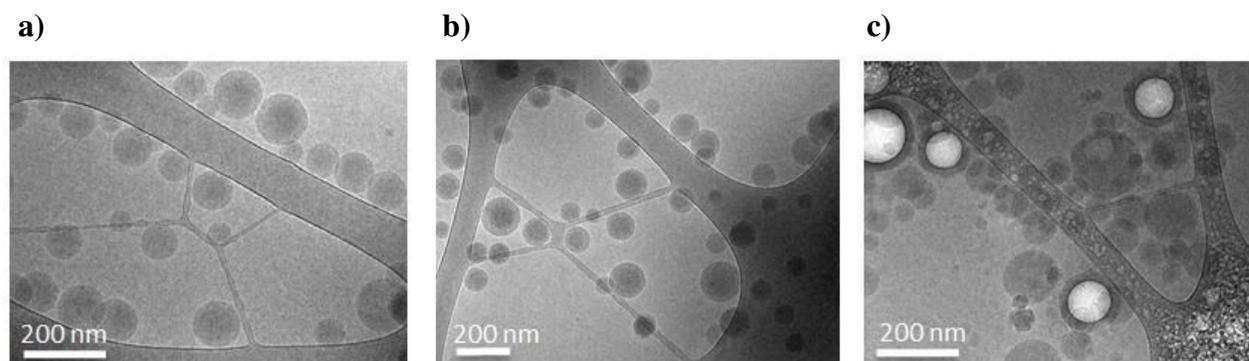


Figure II- 51 : Micrographies cryo-MET des NCs en suspension dans l'eau: a) NCs-MOD, b) NCs-CTA, c) NCs-CTA endommagées par irradiation.

Ces images montrent bien l'obtention de nano-objets sphériques et confirment les valeurs de diamètre moyen mesurées par granulométrie (110 nm et 102 nm pour NCs-MOD et NCs-CTA, respectivement, voir paragraphe 1). Néanmoins, le faible contraste entre l'huile (M810) et le polymère (PMMA) rend difficile la différenciation du cœur et de l'écorce de ces objets (Figure II- 51, a et b). Dans le cas de NCs-CTA, le cœur huileux n'a pu être observé que pour certains objets suite à la dégradation de l'écorce polymère par irradiation (Figure II- 51, c). La fragilité plus importante de l'écorce polymère des NCs-CTA par rapport aux NCs-MOD est probablement due à la présence d'une couche plus fine de PMMA dans le cas des NCs-CTA.

Par manque de temps et des résultats satisfaisants, nous n'avons pas poursuivi ces études. En revanche, des analyses de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS) ont été effectuées sur différents lots de NCs-MOD et NCs-CTA. Dans ce cas, le contraste entre le cœur huileux et l'écorce polymère de NCs a été modulé en dispersant les objets dans des mélanges H₂O/D₂O et en utilisant du monomère deutéré (MMA-*d*₈) pour fabriquer les NCs. Ces expériences ont eu lieu à l'institut Laue-Langevin (ILL) à Grenoble dans le cadre d'une collaboration avec Cécile Dreiss et Daniela Ridolfi (Institute of Pharmaceutical Science, King's College London) et Isabelle Grillo (ILL) dans le cadre d'un projet (ILL 9-10-1447). La modélisation des données obtenues, qui est en cours, devrait nous donner accès aux paramètres géométriques de nos NCs, notamment à l'épaisseur de l'écorce polymère.

6. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord caractérisé les NCs préparées par polymérisation RAFT en miniémulsion à partir du système modèle DexN₃₋₂₀/CPDB (NCs-MOD) et du transurf DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} (NCs-CTA) d'un point de vue physicochimique.

- Dans un premier temps, la stabilité de ces NCs dans les différentes conditions de stockage (dispersion colloïdale ou à l'état solide) a été étudiée. Les deux types d'objets restent stables sous forme dispersée pendant 5 semaines à 4 °C. Ces NCs peuvent être également lyophilisées en présence d'un cryoprotecteur et stockées sous forme de poudre. La redispersion s'effectue alors par sonication sans aucun changement de leur distribution de taille.
- Contrairement à des NSs de PMMA nues ou recouvertes de DexN₃₋₂₀, préparées par émulsion-évaporation de solvant, qui présentent une charge de surface négative, les NCs-MOD et NCs-CTA présentent un potentiel ζ positif à des faibles concentrations en NaCl. L'analyse de différents types d'objets a permis d'établir que cette charge positive provient très probablement des réactions secondaires entre les fonctions azoture des dérivés amphiphiles du dextrane (DexN_{3- τ} et DexN_{3- τ} CTA γ) et le MMA lors de la polymérisation. Malgré tout, la surface de deux types de nanocapsules (NCs-MOD et NCs-CTA) redevient pratiquement neutre à la force ionique du sang et une partie des fonctions azoture semble être toujours disponible pour la post-fonctionnalisation des NCs (voir chapitre suivant).

- A partir des résultats de potentiel ζ , il a été possible de calculer l'épaisseur du recouvrement en dextrane des NCs-MOD et NCs-CTA. Cette dernière est de 5 nm pour les deux types d'objets. La couronne de dextrane a été également caractérisée en termes de taux de recouvrement grâce à deux analyses complémentaires RMN ^1H et dosage des dérivés dextrane à l'anthrone. Les deux méthodes ont donné des valeurs de 1,2 et 1,8 mg/m^2 pour les NCs-MOD et NCs-CTA, respectivement. Ces taux de recouvrements, inférieurs à celui de NCs fabriquées par émulsion-évaporation de solvant, sont limités par le ratio stabilisant/PMMA utilisé dans la méthode de préparation des NCs.
- La présence d'une couronne de dextrane à la surface des NCs-MOD et NCs-CTA a été indirectement mise en évidence par l'amélioration de la stabilité colloïdale de ces objets en milieu salin (concentrations en NaCl variant entre 10^{-5} – 2 M) par rapport à des NCs non-recouvertes. De plus, aucune floculation de ces objets n'a été observée après 24 heures de mise en suspension dans des tampons PBS de différentes forces ioniques ($1,48 \times 10^{-2}$ - 1,48 M).
- La stabilité du recouvrement de dextrane en surface de NCs-MOD et NCs-CTA a été étudiée en présence de SDS comme tensioactif compétitif. Par comparaison des spectres RMN ^1H des objets avant et après traitement avec du SDS, la quantité de polysaccharide désorbée a pu être estimée. Dans le cas de NCs-MOD une désorption de 50% de dextrane a été observée tandis que dans le cas de NCs-CTA seulement 6% du dextrane a été éliminée par le SDS. Ces résultats montrent l'avantage d'une immobilisation covalente de la couronne de dextrane à la surface des NCs (par rapport à une simple adsorption physique). Cette liaison covalente entre le dextrane et l'écorce est rendue possible grâce à l'utilisation des macroagents RAFT DexN₃- τ CTA γ lors de la polymérisation.
- Des analyses MDSC des NCs-MOD et NCs-CTA confirment l'existence d'une ségrégation de phases entre les différents constituants de nos objets. Cette ségrégation devrait conduire, *a priori*, à l'obtention de la morphologie cœur-écorce désirée.
- Nous avons également caractérisé les NCs-MOD et NCs-CTA par Microscopie Electronique à Transmission à basse température (Cryo-MET). Néanmoins, en raison d'un manque de contraste suffisant entre le M810 et le PMMA cette technique n'a pas permis de bien caractériser la structure interne de ces objets. Des études complémentaires de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS), en cours d'analyse, devraient nous

permettre d'élucider les paramètres géométriques de nos objets et de confirmer leur morphologie cœur/écorce.

Ainsi, les NCs préparées en utilisant les transurfs DexN₃- τ CTA γ (NCs-CTA) remplissent un grand nombre des conditions nécessaires à leur administration par voie intraveineuse. En effet, elles sont stables en milieu salin dans un grand domaine de concentrations. Leur surface est peu chargée à la force ionique du sang et leur taille de l'ordre d'une centaine de nanomètres est suffisamment faible. La couronne de dextrane, ancrée de façon covalente à leur surface, est stable en présence d'autres molécules tensioactives et possède des fonctions azoture encore disponibles pour le greffage des différentes molécules en surface des objets. Dans le chapitre suivant, nous allons étudier le potentiel biomédical de ces NCs. L'extrapolation de la plateforme de ces nano-objets vers des NCs pH-sensibles, l'encapsulation et le suivi de la cinétique de libération d'un principe actif modèle, la post-fonctionnalisation des NCs par une molécule fluorescente et les premiers tests biologiques seront présentés.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. Laville, « Nanoparticules polymères de deuxième et troisième générations pour des applications thérapeutiques anti-cancer et anti-HIV ». **Thèse de doctorat**, Nancy : Université de Lorraine **2013**.
- [2] E. Mutschler, « Drug actions: basic principles and therapeutic aspects ». Stuttgart: Medpharm [u.a.], **1995**, 799p.
- [3] S. D. Shorvon, « Status epilepticus: its clinical features and treatment in children and adults ». Cambridge ; New York: Cambridge University Press, **1994**, 382p.
- [4] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, et H. Fessi, « Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58 (15), 1688-1713.
- [5] I. Y. Perevyazko, A. Vollrath, C. Pietsch, S. Schubert, G. M. Pavlov, et U. S. Schubert, « Nanoprecipitation of poly(methyl methacrylate)-based nanoparticles: Effect of the molar mass and polymer behavior », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2012**, 50 (14), 2906-2913.
- [6] A. Vollrath, D. Pretzel, C. Pietsch, I. Perevyazko, S. Schubert, G. M. Pavlov, et U. S. Schubert, « Preparation, Cellular Internalization, and Biocompatibility of Highly Fluorescent PMMA Nanoparticles », *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, 33 (20), 1791-1797.
- [7] P. E. Feuser, P. C. Gaspar, E. Ricci-Júnior, M. C. S. da Silva, M. Nele, C. Sayer, et P. H. H. de Araújo, « Synthesis and Characterization of Poly(Methyl Methacrylate) PMMA and Evaluation of Cytotoxicity for Biomedical Application », *Macromolecular Symposia* **2014**, 343 (1), 65-69.
- [8] V. Ladmiral, T. M. Legge, et Y. Zhao, « "Click" Chemistry and Radical Polymerization : Potential Loss of Orthogonality », *Macromolecules* **2008**, 41 (18), 6728-6732.
- [9] W. G. Eversole et W. W. Boardman, « The Effect of Electrostatic Forces on Electrokinetic Potentials », *The Journal of Chemical Physics* **1941**, 9 (11), 798, 1941.
- [10] E. Rotureau, E. Marie, M. Leonard, E. Dellacherie, T. A. Camesano, et A. Durand, « From polymeric surfactants to colloidal systems (2): Preparation of colloidal dispersions », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, 288 (1-3), p. 62-70.

- [11] K. Poltorak, A. Durand, M. Léonard, J.-L. Six, et C. Nouvel, « Interfacial click chemistry for improving both dextran shell density and stability of biocompatible nanocapsules », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2015**, 483, 8-17.
- [12] J. Long, D. W. Osmond, et B. Vincent, « The equilibrium aspects of weak flocculation », *Journal of Colloid and Interface Science* **1973**, 42 (3), 545-553.
- [13] M. Laville, J. Babin, I. Londono, M. Legros, C. Nouvel, A. Durand, R. Vanderesse, M. Leonard, et J.-L. Six, « Polysaccharide-covered nanoparticles with improved shell stability using click-chemistry strategies », *Carbohydrate Polymers* **2013**, 93 (2), 537-546.
- [14] B. Cattoz, T. Cosgrove, M. Crossman, et S. W. Prescott, « Surfactant-Mediated Desorption of Polymer from the Nanoparticle Interface », *Langmuir* **2012**, 28 (5), 2485-2492.
- [15] A. M. Blokhuis et K. Djurhuus, « Adsorption of poly(styrene sulfonate) of different molecular weights on α -alumina: Effect of added sodium dodecyl sulfate », *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 296 (1), 64-70.
- [16] C. Rouzes, M. Leonard, A. Durand, et E. Dellacherie, « Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, 32 (2), 125-135.

CHAPITRE IV

Potentiel biomédical des nano-objets

| | |
|--|------------|
| 1. PUBLICATION..... | 221 |
| 1.1. INTRODUCTION..... | 221 |
| 1.2. EXPERIMENTAL SECTION..... | 223 |
| 1.2.1. Materials and methods..... | 223 |
| 1.2.2. RAFT miniemulsion (co)polymerization | 224 |
| 1.2.3. Particle size..... | 224 |
| 1.2.4. Zeta potential measurements | 224 |
| 1.2.5. Swelling measurements | 224 |
| 1.2.6. Drug loading and in vitro release studies | 224 |
| 1.2.7. Reactivity with albumin | 225 |
| 1.2.8. Reactivity with fibrinogen..... | 225 |
| 1.2.9. Human monocytes culture..... | 225 |
| 1.2.10. Cytocompatibility of nanocapsules | 225 |
| 1.2.11. NCs surface post-functionalization | 226 |
| 1.2.12. Characterizations | 226 |
| 1.3. RESULTS AND DISCUSSION | 227 |
| 1.3.1. RAFT miniemulsion (co)polymerization | 228 |
| 1.3.2. NCs characterization | 232 |
| 1.3.2.1. Particle size | 232 |
| 1.3.2.2. Dextran coverage characterization | 232 |
| 1.3.2.3. NCs colloidal stability..... | 233 |
| 1.3.2.4. pH-sensitivity of COPO-NCs..... | 233 |
| 1.3.3. Biomedical potential..... | 235 |
| 1.3.3.1. Loading and release study of a model active substance | 235 |
| 1.3.3.2. Interaction with blood proteins | 237 |
| 1.3.3.3. NCs cytotoxicity | 238 |
| 1.3.3.4. NCs surface labeling | 239 |
| 1.4. CONCLUSIONS | 241 |
| 2. SUPPORTING INFORMATION..... | 243 |
| 3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE..... | 249 |
| 4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 252 |

CHAPITRE IV

Parmi les objectifs décrits au début de cette partie, nous avons proposé de faire évoluer la plateforme des NCs vers la fabrication de nano-objets stimulables permettant d'exploiter les particularités physiopathologiques des tumeurs. En effet, les NCs à écorce PMMA précédemment élaborées devraient permettre une vectorisation passive des anticancéreux, en passant entre les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux grâce à leur faible diamètre. Ainsi, ces NCs devraient s'accumuler dans la tumeur pour y libérer le médicament. Afin de rendre cette libération plus contrôlée et d'atteindre une vectorisation ciblée et plus spécifique, deux stratégies ont été testées :

- Le DEAEMA, un monomère cationique, a été incorporé avec le MMA dans l'écorce polymère des NCs. Ainsi, des objets potentiellement pH-sensibles peuvent être formulés. L'objectif est de tirer profit des variations locales de pH dans les tumeurs et de faciliter, à l'aide de ce caractère pH-sensible, la désintégration de l'objet, ou tout au moins la libération de la SA au voisinage des tumeurs.
- La possibilité d'une post-fonctionnalisation des NCs via les fonctions azoture présentes à leur surface a été mise en évidence en utilisant des molécules fluorescentes modèles à la place des ligands ou marqueurs de reconnaissance spécifiques aux cellules cancéreuses.

Ces deux stratégies ont été étudiées en fin de contrat doctoral. Aussi, nous ne montrerons ici que des travaux exploratoires démontrant la faisabilité de ces deux concepts sur la plateforme développée.

En plus de ces deux aspects, le potentiel biomédical des objets élaborés a également été évalué. Nous nous sommes particulièrement concentrés sur les objets fabriqués en présence du transurf et à base d'écorces PMMA ou pH-sensible. D'une part, des tests d'encapsulation et des essais de libération *in vitro* d'un principe actif modèle en fonction du pH seront présentés. D'autre part,

une collaboration avec l'équipe d'accueil CITHEFOR (Cibles thérapeutiques, formulation et expertise préclinique du médicament - EA 3452) de la Faculté de Pharmacie à Nancy, nous a permis de réaliser les premières études d'interactions de ces NCs avec les milieux biologiques. Ces expériences préliminaires ont consisté à étudier l'interaction des NCs avec certaines protéines plasmatiques, utilisées comme un premier indicateur de leur furtivité. Puis nous avons évalué la cytotoxicité des NCs en présence des monocytes sanguins humains (THP-1).

L'ensemble des résultats obtenus font l'objet d'une publication dont la première version est présentée dans les pages suivantes. Cet article sera publié à la suite d'une première publication (réf. 19). Cette dernière se focalisera sur l'homopolymérisation RAFT du MMA en miniémulsion menée en présence de l'agent RAFT modèle CPDB et des transurfs $\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{CTA}\gamma$ (résultats présentés dans les chapitres I et II de cette partie).

1. PUBLICATION

DEXTRAN-COVERED/pH-SENSITIVE NANOCAPSULES PRODUCED BY INTERFACIAL RAFT MINIEMULSION POLYMERIZATION

L. M. Forero, A. Boudier, C. Gaucher, J. Babin, A. Durand, J-L Six, C. Nouvel

1.1. INTRODUCTION

The design of nanoparticle-based platforms for anti-cancer drugs delivery has proven to be challenging as involving several physiological constraints [1], [2]. In particular, for parenteral administration, nanoparticles (NPs) are expected to: i) be stable in circulation, ii) have neutral and hydrophilic surface to minimize interaction with blood components iii) not accumulate in normal tissue, iv) not be cleared by the kidneys, v) have reduced toxicity and vi) provide controlled, sustained and specific drug release. In addition, for most NP platforms, the circulation time should be maximized to increase particles accumulation in the tumor through the Enhanced Permeability and Retention effect (EPR effect), commonly called passive targeting [3], [4]. Moreover, possible incorporation of ligands at NPs surface enables a specific targeting of pathological cells, usually called active targeting. In this respect, NPs having polysaccharide coverage are particularly interesting. In fact, polysaccharides possess many hydroxyl groups along their backbones, which can easily be functionalized by grafting ligands [5]. Furthermore, some polysaccharides such as dextran are nontoxic, hydrophilic, biocompatible and biodegradable, which make them suitable for biomedical applications [6].

Over the past decades, our team has been developing hydrophobized dextran derivatives with attractive surfactant properties [7], [8]. These derivatives which could be used as stabilizers for the production of polymer nanospheres (NSs) by various process: emulsion/evaporation [9], [10], nanoprecipitation [10], [11], and miniemulsion polymerization [12], [13]. In all cases, we succeeded in obtaining polymeric NSs with dextran coverage. Such a coverage ensured NSs colloidal stability in the presence of salts and was potentially preventing non-specific interaction with Bovine Serum Albumin (BSA) [14].

Compared to NSs, nanocapsules (NCs) core-shell morphology offers numerous advantages [15], [16], one of them being the possibility to modulate drug release by adjusting nature and thickness of polymeric shell. To control the morphology of such NCs we recently developed for

the first time various approaches using multifunctional reactive dextran surfactants associated either with an emulsion/solvent evaporation process [17] or a miniemulsion polymerization [18], [19].

Miniemulsion polymerization is a common and suitable one-step technique to produce NCs loaded with active substances. It has the advantage to produce a final dispersion of nano-objects, whose size-distribution is roughly a copy of the initial monomer emulsion [20]. This approach was recently studied for the first time with Activator Generated by Electron Transfer (AGET) Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) of butyl acrylate [21] and then of methyl methacrylate (MMA) [18], using a dextran-based inisurf both as stabilizer and as macroinitiator. Then, Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer (RAFT) polymerization of MMA was carried out using a multifunctional dextran-based transurf both as stabilizer and as macroRAFT agent, which led to dextran-covered PMMA NCs [19]. RAFT polymerization prevented the use of copper catalyst necessary for ATRP, thus leading to more suitable pharmaceutically acceptable carriers. Because of their amphiphilic character, both dextran-based surfactants (inisurf and transurf) were able to migrate at oil/water interface and to mediate there the polymerization from their reactive groups, so producing graft copolymers. Polymeric grafts constituting NCs internal shell were found to have well-defined macromolecular parameters. Altogether, these works showed the feasibility to produce dextran-covered NCs and the advantages of combining miniemulsion polymerization, reactive dextran surfactants and Reversible-Deactivation Radical Polymerizations (like AGET-ATRP or RAFT polymerization) to obtain well-defined NCs having irreversibly anchored dextran coverage. However an extrapolation of such objects for biomedical applications has not been already assessed. That's why we firstly focused the present work on pH-sensitive polymeric shell/ oily core NCs prepared by RAFT polymerization using a dextran-based transurf. Then the use of these NCs as drug delivery systems for parenteral administration was evaluated.

In recent years, the design of stimuli-responsive nanocarriers has attracted increasing attention because of their ability to control drug release in response to specific internal (temperature, pH, enzymes or redox gradients) or external stimuli (temperature, magnetic field, ultrasound intensity, light or electric pulses) [22]. PDEAEMA is a biocompatible weak polybase with a pKa of about 7.3 [23] already tested in pH-responsive systems. Thus the incorporation of DEAEEMA in NCs formulation was expected to confer pH-responsiveness to the polymeric shell in physiological pH range (4.5-7.4). Accordingly, this would in turn allow a pH-triggered release of drug content in the acidic tumor microenvironment or in the acidic intracellular compartments of

cancer cells [24]. In this regard, our previous studies on RAFT miniemulsion polymerization of MMA using a dextran-based transurf were extended here to the miniemulsion copolymerization of MMA with N,N-(diethylamino)ethyl methacrylate (DEAEMA) to produce dextran-covered NCs having a poly(MMA-co-DEAEMA) shell. To the best of our knowledge, most of the studies devoted to RAFT (co)polymerization of DEAEMA were carried out in homogeneous media using molecular RAFT agents [25]–[37]. There is only one work dealing with the styrene emulsion polymerization using a preformed DEAEMA-based macroRAFT agent [38]. Some studies reported the use of DEAEMA as monomer or comonomer in a free radical emulsion polymerization process [39]–[44], to mostly produce pH-sensitive nanogels. Herein and in an original way, we reported poly(MMA-co-DEAEMA)-based NCs preparation by RAFT polymerization carried out with a dextran-based transurf in heterogeneous conditions (miniemulsion polymerization).

Such poly(MMA-co-DEAEMA) NCs were compared to the previous PMMA NCs reported by some of us. Both objects were examined in terms of surface-charge, dextran coverage, colloidal stability, and physicochemical behavior under pH variations. The potential of such NCs to encapsulate and release hydrophobic substances was evidenced with a model fluorescent dye. In addition, investigation of NCs interactions with blood proteins and NCs cytotoxicity evaluation towards THP-1 cells was performed *in vitro*. Finally, fluorescent labeling of NCs was experienced to confirm the possible NC surface modification to selectively target of cancer cells.

1.2. EXPERIMENTAL SECTION

1.2.1. Materials and methods

Dextran T40 ($\overline{M}_n = 33\ 000$ g/mol, $\overline{D} = 1.37$; values determined by size exclusion chromatography coupled to a multi-angle laser light scattering detector in water (0.1M NaNO₃)) was purchased from Aldrich. Dextran was dried under reduced pressure at 100°C overnight for anthrone titration. Methyl methacrylate (MMA, 99% Aldrich) and N,N'-(diethylamino)ethyl methacrylate (DEAEMA, 99% Aldrich) were vacuum distilled on CaH₂. 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN, 99%, Aldrich) was purified by recrystallization from methanol. Miglyol®810 (M810, $d = 0.94$ g/cm³, viscosity = 28 mPa.s, water content: 0.02 wt%) was a gift from CREMER Oleo GmbH & Co. KG. 4-Carboxy-7-propargyloxy-coumarin (Cou-click) was prepared using literature procedures with slight modifications [45]. 7-Diethylamino-4-

methylcoumarin (Cou1, 99%-Aldrich- see Figure 4) and dibenzocyclooctyne-PEG4-Fluor545 (DBCO-PEG4-TAMRA, 90%-Aldrich) were used without further purification. Bovine Serum Albumin (BSA), fibrinogen from human plasma, RPMI 1640, fetal bovine serum, penicillin, streptomycin and amphotericin B, were all of analytic grade and purchased from Aldrich. Cell Proliferation Reagent 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (WST-1) was supplied by Roche.

Phosphate-buffered saline solution (PBS) was prepared as follows: $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 6.48 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1.47 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NaCl}] = 138 \times 10^{-3} \text{ M}$, and $[\text{KCl}] = 2.68 \times 10^{-3} \text{ M}$, final pH adjusted to 7.4. Ultrapure deionized water ($>18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) was used for the preparation of all solutions.

Dextran-based transurfs called $\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{CTA}\gamma$ were synthesized in two steps as previously described [10], [19] and used both as stabilizer and transurf agent. τ and γ were the number of N_3 -end alkyl chains (N_3) and of dithiobenzoate RAFT agent groups (CTA) introduced per 100 glucopyranose units, respectively.

1.2.2. RAFT miniemulsion (co)polymerization

Voir Partie III, Paragraphe 3.2.

1.2.3. Particle size

Voir Partie III, Paragraphe 6.3.

1.2.4. Zeta potential measurements

Voir Partie III, Paragraphe 6.4.

1.2.5. Swelling measurements

Voir Partie III, Paragraphe 6.7

1.2.6. Drug loading and in vitro release studies

Voir Partie III, Paragraphe 7.1

1.2.7. Reactivity with albumin

To evaluate the adsorption of proteins, NCs were dispersed in PBS (final concentrations ranging from $3.3 \cdot 10^{-8}$ to $3.3 \cdot 10^{-3}$ mg of polymer /mL), then incubated for 24 h with the albumin solution in PBS (at a final concentration of $0.53 \mu\text{M}$) at 37°C . Quenching of albumin fluorescence by NCs was monitored using a spectrofluorimeter (Hitachi F-2000, France) set at $\lambda_{\text{ex}} 280 \pm 10$ nm, $\lambda_{\text{em}} 350 \pm 10$ nm. Fluorescence intensities of the protein were recorded with (F) or without the NCs (F_0) as a function of the NCs concentrations. Three different batches of NCs, prepared under same polymerization conditions, were used in this study.

1.2.8. Reactivity with fibrinogen

NCs were diluted in PBS (final concentrations ranging from $3.3 \cdot 10^{-6}$ to $3.3 \cdot 10^{-3}$ mg of polymer per mL) and mixed with a fibrinogen solution (2 g/L in PBS), which was pre-warmed at 37°C for 10 min. After 2 h incubation at 37°C , the samples were centrifuged at $21,000 \text{ g}$ for 1 h. Then, $100 \mu\text{L}$ of supernatant was collected, diluted in PBS and protein quantification was performed using a microbicinchoninic acid test according to the manufacturer's specifications using a microplate reader (BioTeK EL 800). Three different batches of NCs, prepared under same polymerization conditions, were used in this study.

1.2.9. Human monocytes culture

Human non-adherent monocyte cell line, THP-1 (ATCC®, TIB-202™, Manassas, VA, USA) was grown in complete medium composed of RPMI 1640 medium supplemented with 10 % (V/V) of heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL of penicillin, $100 \mu\text{g/mL}$ of streptomycin, and $0.25 \mu\text{g/mL}$ of amphotericin B. Cells were grown at 37°C under 5 % CO_2 atmosphere and split every 3 days.

1.2.10. Cytocompatibility of nanocapsules

Cells were seeded in 96-well plates at $125 \cdot 10^3$ cells per cm^2 and allowed to grow during 24 h at 37°C . Then, $22 \mu\text{L}$ of NCs for final concentrations ranging from $3.3 \cdot 10^{-8}$ to $3.3 \cdot 10^{-3}$ mg of polymer/mL of suspension (or phosphate buffered saline (pH 7.4) for control) were added. After 24 h incubation at 37°C , the metabolic activity of cells was determined with WST-1 assays performed according to manufacturer's protocol (Roche). This assay is based on the cleavage of a tetrazolium salt by cell mitochondrial deshydrogenase. The absorbance of the produced formazan salt was measured at 450 nm with reference wavelength of 620 nm . Numbers of dead

and alive cells were also counted using the Trypan blue assay. Total cells count and percentage of viable and dead cells were determined with the automated cell counter (TC20, Biorad). Three different batches of NCs, prepared under same polymerization conditions, were used in this study.

1.2.11. NCs surface post-functionalization

Voir Partie III, Paragraphe 7.3.

Number of DBCO-PEG4-TAMRA molecules per NC was calculated as shown in S6 b.

1.2.12. Characterizations

^1H NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 apparatus (300.13 MHz, 25°C) in DMSO- d_6 .

SEC-MALLS analyses of PMMA and poly(MMA-co-DEAEMA) chains were performed in THF at 40°C using a Waters 515 HPLC pump equipped with a degazer, a temperature controller and three PLgel 5 μm columns (100 Å, 1000 Å and 10000 Å, columns (300 x 7.5 mm, P/N 1100-6350, Polymer laboratories)) at elution rate 1 mL/min. Two detectors were used online: a MALLS detector (Mini Dawn Treos Wyatt -Wyatt Technology Corporation) and differential refractometer (OPTI Lab rex Wyatt). Solutions (10 mg/mL) were prepared by dissolution in the eluent and were left under vigorous stirring for 24 h. Filtration of these solutions was carried out right before injection. Refractive index increments (dn/dc) of 0.087 mL.g $^{-1}$ and 0.10 mL.g $^{-1}$ were used for PMMA and PDEAEMA in THF, respectively. dn/dc of poly(MMA-co-DEAEMA) was estimated by calculation using dn/dc of each homopolymer weighted by the weight fractions of each comonomer in the copolymers.

Exact DexN $_3$ - τ CTA γ concentrations in aqueous solution were determined by the anthrone titration method [46]. Briefly, a known amount of polymer solution was added to 5 mL of anthrone aqueous solution (2 g/L of anthrone in a sulfuric acid solution, 8.4 N). The mixture was vigorously stirred during 40 min in a water bath at 80 °C. Then, the mixture was left coming back to room temperature for 1 h. The optical density of the solution was measured at 625 nm. A standard curve was previously established with the native dextran.

1.3. RESULTS AND DISCUSSION

Based on our previous researches [13], [18], [19], we selected Miglyol[®]810 (M810) as both co-stabilizer during the miniemulsion process and oily core of final NCs. M810 is a biocompatible triacylglycerol containing saturated fatty acids (mainly caprylic acid -69 wt%- and capric acid -30 wt%) and widely used in pharmaceutical formulations [47]. Furthermore, our objectives were to use DexN₃- τ CTA γ derivatives both as steric stabilizers and as macroRAFT agents during polymerization. As previously, we choose to introduce N₃-end alkyl chains (N₃) and dithiobenzoate groups (CTA) all long the dextran chains for several reasons. First of all, the surface activity of such DexN₃- τ CTA γ has already been shown to be sufficient enough to stabilize water/(MMA+M810) interfaces under polymerization conditions (i.e. 80 °C, 3 hours), when τ (number of alkyl chains per 100 glucopyranose units) was higher than 18% [19]. Secondly, azide functions (N₃) located at the end of alkyl chains may be available at the surface of final NCs for post-functionalization with the appropriate targeting ligands, thus extending the range of applications of these nanocarriers (e.g. diagnostics, cancer cells specific targeting...). Thirdly, dithiobenzoate RAFT agent groups (CTA) have also provided a good control of RAFT miniemulsion polymerization of MMA at water/(MMA+M810) interface [19]. By this way PMMA-grafted dextran copolymers were produced at the interface leading to dextran coverage/PMMA shell/oily core NCs having various M810 contents and a well-defined PMMA (i.e. $D < 1.2$) shell. We were expecting that these RAFT groups were also appropriate for RAFT miniemulsion copolymerization of MMA with DEAEMA. Indeed, RAFT homogeneous homopolymerization of DEAEMA has been successfully performed in ethanol [38], [48], or in 1,4-dioxane [26], [49] using 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate (CPADB) as molecular RAFT agent. In addition, RAFT copolymerizations of DEAEMA with dimethylaminoethyl methacrylate [36] or 2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate [26] have also been reported in 1,4-dioxane using 2-cyanoprop-2-yl dithiobenzoate (CPDB) and CPADB, respectively. Both CPDB and CPADB are dithiobenzoate molecular RAFT agents having a structure similar to the CTA groups of our dextran-based transurf. Based on our previous work [19] and to make reading this paper easier, we focused on DexN₃₋₂₀CTA_{3.7} transurf having 20 N₃-end alkyl chains and 3.7 RAFT groups per 100 glucopyranose units.

1.3.1. RAFT miniemulsion (co)polymerization

Miniemulsions were initially obtained by mixing monomer(s) (MMA or MMA/DEAEMA mixture) and M810 together with oil-soluble initiator AIBN, and then emulsifying the mixture in an aqueous solution containing 10 g/L of DexN₃₋₂₀CTA_{3.7}. DexN₃₋₂₀CTA_{3.7} as stabilizer was initially adsorbed at the (monomer(s)+M810)/water interface. As macroRAFT agent, its CTA sites mediated RAFT polymerization, producing polymeric grafts anchored to dextran chains via the R-group approach. At the end, NCs having covalently linked dextran outer surface to the polymeric shell were formulated. In the initial miniemulsion monomer(s) were miscible with M810 but phase separation occurred during polymerization because of the immiscibility of (co)polymer grafts with M810 (Figure 1). Herein, a large amount of M810 (about 25-30% v/v to monomers) was used to favor core-shell structure. Indeed, M810 segregation was evidenced by the presence of M810 fusion pic at about -4 °C on Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) thermograms of final nano-objects. Depending on miniemulsion recipe, the M810 oily core was surrounded by either a PMMA (Run 1, Table 1) or a poly(MMA-co-DEAEMA) (Run 2, Table 1) shell after polymerization. These objects were named PMMA-NCs and COPO-NCs, correspondingly.

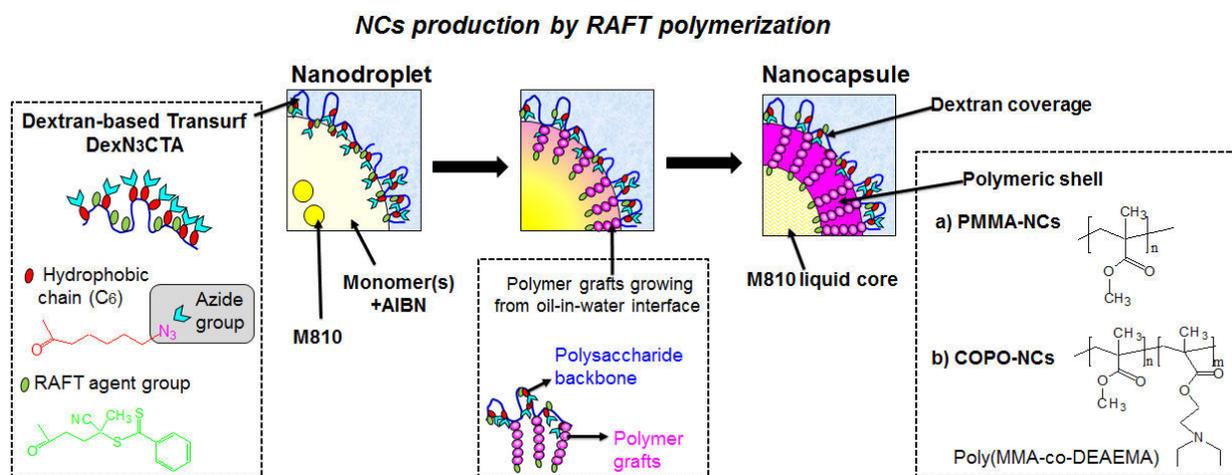


Figure 1. Preparation of dextran-covered PMMA-NCs and COPO-NCs by RAFT miniemulsion polymerization using a dextran-based (DexN₃CTA) transurf.

The amount of DexN₃₋₂₀CTA_{3.7} adsorbed/linked at NCs surface was indirectly deduced by titration of the surfactant remaining in the aqueous phase after particle removal, following the anthrone method, and expressed as a percentage of the initially introduced amount. We assumed here that this amount corresponded to the DexN₃₋₂₀CTA_{3.7} initially adsorbed at the monomer

Table 1. RAFT homopolymerization (MMA) and copolymerization (MMA/DEAEMA) carried out from DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} in miniemulsion: grafts characterization, loading efficiency and NCs size.

| Run | NCs | Conv (%) ^(a) | Cou1 EE (%) ^(b) | Cou1 load (wt%) ^(c) | Final NPs diameter (nm) ^(d) | F _{DEAEMA} | | $\bar{M}_{n Th}^{(f)}$ (g/mol) | dn/dc ^(g) | $\bar{M}_{n exp}^{(h)}$ (g/mol) | D ^(h) |
|-----|------|-------------------------|----------------------------|--------------------------------|--|---------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------------|------------------|
| | | | | | | In feed | In polymer ^(e) | | | | |
| 1 | PMMA | 86 | - | - | 109 (1.30) | 0 | 0 | 33 400 | 0.087 | 54 700 | 1,16 |
| 2 | COPO | 75 | - | - | 125 (3.46) | 0.66 | 0.75 | 25 400 | 0.097 | 41 400 | 1.09 |
| 3 | PMMA | 85 | 99 | 1.4 | 112 (1.60) | 0 | 0 | 33 800 | 0.087 | 52 700 | 1.35 |
| 4 | PMMA | 90 | 99 | 1.4 | 105 (1.50) | 0 | 0 | 35 400 | 0.087 | 54 500 | 1.18 |
| 5 | COPO | 78 | 99 | 1.7 | 125 (3.50) | 0.66 | 0.79 | 26 700 | 0.097 | 43 100 | 1.08 |

All experiments were carried out at 80 °C, 3 h, [DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}] = 10 g/L. [MMA]_o/[DEAEMA]_o/[CTA]_o/[AIBN]_o molar ratios in initial nanodroplets were equal to 393/0/1/0.3 and 115/120/1/0.3 for PMMA-NCs and COPO-NCs, respectively. M810/monomers ratio was equal to 25 vol% and 30 vol% for PMMA-NCs and COPO-NCs, respectively. For runs 3-5, Cou1 was added into the organic phase at 76 mg per mL of M810.

(a) Monomer(s) conversion estimated by gravimetry.

(b) Cou1 loading efficiency determined by fluorescence quantification of Cou1 lost in the aqueous phase during encapsulation process. Verified by NMR ¹H spectrum of NCs in case of PMMA.

(c) Weight content of Cou1 inside NCs.

(d) Final nanoparticles diameter. Values under brackets correspond to Span (see experimental part).

(e) DEAEMA weight fraction in polymer grafts calculated from ¹H NMR spectrum of extracted free poly(MMA-co-DEAEMA).

(f) Theoretical molecular weight of grafts based on conversion and estimated by the following equation: $\bar{M}_{n Th} = \frac{[MMA]_0}{[CTA]_0} M_{MMA} x_{MMA} + \frac{[DEAEMA]_0}{[CTA]_0} M_{DEAEMA} x_{DEAEMA}$, where x_{MMA} and x_{DEAEMA} are monomer conversions.

(g) dn/dc value of Poly (MMA-co-DEAEMA) in THF was estimated by the following equation $(dn/dc)_{copolymer} = F_{PDEAEMA} (dn/dc)_{PDEAEMA} + (1 - F_{PDEAEMA}) (dn/dc)_{PMMA}$, where $(dn/dc)_{PDEAEMA} = 0.10$ and $(dn/dc)_{PMMA} = 0.087$.

(h) Evaluated by SEC-MALLS in THF of free PMMA or poly(MMA-co-DEAEMA) chains extracted with THF from the final particles, with dn/dc calculated in (g).

droplet interface as it became quickly irreversibly anchored at the interface thanks to the polymer grafts propagation. 94% and 90% of the transurf was found to be located at the interface of MMA and MMA/DEAEMA miniemulsions respectively, which is perfectly coherent with our previous results [18], [19]. These high values helped to prevent homogenous nucleation during the process which is convenient to control NCs morphology. Knowing the amount of transurf at nanodroplets interface as well as the total amount of monomer(s) in the system, it was possible to calculate the initial $[\text{DEAEMA}]_0/[\text{CTA}]_0$ and/or $[\text{MMA}]_0/[\text{CTA}]_0$ molar ratios at droplet interface. In the case of MMA homopolymerization, $[\text{MMA}]_0/[\text{CTA}]_0/[\text{AIBN}]_0$ was chosen equal to 393/1/0.3 as polymerization control was already optimized with such conditions [19]. Compared to MMA, DEAEMA has lower water solubility in basic medium because of its protonable amine groups ($\text{pK}_a = 8.6$) [50]. However, ester linkages between both hydrophobic or RAFT agent groups and dextran are prone to undergo hydrolysis in such basic conditions. Consequently, we imagined the polymerization could not be carried out in basic media ensuring the hydrophobicity of DEAEMA. To confirm this hypothesis, a preliminary assay was performed with a DexN₃₋₂₀ (dextran derivative bearing 20 N₃-end alkyl chains per 100 glucopyranose units and no reactive groups). After 3 hours of stirring at 80 °C in aqueous basic media (pH 10), only 25% of hydrophobic groups remained attached to dextran. As a result, in this last case, surfactant properties of dextran derivatives were diminished and miniemulsion stability was lost during polymerization. Miniemulsion copolymerization was therefore carried out in pure water and an excess of DEAEMA was added to compensate the amount of monomer remaining in the aqueous phase (DEAEMA water solubility was estimated at 67 g/L). $[\text{MMA}]_0/[\text{DEAEMA}]_0/[\text{CTA}]_0/[\text{AIBN}]_0$ molar ratios in initial nanodroplets were equal to 115/120/1/0.3.

According to RAFT mechanism [51], grafts growing from CTA groups of DexN₃₋₂₀CTA_{3.7} at nanodroplets/nanoparticles interface are in a dynamic equilibrium with the non-grafted chains (also called free chains) issued from AIBN-derived radicals and propagating inside the droplets, as we previously reported in the case of MMA RAFT polymerization using DexN_{3-τ}CTA_γ transurfs [19]. These free chains have similar composition and length than the grafts linked to dextran. Therefore, the low amount of free chains formed in the organic phase could be used to approximate molecular weight, molecular weight distribution and composition of grafted polymers. Figure 2 shows SEC traces of free PMMA and poly(MMA-co-DEAEMA) chains extracted with THF from the polymerization mixtures at high conversion.

The monomodal and very narrow molecular weight distributions observed are further evidences for control of the RAFT polymerization (Figure 2, Table 1). In the case of COPO-NCs, both monomers MMA and DEAEMA were expected to be statistically distributed along the polymeric chains as indicated by reactivity ratios obtained for free radical bulk copolymerizations performed at 60°C ($r_{\text{DEAEMA}}=1.27$ and $r_{\text{MMA}}=0.89$) [52]. DEAEMA content of our poly(MMA-co-DEAEMA) was estimated from free copolymers using ^1H NMR spectroscopy (see S1 p. 243). DEAEMA weight fraction (F_{DEAEMA}) could be evaluated at 0.75 at a global conversion of 75%. Thanks to this value, the dn/dc of the copolymer could be calculated and subsequently its average molar mass was evaluated by SEC-MALLS (see Table 1). For both PMMA and poly(MMA-co-DEAEMA) experimental molar masses ($\bar{M}_{n \text{ exp}}$) were much higher compared to theoretical ones ($\bar{M}_{n \text{ th}}$). As previously reported in case of MMA [19], the poor accessibility of some CTA groups towards organic phase reduces their efficiency, thus increasing the degree of polymerization of grafts at the same conversion. For MMA RAFT polymerization using DexN₃₋₂₀CTA_{3.7} as transurf, the efficiency of reactive groups was formerly estimated at 50% [19]. This efficiency seemed to be comparable in the case of MMA/DEAEMA copolymerization.

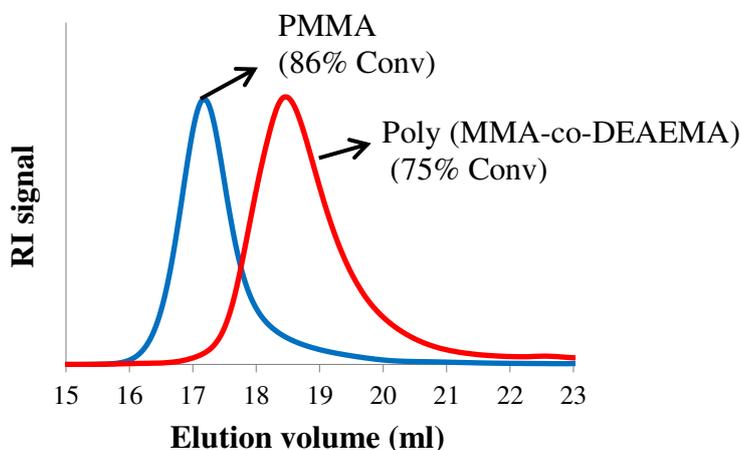


Figure 2. Preparation of dextran-covered PMMA-NCs and COPO-NCs by RAFT miniemulsion polymerization using a dextran-based (DexN₃CTA) transurf.

The MDSC analysis of COPO-NCs purified from both free chains and M810 (see S2, p. 244) was another proof of effective polymeric grafting from dextran as only one T_g is observed at 25 °C. Homopolymers free chains formation would have given a T_g of 108 °C for PMMA and 19 °C for PDEAEMA [43]. In conclusion, these first assays confirmed the possibility to mediate RAFT miniemulsion copolymerization of MMA with DEAEMA from a multifunctional

polysaccharide transurf in order to prepare dextran-covered NCs with a poly(MMA-co-DEAEMA) internal shell, which is potentially pH-responsive.

1.3.2. NCs characterization

1.3.2.1. Particle size

Whatever the run (Table 1), final nanoparticles diameters were quite similar to those of corresponding initial nanodroplets as expected in miniemulsion polymerization. COPO-NCs final size (about 125 nm) was slightly higher than PMMA-NCs one (about 109 nm) in agreement with the less hydrophobic poly(MMA-co-DEAEMA) than PMMA shell. In addition, size distribution was narrow for PMMA-NCs whereas a small aggregate was visible for COPO-NCs (see S3, p. 244) in agreement with Span values reported in Table 1. DEAEMA/MMA miniemulsions seem to be slightly less stable than MMA ones. All these differences can be ascribed to the unlike composition of initial organic phase as DEAEMA is more polar and highly soluble in aqueous continuous phase.

1.3.2.2. Dextran coverage characterization

Evaluation of NCs zeta potential as a function of ionic strength allowed us to evidence the presence of a dextran outer shell onto NCs surface and to estimate its thickness (Δ_{PZ}). Δ_{PZ} has been evaluated at 5 nm for both PMMA-NCs and COPO-NCs using Eversole and Boardman equation [53] as already reported by some of us [10], [17]. Moreover, a very low zeta potential value (i.e. an almost neutral surface) was observed for both kinds of particles at the ionic concentration of human blood plasma (0.148 M). One can estimate the quantity of dextran per particle surface unit (Γ_{dex}) from the amount of adsorbed dextran (see section 1.3.1) and the particles diameter. Γ_{dex} was evaluated equal to 1.8 mg/m² and 2.5 mg/m² for PMMA-NCs and COPO-NCs, respectively. These values are in good agreement with our previous results on adsorption of hydrophobized dextran derivatives on polylactide NPs surface, when used as stabilizers during emulsion- solvent evaporation process [10].

Surfactant-mediated desorption of polymeric layers adsorbed onto a solid surface has already been reported in the literature [10], [17], [54]. Therefore dextran shell anchorage was also investigated in the case of PMMA-NCs using a drastic anionic surfactant, sodium dodecyl sulfate (SDS). After 1 day contact with 1 wt% SDS solution, nanoparticles were washed several

times, freeze-dried and dissolved in DMSO- d_6 for ^1H NMR characterization. As expected, no significant desorption of dextran layer was observed for PMMA-NCs (see S4, p. 245), which proved the covalent linkage between dextran chains and PMMA shell (via their CTA groups) and thus their irreversibly anchorage to NCs surface due to the RAFT polymerization using such DexN₃- τ CTA γ transurfs in miniemulsion process. Consequently, this should favor the stability of dextran coverage upon intravenous injection as circulating proteins like opsonins could act as SDS.

1.3.2.3. NCs colloidal stability

The colloidal stability of NCs in the presence of salt is really a concern when the transport of nano-objects through biological fluids is aimed [2]. This stability has been examined by turbidimetry in water solutions at various ionic strengths (ranging from 10^{-5} to 2 mol/L). NCs concentration was fixed to 0.5 g/L to get measurable optical densities. Good colloidal stability was observed over the whole NaCl concentration range for both PMMA-NCs and COPO-NCs. For comparison, uncoated PMMA NSs were no longer stable above 10^{-2} M and aggregation was evidenced by a decrease in the straight line slope of $\log(\text{optical density})$ versus $\log(\text{wavelength})$ ($d(\log\text{OD}/d\lambda)$ -see S5, p. 246). Lack of both steric stabilization and screening of residual surface charges by increasing of electrolyte concentration caused destabilization of this system. Conversely, good results obtained in PMMA-NCs and COPO-NCs were a further evidence of the presence of a dextran shell at the surface of these nano-objects. Besides, in such cases, this hydrophilic outer shell was dense enough to prevent NCs aggregation by means of steric stabilization, even at high salt concentration. Thus both PMMA-NCs and COPO-NCs should display a convenient stability in physiological media as the ionic strength of human blood is about 0.148 M.

1.3.2.4. pH-sensitivity of COPO-NCs

Because of their high glycolytic rates, cancer cells exhibit an acidic environment whereas normal blood pH remains constant at 7.4 [24]. Measured pH values of solid tumors are about 6.5 in the extracellular environment, or even lower in the intracellular organelles such as endosomes (pH between 5 and 6) and lysosomes (pH around 4.5) [24], [55], [56]. Therefore an ideal drug pH-sensitive nanocarrier is expected to protect and keep the drug at normal pH and release it under weakly acidic conditions [57].

With the aim of studying the response of PMMA-NCs and COPO-NCs to pH variations, the hydrodynamic diameters of these particles at different pH values were measured at 25 °C by dynamic light scattering (DLS). In order to be as close as possible to real physiological conditions, PMMA-NCs and COPO-NCs were dispersed in phosphate buffered saline (PBS) at the ionic strength of human blood (0.148 M). In both cases, pH was first set in the basic range (9-10) adding NaOH and progressively decreased down with HCl. Results are summarized in Figure 3. Since DLS measurements are based on scattering intensity and intensity distribution emphasize aggregates, a bigger size was obtained for COPO-NCs (180 nm) compared to those previously measured by granulometry (125 nm).

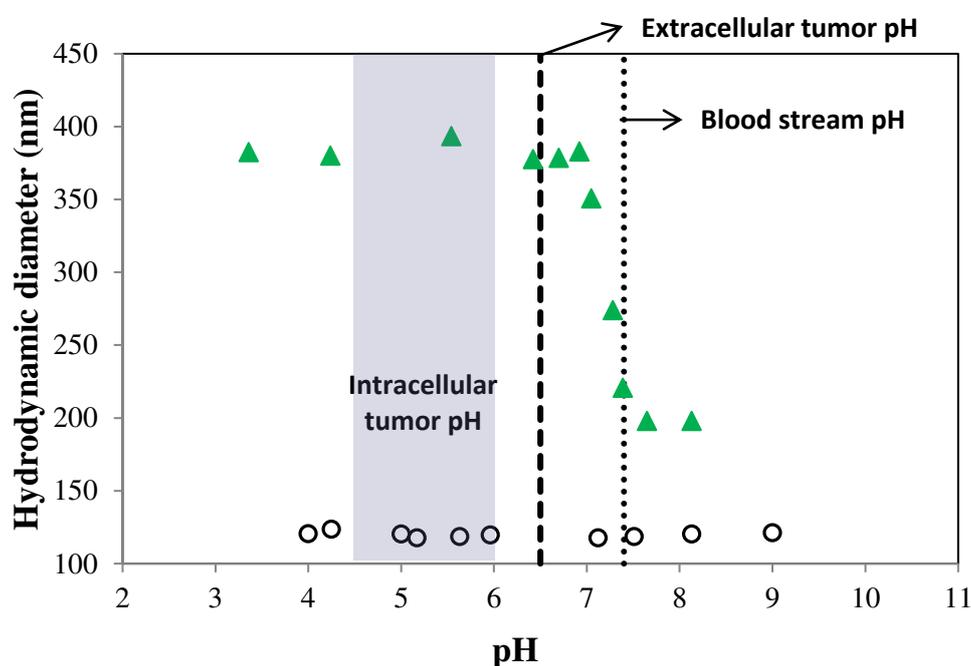


Figure 3. pH-responsive swelling of NCs. Average hydrodynamic particle diameter (determined by DLS) as a function of pH at 25 °C: (○) PMMA-NCs (PBS-0.148M) and COPO-NCs (▲) in water and PBS-0.148M.

As expected, PMMA-NCs exhibited no swelling in aqueous PBS buffers having pH from 3 to 9. To the contrary, COPO-NCs exhibited a 2-fold change in diameter in PBS buffer by changing the pH from the blood stream (pH = 7.4) to the internal tumor cells (pH from 4 to 6). Based on this diameter variation, a volume increase of about 10 times could be estimated. This transition resulted from protonation (in acidic media) or deprotonation (in basic media) of the amine groups of DEAEMA units in the grafts constituting the polymeric shell [44]. Electrostatic repulsions between protonated groups resulted in swelling of NCs shell. Swelling transition was detected at pH ~ 7.4 in PBS (0.148 M). This pH value corresponding to the volume phase

transition pH (commonly known as VPTpH). According to these results, pH-sensitive COPO-NCs are potentially interesting drug delivery systems for *in vivo* cancer therapy and after optimization of poly(MMA-co-DEAEMA) shell composition to reach VPTpH around 6.5 are expected to give a low premature drug release during blood circulation and a rapid drug discharge after reaching tumor tissues.

1.3.3. Biomedical potential

1.3.3.1. Loading and release study of a model active substance

In order to study pH-responsive drug release properties of PMMA-NCs and COPO-NCs, a fluorescent dye 7-diethylamino-4-methylcoumarin (Cou1) was chosen as model of active substance. In a typical loading experiment, Cou1 was added into the organic phase at a constant concentration (76 mg per mL of M810), which was below the maximum solubility of Cou1 in this oil (estimated at 92 mg/mL). Cou1 encapsulation and NCs preparation were achieved in one-pot during the miniemulsion polymerization process described earlier. As shown in Table 1, Cou1 could be efficiently loaded into both PMMA-NCs (Runs 3 and 4, Table 1) and COPO-NCs (Run 5, Table 1) with high encapsulation efficiency (99%). Cou1 loading was found to be 14 mg/g of PMMA-NCs (1.4 wt%) and 17 mg/g of COPO-NCs (1.7 wt%) as shown in Table 1. The efficient Cou1 encapsulation was most likely due to its very low solubility in water (estimated at 0.026 mg/ml by fluorescence spectroscopy) that limited its diffusion into the aqueous phase during polymerization or washing steps. Nanoparticles final sizes as well as polymer shell macromolecular parameters were similar with those observed for non-loaded PMMA-NCs (Runs 3 and 4 vs Run 1, Table 1) and COPO-NCs (Run 5 vs Run 2, Table 1). This suggested that Cou1 has no influence on RAFT polymerization nor on miniemulsion stability.

The pH-dependent release profile of Cou1 from PMMA-NCs has been firstly investigated *in vitro* by monitoring Cou1 release in PBS (0.148 M) under physiological (pH = 7.4) and acidic conditions (pH = 4.0) (Figure 4). Cou1 solubility in PBS was evaluated by fluorescence spectroscopy to be about 0.023 mg/mL and 0.031 mg/mL at pH 7.4 and 4, respectively. Cou1-loaded NCs concentration in release media was in consequence fixed to about 100 mg NPs/L in order to assure perfect sink conditions (i.e. Cou1 was present for less than 10 % of its maximum solubility in the release media). Release studies were performed in a batch sealed system maintained at 37 °C and samples were taken at different times without refreshing of dissolution

medium. The relative amount of released Cou1 was estimated by fluorescence spectroscopy of the dissolution media after particle removal.

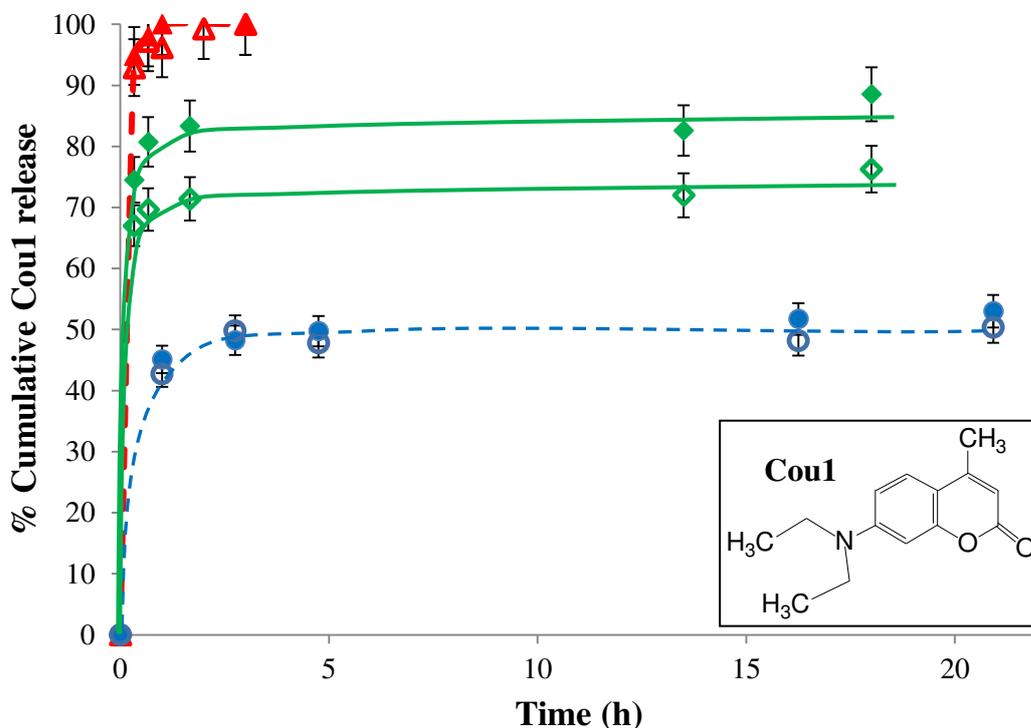


Figure 4. pH-triggered release of Cou1 at 37°C from PMMA-NCs in (●) PBS (Run 3, Table 1) or (▲) PBS/SDS (Run 4, Table 1) and from COPO-NCs in (◆) PBS (Run 5, Table 1). Full symbols (pH = 4.0) and open symbols (pH= 7.4).

Whatever the pH value (4 or 7.4), only 50% of Cou1 was released from PMMA-NCs (Run 3, Table 1) in PBS buffer within the first half hour and no further release was observed after next 22 hours. This supported the fact that PMMA-NCs are stable under acidic conditions with no influence of pH. Furthermore, since Cou1 solubility was not highly sensitive to pH, similar release profiles were expected at both pH conditions. Two more release tests were then performed with Cou1-loaded PMMA-NCs (Run 4, Table 1) in PBS buffer containing 1 wt% of SDS (PBS/SDS) as release medium. SDS was added above its critical micelle concentration (CMC~0.23wt% in water and ~0.06wt% in PBS (0,05M pH = 7,0)) [59] to ensure the formation of surfactant micelles able to further solubilize Cou1. When compared to the PBS solution and whatever the pH value, PBS/SDS micellar solution resulted in an 80-fold increase of Cou1 solubility (estimated by fluorescence spectroscopy at about 2.0 mg/mL and 2.3 mg/mL at pH 7.4 and 4, respectively). Cou1 release was therefore favored in these last conditions and completely achieved within 1 hour independently of the pH of the dissolution media (Figure 4). This proved that the previous partial release of Cou1 in PBS (Run 3, Table 1) was not due to secondary

reactions that would happen during polymerization and would have link Cou1 and polymer shell together thus preventing the effective and total Cou1 delivery. Indeed, when comparing these last results (in PBS/SDS) with former ones (PBS), Cou1 release seemed to be mainly driven by its partition coefficient between the oily core and the aqueous external media rather than by its diffusion through the polymeric membrane shell as it should be expected for sink conditions.

Regarding COPO-NCs (Run 5, table 1), similar Cou1 delivery profiles were obtained at both pH in PBS buffer but Cou1 release was increased (12% net difference) in acidic media (Figure 4). These results were consistent with the previous pH-response studies (see section 1.3.2.4) wherein the maximal swelling ratio of COPO-NCs was found for pH values below 6, while collapsed state was observed at pH 7.4 (value near the VPTpH). Consequently, Cou1 dissolution into the aqueous media was thus enhanced in acidic conditions by the hydration of poly(MMA-co-DEAEMA) shell and its increased permeability.

When comparing PMMA-NCs (Run 3, Table 1) and COPO-NCs (Run 5, Table 1) release studies in PBS buffer at physiological pH (7.4), the release rate of Cou1 was faster through poly(MMA-co-DEAEMA) shell with 70% of Cou1 being delivered within half an hour whereas 50% was only released from PMMA-NCs in the same time. This difference probably arised from the unlike chemical nature of NCs internal shell but certainly more from morphological differences between both NCs types: at physiological normal pH, COPO-NCs were slightly swollen compared to PMMA-NCs as shown in Figure 3 thereby further enhancing Cou1 diffusivity.

In summary, these studies have demonstrated the potential of PMMA-NCs and COPO-NCs to be use as reservoirs of hydrophobic drugs. Despite, some optimization may be required to get a well-controlled and sustained drug release under physiological ionic strength and pH variations (i.e. drug retention in blood circulation and release in tumor cells). Varying DEAEMA content and/or crosslinking of poly(MMA-co-DEAEMA) shell in COPO-NCs could be suitable approaches for fine-tuning of their pH-sensitive properties (i.e. swelling ratio and VPTpH) and for decreasing premature load release.

1.3.3.2. Interaction with blood proteins

It's well known that interaction of nanoparticles with blood components (i.e blood cells, proteins, lipoproteins...) may modify nanoparticles surface properties and determine their *in vivo* outcome [60]. As first assessment, PMMA-NCs and COPO-NCs interactions with blood proteins were studied to check whether albumin (the most important plasmatic protein in quantity) and

fibrinogen (a key protein for coagulation) were adsorbed on NCs surface. Albumin fluorescence quenching is a classical approach to study drug or nanoparticle adsorption [61], [62]. Whatever the tested NCs (Cou1 unloaded), no difference in term of fluorescence intensities was measured in presence or in absence of NCs (Figure 5, a). Moreover, a total recovery of the initial fibrinogen concentration was observed after NCs incubation, whatever the NCs concentrations (Figure 5, b). Even if the debate about the best way to fix dextran-shell on the NPs surface (end-on *versus* side-on coverage) is still open [63]–[65], these results showed an absence of protein adsorption on NCs surface due to hydrophilic dextran chains organized as a corona (side-on configuration) around the hydrophobic PMMA or poly(MMA-co-DEAEMA) internal shell. Dextran outer layer is expected to provide a stealth surface coating allowing an improved NCs circulation lifetime, at least enough to ensure their recognition by pathological cells in the case of an active targeting strategy.

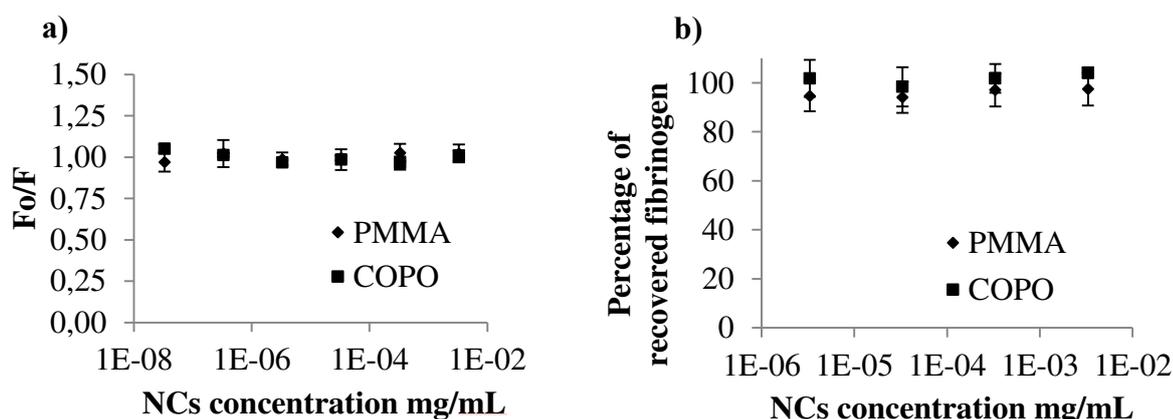


Figure 5. BSA fluorescence intensities in presence (F) or in absence (Fo) of NCs (a) and percentage of fibrinogen recovered after PMMA-NCs and COPO-NCs incubation (b), n=3.

1.3.3.3. NCs cytotoxicity

Whatever the studied drug delivery systems, an additional concern is their own potential toxicity [55]. Particularly, if residual monomers potentially toxic for biological systems remain in the nano-objects. PMMA-NCs and COPO-NCs (Cou1 unloaded) were thus incubated with monocytes (THP-1) and showed no toxicity regarding to the Trypan blue assay showing more than 96 % of viable cells whatever the conditions (Table 2). Then, metabolic activity of THP-1 cells through the cleavage of tetrazolium salt by mitochondrial deshydrogenase was evaluated. As components are considered as cytotoxic when cell metabolic activity decreases until 80%, both PMMA-NCs and COPO-NCs were cytocompatible (Figure 6A). As metabolic activity is

also a function of the cell number, the ratio between absorbance of formazan salt produced and the number of cell was calculated. As shown in Figure 6B, none of the conditions were different from the control (Figure 6B) proving that PMMA-NCs and COPO-NCs did not influence cell viability nor proliferation of THP-1 and could be considered as cytocompatible.

Table 2. Average percentage of living THP-1 after 24 h of incubation at 37°C with $3.3 \cdot 10^{-8}$ to $3.3 \cdot 10^{-3}$ mg/mL (based on polymer internal shell content) of PMMA-NCs or COPO-NCs determined by the Trypan blue assay. n = 3

| Time (h) | Control | PMMA-NCs | COPO-NCs |
|----------|-------------|-------------|-------------|
| 24 | 99.3 ± 0.3% | 96.8 ± 0.7% | 97.2 ± 1.3% |

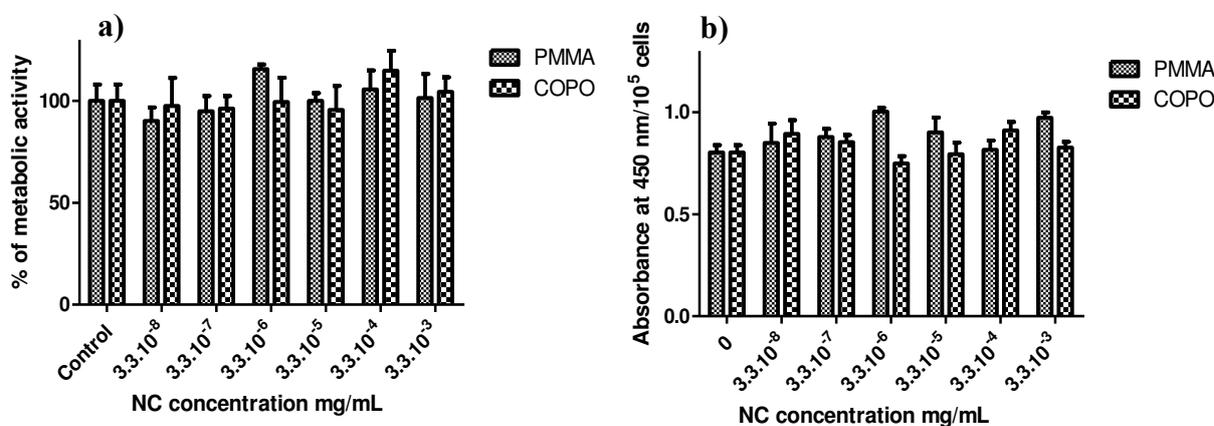


Figure 6. Cytocompatibility of $3.3 \cdot 10^{-8}$ to $3.3 \cdot 10^{-3}$ mg/mL (based on polymer internal shell content) of PMMA-NCs or COPO-NCs incubated during 24 h at 37°C with human monocytes (THP-1). (A) Metabolic activity (WST-1 assay) 100% represents control cells incubated with PBS, n = 3. (B) Ratio of the metabolic activity (WST-1 absorbance at 450 nm) to the number of living cells determined by the Trypan blue assay, n = 3.

1.3.3.4. NCs surface labeling

One strategy for cell specific targeting involves the grafting of active targeting ligands on NPs surface that are able to bind to tumor tissues [3]. As mentioned before, dextrane coverage of NCs was deliberately decorated with azide functions located at the end of alkyl chains with the aim to allow facile post-functionalization chemistry (Figure 1). Surface modification feasibility was tested by grafting of fluorescent molecules onto PMMA-NCs via two approaches (Figure 7): i) a Cu (I)-catalyzed chemistry reaction with the end-alkyne groups of Cou-click and ii) a Cu-free reaction with cyclooctyne groups of DBCO-PEG₄-TAMRA.

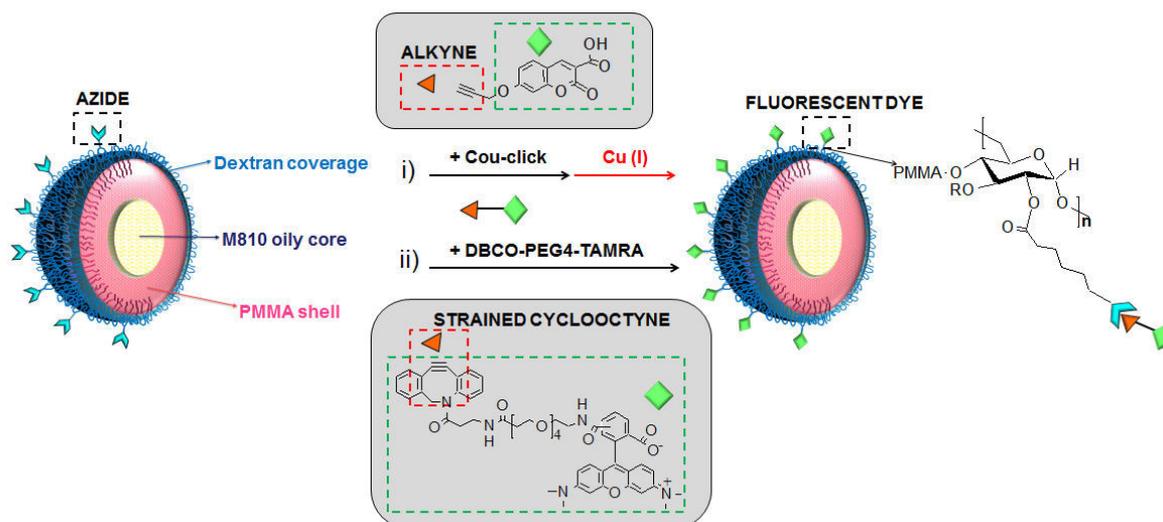


Figure 7. NCs post-functionalization strategies by click chemistry.

In the former case, a classical click reaction was performed. Cou-click (alkyne functions) was added in a 4-fold excess over azide groups and the reaction was carried out during 24 hours at ambient temperature after addition of copper catalyst. In parallel, a blank sample containing NCs and Cou-click without any catalyst was also prepared and maintained 24 hours under magnetic stirring. The presence of grafted dye at NCs surface (when adding copper catalyst) was checked by fluorescence spectroscopy. Slight difference in emission was observed between initial NCs (before click reaction) and washed blank NCs (no catalyst). This could be ascribed to Cou-click traces still present after NCs washing or to click reaction proceeding to a small extent even in the absence of catalyst. Nevertheless, modified washed PMMA-NCs exhibited a clear and much bigger peak at 432 nm in the fluorescence spectrum when excited at 325 nm in water (see S6 a, p. 247). This peak was assignable to grafted Cou-click as corresponding to emission range of pure dye. These observations confirmed both the feasibility of such NCs surface modification, the need of a copper catalyst to carry out the reaction to a greater extent and that Cou-click was covalently bound to dextrane coverage and not just adsorbed on NCs surface. The presence of outer azide functions available for reaction was as well evidenced. However, in this case, only a qualitative assessment of click-reaction was possible. Indeed the comparison of fluorescence emission measurements of modified NCs with a standard curve of pure Cou-click mixed with non-modified NCs in aqueous phase lead to an overestimation of the grafted dye. We first ascribed this result to residual copper catalyst probably distorting the measured emission values. Nevertheless, after reaction, such functionalized PMMA-NCs were purified by adding ethylenediaminetetraacetic acid as copper complexing agent followed by several washings with

water. Such a treatment was expected to take off more than 99% of copper and then to reduce the copper amount to a very low concentration (less than 150 ppm) as already observed in our previous works [13], [17]. A more likely explanation is that fluorescence properties of cou-click covalently linked to NCs are quite different of those of molecular fluorescent dye maybe due to triazole ring formation.

For the second coupling assay, Cu(I)-free or strain promoted click reaction was performed with cyclooctyne groups of DBCO-PEG₄-TAMRA. DBCO-PEG₄-TAMRA is an azide-reactive fluorescent dye that is well suited for labeling and visualizing chemically azide-modified biomolecules *in vivo* (e.g. peptides) without observable cytotoxicity [66]. Cyclooctyne in DBCO group reacts with an azide at room temperature and without the need of a copper catalyst to produce a stable triazole [67]. Compared to the previous classical click-chemistry, reactions using cyclooctynes are more suitable in biomedical field as overcoming the intrinsic toxicity of copper catalyst [68]. Herein, reaction was performed during 30 minutes with a 2-fold excess of cyclooctyne groups over azide functions of dextran. PMMA-NCs functionalization was confirmed in both qualitatively and quantitatively fashions. After reaction and several washings, the initially white PMMA-NCs turned into a dark pink color (see S6 b, p. 247) attesting DBCO-PEG₄-TAMRA grafting. The amount of grafted dye was indirectly determined by fluorescence titration of DBCO-PEG₄-TAMRA remaining in the aqueous phase after particles centrifugation and removal. Emission fluorescence was converted to DBCO-PEG₄-TAMRA concentration from a standard curve of pure DBCO-PEG₄-TAMRA in water. Yield of click-chemistry was estimated to be 25%, which meant that 25 on 100 azide functions of dextran coverage (5 azide functions per 100 glucopyranose units) were effectively available for reaction or were simply reacted during this reaction time. This corresponded to about 12 000 DBCO-PEG₄-TAMRA molecules per NC. In the future, NCs surface azide functionality could be used to covalently attach targeting ligands showing specificity for cancer cells.

1.4. CONCLUSIONS

A multifunctional transurf based on dextran was used for the first time as both a stabilizer and macroRAFT agent in RAFT miniemulsion polymerization to produce pH-sensitive dextran-covered NCs. Our previous works on MMA homopolymerization were successfully extended to MMA/DEAEMA copolymerization allowing the incorporation of DEAEMA in NCs internal shell. Both PMMA and poly(MMA-co-DEAEMA) nano-objects were further characterized

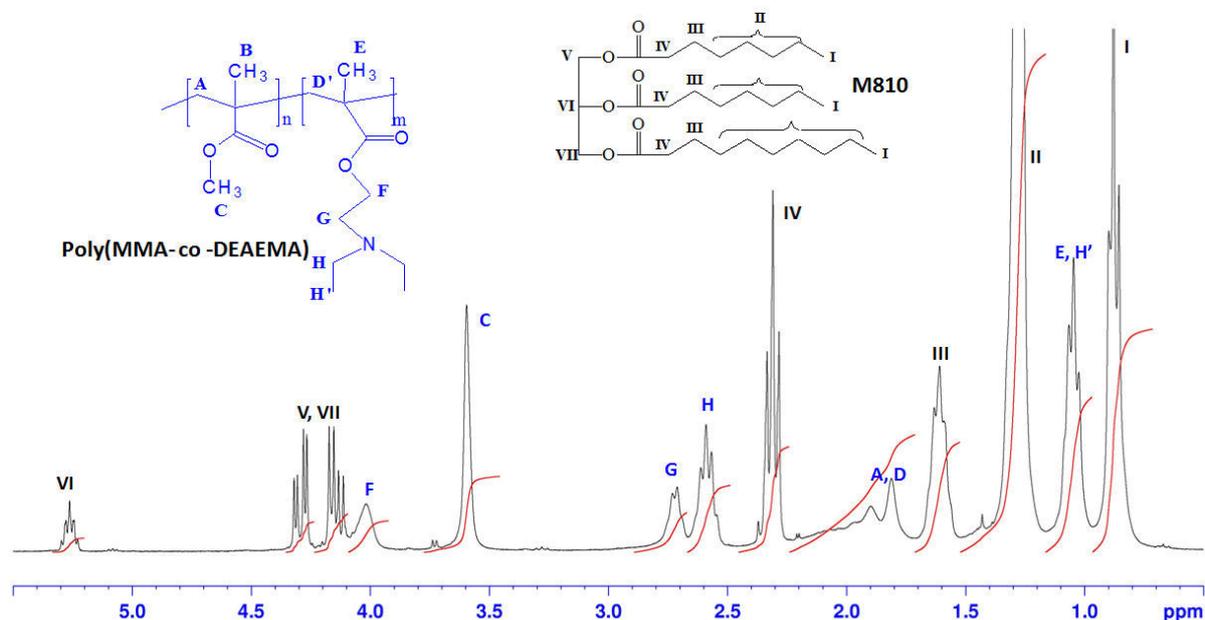
regarding on their potential for biomedical applications, particularly in view of cancer treatment. The *in vitro* assays we performed depicted promising properties of these objects for intravenous administration: i) size about 100 nm, ii) almost neutral surface and good colloidal stability at physiological ionic strength, iii) very stable hydrophilic dextran coverage providing protection against non-specific interactions with plasmatic proteins (BSA and fibrinogen) v) potential oily reservoirs for hydrophobic drugs and iv) no cytotoxicity to human monocytic THP-1 cells. In addition, both PMMA-NCs and COPO-NCs were evaluated for the encapsulation of a model hydrophobic active substance and a high loading efficiency (99%) was obtained. During Cou1 delivery experiences, we demonstrated that poly(MMA-co-DEAEMA) shell of COPO-NCs presented pH sensitivity in the physiologically relevant pH range of 4.5-7.4 thus allowing a pH-tunable Cou1 release behavior. Preliminary assays to bind fluorescent dyes on NCs surface showed promising results: a large amount of the azide functions incorporated in the dextran-based transurf was effectively available for click post-functionalization. This gave the possibility to attach targeting moieties to enhance nanoparticles uptake by tumor cells. Overall, this work highlighted the value of this NCs platform with potential for *in vivo* cancer drug delivery. Commonly used *in vitro* blood compatibility tests like complement activation will be applied in the next future in order to get further information on NCs suitability to be injected as drug delivery system. NCs loaded with different anticancer agents will be as well prepared. After functionalization with the appropriate(s) ligands, such NCs will be used to target a particular cancer pathology.

Acknowledgments

The authors express their highest gratitude to Marie-Christine Grassiot for help in SEC measurements, to Olivier Fabre for NMR measurements, to Isabelle Fries for cytotoxicity assays and to the physicochemical platform of the Faculty of Pharmacie (Nancy-France) for help in protein-NCs interactions analyses. C. Nouvel and L.M Forero Ramirez acknowledge support from ANR JCJC ANR-12-JS08-0003-01 NANOCAPDEX for funding and PhD Research Fellowship, respectively.

2. SUPPORTING INFORMATION

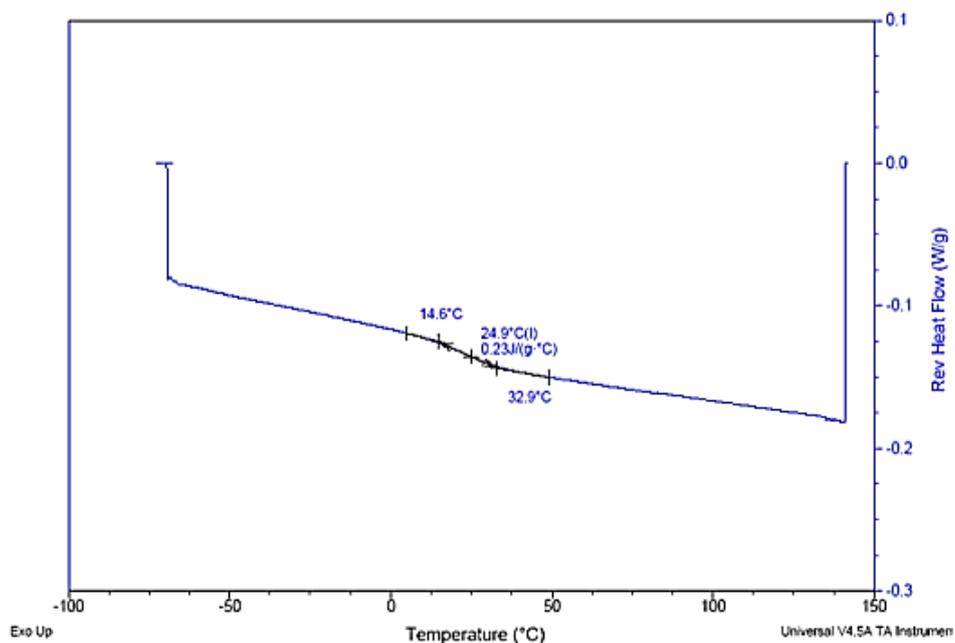
S1. ¹H NMR spectrum of free poly(MMA-co-DEAEMA) chains extracted with THF from polymerization mixture.



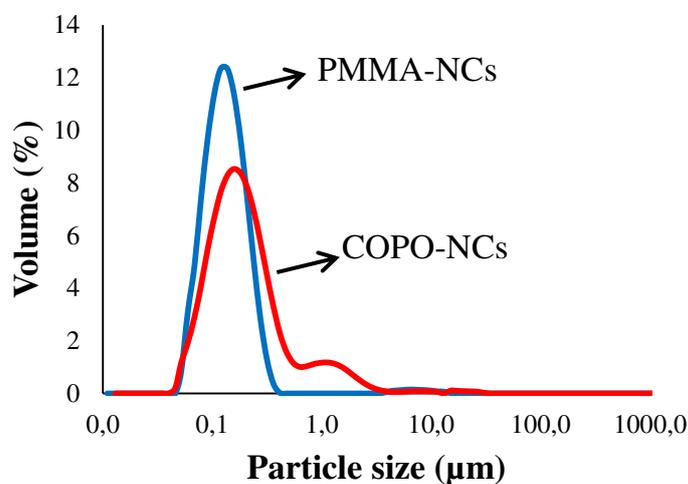
The DEAEMA content in copolymer chains was calculated as follows:

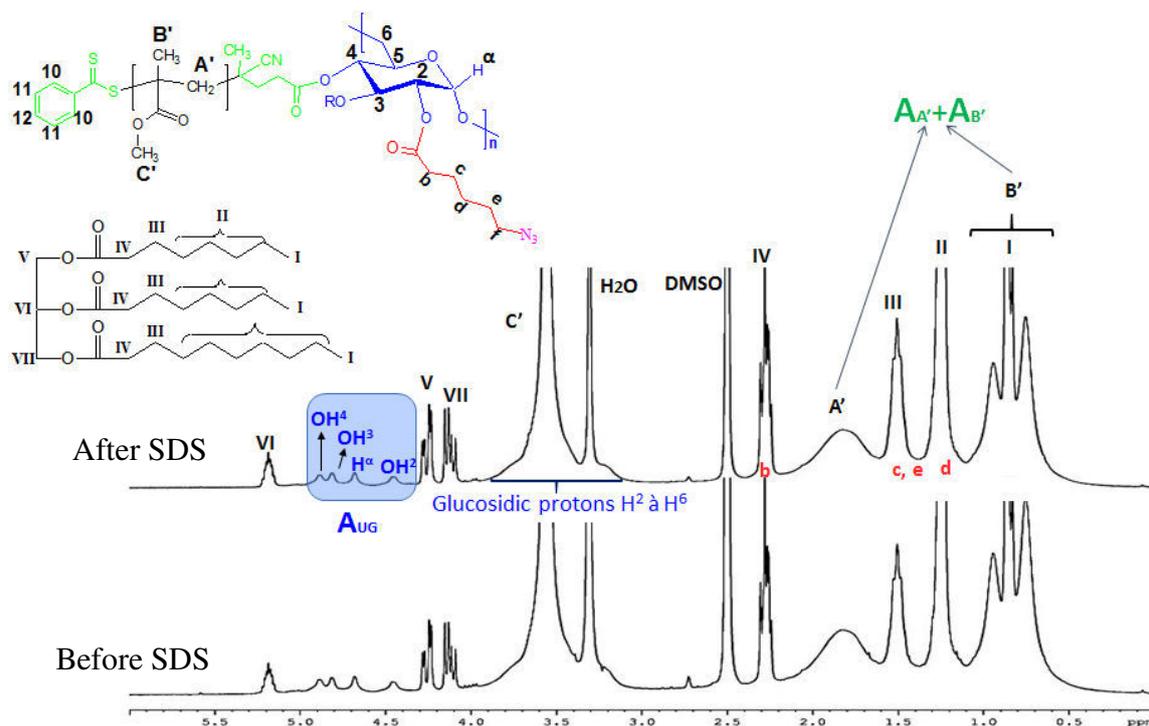
$$F_{\text{DEAEMA}} = \frac{\frac{n_{\text{PDEAEMA}}}{n_{\text{PMMA}}} \times \frac{M_{\text{DEAEMA}}}{M_{\text{MMA}}}}{1 + \frac{n_{\text{PDEAEMA}}}{n_{\text{PMMA}}} \times \frac{M_{\text{DEAEMA}}}{M_{\text{MMA}}}} \quad \text{with} \quad \frac{n_{\text{PDEAEMA}}}{n_{\text{PMMA}}} = \frac{A_{\text{G,H}}/6}{A_{\text{C}}/3}$$

- F_{DEAEMA} = DEAEMA monomer units weight fraction in copolymer
- n_{PDEAEMA} = DEAEMA monomer units in copolymer (mol)
- n_{PMMA} = MMA monomer units in copolymer (mol)
- M_{DEAEMA} = Molar masse of one DEAEMA unit (185.3 g/mol)
- M_{MMA} = Molar masse of one MMA unit (100 g/mol)
- $A_{\text{G,H}}$ = Area of G and H protons (DEAEMA units)
- A_{C} = Area of C protons (MMA units)

S2. MDSC thermogram of COPO-NCs after purification.

Thermal analyses were performed using differential scanning calorimetry at modulated mode (MDSC) (Q2000, TA Instruments). The operating method consisted of three cycles of heating and cooling from -70 to 150 °C with the constant rate of 5 °C/min modulating ± 1 °C every 40s. The experimental curves were treated with TA Universal Analysis 2000 software provided with the instrument. First heat cycle allows removing all solvent and thermal history of the sample, so second heat cycle results are showed here.

S3. NCs size distribution determined by laser granulometry.

S4. PMMA-NCs 1H NMR spectrum before and after treatment with SDS.


To assess colloidal stability of dextran coverage toward SDS, PMMA-NCs were firstly washed, then 1 wt% of SDS was added to final NCs suspension. The sample was allowed to stand for 24 h at room temperature under magnetic stirring. Then, NCs were recovered by centrifugation, washed again and freeze-dried. ¹H NMR analysis in DMSO-*d*₆ was performed after dissolution of these freeze-dried NCs. The percentage of desorbed dextran was calculated using the equation below, where (Dextran/PMMA)_i and (Dextran /PMMA)_f corresponded to molar ratios before and after treatment by SDS, respectively.

$$\text{Desorbed dextran} = 1 - \frac{\left(\frac{\text{Dextran}}{\text{PMMA}}\right)_f}{\left(\frac{\text{Dextran}}{\text{PMMA}}\right)_i} \quad \text{with} \quad \frac{\text{Dextran}}{\text{PMMA}} = \frac{A_{UG}}{A_{A'} + A_{B'}}$$

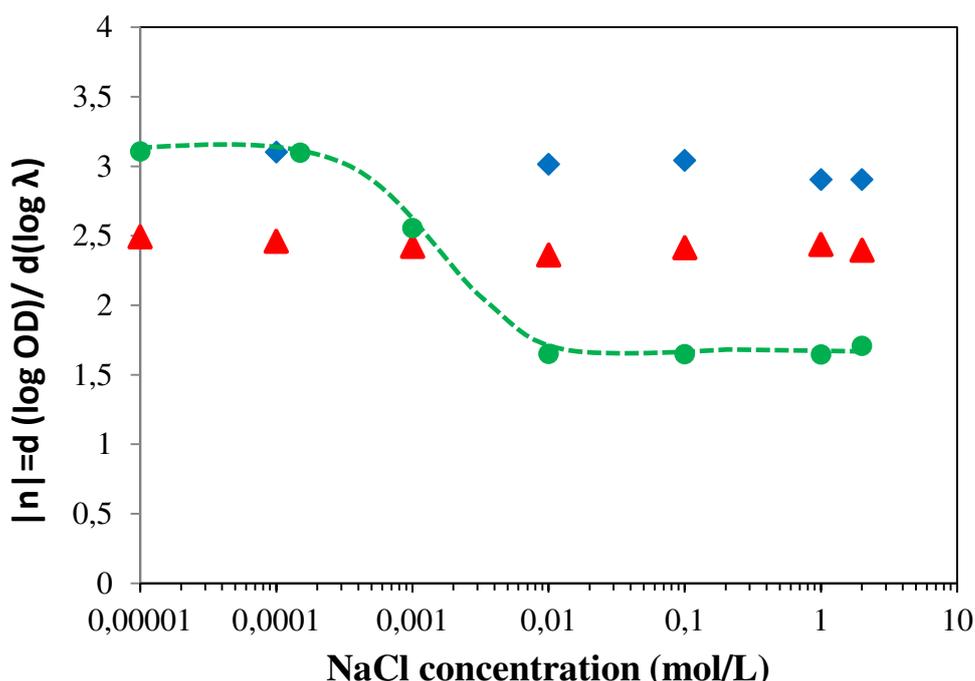
$A_{A'}$ = Area of PMMA methylene (A') protons located between 1.5 and 2.2 ppm.

$A_{B'}$ = Area of PMMA and methyl (B') protons located between 0.5 and 1.2 ppm.

A_{UG} = Area of anomeric H and residual OH from glucopyranose dextran units between 4.1 et 5.4 ppm (OH², OH³, OH⁴ et H^α).

For a better estimation of $A_{A'} + A_{B'}$, we took into account the presence of M810 methylene (II, III) and methyl (I) protons located between 0,5 and 1,6 ppm by estimating peaks (I, II, III) area equal to A_{VI} (around 5,2 ppm) multiplied by 40.5. The presence of methylene protons (c, e, d) coming from alkyl side chains of dextran were as well considered. In this case, this corresponding area was equal to A_{UG} multiplied by 0.3 ($\frac{\tau}{100} \times \frac{6}{4}$)

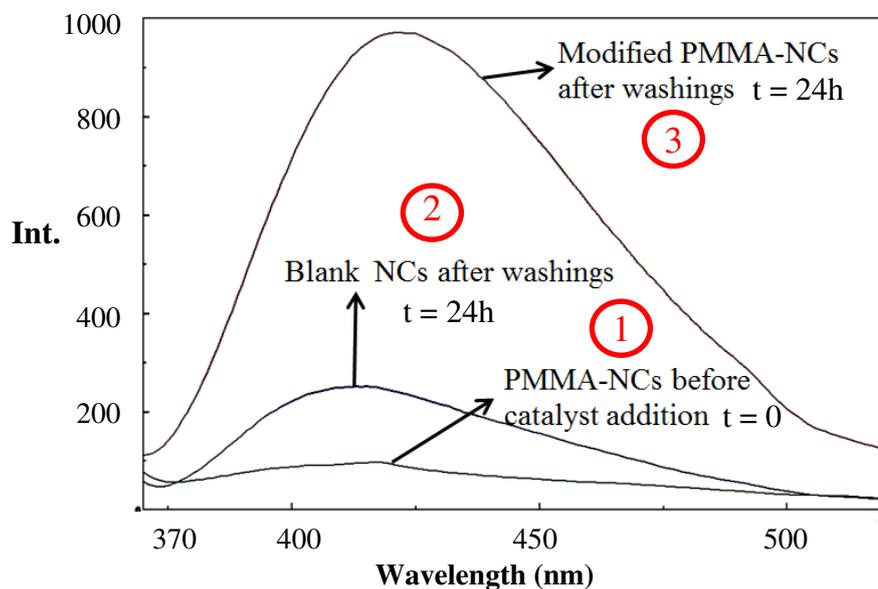
S5. NCs colloidal stability in presence of NaCl: (♦) PMMA-NCs (▲) COPO-NCs and (●) uncoated PMMA NSs.



The colloidal stability of PMMA-NCs, COPO-NCs and uncoated PMMA-NSs toward added electrolyte has been assessed by turbidimetry using UVikon XL Spectrophotometer (Bio-Tek Instruments). Typically, 20 μ L of dispersions has been added to 4 mL of NaCl (from 1×10^{-5} to 2 M). The samples have been allowed to stand for 1 h and their absorbance has been measured over the range 450–650 nm, at 50 nm intervals. For each NaCl concentration, the curve $\log(\text{OD})$ as a function of $\log(\lambda)$ (λ = wavelength) was plotted. The slope $d(\log \text{OD})/d\lambda$ was then calculated. Finally, the fluctuation of this slope as a function of NaCl concentration was taken as an indication of the particle size variations and eventually particles aggregation.

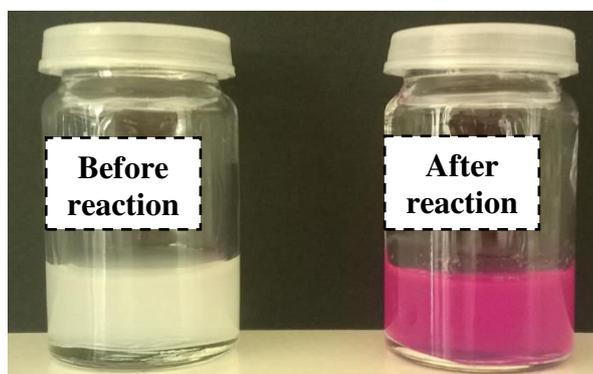
S6.

- a) **Qualitative assessment of click-reaction between Cou-click and azide functions of NCs dextran coverage. Fluorescence spectrum of PMMA-NCs.**



- 1) Fluorescence spectrum of washed PMMA NCs before adding cou-click and copper catalyst (i.e. before reaction)
- 2) Fluorescence spectrum of blank PMMA-NCs after several washings. This blank corresponds to PMMA-NCs mixed with cou-click during 24 hours without the addition of copper catalyst.
- 3) Fluorescence spectrum of modified PMMA-NCs after purification (copper complexation with EDTA followed by several washings with water). These NCs were obtained after click reaction (24 hours, room temperature) in presence of copper catalyst.

- b) **Copper-free click chemistry between DBCO-PEG₄-TAMRA and azide functions of dextrane coverage. PMMA-NCs dispersions prior and after click reaction.**



The number of DBCO-PEG₄-TAMRA molecules per NC (*DBCO/NC*) was calculated as follows:

$$\frac{DBCO}{NC} = \frac{n_{DBCO} \times N_A}{m_{PMMA-NCs} \times N_p} \quad \text{with} \quad N_p = \frac{3}{4d_{NCs}\pi \left(\frac{D}{2}\right)^3}$$

- n_{DBCO} = Total grafted DBCO-PEG₄-TAMRA deduced by fluorescence spectrophotometry (mol).
 N_A = Avogadro's number.
 $m_{PMMA-NCs}$ = Masse of PMMA-NCs in click-reaction medium (g).
 N_p = Number of NCs /g of NCs
 d_{NCs} = NCs density (g/ml)
 D = NCs diameter (cm).

NCs density (d_{NCs}) is evaluated using the following equation, where m_i corresponds to the masse of component i in final NCs. $d_{MMA} = 0.94$ g/ml, $d_{M810} = 0.94$ g/ml and $d_{PMMA} = 1.2$ g/ml were densities of MMA, M810 and PMMA, respectively.

$$d_{NCs} = \frac{m_{MMA} + m_{M810} + m_{PMMA}}{\frac{m_{MMA}}{d_{MMA}} + \frac{m_{M810}}{d_{M810}} + \frac{m_{PMMA}}{d_{PMMA}}}$$

3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Dans ce dernier chapitre, nous avons montré qu'il est possible de fabriquer des NCs à cœur M810, écorce poly(MMA-co-DEAEMA) (aux paramètres macromoléculaires bien définis) et recouvrement hydrophile en dextrane en employant une polymérisation RAFT en miniémulsion menée en présence des transurfs $\text{DexN}_3\text{-}\tau\text{CTA}\gamma$. Ces NCs sont appelées COPO-NCs par rapport aux NCs précédentes à écorce PMMA appelées PMMA-NCs. Ces COPO-NCs, de diamètre moyen de 125 nm, présentent les caractéristiques suivantes :

- La fraction massique des unités DEAEMA dans l'écorce polymère a été évaluée à 75-79% grâce à des analyses RMN ^1H .
- La présence d'une couronne de dextrane à la surface des COPO-NCs a été indirectement mise en évidence par l'amélioration de la stabilité colloïdale de ces objets par rapport à de NSs non-recouvertes, en milieu salin à différentes forces ioniques (entre 10^{-5} et 2 M). L'épaisseur et le taux de recouvrement de cette couronne hydrophile ont été estimés à environ 5 nm et 2.5 mg/m^2 , respectivement. Ces valeurs sont similaires à celles précédemment observées pour les PMMA-NCs (voir Chapitre III, p. x).
- Le caractère pH-sensible des COPO-NCs a été étudié en suivant l'évolution de la taille de ces objets en fonction du pH. Contrairement aux PMMA-NCs qui ne présentent aucune réponse aux changements de pH, ces NCs peuvent gonfler en milieu acide grâce à la protonation des unités DEAEMA présentes dans l'écorce polymère. Le volume des COPO-NCs augmente alors d'environ dix fois lorsque le pH diminue de 6,6 à 4,5 dans l'eau ou de 7,6 à 6,9 dans le PBS (0,148 M). Ce comportement pH-sensible a lieu dans des domaines de pH similaires aux variations du pH en milieu physiologique. Aussi, les COPO-NCs semblent attractives pour contrôler la libération des anticancéreux dans le microenvironnement acide des tumeurs ou bien à l'intérieur des compartiments cellulaires tels que les endosomes et les lysosomes.

Nous avons finalement étudié le potentiel biomédical de ces NCs par plusieurs tests préliminaires:

- Dans un premier temps, des essais d'encapsulation de la 7-diéthylamino-4-méthylcoumarine (Cou1) ont été réalisés. En première approche, il semble que l'incorporation de la Cou1 dans la phase organique lors de la formulation des objets n'a

aucune influence ni sur la polymérisation RAFT ni sur la stabilité de la miniémulsion. Pour les deux types des NCs étudiées, une efficacité d'encapsulation de l'ordre de 99% a été obtenue avec environ 14-17 mg de Cou1/g NCs encapsulée.

- Dans un deuxième temps, la libération de la Cou1 à partir de ces NCs a été suivie à 37 °C. Dans le cas de PMMA-NCs, nous avons observé une libération partielle de la Cou1 (environ 50%) dans le PBS (0,148 M), indépendamment du pH du milieu de relargage (4 ou 7,4). Une libération totale de la Cou1 a cependant été observée lorsque 1% massique de SDS a été ajouté au PBS. Le fait que la solubilité de la Cou1 soit augmentée d'environ 80 fois dans ce milieu par rapport au PBS, explique probablement ce résultat. Ceci semble également confirmer qu'il n'y a pas de réactions secondaires conduisant à un greffage de la Cou1 sur l'écorce polymère de NCs lors de la polymérisation. En outre, la libération de la Cou1 à partir des COPO-NCs s'est avérée plus rapide et pH-dépendante. 70% et 82% de la Cou1 encapsulée a été libérée au bout d'une demi-heure dans le PBS à pH=7,4 et 4, respectivement. Lors du gonflement des COPO-NCs en milieu acide, l'hydratation de l'écorce polymère favorise ainsi la diffusion de la SA en dehors des objets.
- Nous avons également étudié l'interaction des PMMA-NCs et COPO-NCs avec certaines protéines plasmatiques : l'albumine (protéine la plus abondante dans le plasma sanguin) et le fibrinogène (facteur de la coagulation). Aucune absorption de ces protéines à la surface des NCs n'a été observée pour des concentrations en NCs variant entre $3,3 \times 10^{-8}$ et $3,3 \times 10^{-3}$ mg de polymère/mL. Ces résultats laissent supposer que le recouvrement hydrophile en dextrane en surface des NCs limite leur reconnaissance par les protéines plasmatiques. Ceci devrait leur permettre d'avoir un temps de circulation plasmatique prolongé après administration intraveineuse, ce qui pourrait favoriser l'accumulation passive du médicament encapsulé au niveau de la tumeur.
- Afin d'évaluer la cytotoxicité des PMMA-NCs et COPO-NCs, nous avons exposé des macrophages pulmonaires (THP-1) à des concentrations croissantes de NCs ($3,3 \times 10^{-8}$ to $3,3 \times 10^{-3}$ mg de polymère/mL). Aucun effet des NCs sur la viabilité ou la prolifération cellulaire des macrophages THP-1 n'a été observé après 24 heures d'incubation à 37 °C. Au regard de ces premiers résultats, les PMMA-NCs et COPO-NCs semblent pouvoir être considérées comme cytocompatibles.

- Finalement, des sondes fluorescentes modèles ont été utilisées pour valider le concept de post-fonctionnalisation de la surface de NCs via les fonctions azoture présentes sur le transurf et *in fine* à la surface des NCs. Deux types de réactions « click » ont été testées : i) la cycloaddition Azoture/Alcyne catalysée par le Cu(I) et ii) la cycloaddition Azoture/Alcyne non-catalysée faisant intervenir un cyclooctyne. Ces réactions ont respectivement permis de greffer un dérivé de la coumarine et la dibenzocyclooctyne-PEG4-Fluor 545 (DBCO-PEG4-TAMRA) à la surface de PMMA-NCs. La spectrométrie de fluorescence a permis d'évaluer le taux de fixation de la DBCO-PEG4-TAMRA. Dans ce dernier cas, la fraction des groupements azoture modifiés en surface, par rapport à ceux initialement présents sur le transurf, a ainsi pu être estimée à 25%. Ceci démontre qu'une partie des N₃ restent disponibles pour une post-fonctionnalisation des NCs avec des ligands ou marqueurs de reconnaissance des cellules cancéreuses.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre démontrent le potentiel des nano-objets élaborés au cours de cette thèse à être utilisés comme nanovecteurs pour l'administration intraveineuse d'anticancéreux. Initialement conçue pour un ciblage passif des cellules cancéreuses (cas des PMMA-NCs), la plateforme de NCs ici développée semble pouvoir être potentiellement exploitable pour une libération contrôlée de la SA en fonction du pH du milieu environnant (cas des COPO-NCs), mais aussi pour un ciblage actif des cellules cancéreuses. Afin de confirmer le caractère cytocompatible et furtif de nos NCs, d'autres études biologiques sont déjà programmées et devraient faire l'objet d'une troisième publication :

- **Tendance des NCs à activer le système du complément (voir glossaire).** Dans ce cas, il s'agit de vérifier dans quelle mesure les protéines du complément s'adsorbent ou non à la surface des NCs. Ces études sont réalisées en collaboration avec l'unité Micro et Nanomédecines Biomimétiques (MINT) de l'Université d'Angers et avec CITHEFOR à Nancy.
- **Tendance de NCs à activer les macrophages.** Etude réalisée en collaboration avec CITHEFOR.
- **Cytotoxicité des NCs sur une autre lignée cellulaire.** Cette fois-ci, l'influence des NCs sur la viabilité et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires de rat (lignée, A-10) sera étudiée en collaboration avec CITHEFOR.

4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. E. Wang, P. S. Stayton, S. H. Pun, et A. J. Convertine, « Polymer nanostructures synthesized by controlled living polymerization for tumor-targeted drug delivery », *Journal of Controlled Release* **2015**, 219, 345-354.
- [2] C. M. Dawidczyk, C. Kim, J. H. Park, L. M. Russell, K. H. Lee, M. G. Pomper, et P. C. Searson, « State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines », *Journal of Controlled Release* **2014**, 187, 133-144.
- [3] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, et J. Huwyler, « Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications », *Journal of Controlled Release* **2015**, 200, 138-157.
- [4] N. A. Fonseca, A. C. Gregório, Â. Valério-Fernandes, S. Simões, et J. N. Moreira, « Bridging cancer biology and the patients' needs with nanotechnology-based approaches », *Cancer Treatment Reviews* **2014**, 40 (5), 626-635.
- [5] C. Lemarchand, R. Gref, et P. Couvreur, « Polysaccharide-decorated nanoparticles », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 58 (2), 327-341.
- [6] C. Lemarchand, R. Gref, C. Passirani, E. Garcion, B. Petri, R. Müller, D. Costantini, et P. Couvreur, « Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems », *Biomaterials* 2006, , 27 (1), 108-118.
- [7] J. Raynaud, B. Choquet, E. Marie, E. Dellacherie, C. Nouvel, J.-L. Six, et A. Durand, « Emulsifying Properties Of Biodegradable Polylactide-Grafted Dextran Copolymers », *Biomacromolecules* **2008**, 9 (3), 1014-1021.
- [8] C. Nouvel, C. Frochot, V. Sadler, P. Dubois, E. Dellacherie, et J.-L. Six, « Polylactide-Grafted Dextrans: Synthesis and Properties at Interfaces and in Solution », *Macromolecules* **2004**, 37 (13), 4981-4988.
- [9] C. Nouvel, J. Raynaud, E. Marie, E. Dellacherie, J.-L. Six, et A. Durand, « Biodegradable nanoparticles made from polylactide-grafted dextran copolymers », *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 330 (2), 337-343.
- [10] M. Laville, J. Babin, I. Londono, M. Legros, C. Nouvel, A. Durand, R. Vanderesse, M. Leonard, et J.-L. Six, « Polysaccharide-covered nanoparticles with improved shell stability using click-chemistry strategies », *Carbohydrate Polymers* **2013**, 93 (2), 537-546.
- [11] C. Gavory, A. Durand, J.-L. Six, C. Nouvel, E. Marie, et M. Leonard, « Polysaccharide-covered nanoparticles prepared by nanoprecipitation », *Carbohydrate Polymers*, vol. 84, no 1, p. 133-140, févr. 2011.
- [12] M. Wu, E. Dellacherie, A. Durand, et E. Marie, « Poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization. 2. PEG-based surfactants », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2009**, 69 (1), 147-151.
- [13] L. M. Ramirez, J. Babin, A. Durand, J.-L. Six, et C. Nouvel, « Biocompatible dextran-covered nanoparticles produced by Activator Generated by Electron Transfer Atom Transfer Radical Polymerization in miniemulsion », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2015**, 486, 60-68.
- [14] C. Rouzes, M. Leonard, A. Durand, et E. Dellacherie, « Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, 32 (2), 125-135.
- [15] L. Nordstierna, A. A. Abdalla, M. Nordin, et M. Nydén, « Comparison of release behaviour from microcapsules and microspheres », *Progress in Organic Coatings* **2010**, 69 (1), 49-51.
- [16] N. Anton, J.-P. Benoit, et P. Saulnier, « Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review », *Journal of Controlled Release* 2008, 128 (3), 185-199.
- [17] K. Poltorak, A. Durand, M. Léonard, J.-L. Six, et C. Nouvel, « Interfacial click chemistry for improving both dextran shell density and stability of biocompatible nanocapsules », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2015**, 483, 8-17.

- [18] L. M. Forero Ramirez, J. Babin, A. Durand, J.-L. Six, et C. Nouvel « How inisurf improve control of atom transfer radical polymerization and facilitate nanocapsules production? ». *En préparation*.
- [19] « NCs-PMMA-transurf-Article 1 ». *En préparation*.
- [20] K. Landfester, « Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles », *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48 (25), 4488-4507.
- [21] M. Wu, L. M. Forero Ramirez, A. Rodriguez Lozano, D. Quémener, J. Babin, A. Durand, E. Marie, J.-L. Six, et C. Nouvel, « First multi-reactive dextran-based inisurf for atom transfer radical polymerization in miniemulsion », *Carbohydrate Polymers* **2015**, 130, 141-148.
- [22] S. Mura, J. Nicolas, et P. Couvreur, « Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery », *Nature Materials* **2013**, 12 (11), 991-1003.
- [23] J. I. Amalvy, E. J. Wanless, Y. Li, V. Michailidou, S. P. Armes, et Y. Duccini, « Synthesis and Characterization of Novel pH-Responsive Microgels Based on Tertiary Amine Methacrylates », *Langmuir* **2004**, 20, 21, 8992-8999.
- [24] J. Liu, Y. Huang, A. Kumar, A. Tan, S. Jin, A. Mozhi, et X.-J. Liang, « pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy », *Biotechnology Advances* **2014**, 32 (4), 693-710.
- [25] L. Liu, C. Wu, J. Zhang, M. Zhang, Y. Liu, X. Wang, et G. Fu, « Controlled polymerization of 2-(diethylamino)ethyl methacrylate and its block copolymer with N-isopropylacrylamide by RAFT polymerization », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, 46 (10), 3294-3305.
- [26] Y. Q. Hu, M. S. Kim, B. S. Kim, et D. S. Lee, « RAFT synthesis of amphiphilic (A-ran-B)-b-C diblock copolymers with tunable pH-sensitivity », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, 46 (11), 3740-3748.
- [27] S. Yusa, M. Sugahara, T. Endo, et Y. Morishima, « Preparation and Characterization of a pH-Responsive Nanogel Based on a Photo-Cross-Linked Micelle Formed From Block Copolymers with Controlled Structure », *Langmuir* **2009**, 25 (9), 5258-5265.
- [28] C. Chang, H. Wei, J. Feng, Z.-C. Wang, X.-J. Wu, D.-Q. Wu, S.-X. Cheng, X.-Z. Zhang, et R.-X. Zhuo, « Temperature and pH Double Responsive Hybrid Cross-Linked Micelles Based on P(NIPAAm- co - MPMA)- b -P(DEA): RAFT Synthesis and “Schizophrenic” Micellization », *Macromolecules* **2009**, 42 (13), 4838-4844.
- [29] J. Du, H. Willcock, J. P. Patterson, I. Portman, et R. K. O'Reilly, « Self-Assembly of Hydrophilic Homopolymers: A Matter of RAFT End Groups », *Small* **2011**, 7 (14), 2070-2080.
- [30] F. Chen, D. Dai, J. Yang, Z. Fei, et M. Zhong, « Controlled Synthesis of Polyelectrolytes by 4-Cyanopentanoic Acid Dithiobenzoate Mediated RAFT Polymerization », *Journal of Macromolecular Science, Part A*, **2013**, 50 (9), 1002-1006.
- [31] J. Chen, M. Liu, C. Gao, S. Lü, X. Zhang, et Z. Liu, « Self-assembly behavior of pH- and thermo-responsive hydrophilic ABCBA-type pentablock copolymers synthesized by consecutive RAFT polymerization », *RSC Advances* **2013**, 3 (35), 15085, 2013.
- [32] M. T. Savoji, S. Strandman, et X. X. Zhu, « Switchable Vesicles Formed by Diblock Random Copolymers with Tunable pH- and Thermo-Responsiveness », *Langmuir* **2013**, 29 (23), 6823-6832.
- [33] Z. Ge et S. Liu, « Facile Fabrication of Multistimuli-Responsive Metallo-Supramolecular Core Cross-Linked Block Copolymer Micelles », *Macromolecular Rapid Communications* **2013**, 34 (11), 922-930.
- [34] M. T. Savoji, S. Strandman, et X. X. Zhu, « Invertible vesicles and micelles formed by dually-responsive diblock random copolymers in aqueous solutions », *Soft Matter* **2014**, 10 (32), p. 5886.
- [35] C. Ren, X. Jiang, G. Lu, X. Jiang, et X. Huang, « Construction of PIB-b-PDEAEMA well-defined amphiphilic diblock copolymers via sequential living carbocationic and RAFT polymerization », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2014**, 52 (10), 1478-1486.
- [36] D. B. Wright, J. P. Patterson, A. Pitto-Barry, P. Cotanda, C. Chassenieux, O. Colombani, et R. K. O'Reilly, « Tuning the aggregation behavior of pH-responsive micelles by copolymerization », *Polymer Chemistry* **2015**, 6 (14), 2761-2768.

- [37] J. Zhou, W. Zhang, C. Hong, et C. Pan, « Silica Nanotubes Decorated by pH-Responsive Diblock Copolymers for Controlled Drug Release », *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, 7 (6), 3618–3625
- [38] M. Manguian, M. Save, et B. Charleux, « Batch Emulsion Polymerization of Styrene Stabilized by a Hydrophilic Macro-RAFT Agent », *Macromolecular Rapid Communications* **2006**, 27 (6), 399-404.
- [39] S. R. Marek, C. A. Conn, et N. A. Peppas, « Cationic nanogels based on diethylaminoethyl methacrylate », *Polymer* **2010**, 51 (6), 1237-1243.
- [40] A. Kawamura, Y. Hata, T. Miyata, et T. Uragami, « Synthesis of glucose-responsive bioconjugated gel particles using surfactant-free emulsion polymerization », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 99, 74-81.
- [41] R. Tiwari, T. Heuser, E. Weyandt, B. Wang, et A. Walther, « Polyacid microgels with adaptive hydrophobic pockets and ampholytic character: synthesis, solution properties and insights into internal nanostructure by cryogenic-TEM », *Soft Matter* **2015**, 11 (42), 8342-8353.
- [42] A. Pikabea, G. Aguirre, J. I. Miranda, J. Ramos, et J. Forcada, « Understanding of nanogels swelling behavior through a deep insight into their morphology », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2015**, 53 (17), 2017-2025.
- [43] N. Sharifi-Sanjani, A. R. Mahdavian, et P. Bataille, « Emulsion polymerization of styrene and DEAEMA with a core-shell structure », *Journal of Applied Polymer Science* **2000**, 78 (11), 1977-1985.
- [44] A. Pikabea, J. Ramos, et J. Forcada, « Production of Cationic Nanogels with Potential Use in Controlled Drug Delivery », *Particle & Particle Systems Characterization* **2014**, 31 (1), 101-109.
- [45] F. M. J. Vallet, « Ethers of 7-hydroxy-coumarin useful as medicaments », Brevet US4151291 [en ligne] 24 avril 1979, disponible sur : < <http://www.google.co.id/patents/US4151291>> (Consulté le 01/01/2016)
- [46] T. A. Scott et E. H. Melvin, « Determination of Dextran with Anthrone », *Analytical Chemistry* **1953**, 25 (11), 1656-1661.
- [47] R. G. Strickley, « Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations », *Pharmaceutical Research* **2004**, 21 (2), 201-230.
- [48] A. Licea-Claverie, J. Alvarez-Sánchez, L. A. Picos-Corrales, C. Obeso-Vera, M. C. Flores, J. M. Cornejo-Bravo, C. J. Hawker, et C. W. Frank, « The Use of the RAFT-Technique for the Preparation of Temperature/pH Sensitive Polymers in Different Architectures », *Macromolecular Symposia* **2009**, 283-28 (1), 56-66.
- [49] L. Liu, C. Wu, J. Zhang, M. Zhang, Y. Liu, X. Wang, et G. Fu, « Controlled polymerization of 2-(diethylamino)ethyl methacrylate and its block copolymer with N-isopropylacrylamide by RAFT polymerization », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, 46 (10), 3294-3305.
- [50] K. E. Christodoulakis et M. Vamvakaki, « pH-Responsive Microgel Particles Comprising Solely Basic or Acidic Residues », *Macromolecular Symposia* **2010**, 291-292 (1), 106-114.
- [51] L. Barner, N. Zwaneveld, S. Perera, Y. Pham, et T. P. Davis, « Reversible addition-fragmentation chain-transfer graft polymerization of styrene: Solid phases for organic and peptide synthesis », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2002**, 40 (23), 4180-4192.
- [52] M. Camail, H. Essauoudi, A. Margailan, et J. L. Vernet, « Copolymérisation radicalaire de méthacrylates de 2-aminoéthyle avec le méthacrylate de méthyle », *European Polymer Journal* **1995**, 31 (11), 1119-1125.
- [53] W. G. Eversole et W. W. Boardman, « The Effect of Electrostatic Forces on Electrokinetic Potentials », *The Journal of Chemical Physics* **1941**, 9 (11), 798.
- [54] B. Cattoz, T. Cosgrove, M. Crossman, et S. W. Prescott, « Surfactant-Mediated Desorption of Polymer from the Nanoparticle Interface », *Langmuir* **2012**, 28 (5), 2485-2492.
- [55] A. Jhaveri, P. Deshpande, et V. Torchilin, « Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy », *Journal of Controlled Release* **2014**, 190, 352-370.
- [56] B. Chang, X. Sha, J. Guo, Y. Jiao, C. Wang, et W. Yang, « Thermo and pH dual responsive, polymer shell coated, magnetic mesoporous silica nanoparticles for controlled drug release », *Journal of Materials Chemistry* **2011**, 21 (25), 9239.

- [57] C. Y. Zhang, W. S. Wu, N. Yao, B. Zhao, et L. J. Zhang, « pH-sensitive amphiphilic copolymer brush Chol-g-P(HEMA-co-DEAEMA)-b-PPEGMA: synthesis and self-assembled micelles for controlled anti-cancer drug release », *RSC Advances* **2014**, 4 (76), 40232.
- [58] E. He, P. Ravi, et K. C. Tam, « Synthesis and Self-Assembly Behavior of Four-Arm Poly(ethylene oxide)-b-poly(2-(diethylamino)ethyl methacrylate) Star Block Copolymer in Salt Solutions », *Langmuir* **2007**, 23 (5), 2382-2388.
- [59] E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, et E. Bosch, « Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems », *Analytica Chimica Acta* **2005**, 548 (1-2), 95-100.
- [60] J. Lazarovits, Y. Y. Chen, E. A. Sykes, et W. C. W. Chan, « Nanoparticle–blood interactions: the implications on solid tumour targeting », *Chemical Communications* **2015**, 51 (14), 2756-2767.
- [61] J. Tournebize, A. Boudier, A. Sapin-Minet, P. Maincent, P. Leroy, R. Schneider, « Role of Gold Nanoparticles Capping Density on Stability and Surface Reactivity to Design Drug Delivery Platforms » *ACS Applied Materials & Interfaces* **2012**, 4, 5790-5799.
- [62] « J. Tournebize, A. Boudier, O. Joubert, H. Eidi, G. Bartosz, P. Maincent, P. Leroy, A. Sapin-Minet, “Impact of gold nanoparticle coating on redox homeostasis”, *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, 438, 107-116. »
- [63] I. Bertholon, C. Vauthier, et D. Labarre, « Complement Activation by Core–Shell Poly(isobutylcyanoacrylate)–Polysaccharide Nanoparticles: Influences of Surface Morphology, Length, and Type of Polysaccharide », *Pharmaceutical Research* **2006**, 23 (6), 1313-1323.
- [64] C. Vauthier, B. Persson, P. Lindner, et B. Cabane, « Protein adsorption and complement activation for diblock copolymer nanoparticles », *Biomaterials* **2011**, 32 (6), 1646-1656.
- [65] E. Österberg, K. Bergström, K. Holmberg, T. P. Schuman, J. A. Riggs, N. L. Burns, J. M. Van Alstine, et J. M. Harris, « Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations: Comparison to PEG: protein-rejecting ability of dextran », *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, 29 (6), 741-747.
- [66] J. T. Ngo, B. M. Babin, J. A. Champion, E. M. Schuman, et D. A. Tirrell, « State-Selective Metabolic Labeling of Cellular Proteins », *ACS Chemical Biology* **2012**, 7 (8), 1326-1330.
- [67] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, et C. R. Bertozzi, « Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging », *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, 104 (43), 16793-16797.
- [68] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, et G.-J. Boons, « Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions », *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47 (12), 2253-2255.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

La conception de nanovecteurs (NVs) capables de protéger une substance active (SA) de la dégradation *in vivo*, de l'adresser sélectivement vers le tissu ou la cellule cible et d'en contrôler la libération demeure un challenge pour les biologistes et les chimistes. La cancérologie est de loin le domaine médical dans lequel le plus d'efforts sont investis pour répondre à ce challenge et pour lequel de nombreux types de NVs ont été développés.

Les nanocapsules (NCs) polymères, bien qu'elles ne soient pas encore commercialisées, sont des candidats potentiels en raison de leurs nombreux avantages. Les NCs sont des systèmes particuliers à morphologie cœur/écorce constituées d'un cœur vide (NCs creuses), solide ou liquide, entouré par une écorce de polymère. Dans le cas de NCs à cœur liquide, il est possible d'encapsuler des composés lipophiles ou hydrophiles selon la nature du cœur liquide (phase aqueuse ou huile hydrophobe). Les NCs offrent également la possibilité de moduler la cinétique de libération de la SA en variant l'épaisseur et la nature chimique de l'écorce polymère.

De nombreuses méthodes sont utilisées pour la fabrication de NCs à cœur liquide et peuvent être classifiées en trois grands groupes : i) ségrégation de phases entre le cœur liquide et le polymère (préformé ou produit *in situ*) qui constituera l'écorce de la NC ii) i) déposition des polymères préformés en surface d'un cœur sacrificiel et iii) réactions confinées à l'interface liquide/liquide des nanogouttelettes d'une émulsion.

Parmi ces différentes techniques, la polymérisation en miniémulsion présente l'avantage de permettre l'incorporation de la SA, la synthèse du polymère qui constituera l'écorce et la fabrication de la NC dans une seule étape. De plus, l'utilisation combinée de la polymérisation en miniémulsion et d'un tensioactif réactif peut favoriser ou permettre exclusivement la

formation du polymère à l'interface liquide/liquide, et ainsi éviter les problèmes de contrôle de la morphologie des nano-objets formés par simple ségrégation de phases entre le polymère et le cœur liquide. En outre, si les groupements réactifs de ce tensioactif réactif sont des amorceurs d'une polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) (cas des inisurfs) ou des agents de transfert d'une polymérisation par Addition-Fragmentation-Transfert Réversible RAFT (cas des transurfs), les paramètres macromoléculaires du polymère qui constituera l'écorce de la NC peuvent également être contrôlés.

L'objectif de cette thèse était d'utiliser un transurf multifonctionnel dérivé du dextrane comme stabilisant et agent de contrôle d'une polymérisation RAFT en miniémulsion afin de préparer des NCs à morphologie et propriétés de surface contrôlées. A notre connaissance, un tel macroagent RAFT tensioactif réactif et multifonctionnel n'a jamais encore été reporté dans la littérature. Dans ces travaux, les NCs sont composées d'une écorce polymère interne (poly(méthacrylate de méthyle), PMMA), d'un cœur huileux hydrophobe et biocompatible (Miglyol[®]810, M810) et d'une couronne externe hydrophile à base de polysaccharide (dextrane). Ces NCs sont destinées à la délivrance de SAs, idéalement des anticancéreux, après injection par voie intraveineuse.

Pour préparer de telles NCs, nous avons tout d'abord synthétisé les macroagents RAFT multifonctionnels dérivés du dextrane (DexN₃.τCTAγ). Dans un premier temps, des chaînes alkyle hydrophobes ont été greffées sur le dextrane par réaction avec un acide activé (obtenu à partir de l'acide 6-azidohéxanoïque) dans le DMSO. Ceci a permis l'obtention de dérivés nommés DexN₃.τ. Ensuite, des groupements agents de transfert RAFT du type dithiobenzoate, appelés CTA, ont été introduits directement sur les DexN₃.τ, par réaction avec l'acide 4-cyano-4-(phénylcarbonothioylthio)pentanoïque (CPADB) en présence du système catalytique EDC/DMAP. Les dérivés DexN₃.τ et DexN₃.τCTAγ obtenus possèdent des propriétés tensioactives ce qui leur permet de stabiliser des émulsions huile-dans-eau.

Dans un deuxième temps, nous avons validé le choix du M810 comme co-stabilisant et cœur liquide de NCs. Des études de stabilité des émulsions (MMA+M810)/eau dans les conditions opératoires de préparation des NCs nous ont permis de vérifier la capacité du M810 à limiter le vieillissement de la miniémulsion par mûrissement d'Ostwald et le potentiel des dérivés DexN₃.τ à éviter le phénomène de coalescence. La possibilité d'obtenir une morphologie cœur-écorce a aussi été vérifiée par calorimétrie différentielle à balayage modulée (MDSC). Il semble ainsi envisageable de préparer des systèmes cœur-écorce avec le couple M810/PMMA pour des

teneurs supérieures à 11% massique de M810 par rapport au PMMA, puisque ces derniers ne sont alors pas miscibles.

Dans un troisième temps, nous avons cherché à établir les conditions réactionnelles permettant le contrôle de la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion. Ceci a été réalisé grâce à un agent de transfert RAFT modèle, le dithiobenzoate de 2-cyano-2-propyle (CPDB, de structure similaire à celle des groupements CTA présents sur les dérivés DexN₃-τCTAγ) et en utilisant les dérivés DexN₃-τ comme stabilisant de la miniémulsion. La polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence de CPDB comme CTA peut être contrôlée dans une large gamme de conditions. Ainsi, des ratios [MMA]₀/[CPDB]₀ compris entre 89 et 398, [CPDB]₀/[AIBN]₀ variant entre 2 et 8 et des températures de 70 °C et 80 °C nous ont permis d'obtenir des PMMA bien définis ($\bar{M}_w < 1,2$) à forte conversion en monomère.

Après avoir déterminé les conditions optimales nécessaires au contrôle de la polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion, nous avons mis au profit les sites agent de transfert RAFT présents sur les DexN₃-τCTAγ pour générer les greffons PMMA. Les conditions réactionnelles déterminées lors de l'homopolymérisation du MMA en présence du système modèle DexN₃-τ/CPDB ont été appliquées et se sont également avérées adaptées pour contrôler cette polymérisation en miniémulsion. De plus, aucun problème de stabilité colloïdale n'a été observé. Les conditions choisies ont permis de synthétiser des objets avec une distribution de taille relativement étroite et un diamètre moyen d'environ 110 nm. La croissance effective de greffons PMMA à partir du dextrane a pu être vérifiée grâce à différentes techniques (RMN ¹H, RMN 2D DOSY ¹H et SEC-MALLS). Après une étape d'hydrolyse basique des fonctions ester reliant le tronc dextrane aux greffons PMMA, nous avons pu étudier la distribution massique de ces derniers. Une évolution linéaire des masses molaires de ces greffons avec la conversion et des dispersités inférieures à 1,2 ont été observées. Nous avons également montré la possibilité de fabriquer des objets à forte teneur en M810 (ce qui laisse espérer une plus forte capacité d'encapsulation), tout en gardant le caractère contrôlé de la polymérisation. Finalement, une efficacité moyenne des groupements CTA d'environ 50% a pu être estimée.

Nous nous sommes, par la suite, intéressés aux caractérisations physicochimiques des NCs préparées avec le système modèle CPDB/DexN₃-τ (nommées NCs-MOD) ou en présence des transurfs DexN₃-τCTAγ (nommées NCs-CTA). Elles ont été tout d'abord caractérisées en termes de distribution de taille, de stabilité colloïdale et de couche superficielle de dextrane (stabilité, épaisseur, et taux de recouvrement). Nous avons pu montrer la stabilité des deux types de NCs

dans deux conditions de stockage (dispersion colloïdale ou à l'état solide après lyophilisation). La présence d'une couronne de dextrane à la surface des NCs-MOD et NCs-CTA a été indirectement mise en évidence par l'amélioration de la stabilité colloïdale de ces objets en milieu salin, par rapport à des NCs non-recouvertes, et par l'écrantage de la charge de surface des objets mesurée par potentiel Zêta. Les deux types de NCs se sont également avérées stables à la force ionique du sang (0,148 M) et sont alors potentiellement utilisables pour une administration par voie intraveineuse. De plus, la stabilité du recouvrement en dextrane des NCs-CTA en présence d'un tensioactif compétitif montre l'avantage de l'immobilisation covalente de la couronne de dextrane à la surface des NCs (par rapport à une simple adsorption physique) grâce à l'utilisation des macroagents RAFT DexN₃-τCTAγ lors de la polymérisation. Des analyses par MDSC des NCs-MOD et NCs-CTA confirment qu'il y a bien une ségrégation de phases entre les différents constituants de nos objets. Cette ségrégation devrait conduire, *a priori*, à l'obtention de la morphologie cœur-écorce désirée. Enfin, des analyses par Microscopie Electronique à Transmission à basse température (Cryo-MET) ont permis de confirmer la sphéricité des objets fabriqués. Néanmoins, en raison d'un manque de contraste suffisant entre le M810 et le PMMA cette technique n'a pas permis de bien caractériser la structure interne de ces objets.

Tous les résultats précédents nous ont permis de valider la stratégie de synthèse de NCs à écorce PMMA par polymérisation RAFT en miniémulsion en présence des surfactifs DexN₃-τCTAγ. Cette même stratégie nous a ensuite permis d'aboutir à des NCs à écorce poly(MMA-co-DEAEMA) présentant un comportement pH-sensible dans des domaines de pH similaires aux variations du pH en milieu physiologique. Ces nouvelles NCs ont été appelées COPO-NCs, en opposition aux NCs précédentes à écorce PMMA appelées PMMA-NCs.

Finalement, nous avons étudié le potentiel biomédical des PMMA-NCs et COPO-NCs par plusieurs tests préliminaires. D'une part, des tests d'encapsulation et des essais de libération *in vitro* d'une SA modèle, la 7-diéthylamino-4-méthylcoumarine, en fonction du pH ont été réalisés. Pour les deux types des NCs étudiées, une efficacité d'encapsulation de l'ordre de 99% a été obtenue avec environ 14-17 mg de SA encapsulée par gramme de NCs. La cinétique de libération de cette SA à partir des COPO-NCs s'est avérée plus rapide (que dans le cas de PMMA-NCs) et pH-dépendante, ce qui montre l'influence de la nature chimique de l'écorce polymère sur la vitesse de libération. De plus, la SA ne semble pas avoir réagi lors de la polymérisation puisqu'elle peut être complètement libérée dans un milieu contenant du SDS. D'autre part, des premières études d'interactions de ces NCs avec les milieux biologiques ont été

réalisées. Ces expériences préliminaires ont consisté à étudier l'interaction des NCs avec certaines protéines plasmatiques (l'albumine et le fibrinogène) et à évaluer la cytotoxicité des NCs en présence des monocytes sanguins humains (THP-1). Aucune absorption des protéines étudiées à la surface des NCs n'a été observée pour des concentrations en NCs variant entre $3,3 \times 10^{-8}$ et $3,3 \times 10^{-3}$ mg de polymère/mL. Ces résultats laissent supposer que le recouvrement hydrophile en dextrane en surface des NCs limite leur reconnaissance par les protéines plasmatiques. De même, aucun effet des NCs sur la viabilité ou la prolifération cellulaire des macrophages THP-1 n'a été observé après 24 heures d'incubation à 37 °C. Au regard de ces premiers résultats, les PMMA-NCs et COPO-NCs semblent pouvoir être considérées comme cytocompatibles. Enfin, la possibilité d'une post-fonctionnalisation des NCs via les fonctions azoture présentes à leur surface a été mise en évidence en utilisant des molécules fluorescentes modèles à la place des ligands ou de marqueurs de reconnaissance des cellules cancéreuses. Au moins 25% des groupements azoture initialement présents sur le transurf sont disponibles pour une post-modification des objets.

PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans ce manuscrit montrent qu'il est possible d'obtenir des NCs à écorce polyméthacrylate (hydrophobe ou pH-sensible), à cœur huileux et à couronne hydrophile via un procédé de polymérisation en miniémulsion confiné à l'interface liquide/liquide. De plus, les caractérisations physico-chimiques et les études biologiques réalisées sur ces objets témoignent de leur potentiel à être utilisés comme nanovecteurs pour l'administration intraveineuse d'anticancéreux. Néanmoins, en raison d'un manque de temps, plusieurs points intéressants restent à approfondir :

- Optimisation des conditions opératoires de fabrication des NCs à écorce poly(MMA-co-DEAEMA). Les propriétés pH-sensibles de ces NCs pourraient être ajustées en jouant sur la fraction massique du MMA dans le copolymère ou en réticulant l'écorce polymère. L'idée serait de limiter le gonflage de ces NCs et donc de retarder la sortie de la SA. De même, il serait intéressant de réaliser le suivi cinétique de la copolymérisation afin de vérifier le contrôle de la polymérisation RAFT. L'utilisation de transurfs avec différents taux de substitution en groupements réactifs pourrait aussi permettre de varier la longueur de greffons polymères et éventuellement de préparer de NCs à écorce pH-sensible d'épaisseur variable, tout en gardant un taux de conversion le plus élevée possible.
- Caractérisation plus poussée de la morphologie de NCs. Les analyses par diffusion de neutrons aux petits angles (SANS) réalisés dans le cas de NCs à écorce PMMA, devraient nous permettre d'élucider la structure interne de ces objets et éventuellement d'évaluer l'épaisseur de l'écorce polymère. Nous avons envisagé d'étudier l'influence de trois paramètres sur la morphologie : la teneur en M810, le type de transurf et la longueur de greffons PMMA. A l'avenir, une étude similaire devrait idéalement être menée dans le cas de NCs pH-sensibles. En outre, l'utilisation d'autres techniques de caractérisation

morphologique telles que la cryofracture pourraient aussi permettre de confirmer la morphologie cœur-écorce de nos objets.

- Augmentation du taux d'encapsulation de la SA modèle dans les NCs. Pour cela, il serait intéressant d'utiliser des concentrations en SA supérieures à la limite de solubilité de cette SA modèle dans le M810 et/ou de tester des NCs préparées avec une teneur en M810 plus importante.
- Evaluation de l'influence de l'épaisseur de l'écorce polymère sur la cinétique de libération de la SA modèle. Ces essais nécessiteraient de produire des NCs avec des écorces d'épaisseur variable. Ceci serait idéalement possible en utilisant différents transurfs ou en stoppant la polymérisation à des conversions intermédiaires.
- Encapsulation et suivi de la libération de SAs potentiellement anticancéreuses. Le paclitaxel et le docétaxel seraient dans un premier temps des candidats idéaux en raison de leur affinité par le M810.
- Utilisation des groupements azoture présents à la surface de NCs pour introduire des éléments de reconnaissance ou ligands capables d'interagir, de manière spécifique, avec les récepteurs surexprimés par les cellules cancéreuses, comme par exemple l'acide folique.
- Etude biologique des NCs chargées en anticancéreux et décorées en surface avec des ligands. Dans une première approche, il s'agirait d'évaluer l'influence de la SA et des ligands sur les interactions des NCs avec les protéines et sur la cytotoxicité des nano-objets.

Finalement, la plateforme de NCs ici développée pourrait éventuellement être exploitée pour des applications autres que le domaine biomédical. L'encapsulation des SAs telles que des pesticides, des insecticides ou des produits cosmétiques (aromes, parfums), pourrait être envisagée.

PARTIE III

MATERIELS ET METHODES

| | |
|---|------------|
| 1. MATERIELS..... | 265 |
| 2. MODIFICATION CHIMIQUE DU DEXTRANE..... | 266 |
| 2.1. SYNTHÈSE DES DERIVES DexN ₃ -τ..... | 266 |
| 2.1.1. Synthèse de l'acide 6-azidohéxanoïque..... | 266 |
| 2.1.2. Synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohéxanoïque | 268 |
| 2.1.3. Réaction du dextrane avec l'acide 6-azidohéxanoïque activé | 269 |
| 2.2. SYNTHÈSE DES MACROAGENTS RAFT DexN ₃ -τCTAγ | 269 |
| 3. ELABORATION DES NANO-OBJETS..... | 270 |
| 3.1. PAR POLYMERISATION RAFT DU MMA EN MINIEMULSION | 270 |
| 3.1.1. En présence du système modèle DexN ₃ -τ/CPDB | 270 |
| 3.1.2. En présence des transurfs DexN ₃ -τCTAγ..... | 271 |
| 3.2. PAR COPOLYMERISATION RAFT DU MMA ET DU DEAEMA. | 271 |
| 3.3. PAR EMULSION-EVAPORATION DU SOLVANT..... | 272 |
| 4. ETUDE DES GREFFONS PMMA : ETAPE DE DEGREFPAGE..... | 272 |
| 5. CARACTERISATIONS DES POLYMERES | 273 |
| 5.1. SPECTROSCOPIES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE..... | 273 |
| 5.2. INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (FTIR) | 273 |
| 5.3. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (SEC)..... | 274 |
| 5.4. PROPRIETES TENSIOACTIVES DES DERIVES DU DEXTRANE..... | 276 |
| 6. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES NANO-OBJETS..... | 278 |
| 6.1. CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE MODULEE (MDSC) | 278 |
| 6.2. DETERMINATION DU TAUX DE RECOUVREMENT EN DEXTRANE | 279 |
| 6.2.1. Dosage direct (par RMN ¹ H)..... | 280 |
| 6.2.2. Dosage indirect à l'anthrone..... | 281 |
| 6.3. DISTRIBUTION DE TAILLE DES OBJETS | 282 |
| 6.3.1. Granulomètre..... | 282 |
| 6.3.2. HPPS | 283 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 6.4. | MESURES DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE (DETERMINATION DE L'ÉPAISSEUR DU RECOUVREMENT EN DEXTRANE) | 284 |
| 6.5. | STABILITE COLLOÏDALE EN PRESENCE DE NaCl..... | 287 |
| 6.6. | STABILITE DU RECOUVREMENT EN DEXTRANE EN PRESENCE DE SDS | 288 |
| 6.7. | GONFLEMENT DES NP _s pH-SENSIBLES | 289 |
| 6.8. | MORPHOLOGIE : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET) | 289 |
| 7. | POTENTIEL DES NANO-OBJETS POUR DES APPLICATIONS BIOMEDICALES | 290 |
| 7.1. | ENCAPSULATION ET CINETIQUE DE LIBERATION DE LA COUMARINE 1 | 290 |
| 7.1.1. | Milieux de libération | 290 |
| 7.1.2. | Détermination de la masse de Cou1 encapsulée..... | 290 |
| 7.1.3. | Protocole de libération de la Cou1 à partir de NCs à écorce PMMA..... | 292 |
| 7.1.4. | Dosage de la Cou1 par fluorimétrie..... | 293 |
| 7.1.5. | Libération de la Cou1 à partir de NPs à écorce pH sensible..... | 295 |
| 7.2. | INTERACTIONS AVEC LES MILIEUX BIOLOGIQUES | 296 |
| 7.2.1. | Dosage BSA | 296 |
| 7.2.2. | Dosage fibrinogène..... | 297 |
| 7.2.3. | Interaction avec les cellules immunocompétentes monocytes sanguins humains (THP-1).... | 298 |
| 7.3. | POST-FONCTIONNALISATION DES NCs PAR UNE SONDE FLUORESCENTE MODELE | 299 |
| 7.3.1. | Par Chimie « Click » en présence de cuivre | 299 |
| 7.3.2. | Par Chimie « Click » sans cuivre..... | 301 |
| 8. | REFERENCES..... | 303 |

MATERIELS ET METHODES

1. MATERIELS

Le dextrane T40, fourni par Pharmacia Biotech ($\bar{M}_n = 26\ 000$ g/mol ; $D = 1,3$), a été caractérisé par chromatographie d'exclusion stérique couplée à une diffusion de la lumière multi-angles (SEC-MALLS) en utilisant DMSO/NaNO₃ (0,1 M) comme éluant aqueux. Avant chaque modification chimique, le dextrane est séché pendant une nuit sous vide dynamique à 100°C, directement dans le ballon de réaction.

▪ Modification chimique du dextrane

Les réactifs suivants ont été utilisés sans purification préalable pour la synthèse des macroagents de transfert dérivés du dextrane: l'azidure de sodium (NaN₃, Aldrich), le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI, Aldrich), l'acide 4-cyano-4-(phénylcarbonothioylthio)pentanoïque (CPADB, Aldrich), la 4-diméthylaminopyridine (DMAP, Aldrich) et l'hydrochlorure de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC, ABCR).

Le diméthylsulfoxyde (DMSO), le dichlorométhane (DCM), le tétrahydrofurane (THF), le diméthylformamide (DMF) et le diméthylacétamide (DMAC) sont séchés sur tamis moléculaire après ouverture de bouteille.

▪ Polymérisation en miniémulsion

Les monomères, méthacrylate de méthyle (MMA, Aldrich) et méthacrylate de *N,N*-diéthylaminoéthyle (DEAEMA, Aldrich), sont séchés sur CaH₂ puis distillés sous pression réduite

avant de leur utilisation. Le MMA- d_8 (Aldrich) employé pour la préparation de NPs destinées aux analyses SANS a été purifié sur une colonne d'oxyde d'aluminium. Le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN, Aldrich) est recristallisé deux fois dans le méthanol avant d'être employé. L'agent RAFT modèle, le dithiobenzoate de 2-cyano-2-propyle (CPDB, Aldrich), a été utilisé sans aucune purification préalable. Le Miglyol 810 (M810) a été offert par CREMER Oleo GmbH & Co. KG. C'est un triglycéride majoritairement composé d'acides caprique (C_8 : 0 69,3 % m.) et caprylique (C_{10} : 0 30,1 % m.) ($\rho = 0,94$ g/mL, $\mu = 30$ mPa.s, masse molaire = 488 g/mol¹, $\log P=10,4^2$)

▪ **Potentiel biomédical des objets**

La 7-diéthylamino-4-méthylcoumarine (Cou1, Aldrich) a été utilisée comme principe actif modèle lors des expériences d'encapsulation et de libération. La dibenzocyclooctyne-PEG4-Fluor 545 (DBCO-PEG4-TAMRA, Aldrich) a été employée telle quelle pour post-fonctionnaliser la surface de NCs via une réaction de chimie click en absence de cuivre. L'albumine de sérum bovine (BSA, Aldrich) et le fibrinogène humain (Aldrich) ont été employés en l'état pour l'étude de l'interaction des NPs avec les protéines. La lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1, utilisée dans les études de cytocompatibilité, a été obtenue auprès de ATCC® (TIB-202™, Manassas, VA, USA)

2. MODIFICATION CHIMIQUE DU DEXTRANE

2.1. SYNTHÈSE DES DERIVES DexN₃. τ

Ce protocole a été repris à partir de travaux précédents menés au LCPM [2].

2.1.1. Synthèse de l'acide 6-azidohéxanoïque



Schéma III- 1: Synthèse de l'acide 6-azidohéxanoïque

¹ Calculée en utilisant l'indice de saponification moyen donné par le fournisseur (IS=345 mg KOH/g) par l'équation : $M_{M810} \left(\frac{g}{mol}\right) = \frac{3 \times 1000 \times 56,1}{IS}$ avec 56,1 g/mol, la masse molaire du KOH.

² Estimé par une méthode de contribution des groupes [1] en utilisant la composition moyenne en acides gras.

8,18 g d'azidure de sodium (0,126 mol, soit 1,22 mol/COOH) sont solubilisés dans 250 mL de DMSO à 40 °C pendant 3 heures. 20 g d'acide 6-bromohexanoïque (0,103 mol) sont ajoutés progressivement à cette solution et le mélange est laissé sous agitation pendant 4 heures à température ambiante.

Le produit désiré est purifié par extraction liquide/liquide. Pour cela, 250 mL d'eau acidifiée à pH 3 par de l'HCl (12 N) sont ajoutés au milieu réactionnel. Ceci permet d'éviter de perdre du produit sous sa forme carboxylate dans la phase aqueuse. La phase aqueuse est extraite trois fois avec 200 mL de DCM, puis la phase organique est lavée deux fois avec de l'eau acidifiée par de l'HCl 12 N (pH = 3). La phase organique est finalement séchée avec du MgSO₄ pendant 30 minutes sous agitation. Après filtration sur du coton, le DCM est éliminé majoritairement par évaporation sous pression réduite. Cette étape est réalisée à 25 °C pour éviter tout risque d'explosion des azotures [3]. Le produit final est séché dans une étuve sous vide dynamique à température ambiante et analysé par RMN ¹H dans le CDCl₃ (Figure III- 1). Comme on peut le remarquer, ce composé contient encore du DMSO résiduel. La teneur massique du produit est estimée à 72% et est calculée grâce à l'équation III- 1.

$$\% m_{Ac-N_3} = \frac{\frac{A_{b+c+d+e+f}}{10} \times M_{Ac-N_3}}{\frac{A_{b+c+d+e+f}}{10} \times M_{Ac-N_3} + \frac{A_{D+D'}}{6} \times M_{DMSO}} \times 100 \quad \text{III- 1}$$

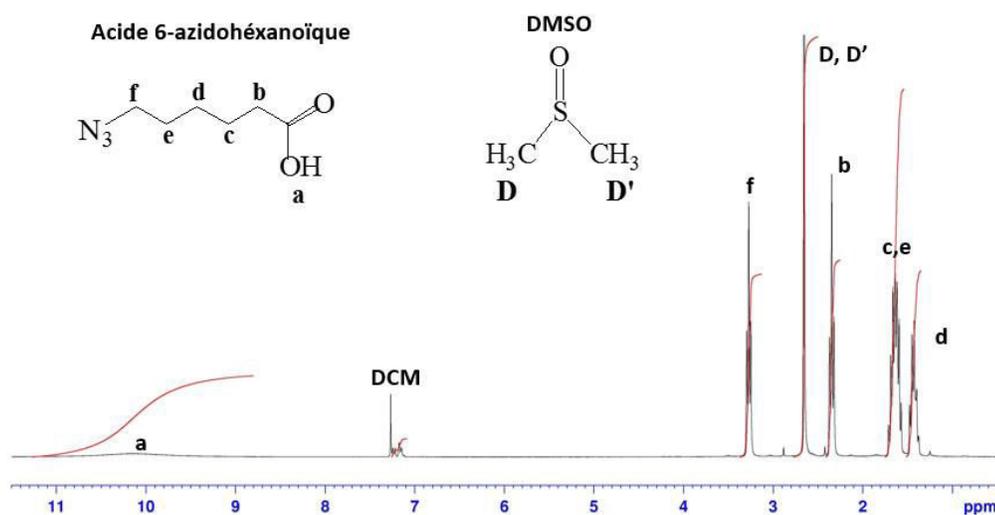


Figure III- 1: Spectre RMN ¹H de l'acide 6-azidohéxanoïque dans CDCl₃.

2.1.2. Synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohéxanoïque

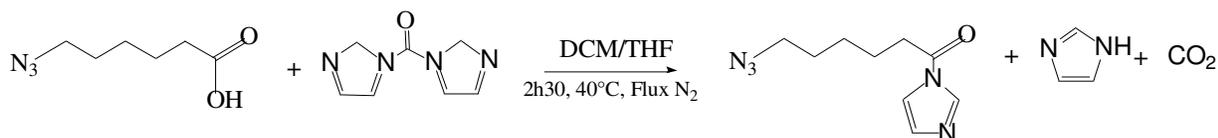
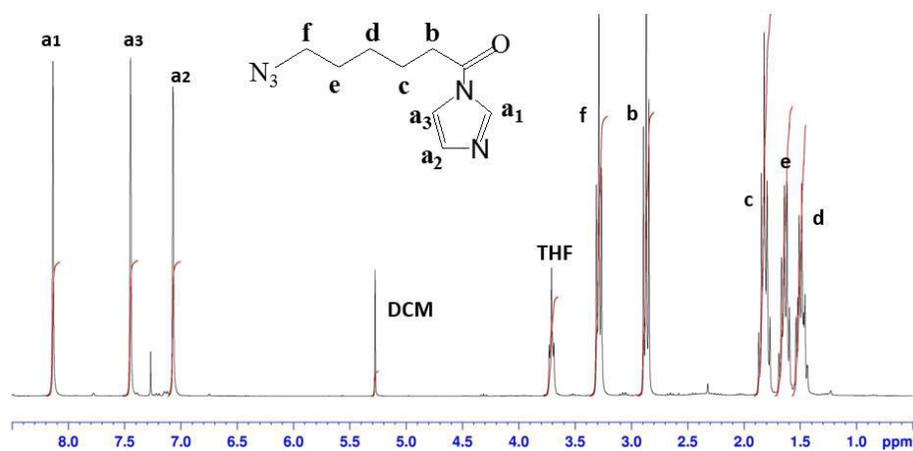


Schéma III- 2: Synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohéxanoïque

Afin d'éliminer toute trace d'eau, la verrerie est mise à l'étuve et le montage purgé sous azote. Le solvant choisi pour cette réaction est un mélange 1 : 1 v/v de DCM et THF anhydres. 19,4 g de 1,1'-carbonyldiimidazole CDI (0,120 mol, soit 1,3 mol/COOH) et 200 mL du solvant sont introduits dans le ballon réactionnel sous circulation d'azote. 14,5 g de l'acide 6-azidohéxanoïque (soit 0,079 mol d'acide pur en tenant compte du DMSO résiduel) préalablement dissout dans 12 mL de solvant (1 : 1 v/v DCM/THF) sont ajoutés goutte-à-goutte à l'aide d'une ampoule de coulée. La réaction est poursuivie pendant 2 h 30 sous agitation et sous faible flux d'azote à 40 °C.

En fin de réaction, le mélange est concentré par évaporation sous pression réduite. 100 mL de DCM sont à nouveau ajoutés et le milieu réactionnel est lavé 2 fois à 100 mL d'eau. Ainsi le CDI en excès est hydrolysé en imidazole soluble dans la phase aqueuse. La phase aqueuse est ensuite extraite deux fois à 100 mL du DCM. La totalité des phases organiques est lavée deux fois à l'eau, séchée sur MgSO₄, et filtrée sur du coton. Le DCM est évaporé sous pression réduite et le produit est séché sous vide dynamique à température ambiante pendant 1h. Le produit final est analysé par RMN ¹H dans le CDCl₃ (Figure III- 2) et stocké à -20 °C.

Figure III- 2: Spectre RMN ¹H de l'ester activé de l'acide 6-azidohéxanoïque dans CDCl₃.

2.1.3. Réaction du dextrane avec l'acide 6-azidohéxanoïque activé

- **Exemple du DexN₃₋₂₀**

10 g de dextrane sec (62 mmol d'unités glucopyranose -UG) sont dissous dans 100 mL de DMSO (soit 10 mL/g de dextrane). Le mélange est chauffé à 50 °C et maintenu sous agitation jusqu'à dissolution complète du polysaccharide. 3,0 g d'acide 6-azidohéxanoïque activé (14,5 mmol, soit 0,23 mol/UG) sont alors introduits dans le ballon réactionnel via une seringue. La réaction se fait à 50 °C pendant 48 heures. Le mélange réactionnel est précipité 2 fois par de l'éthanol froid et le produit obtenu est séché sous vide dynamique à 40 °C puis analysé par RMN ¹H dans le DMSO-*d*₆.

En variant la quantité d'acide activé utilisé, il est possible d'obtenir des dérivés DexN_{3-τ} avec différents taux de substitution τ en groupements hydrophobes (Chapitre I, paragraphe 1.2.1).

2.2. SYNTHÈSE DES MACROAGENTS RAFT DexN_{3-τ}CTA γ

- **Exemple du macroagent RAFT DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}**

Dans ce cas, les rapports molaires UG/CPADB/EDC/DMAP utilisés sont : 3,3/1/3/0,1. 2 g de DexN₃₋₂₀ (10,5 mmol UG) sont dissous dans 40 mL de DMF (soit 20 mL/g DexN₃₋₂₀). Cette solution est placée dans un bain froid à 0 °C et 1,84 g d'EDC (9,6 mmol) sont ensuite ajoutés. Au bout d'une heure sous agitation à 0 °C, 0,88 g de CPADB (3,2 mmol) ainsi que 38 mg de DMAP (0,32 mmol, dissout dans 1 mL de DMF) sont alors additionnés au milieu réactionnel. Le mélange est maintenu sous agitation à 20 °C pendant 48 heures puis précipité deux fois par de l'éthanol froid. Le produit rose obtenu est séché à l'étuve sous vide dynamique à 40 °C pendant une nuit, puis caractérisé par RMN ¹H dans le DMSO-*d*₆.

3. ELABORATION DES NANO-OBJETS

3.1. PAR POLYMERISATION RAFT DU MMA EN MINIEMULSION

3.1.1. En présence du système modèle DexN₃.τ/CPDB

Dans le cas d'une polymérisation en présence de l'agent RAFT modèle, la phase aqueuse est classiquement constituée de 150 mg du dérivé dextrane tensioactif (DexN₃.τ) dissout dans 15 mL d'eau MilliQ (concentration finale de 10 g/L). La phase organique est quant à elle préparée avec des rapports molaires $[MMA]_o/[CPDB]_o/[AIBN]_o = X/1/0,33$. Pour $X = 398$, 1,1 mL de MMA (10,3 mmol), 1,3 mg d'AIBN ($7,9 \times 10^{-3}$ mmol), 5,7 mg de CPDB ($2,6 \times 10^{-2}$ mmol) et 275 µl de M810 sont mélangés. Dans ce cas, le rapport volumique M810/MMA est égal à 25 % vol. La phase aqueuse est versée sur la phase organique puis le mélange est émulsifié en utilisant une sonde à ultrasons (modèle Vibracell 600W, Sonics&MaterialsInc, Danbury, CT) en mode pulsé et en présence d'un bain glacé (51% d'amplitude, 5W, 1 minute). Après sonication, l'émulsion est dégazée pendant 45 minutes dans un bain d'eau glacée maintenue à une température de 10-15 °C, puis porté à 80 °C afin de démarrer la polymérisation. Différentes réactions sont menées en parallèle dans les mêmes conditions afin de réaliser un suivi cinétique. La conversion du monomère est estimée par gravimétrie. Pour cela, 1 mL de l'émulsion obtenue à un temps donné, est séché sous vide dynamique à 100 °C jusqu'à poids constant. Une partie des objets secs est utilisée pour la détermination de la masse molaire de chaînes PMMA par SEC-MALLS dans le THF (paragraphe 5.3). L'évolution de la taille des nanogouttelettes/nano-objets lors de la polymérisation est déterminée par granulométrie (paragraphe 6.3.1).

Les nano-objets obtenus en fin de polymérisation sont lavés par centrifugation (21 000 tours par minute-tpm, 1 heure, 15 °C). La technique consiste à centrifuger les particules, à éliminer le surnageant et le remplacer par de l'eau MilliQ frais, puis à les redisperser à l'aide des ultrasons dans une cuve modèle Branson 2510, 40 KHz. L'opération est ainsi réalisée deux fois. La redispersion totale des nano-objets peut prendre environ 1 heure. Ces objets lavés sont ensuite utilisés pour les analyses biologiques et caractérisations morphologiques.

3.1.2. En présence des transurfs DexN₃-τCTA_γ

Dans le cas du transurf DexN₃₋₂₀CTA_{3,7}, des rapports molaires théoriques [MMA]_o/[CTA]_o/[AIBN]_o = 393/1/0,3 ont été classiquement employés. Dans ce cas, la phase aqueuse est composée de 150 mg du macroagent RAFT dissout dans 15 mL d'eau MilliQ pour arriver à une concentration de 10 g/L. 1,1 mL de MMA (10,3 mmol), 1,3 mg d'AIBN ($7,9 \times 10^{-3}$ mmol) et 275 µl de M810 (dans le cas d'un ratio M810/MMA de 25 % vol.) constituent la phase organique. Si on désire encapsuler la Cou1, environ 21 mg de cette sonde (0,09 mmol) sont préalablement dissout dans la phase organique.

Les protocoles utilisés lors de la préparation de la nanoémulsion, du démarrage de la polymérisation, de la détermination du taux de conversion et pour le lavage des objets finaux sont similaires à ceux décrits dans le cas des expériences modèles.

Afin de caractériser les glycopolymères produits, une étape de purification additionnelle est réalisée. Les nano-objets secs sont lavés plusieurs fois au THF afin d'enlever le M810 et les chaînes polymères non-fixées au dextrane. Le copolymère ainsi purifié est analysé, après évaporation du THF (par séchage sous vide dynamique à 50 °C pendant une nuit), par SEC-MALLS dans le DMF/LiCl (2 g/L). La masse molaire des chaînes PMMA non-greffées et récupérées dans la première solution de lavage, est déterminée par SEC-MALLS dans le THF.

3.2. PAR COPOLYMERISATION RAFT DU MMA ET DU DEAEMA.

Toutes les expériences ont été réalisées en présence du transurf DexN₃₋₂₀CTA_{3,7} avec des rapports molaires théoriques [MMA]_o/[DEAEMA]_o/[CTA]_o/[AIBN]_o = 115/120/1/0,3. La phase aqueuse (15 mL) est toujours composée du macroagent RAFT dissout à 10 g/L dans l'eau. La phase organique est dans ce cas préparée avec 0,3 mL de MMA (2,9 mmol), 1,3 mg d'AIBN ($7,9 \times 10^{-3}$ mmol) et 275 µl de M810. Le DEAEMA est rajouté en excès pour contrebalancer sa solubilité dans l'eau (67 g/L). Ainsi 1,7 mL de DEAEMA sont introduits dont 1,1 mL se solubilisant dans la phase aqueuse et 0,6 mL (3,8 mmol) dans la phase organique. Si on désire encapsuler la Cou1, environ 21 mg de cette sonde (0,09 mmol) sont aussi introduits dans la phase organique.

La polymérisation et purification des objets sont réalisées comme expliqué ci-dessus. Afin de déterminer la composition molaire des greffons, les chaînes non-accrochées au dextrane ont été

extraites dans du THF, séchées sous vide dynamique à 50 °C puis caractérisées par RMN ¹H dans le CDCl₃.

3.3. PAR EMULSION-EVAPORATION DU SOLVANT

25 mg de PMMA (8 300 g/mol, $D=1,06$)³ sont dissous dans une phase organique composée de 1 mL de DCM et x μL de M810 (x = 0 dans le cas des NSs et x = 7 pour des NCs). En parallèle, 60 mg de cholate de sodium (cas des NSs-nues) ou de DexN₃₋₂₀ sont solubilisés dans 10 mL d'eau Milli-Q saturée par du DCM. La phase aqueuse est ensuite ajoutée à la phase organique. Le mélange est préémulsifié à l'aide d'un vortex pendant 1 minute, puis émulsifié en utilisant une sonde à ultrasons (modèle Vibracell 600W, Sonics&MaterialsInc, Danbury, CT) en mode pulsé et en présence d'un bain glacé (51% d'amplitude, 5W, 1 minute). L'émulsion est transférée dans un cristallisateur de 50 mL puis le DCM est évaporé pendant 3 h dans une étuve ventilée à 37 °C sous agitation modérée à 65 tpm. Les objets formés sont centrifugés (18 000 tpm, 30 min, 15 °C), le surnageant est enlevé et les objets sont redispersés dans l'eau Milli-Q pendant 30 min, comme précédemment (paragraphe 3.1.1). La procédure est répétée encore deux fois. Finalement, les objets sont caractérisés par granulométrie puis lyophilisés pour l'analyse RMN ¹H dans le DMSO-*d*₆.

4. ETUDE DES GREFFONS PMMA : ETAPE DE DEGREFPAGE

Le « décrochage » des chaînes PMMA d'un copolymère DexN_{3-τ}-g-*n*PMMA _{\overline{M}_n} issu d'un macroagent RAFT (DexN_{3-τ}CTAγ) est réalisé en introduisant 50 mg du glycopolymère dans 6 mL d'un mélange THF/(KOH-MeOH 1M) (2/1 v/v). Cette solution est ensuite agitée pendant 72 h à température ambiante. Après neutralisation du milieu réactionnel avec une solution aqueuse d'HCl (12 N), le THF et le méthanol sont totalement évaporés. Les chaînes PMMA sont solubilisées dans du toluène et la solution est ensuite filtrée sur du papier filtre, dans le but d'éliminer le KCl. Le PMMA est récupéré par précipitation par l'éther de pétrole froid, filtration puis séchage une nuit

³ Il s'agit d'un polymère synthétisé par polymérisation RAFT du MMA en masse ([MMA]₀/[CPDB]₀/[AIBN]₀=300/1/0,33, 70 °C, 1 heure), purifié par deux précipitations par l'éther de pétrole froid et séché à l'étuve toute une nuit à 50 °C sous vide dynamique.

sous vide à 50 °C. Le polymère est enfin dissout dans du THF, filtré et analysé par SEC-MALLS. Une caractérisation par RMN ^1H dans le DMSO- d_6 permet de vérifier l'absence de chaîne dextrane.

5. CARACTERISATIONS DES POLYMERES

5.1. SPECTROSCOPIES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Nous avons utilisé la RMN ^1H et la RMN 2D DOSY ^1H pour caractériser la structure des copolymères synthétisés. Les spectres ont été réalisés à 25 °C à l'aide d'un spectromètre Brüker Avance 300 avec un champ 300,13 MHz. Les polymères sont analysés en solution à une concentration d'environ 10 g/L dans des solvants deutérés : DMSO- d_6 ou CDCl_3 .

Dans le cas de la RMN 2D DOSY ^1H , la séquence utilisée est une LED-STE-Bipolaire Gradient Pulse avec des gradients de purge. Une série de 32 expériences est enregistrée en faisant varier linéairement l'intensité du gradient de 5 à 95 % avec une intensité maximale du gradient de 46,25 G/cm^{-1} . Le délai de relaxation entre les impulsions est fixé à 3 s. Afin d'éliminer des artefacts dus aux courants de Foucault, un délai LED est ajouté avant l'acquisition pendant une durée variant de 20 à 50 ms ainsi que des gradients de purge. Après optimisation de la séquence DOSY, le délai de diffusion D20 (Diffusion Delay) varie de 100 ms à 2000 ms et la durée du gradient P30 (Gradient Lengths) varie de 1 ms à 2,5 ms selon les échantillons. Les données sont traitées avec le logiciel TopSpin3.0.

5.2. INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (FTIR)

La FTIR est une technique de caractérisation des échantillons en poudre, rapide, non destructive, permettant l'analyse de surface de matériaux ayant une forte absorbance. Dans notre cas, le spectromètre utilisé (Tensor 27, Bruker Optics) est équipé d'une source lumineuse émettant des longueurs d'onde dans l'infrarouge-moyen et d'un détecteur de type DLaTGS. Les NPs et les dérivés du dextrane ont été séchés une nuit sous vide dynamique à 40 °C et 100 °C respectivement, avant l'analyse.

5.3. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (SEC)

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

La théorie fondamentale de la diffusion de la lumière par des solutions de polymères émane des travaux de Debye et Zimm [4]. L'équation générale reliant l'intensité de la lumière diffusée par une solution diluée de polymère de masse molaire moyenne en masse \bar{M}_w à un angle θ est la suivante :

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

III- 2

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

Avec C la concentration massique du polymère en solution, A_2 le second coefficient de Viriel, λ la longueur d'onde du rayon incident, R_g le rayon de giration moyen de la pelote macromoléculaire, θ l'angle de mesure par rapport au rayon incident, N_A le nombre d'Avogadro, n l'indice de réfraction du solvant, ΔR_θ le rapport de Rayleigh ; I_θ l'intensité de la lumière diffusée par le volume V mesurée à la distance r de l'échantillon et à l'angle θ et I_0 l'intensité de la lumière incidente.

Dans notre étude, et selon la nature hydrosoluble ou non des produits, différents systèmes ont été employés :

- **Cas de l'eau/NaNO₃ (0,1 M) comme éluant**

L'appareillage est constitué d'une pompe Waters 515 (débit = 0,7 mL/min), d'un dégazeur (Degazys DG 1310, Uniflow), d'une boucle d'injection de 200 μ l et d'une série de deux colonnes PL aquagel-OH 40 et 50 (8 μ m) avec une précolonne de même type. Un photodiffusiomètre de modèle

miniDawn (Wyatt Technology Corporation) ($\lambda = 690$ 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 Merk RI-71 est également installé en série.

▪ Cas du THF comme éluant

L'appareillage est constitué d'une pompe Waters 515 (débit = 1 mL/min), d'un dégazeur AF (waters in-line), d'une boucle d'injection de 100 μ l et d'une série de trois colonnes PLgel 5 μ m, 300 mm 7,5 mm, (10² Å, 10³ Å, 10⁴ Å) avec une pré-colonne de même type. Un détecteur de diffusion de la lumière de modèle mini Dawn Treos (Wyatt Technology Corporation) ($\lambda = 658$ nm) est situé à la sortie des colonnes. Il est constitué de trois photodiodes qui mesurent l'intensité diffusée à 45, 90 et 140°. Un réfractomètre différentiel de type OPTILAB rex (Wyatt Technology Corporation) est également installé en série. L'appareil est équipé d'un passeur d'échantillon de type Waters 2707 et d'un régulateur de température qui permet de faire les analyses à 40 °C.

▪ Cas du DMSO, DMSO/NaNO₃ (0,1 M) et DMF/LiCl (2 g/L) comme éluants

L'appareillage est constitué d'une pompe LC - 20AD, Shimadzu (débit = 0,7 mL/min), d'un dégazeur DGU - 20A3R, Shimadzu, d'une boucle d'injection de 100 μ l et d'une série de trois colonnes PLgel 5 μ m, 300 mm 7,5 mm, (105 Å, 103 Å, 100 Å) avec une pré-colonne et un passeur d'échantillon de Shimadzu. Un détecteur de diffusion de la lumière de modèle mini Dawn Treos (Wyatt Technology Corporation) ($\lambda = 658$ nm) est situé à la sortie des colonnes. Il est constitué de trois photodiodes qui mesurent l'intensité diffusée à 45, 90 et 140°. Un réfractomètre différentiel de type RID - 10A, Shimadzu est également installé en série.

Les solutions de polymères (10 g/L) sont préparées la veille dans l'éluant sélectionné, puis filtrées sur des filtres Millex HA de 0,2 μ m.

Les dn/dc utilisés sont :

- Cas de l'eau/NaNO₃ (0,1 M) : Dextrane (0,146 mL/g).
- Cas du THF : PMMA (0,087 mL/g), DEAEMA (0,10 mL/g) [5].
- Cas du DMSO, DMSO/ NaNO₃ (0,1 M): Dextrane, DexN₃- τ , DexN₃- τ CTA γ (0,07 mL/g).
- Cas du DMF/LiCl (2 g/L) : PMMA (0,064 mL/g), DexN₃- τ , DexN₃- τ CTA γ (0,07 mL/g).

5.4. PROPRIETES TENSIOACTIVES DES DERIVES DU DEXTRANE

Des mesures de tension superficielle ont été réalisées sur des solutions aqueuses des différents DexN₃- τ et DexN₃- τ CTA γ synthétisés, afin d'évaluer leur pouvoir tensioactif et ainsi leur capacité à stabiliser une émulsion huile dans eau.

▪ Principe de la mesure

L'interface liquide/air présente un caractère plus ou moins "élastique" selon les caractéristiques propres du liquide étudié. Ce phénomène peut être quantifié par la mesure de la tension de surface (σ) du liquide. Cette tension représente le travail réversible à fournir au système pour augmenter la surface du liquide d'une unité et peut être calculée par :

$$\sigma = \left(\frac{\partial U_s}{\partial S} \right)_{T^{\circ}C} \quad \text{III- 3}$$

Où ∂U_s représente la variation d'énergie interne de la région interfaciale et ∂S la variation de surface à une température donnée.

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

Expérimentalement, il est possible d'observer, au fur et à mesure de l'étirement du ménisque, que la force de traction augmente pour passer par un maximum, puis décroît jusqu'à rupture du ménisque. Il est alors possible de déterminer la tension superficielle (σ) du liquide étudié en connaissant que l'intensité de la force et son maximum par la relation :

$$\sigma = \frac{F^{\max}}{4\pi R} \times J \times \left(\frac{R}{r} \left(\frac{\Delta\rho g R^3}{F^{\max}} \right) \right) \quad \text{III- 4}$$

Avec F^{\max} l'intensité maximale de la force de traction, R le rayon de l'anneau, r le rayon du fil de platine, g la force de gravité, $\Delta\rho$ la différence de densité entre le liquide et l'air et J le facteur correctif de Harkins et Jordan.

▪ Protocole opératoire

Les piluliers constituant la cellule de mesure et destinés à recevoir la solution à analyser sont préalablement nettoyés avec de l'acide sulfurique (afin d'éliminer toute trace organique) puis abondamment rincés à l'eau et séchés. La solution en polymère amphiphile la plus concentrée (15 g/L) est préparée 24 h à l'avance avec de l'eau MilliQ. Les solutions à différentes concentrations ($3,5 \times 10^{-5}$ à 7,5 g/L) sont préparées par une cascade de dilution à partir de cette solution mère. 20 mL de chaque dilution sont mis dans les pilluliers, puis laissés au repos pendant une nuit pour permettre la stabilisation de l'interface par le tensioactif étudié.

Les mesures de tension superficielle sont effectuées à l'aide d'un tensiomètre Krüss K20 EasyDyne, qui donne directement la valeur de σ . Chacune des solutions des dérivés du dextrane est thermostatée à 25 °C pendant 10 minutes, puis cinq mesures sont effectuées et une valeur moyenne est calculée. Entre chaque mesure, l'anneau est rincé à l'eau puis à l'acétone et séché par la flamme d'un chalumeau.

6. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES NANO-OBJETS

6.1. CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE MODULEE (MDSC)

La MDSC est une version évoluée de la DSC traditionnelle. Elle permet la séparation du signal du flux thermique total dans ses composants thermodynamiques (dépendants de la température) et cinétiques (dépendants de la vitesse de changement de la température). Ceci est possible grâce à l'application d'une rampe de température de type sinusoïdale ($T = \sin(\omega t)$).

$$\frac{dQ}{dt} = C_p \frac{dT}{dt} + f(T, t) \quad \text{III- 5}$$

Flux total = Composante thermodynamique + composante cinétique

Dans le cas de la composante thermodynamique, le flux de chaleur enregistré en fonction de la température est appelé « flux inversible ». Il permet de détecter des phénomènes tels que la transition vitreuse et la fusion de l'échantillon analysé. La composante cinétique, quant à elle, est caractérisée par un « flux non inversible ». Ce dernier permet de détecter des transitions relatives à plusieurs événements thermiques tels que : relaxation enthalpique, cristallisation, évaporation, réticulation, oxydation, décomposition,...

▪ **Plastification du PMMA par le M810**

Des solutions ont été préparées en dissolvant le PMMA (8 300 g/mol, $D = 1,06$) et le M810 dans le dichlorométhane. Après l'évaporation totale du DCM, les mélanges ont été séchés sous vide à 90 °C pendant 15 heures. 5-10 mg du mélange obtenu sont analysés en utilisant un calorimètre différentiel à balayage en mode modulé (Q2000, TA Instruments). La méthode opératoire consiste en trois cycles de chauffage et refroidissement de -70 °C à 250 °C sous flux continu de N_2 avec une vitesse constante de 5 °C/min, en modulant de ± 1 °C chaque 40 s. Les échantillons sont introduits dans des creusets en aluminium (Tzero Aluminium) et placés dans le passeur automatique de l'appareil. Un creuset vide sert de référence.

6.2. DETERMINATION DU TAUX DE RECOUVREMENT EN DEXTRANE

Le taux de recouvrement des NPs en dextrane est déterminé selon l'équation III- 6 :

$$\Gamma_{dex} = \frac{m_{\text{DexN}_{3-\tau}(\text{CTA}\gamma)}}{S_{\text{NPS}} * m_{\text{NPS}}} \quad \text{III- 6}$$

Avec :

$m_{\text{DexN}_{3-\tau}(\text{CTA}\gamma)}$ = Masse de DexN_{3-τ}(CTAγ) à la surface des NPs

S_{NPS} = Surface spécifique des NPs calculée grâce aux équations III- 7, III- 8 et III- 9

m_{NPS} = Masse totale des NPs produits.

Pour cela, la surface spécifique des NPs (S_{NPS}) est calculée selon l'équation III- 7 après avoir évalué leur masse volumique (ρ_{NPS} , équation III- 9) puis le nombre de NCs/g d'objets (N_p , équation III- 8).

$$S_{\text{NPS}} = \pi d[3:2]^2 N_p \quad \text{III- 7}$$

$$N_p = \frac{3}{4\rho_{\text{NPS}}\pi \left(\frac{d[3:2]}{2}\right)^3} \quad \text{III- 8}$$

$$\rho_{\text{NPS}} = \frac{m_{\text{MMA}} + m_{\text{M810}} + m_{\text{PMMA}}}{\frac{m_{\text{MMA}}}{\rho_{\text{MMA}}} + \frac{m_{\text{M810}}}{\rho_{\text{M810}}} + \frac{m_{\text{PMMA}}}{\rho_{\text{PMMA}}}} \quad \text{III- 9}$$

Avec :

$d[3:2]$ = Diamètre moyen des objets déterminé par granulométrie

N_p = Nombre de NPs par gramme d'objets

ρ_{NPS} = Masse volumique des NPs

$m_{\text{MMA}}, m_{\text{M810}}, m_{\text{PMMA}}$ = Masses du MMA, du M810 et du PMMA dans l'échantillon

$\rho_{\text{MMA}}, \rho_{\text{M810}}, \rho_{\text{PMMA}}$ = Masses volumiques du MMA (0,94 g/mL), du M810 (0,94 g/mL) et du PMMA (1,2 g/mL).

La masse de DexN_{3-τ}(CTAγ) à la surface des NPs ($m_{\text{DexN}_{3-\tau}(\text{CTA}\gamma)}$) est quant à elle estimée par deux méthodes :

6.2.1. Dosage direct (par RMN ¹H)

Les nano-objets secs sont solubilisés dans du DMSO-*d*₆ et analysés par RMN ¹H (Figure III- 3). $m_{\text{DexN}_{3-\tau}(\text{CTA}\gamma)}$ est calculée grâce à l'équation III- 10.

$$m_{\text{DexN}_{3-\tau}(\text{CTA}\gamma)} = \frac{A_{UG}/4}{A_{A'B'}/5} \times \frac{M_{UG}}{M_{MMA}} \times m_{PMMA \text{ total}} \quad \text{III- 10}$$

Où :

- $A_{A'B'}$ = Aire des protons A' et B' du PMMA entre 0,4 et 2,1 ppm (Figure III- 3). On soustrait alors la contribution des protons du dextrane (c, e, d) et du M810 (I, II, III). Voir équation III- 11.
- A_{UG} = Aire des OH résiduels et du H anomère des unités glucopyranose du dextrane entre 4,1 et 5,4 ppm (OH², OH³, OH⁴ et H^α, Figure III- 3).
- M_{MMA} = Masse molaire d'une unité monomère du PMMA (g/mol).
- M_{UG} = Masse molaire d'une unité glucopyranose du DexN₃₋₂₀(CTAγ) (g/mol).
- $m_{PMMA \text{ total}}$ = Masse totale de PMMA synthétisé à une conversion donnée (g)

$$A_{A'B'} = A_{0,5-2,1 \text{ ppm}} - \frac{A_{UG}}{4} \times \frac{\tau}{100} \times 6 - A_{VI} \times 40,5 \quad \text{III- 11}$$

Avec :

- $A_{0,5-2,1 \text{ ppm}}$ = Aire de l'ensemble des protons entre 0,4 et 2,1 ppm (Figure III- 3).
- A_{VI} = Aire du proton VI du M810 situé à 5,2 ppm (Figure III- 3).
- τ = Taux de modification du transurf en groupements hydrophobes.

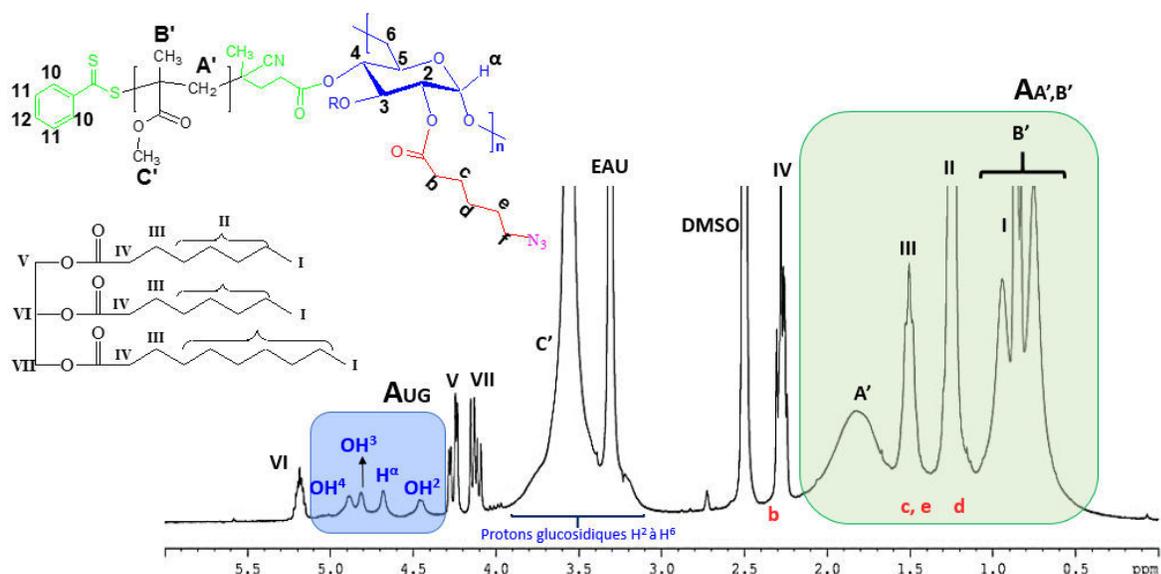


Figure III- 3 : Spectre RMN ^1H des NCs en fin de polymérisation et après lavage dans $\text{DMSO-}d_6$.

6.2.2. Dosage indirect à l'anthrone

Cette technique est basée sur la réaction de l'anthrone avec les motifs glucopyranose des dérivés du dextrane ($\text{DexN}_{3-20}(\text{CTA}\gamma)$) qui conduit, en milieu acide et chaud, à la formation d'un complexe vert quantifiable par spectroscopie dans le visible. Cette technique permet de doser la quantité d'unités glucoses en solution.

▪ Préparation de la solution d'anthrone

1 g d'anthrone et 150 mL d'eau MilliQ sont introduits dans un bécher d'un litre placé dans un bain d'eau froide. 350 mL d'acide sulfurique concentré (95-97%) sont lentement additionnés à cette solution aqueuse sous agitation. L'anthrone se dissout au fur et à mesure pour conduire à un mélange visqueux de couleur jaune. Après homogénéisation et retour à température ambiante, la solution est stockée à 4 °C jusqu'à utilisation (dans un délai maximum d'environ 1 mois).

▪ Dosage des échantillons

Les surnageants obtenus après la première centrifugation des nano-objets produits sont dilués par un facteur de 6. 200 μL de ces surnageants dilués sont ensuite additionnés à 5 mL de solution d'anthrone dans des tubes en verre. Après fermeture, ces tubes sont agités à l'aide d'un vortex, puis

placés pendant 30 minutes dans un bain maintenu à 80 °C. Après retour à température ambiante et homogénéisation au vortex, les densités optiques des solutions sont mesurées par spectrophotométrie visible à 625 nm grâce à un spectrophotomètre UVikon-XL Bio-Tek Instruments.

Chaque dosage nécessite un étalonnage effectué en simultané avec des solutions aqueuses de dextrane de concentration connues, contre un blanc préparé avec 200 µL d'eau MilliQ. Etant donné que la réaction avec l'anthrone ne dépend que de la quantité d'unités glucose en solution, le dextrane a été utilisé pour l'étalonnage. La concentration en dérivé du dextrane ne doit pas excéder 0,7 g/L (soit DO < 1). Des concentrations de 0,1, 0,3, 0,5 et 0,7 g/L ont été employées.

6.3. DISTRIBUTION DE TAILLE DES OBJETS

6.3.1. Granulomètre

- **Principe de la mesure**

Le granulomètre Mastersizer2000© Malvern a été utilisé pour caractériser la taille des nanogouttelettes/nano-objets fabriqués par polymérisation RAFT en miniémulsion au cours de ce travail. Cet appareil permet d'avoir la distribution de tailles des dispersions en se basant sur le volume des particules dans l'échantillon. Le principe de base est la diffraction de la lumière par les particules en suspension. En effet, des particules passant à travers un faisceau laser diffractent la lumière selon un angle différent en fonction de leur taille : les particules de petites tailles diffractent aux grands angles, alors que les particules de tailles plus importantes diffractent aux petits angles.

En faisant une hypothèse de particules sphériques, les données relatives à l'intensité diffusée en fonction de l'angle sont analysées pour calculer la taille des particules qui ont créé l'image de diffraction grâce à la théorie de Mie. La taille des particules est alors représentée par le diamètre de la sphère équivalente, ayant le même volume que la particule. Dans le cas du granulomètre, la gamme de mesure est assez large, de 20 nm à 1000 µm.

- **Protocole opératoire**

Après avoir rempli la cellule de mesure avec de l'eau MilliQ, l'agitation et la pompe sont mises en marche. Le blanc est effectué et l'appareil détecte l'image de diffraction de l'eau qui sera ensuite

Le HPPS permet d'accéder à une valeur appelée « Z-Average Size » qui correspond au diamètre moyen de la sphère équivalente correspondant à la taille moyenne de l'objet, en intensité de lumière diffusée. Afin de renseigner sur l'adéquation de la mesure à la taille réelle des nanoparticules, l'appareil donne aussi un Indice de Polydispersité (PDI). Cet indice traduit la concordance entre les courbes de corrélation mesurée et modélisée que l'appareil utilise pour calculer le « Z-Average Size ».

- **Protocole opératoire**

2 mL de suspension des NCs sont introduites dans une cuve plastique, placée ensuite dans l'enceinte permettant la mesure. Après la stabilisation de l'échantillon en température (25 °C) et vibrations extérieures, la mesure est réalisée trois fois et une valeur moyenne est calculée. On considère que les valeurs sont relativement fiables lorsque l'indice de polydispersité (PDI) est inférieur à 0,2.

6.4. MESURES DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE (DETERMINATION DE L'ÉPAISSEUR DU RECOUVREMENT EN DEXTRANE)

- **Principe de la mesure**

La mesure du potentiel Zêta (ζ) permet de détecter la présence de groupements chargés à la surface d'une particule. En milieu salin, ces groupes chargés affectent la distribution ionique dans la région interfaciale, entre les nano-objets et le liquide environnant, ce qui induit l'apparition d'une double couche de contre-ions à la surface des nano-objets. Une première couche, appelée « couche de Stern », correspond à la région directement au contact de la surface des nano-objets et comporte des contre-ions solidement liés à la surface. Une 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 [6].

soustraite à l'image de diffraction de l'échantillon. Environ 200 μL de la suspension à analyser sont alors ajoutés dans la cellule pour obtenir une obscuration comprise entre 4 et 8%. Chaque mesure est effectuée trois fois.

6.3.2. HPPS

▪ Principe de la mesure

Le HPPS (High Performance Particle Sizer) est une méthode de mesure de la taille des particules submicroniques basée sur la rétrodiffusion de la lumière. Un faisceau laser passe dans une cuve contenant la dispersion et est diffusé par les particules en suspension. Celles-ci sont constamment soumises au mouvement brownien et l'intensité de ce mouvement dépend de la viscosité du milieu dispersant et de la taille des particules. Plus le milieu est visqueux où plus les particules sont grandes, plus elles bougent lentement. La diffusion de lumière varie avec le temps et peut être reliée au coefficient de diffusion des particules dans un milieu donné et donc, par la suite, à un diamètre de particule (d_H) selon la loi de Stokes-Einstein :

$$d_H = \frac{k_B T}{3\eta\pi D_t} \quad \text{III- 12}$$

Où k_B est la constante de Boltzman ; T la température absolue du milieu dispersant ; η la viscosité du milieu dispersant et D_t le coefficient de diffusion.

▪ Appareillage

L'appareil utilisé pour mesurer la taille des nano-objets à écorce pH-sensible (Poly (MMA-co-DEAEMA)) est un HPPS-ET de Malvern Instruments. Par rapport au granulomètre, cet appareil permet de varier facilement le pH dans la cellule de mesure. Il possède un laser de type (He-Ne, 3,0 mW, 633 nm), un atténuateur automatique ou à transmission (100% à 0,0003%), un détecteur de type Avalanche Photodiode, Q,E > 50% à 633 nm, et permet un contrôle en régulation température entre 10 °C et 55 °C. Les mesures se font en rétro-diffusion à un angle d'observation de 173°, ce qui permet d'étudier des dispersions relativement concentrées.

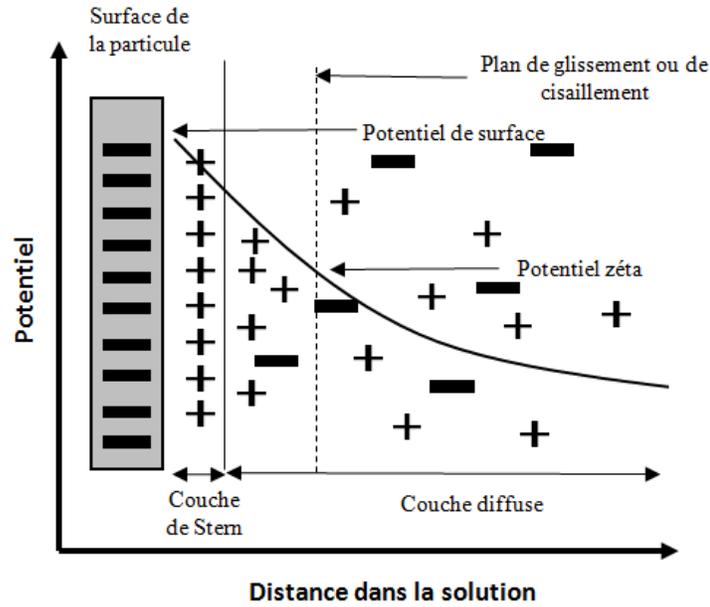


Figure III- 4 : Modélisation de la double-couche électrostatique autour d'une particule chargée.

Lorsqu'un champ électrique est appliqué aux bornes des deux électrodes immergées dans une dispersion de particules chargées, celles-ci sont attirées vers l'électrode de charge opposée. Une force de frottement liée à la viscosité du milieu tend à s'opposer à leur 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).

En pratique, la valeur du potentiel ζ est calculée à partir de la mobilité électrophorétique μ_E (exprimée en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) mesurée par un Zétamètre et selon l'équation modifiée de Booth [7] :

$$\zeta \text{ (mV)} = 25,7 \left[\frac{E}{f_1} \left[\frac{C_3 \left(\frac{E}{f_1}\right)^3 + C_4 \left(\frac{E}{f_1}\right)^4}{f_1 + 3C_3 \left(\frac{E}{f_1}\right)^2 + 5C_4 \left(\frac{E}{f_1}\right)^3} \right] \right] \quad \text{III- 13}$$

où $E = 7520\mu_E$ et f_1 est le facteur de correction de Henry qui tient compte de la déformation du champ électrique autour des particules. Les effets de relaxation sont pris en compte par les

coefficients C_3 et C_4 . Cette équation permet le calcul du potentiel ζ , quelles que soient les valeurs du paramètre de Debye-Hückel (k_H lié à la force ionique) et du rayon des particules.

Par ailleurs, lorsqu'une particule chargée est recouverte d'un polymère neutre et que cette couche de polymère (en surface de la particule) est supérieure à l'épaisseur du plan de cisaillement notée x , il y a déplacement de ce plan de cisaillement, de la distance x à une distance de la surface notée Δ_{PZ} . Δ_{PZ} peut alors être assimilée à l'épaisseur de la couronne de polymère en surface des particules. Eversole et Boardman ont proposé une relation exprimant l'évolution du potentiel ζ en fonction du paramètre de Debye-Hückel k_H et de l'épaisseur Δ_{PZ} de la couche polymère en surface [8]:

$$\ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \zeta}{4 k_B T} \right) \right] = \ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \psi_0}{4 k_B T} \right) \right] - k_H \times \Delta_{PZ} \quad \text{III- 14}$$

Avec :

- Z = Valence de l'ion considéré dans le milieu.
- e = Charge élémentaire de l'électron ($1,6022 \times 10^{-19}$ C)
- k_B = Constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{23}$ J.K⁻¹)
- T = Température absolue du milieu (298 K)
- ψ_0 = Potentiel de la surface de la particule

En mesurant le potentiel ζ à différentes forces ioniques (différents k_H) et en reportant $\ln \left[\tanh \left(\frac{Z e \psi_0}{4 k_B T} \right) \right]$ en fonction de k_H , on obtient une courbe dont la pente à faible k_H est égale à Δ_{PZ} (voir Figure III- 5, exemple de NCs-CTA), comme le LCPM l'a déjà utilisé dans des travaux précédemment réalisés [9], [10].

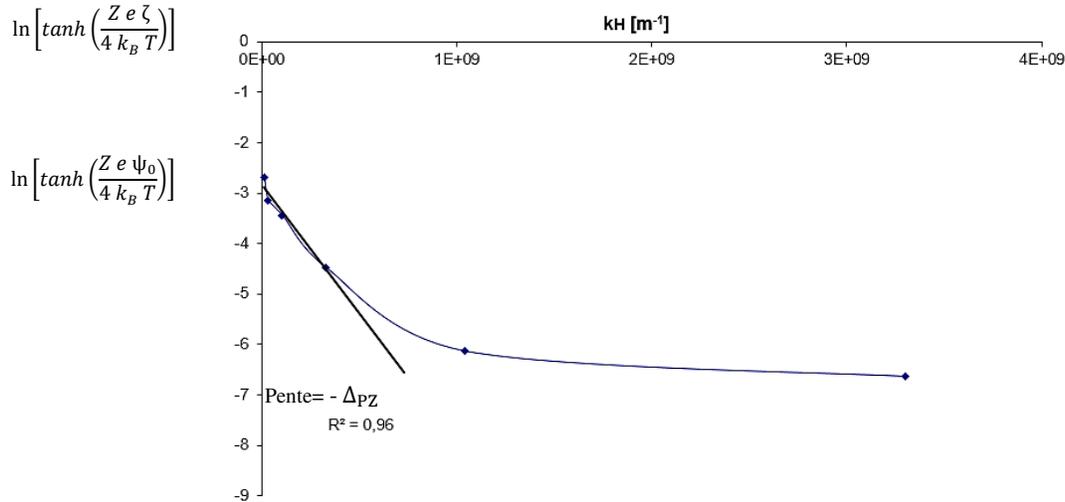


Figure III- 5 : Détermination de Δ_{pZ} , d'après les valeurs de potentiel ζ des NCs-CTA. Les calculs sont réalisés en utilisant l'équation d'Eversole et Boardman (Equation III- 14) en fonction du paramètre de Debye-Hückel (κ_H).

▪ Protocole opératoire

Les mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées dans des solutions de NaCl de concentrations variables ($10^{-6} - 1$ M) et à l'aide du Zetasizer Nano-Z (Malvern instruments). Pour cela, 20 μ L de suspension des nano-objets sont ajoutés à 5 mL de chaque solution de NaCl pour arriver à une concentration en nano-objets de 0,5 g/L. La cuvette d'analyse est ensuite remplie avec 1,5 mL de cette suspension des nano-objets, en veillant à ne pas introduire de bulles d'air. La mesure est réalisée trois fois et une valeur moyenne est calculée.

6.5. STABILITE COLLOÏDALE EN PRESENCE DE NaCl

▪ Principe de la mesure

Lorsque les dispersions colloïdales flocculent ou s'agrègent, la taille des particules augmente. Ceci se traduit par une augmentation de la turbidité du système dans le cas où les particules ont un rayon inférieure à $\lambda/5$ (avec λ la longueur d'onde de la lumière d'observation).

Par ailleurs, la turbidité d'une suspension est proportionnelle à sa densité optique (DO). En suivant les variations de la DO en fonction de la concentration en sel, on peut donc suivre les variations de

la turbidité en fonction de la force ionique du milieu dispersant et, par ce biais, la variation de tailles de particules d'une dispersion. Il suffit de bien choisir la longueur d'onde utilisée pour réaliser les mesures de DO. Pour des particules de taille de l'ordre de la centaine de nanomètres, des mesures par spectrophotométrie visible permettent de repérer les changements de stabilité.

Long et al. [11] ont développé une méthode permettant de suivre la floculation de dispersions stabilisées stériquement en fonction de la force ionique. Il suffit alors de mesurer la DO d'une dispersion en fonction de la longueur d'onde pour une force ionique donnée. Le tracé du $\log(\text{DO})$ en fonction de $\log(\lambda)$ donne une droite, dont la valeur absolue de la pente (notée $|n|$) peut être estimée. Le tracé de $|n|$ en fonction de la force ionique donne une courbe de stabilité. Une diminution brutale de $|n|$ témoigne de l'augmentation de la taille des particules et donc des phénomènes de floculation ou d'agrégation [12]–[14].

▪ Protocole opératoire

La stabilité colloïdale des différents nano-objets fabriqués au cours de ces travaux a été évaluée en présence de sel. Nous avons donc mesuré la variation de la DO des dispersions diluées dans plusieurs solutions de concentrations croissantes en NaCl. Les concentrations en NaCl utilisées varient de 10^{-5} à 2 M. Des cuves spectrophotométriques ont été remplies avec 4 mL de chaque solution NaCl. Environ 20 μL de dispersion de nanoparticules ont ensuite été ajoutés dans chaque cuve pour avoir une concentration en nano-objets de 0,5 g/L. Les cuves ont été agitées manuellement et laissées au repos pendant une heure. Les DO ont été mesurées par un spectrophotomètre (UVikon-XL Bio-Tek Instruments) avec un balayage entre 450 nm et 600 nm. Pour chaque concentration en NaCl, la courbe $\log(\text{DO})$ en fonction de $\log(\lambda)$ a été tracée et la pente $|n|$ évaluée. L'évolution des valeurs absolues des pentes $|n|$ en fonction de la concentration en NaCl est ensuite tracée.

6.6. STABILITE DU RECOUVREMENT EN DEXTRANE EN PRESENCE DE SDS

Du SDS est ajouté à la suspension de NPs lavées de façon à attendre une concentration en SDS égale à 1% m. Le mélange est maintenu sous agitation magnétique à température ambiante pendant 24h. La suspension est ensuite lavée par centrifugation comme lors de l'élaboration des particules.

Après lyophilisation, les particules ayant subi ce traitement au SDS sont dissoutes dans le DMSO- d_6 afin de déterminer la quantité résiduelle de dextrane à la surface des nano-objets grâce à l'équation III- 10 (p. 280) [2].

6.7. GONFLEMENT DES NP_s pH-SENSIBLES

▪ Courbe pH basique à acide

1,2 mL de NPs lavées et redispersées dans l'eau MilliQ sont ajoutés à 50 mL d'eau ou de PBS (0,148 M) à pH = 9 (pH fixé en utilisant du NaOH 0,1M). La solution ainsi obtenue contient environ 1,4 mg NPs/mL. Elle est ensuite répartie dans différents piluliers (5 mL/pilulier). Le pH dans chaque pilulier est à nouveau ajusté en utilisant une solution d'HCl (0,1 M) afin d'avoir une gamme de pH variant entre 9 et 3. Après 30 minutes d'agitation, la taille des NPs de chaque pilulier est mesurée à l'HPSS. Le pH dans chaque pilulier n'est mesuré qu'en fin d'expérience pour éviter la contamination des échantillons.

▪ Courbe pH acide à basique

Le protocole est très similaire à celui décrit dans le paragraphe précédent sauf que dans ce cas nous partons d'une suspension de NPs à pH acide. Pour cela, 1,2 mL de NPs lavées et redispersées dans l'eau MilliQ sont ajoutés à 50 mL d'eau à pH = 3 (pH fixé en ajoutant de l'HCl-0,1 M). La solution ainsi obtenue est répartie dans différents piluliers (5 mL/pilulier). Cette fois-ci le pH est ajusté en ajoutant du NaOH 0,1 M pour avoir une gamme de pH variant entre 3 et 9.

6.8. MORPHOLOGIE : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET)

Ces études ont été réalisées en collaboration avec Marc Schmutz et Dr. Meriem Er-Rafik de l'Institut Charles Sadron (ICS) à Strasbourg.

Les nano-objets ont été observés par Microscopie Electronique à Transmission à basse température (cryo-MET). Toutes les images ont été prises sur un microscope Tecnai G2 (FEI), équipé d'une caméra à balayage lente (FEI Eagle CCD), à une tension de 200 kV. Pour la préparation des

échantillons, les dispersions des nano-objets sont diluées jusqu'à une concentration de 0,5 g/L. 5 μ L de cette suspension sont déposés sur une grille recouverte d'une membrane de carbone à trou (Lacey carbon, Ted Pella) hydrophilisée au préalable avec un système d'effluage ELMO (Cordouan Technologies). L'échantillon est ensuite plongé dans de l'éthane liquide (maintenu à -190°C par l'azote liquide). De cette manière, la structure des nano-objets est préservée. Une fois transférée dans le microscope, la grille, maintenue à -190°C, est observée. Afin de limiter les dommages d'irradiation, de faibles doses d'électrons sont utilisées.

7. POTENTIEL DES NANO-OBJETS POUR DES APPLICATIONS BIOMEDICALES

7.1. ENCAPSULATION ET CINETIQUE DE LIBERATION DE LA COUMARINE 1

7.1.1. Milieux de libération

La solution de PBS (0,148 M, pH = 7,4) a été préparée par dissolution de 0,92 g de Na₂HPO₄ (6,5 mmol), 0,2 g de KH₂PO₄ (1,5 mmol), 8 g de NaCl (0,14 mol) et 0,2 g de KCl (2,7 mmol) dans 1 L d'eau MilliQ. Selon le cas, le pH final est ajusté à 7,4 ou à 4, avec de l'acide phosphorique ou de l'HCl 12 N, respectivement.

Dans le cas des expériences réalisées en présence de SDS, 10 g du SDS ont aussi été ajoutés à ce litre de solution pour arriver à une concentration de 1 % m.

7.1.2. Détermination de la masse de Cou1 encapsulée

- **Par analyse RMN ¹H**

Les NCs lyophilisées ont été dissoutes dans le DMSO-*d*₆, puis caractérisés par RMN ¹H (Figure III-6). La quantité de Cou1 à l'intérieur des objets (m_{cou1}^e) est dans ce cas calculée grâce à l'équation III- 15.

$$m_{cou1}^e(g) = \frac{A_{Cou1}/4}{A_{A'B'}/3} * \left(\frac{m_{PMMA}}{M_{MMA}} \right) * M_{Cou1} \quad \text{III- 15}$$

Avec :

- A_{Cou1} = Aire des protons C1 à C4 de la Cou1 entre 5,9 et 7,5 ppm.
 $A_{A'B'}$ = Aire des protons A' et B' du PMMA entre 0,4 et 2,1 ppm, calculée comme précédemment (voir page 280).
 m_{PMMA} = Masse totale de PMMA dans les nano-objets (g)
 M_{MMA} = Masse molaire d'une unité monomère du PMMA (100 g/mol).
 M_{Cou1} = Masse molaire de la Cou1 (231,29 g/mol)

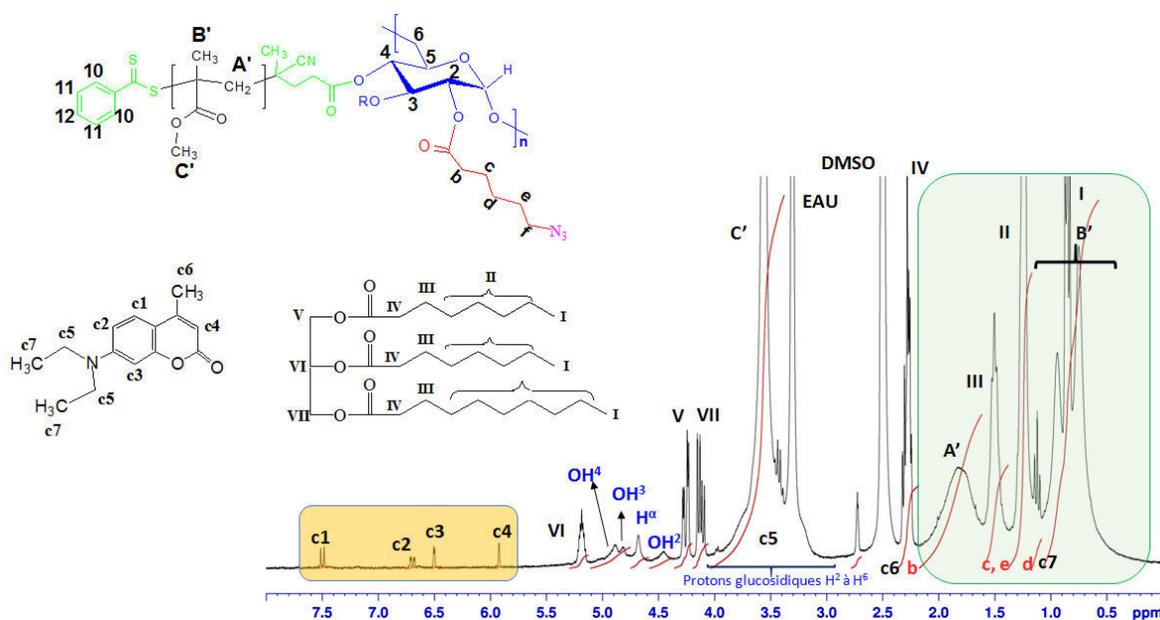


Figure III- 6 : Exemple d'un spectre RMN ^1H des NCs à écorce PMMA encapsulant la Cou1.

▪ Par fluorimétrie

6,4 mg des NCs lavées et lyophilisées sont dissoutes dans 50 mL de DMSO pour obtenir une concentration en NCs de 0,128 g/L. Après 1 nuit sous agitation, cette solution est analysée par fluorimétrie (voir paragraphe 7.1.4). La quantité de Cou1 encapsulée (m_{cou1}^e) est ensuite estimée grâce à l'équation III- 16.

$$m_{cou1}^e(g) = \frac{[Cou_f]}{[NCs]_{DMSO}} * (m_{NCs})_0 * M_{cou} \quad \text{III- 16}$$

$$\text{avec } (m_{NCs})_0 = m_{PMMA} + m_{M810} + m_{DexN_3} + m_{CPDB} + m_{AIBN} \quad \text{III- 17}$$

Où :

- $[Cou_f]$ = Concentration en coumarine déterminée par fluorimétrie (mol/L)
- $[NCs]_{DMSO}$ = Concentration des NCs dans le DMSO, égale à 0,128 g/L
- $(m_{NCs})_0$ = Masse totale de NCs introduites (g)
- m_i = Masse de constituant i dans la NC (g)

7.1.3. Protocole de libération de la Cou1 à partir de NCs à écorce PMMA

1,8 mL de NCs lavées et redispersées contenant environ 60 mg NCs/mL sont diluées dans 1 L du milieu de libération (PBS ou PBS/SDS) afin d'obtenir une concentration finale de 0,11 mg/mL. Le relargage de la Cou1 est réalisé à 37 °C sous agitation magnétique de 250 tpm. A des temps donnés, 200 mL de suspension sont prélevés. Pour chaque prélèvement deux traitements différents sont réalisés :

- **Dosage direct**

2 mL de chaque prélèvement sont centrifugés dans des tubes d'ultrafiltration (Ultrafree®-MC, 0,5 mL, membrane PTFE, 0,2 µm) à 13 000 tpm pendant 30 minutes, afin d'enlever les NCs. 0,5 mL du filtrat est ensuite récupéré et dosé par fluorimétrie (voir paragraphe 7.1.4). On estime alors la Cou1 présente dans ce surnageant et donc libérée.

- **Dosage indirect**

Le reste du prélèvement est centrifugé à 18 000 tpm et 15 °C pendant 30 minutes. Les NCs sont lavées deux fois à l'eau MilliQ puis redispersées et lyophilisées pendant 24 heures. Les NCs sèches sont dissoutes dans le DMSO, solvant commun à tous les constituants des objets, puis analysées par fluorimétrie (voir paragraphe 7.1.4). On mesure alors la Cou1 contenue dans cette solution, ce qui

permet d'estimer la quantité de Cou1 encore contenue dans les nano-objets, c'est-à-dire la Cou1 non libérée.

7.1.4. Dosage de la Cou1 par fluorimétrie

Les spectres de fluorescence des surnageants (dosage direct) et de NCs (dosage indirect) ont été obtenus en utilisant un spectrofluorimètre Fluorolog-3 (Jobin-Yvon Horiba S.A.S.). Celui-ci est équipé d'une lampe à arc basse pression contenant du xénon (450 W), d'un double monochromateur à l'excitation, de deux doubles monochromateurs à l'émission et d'un compartiment échantillon thermostaté par effet Peltier. La température de consigne a été maintenue à 25 °C. Nos études étant réalisées de manière classique (analyse à 90°), il est nécessaire, pour effectuer des mesures quantitatives, de se placer à une concentration adéquate en chromophore. Pour nos analyses, nous avons utilisé des cuves en quartz d'un centimètre de parcours optique. Des exemples de spectres de fluorescence obtenus sont donnés dans les Figure III- 7 et Figure III- 8.

▪ Dosage direct de la Cou1 libérée

Dans le cas du dosage des surnageants (dosage direct), une courbe de calibration de la Cou1 a été réalisée pour chaque milieu de libération (PBS et PBS/SDS) et à chaque pH (7,4 et 4) (Figure III- 7). A cette fin, une courbe d'étalonnage de la fluorescence de la Cou1 a été réalisée à différentes concentrations dans un mélange équimoléculaire de PBS et d'éthanol. On rajoute de l'éthanol pour favoriser la solubilité de la Cou1 à forte concentration. Les surnageants contenant une quantité inconnue de Cou1 sont dilués par un facteur 20 (temps = 0) ou 4 (temps > 0) dans le mélange correspondant (PBS ou PBS/SDS)/éthanol puis et analysés. La quantité de sonde libérée est alors estimée en utilisant la courbe de calibration correspondante.

Paramètres de mesure :

Intervalle de concentration en Cou1 : $3 \times 10^{-7} M - 3,5 \times 10^{-5} M$

$\lambda_{exc} = 372 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$

Largeur de la bande d'excitation : 2,5 nm

Largeur de la bande d'émission : 2,5 nm

Sensibilité : 460 V

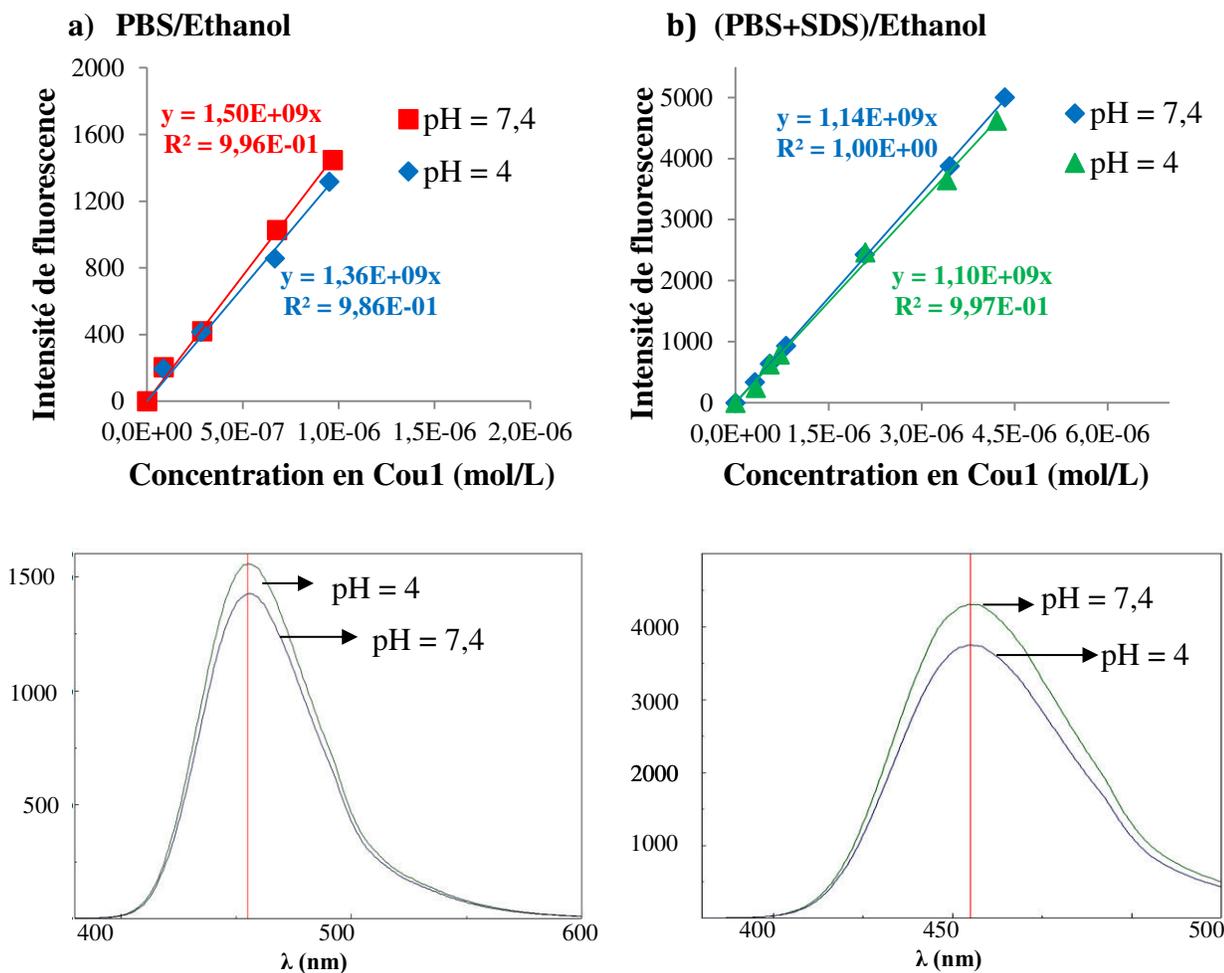


Figure III- 7 : Dosage indirect de la Cou1 par fluorimétrie. Courbes d'étalonnage et exemples de spectre d'émission ($\lambda_{exc} = 372 \text{ nm}$ et $\lambda_{em-max} = 455 \text{ nm}$) dans a) PBS/Ethanol et b) (PBS+SDS)/Ethanol.

▪ **Dosage indirect de la Cou1 libérée.**

Dans le cas du dosage de la quantité de Cou1 à l'intérieur des NCs, la courbe de calibration de la Cou1 a été réalisée dans le DMSO et en présence de NCs non-chargés en principe actif, ayant la même composition que les objets à analyser (Figure III- 8). Ainsi, la concentration de la Cou1 dans le DMSO varie, tout en gardant constante la concentration en NCs à 0,126 g/l. Après lyophilisation, les NCs chargées en Cou1 sont solubilisées dans le DMSO à cette même concentration pendant 1 nuit, puis leur fluorescence est mesurée.

Paramètres de mesure :

Intervalle de concentration en Cou1 : $9 \times 10^{-7} M - 1 \times 10^{-5} M$

$\lambda_{exc} = 338 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 437 \text{ nm}$

Largeur de la bande d'excitation : 2,5 nm

Largeur de la bande d'émission : 2,5 nm

Sensibilité : Moyenne

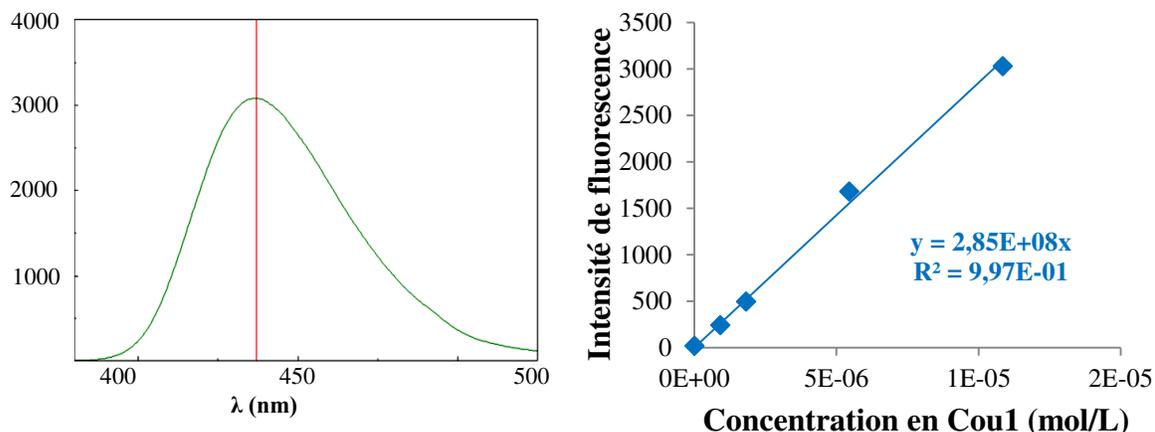


Figure III- 8 : Dosage de la Cou1 contenue dans les NCs par fluorimétrie dans le DMSO : à gauche un exemple de spectre d'émission ($\lambda_{exc} = 338 \text{ nm}$ et $\lambda_{em-max} = 437 \text{ nm}$), à droite la courbe d'étalonnage en présence de NCs (non-chargées en principe actif, à une concentration de 0,126 g/L).

7.1.5. Libération de la Cou1 à partir de NPs à écorce pH sensible

Le protocole de libération reste le même. Seule la méthode directe (dosage des surnageants) a pu être employée pour quantifier la Cou1 encapsulée et libérée, car les copolymères poly(MMA-co-DEAEMA) ne sont pas solubles dans le DMSO.

7.2. INTERACTIONS AVEC LES MILIEUX BIOLOGIQUES

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Dr. Ariane Boudier, Dr. Caroline Gaucher et Isabelle Fries de l'équipe d'accueil CITHEFOR - EA 3452 « Cibles thérapeutiques, formulation et expertise préclinique du médicament » de l'Université de Lorraine.

7.2.1. Dosage BSA

▪ Solution BSA

Une solution mère d'albumine bovine (BSA, $M = 66\,430\text{ g/mol}$) est préparée en pesant environ exactement 33 mg de BSA et en les solubilisant dans 50,0 mL de tampon phosphate (0,148 M pH = 7,4). La solution est agitée par retournement. Une solution fille de BSA est préparée en diluant la solution mère par 10. La concentration finale en BSA est de 0,07 g/L.

▪ Dispersions des NCs

La dispersion de NCs obtenue après lavages est diluée par cascade dans du tampon phosphate (0,148 M pH = 7,4), pour obtenir de concentrations variant entre $6,6 \times 10^{-3}$ et $6,6 \times 10^{-8}$ mg de polymère/ mL.

Afin d'évaluer l'adsorption de la BSA à la surface des NCs, deux séries de microtubes de 2 mL sont préparées :

- i) Série de contrôle : 1 mL des NCs (un tube pour chaque concentration en NCs) + 1 mL de PBS
- ii) Série test : 1 mL des NCs (un tube pour chaque concentration) + 1 mL de solution fille de BSA.

Les deux séries de tubes sont incubées à 37 °C en utilisant un bain-marie. La fluorescence émise est lue après 24 heures d'incubation, en utilisant une cuvette quartz (4 faces transparentes) et un spectrofluorimètre Hitachi F-2000. On réalise également un blanc (solution aqueuse de BSA, sans NCs) que l'on dose par fluorimétrie. La fluorescence émise est proportionnelle à la concentration de BSA en solution. Lorsque la BSA s'adsorbe à la surface des NCs, la fluorescence de cette BSA est quenchée. En d'autres mots, une diminution de la fluorescence traduit une adsorption de la BSA à la surface des NCs.

Paramètres de mesure :

$$\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}, \lambda_{em} = 350 \text{ nm}$$

Largeur de la bande d'excitation : 10 nm

Largeur de la bande d'émission : 10 nm

Sensibilité : 700 V

7.2.2. Dosage fibrinogène**▪ Solution fibrinogène**

50 mg de fibrinogène sont pesés et mis dans un tube falcon de 50 mL. 25 mL de PBS (0,148 M pH = 7,4) sont ajoutés précisément à l'aide d'une burette. Cette solution est agitée manuellement et mise dans un bain marie à 37 °C 10 minutes avant son utilisation. La concentration finale de la solution est de 2 g/L.

▪ Dispersions des NCs

La dispersion de NCs obtenue après lavages est diluée par cascade dans du tampon phosphate (0,148 M pH = 7,4), pour obtenir de concentrations variant entre $3,3 \times 10^{-1}$ et $3,3 \times 10^{-4}$ mg de polymère/mL. Afin d'évaluer l'adsorption du fibrinogène à la surface des NCs, deux séries de microtubes sont préparées :

- i) Série de contrôle : 10 μ L des NCs (un tube pour chaque concentration en NCs) + 1 mL de PBS.
- ii) Série test : 10 μ L des NCs (un tube pour chaque concentration) + 1 mL de solution de fibrinogène.

Un bain-marie agitant est préchauffé à 37 °C et les tubes sont incubés pendant 2 heures. Ensuite, l'ensemble des tubes à analyser est centrifugé à 21000 G pendant une heure et 500 μ L du surnageant de chaque tube sont récupérés. 100 μ L du surnageant sont dilués dans 300 μ L de PBS (homogénéisation au vortex). La teneur en fibrinogène dans ces solutions est déterminée par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA), en suivant les spécifications du fournisseur, sur un lecteur de microplaques BioTeK EL 800. Cette méthode combine la réduction de Cu^{2+} en Cu^{1+} par

la protéine (ici le fibrinogène) dans un milieu alcalin (réaction de Biuret) avec une détection colorimétrique sensible et sélective du cation cuivreux (Cu^{1+}) avec l'acide bicinchoninique [15]. Le produit de la réaction de couleur pourpre est formé par la chélation de deux molécules de BCA avec un ion cuivreux. Ce complexe, soluble dans l'eau, présente une forte absorbance à 562 nm qui est proportionnelle aux concentrations de protéines sur une large gamme (20-2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (m/v). La structure macromoléculaire des protéines à analyser (ici le fibrinogène), le nombre de liaisons peptidiques et la présence de quatre acides aminés particuliers (Cystéine, Cystine, Tryptophane et Tyrosine) sont responsables de la formation de la couleur pourpre.

7.2.3. Interaction avec les cellules immunocompétentes monocytes sanguins humains (THP-1)

▪ Culture des monocytes

La lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 est cultivée en suspension dans du milieu RPMI-1640 (Aldrich) complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (v/v), 100 U/mL de pénicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine et 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'amphotéricine B. Les cellules sont maintenues à 37 °C dans une atmosphère de 5% de CO_2 . Le milieu est renouvelé tous les trois jours.

▪ Etude de cytocompatibilité

Les THP-1 sontensemencées dans des microplaques à 96 puits à une densité de 125×10^3 cellules/ cm^2 . 24 heures après l'ensemencement, 22 μL de PBS (série de contrôle) ou de NCs dispersées dans du PBS ⁴ (série test) sont ensuite ajoutés dans chaque puit pour arriver à des concentrations finales variant entre 3.3×10^{-8} et 3.3×10^{-3} mg de polymère/mL. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, la cytotoxicité des NCs est évaluée par la mesure de l'activité métabolique mitochondriale des cellules (test WST-1). Le test WST-1 (Water Soluble Tétrazolium) est un test colorimétrique basé sur la métabolisation d'un sel de tétrasolium en sel de formazan (substrat coloré) par des déshydrogénases mitochondriales. Il a été réalisé selon le protocole du fournisseur (Roche) [16]. L'absorbance du sel de formazan est mesurée à 450 nm par rapport à l'absorbance à 620 nm (longueur d'onde de référence). Le nombre de cellules mortes (colorées en bleu) et de

⁴ Pour ces expériences, les NCs obtenues en fin de polymérisation sont lavées et redispersées dans de l'eau MilliQ préalablement filtrée sur filtre PALL 0,2 μm , puis diluées dans du PBS.

cellules vivantes (incolores) a été estimé grâce au test d'exclusion au bleu Trypan. Le nombre de cellules totales (mortes et vivantes) ainsi que le taux de mortalité, ont été déterminés à l'aide d'un compteur automatique de cellules (TC20, Biorad).

7.3. POST-FONCTIONNALISATION DES NCs PAR UNE SONDE FLUORESCENTE MODELE

7.3.1. Par Chimie « Click » en présence de cuivre

▪ Protocole opératoire

5 mL de dispersion de NCs lavées (à 2,5 mg/mL) ainsi que 1 mL de solution aqueuse (1 mg/mL) du dérivé de coumarine (Cou-click) (Figure III- 9) sont introduits dans un schlenk.

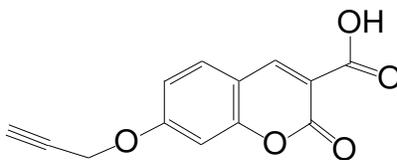


Figure III- 9: Molécule fluorescente utilisée pour la fonctionnalisation des NCs par chimie-click en présence de cuivre (Cou-click).

Cette solution mère du dérivé coumarine est préparée en dissolvant 10 mg de Cou-click (synthétisé par Dr. Jérôme Babin du LCPM selon le protocole du brevet US4151291 [17]) dans 9 mL d'eau milliQ et 1 mL de solution basique (soude 0,05 M). Ce pH basique permet de transformer la fonction carboxylique du dérivé sous sa forme carboxylate, et donc de solubiliser ce produit dans l'eau.

Le catalyseur utilisé est le Cu(I) introduit sous forme de CuBr solide (5 mg). En présence de dioxygène, le Cu(I) s'oxyde en Cu(II). Afin d'éviter cette oxydation, un barbotage de la solution par l'azote est réalisé pendant 15 min avant l'ajout du catalyseur Cu(I). Du Cu⁰ est également ajouté au milieu réactionnel, en très faible quantité (0,5 mg). Après l'ajout du catalyseur CuBr, le milieu réactionnel est maintenu clos et sous agitation pendant 24 h.

Un « blanc » est fait en parallèle, suivant le même protocole mais sans ajout de cuivre. Ce « blanc » permet de montrer que l'ajout de Cu(I) est nécessaire pour que la réaction (Figure III- 10) se fasse et que les molécules Cou-click ne s'adsorbent pas simplement à la surface des particules.

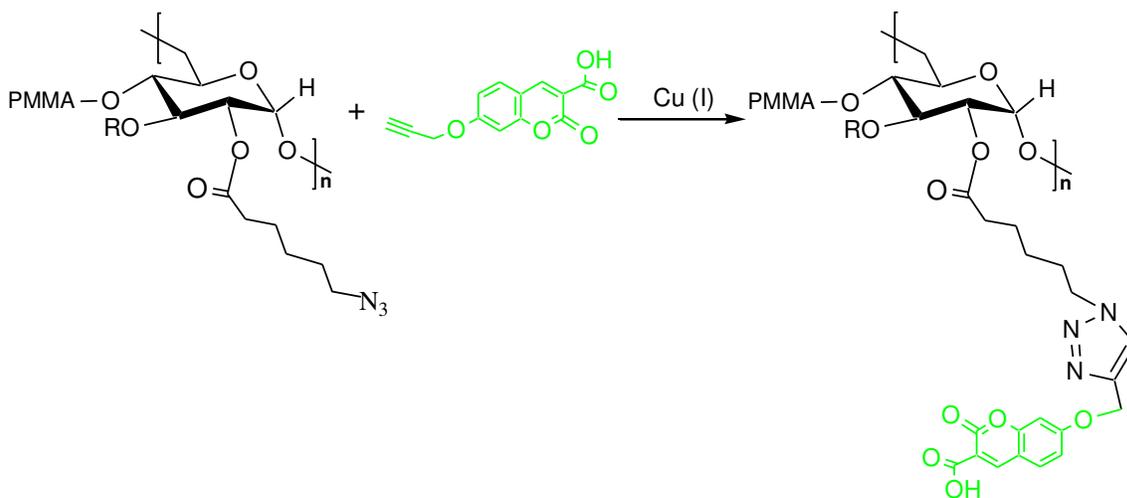


Figure III- 10 : Réaction de chimie-click catalysée par le cuivre entre les groupements N_3 disponibles à la surface de NPs et le dérivé Cou-click.

▪ **Dosage de la coumarine greffée à la surface des objets**

Après post-fonctionnalisation, 1 mL de dispersion (réaction en présence de cuivre ou blanc) est centrifugé dans des tubes d'ultrafiltration (Ultrafree[®]-MC, 0,5 mL, membrane PTFE, 0,2 μ m) pendant 20 minutes à 13 000 tpm. Le filtrat est alors récupéré et son spectre de fluorescence est mesuré. Cependant à cause de la présence du cuivre, le dosage quantitatif par fluorimétrie de la coumarine résiduelle n'a pas été possible.

Les 4 mL restants du milieu réactionnel, qui contient du cuivre, sont traités avec de l'EDTA (5 équivalentes/Cu). La solution devient alors bleutée. Après 24 heures d'agitation, cette solution est centrifugée à 18 000 tpm pendant 30 minutes. Les culots sont ensuite lavés deux fois et puis redispersés dans 4 mL d'eau milliQ afin de les caractériser par fluorimétrie. Dans ce cas, il est possible de vérifier qualitativement la présence de la molécule fluorescente à la surface des nano-objets (observation d'une fluorescence due à la coumarine fixée).

Paramètres de mesure :

$$\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}, \lambda_{em} = 432 \text{ nm}$$

Largeur de la bande d'excitation : 5 nm

Largeur de la bande d'émission : 5 nm

Sensibilité : Moyenne

7.3.2. Par Chimie « Click » sans cuivre

- **Protocole** (Adapté des travaux de la littérature [18], [19])

5 mL de dispersion de NPs lavées (à 2,1 mg/mL) et 0,4 mL d'une solution de DBCO-PEG₄-TAMRA (Figure III- 11) dans le DMSO (4,5 mg/mL) sont introduits dans un pilulier. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes.

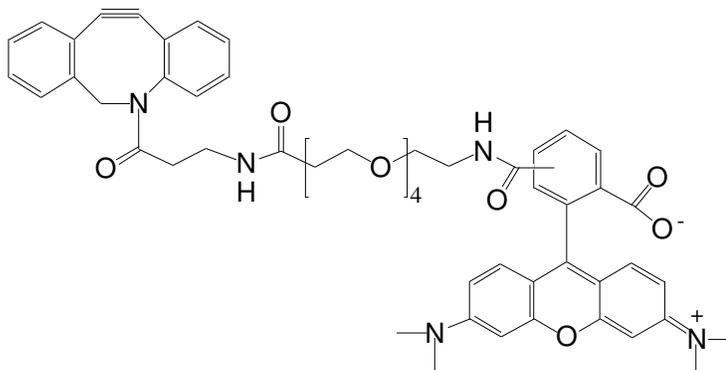


Figure III- 11: Molécule fluorescente utilisée pour la fonctionnalisation des NCs par chimie-click sans cuivre (DBCO-PEG₄-TAMRA).

- **Dosage de la coumarine greffée à la surface des objets**

Après post-fonctionnalisation (Figure III- 12), 1 mL du milieu réactionnel est centrifugé dans des tubes d'ultrafiltration (Ultrafree[®]-MC, 0,5 mL, membrane PTFE, 0,2 µm) pendant 20 minutes à 13 000 tpm. Le filtrat est récupéré, dilué 100 fois, puis analysé par fluorimétrie. La quantité de sonde restant dans la phase aqueuse (non-accrochée à la surface des NPs) est alors estimée en utilisant une courbe de calibration de la DBCO-PEG₄-TAMRA dans l'eau préalablement réalisée (Figure III- 13).

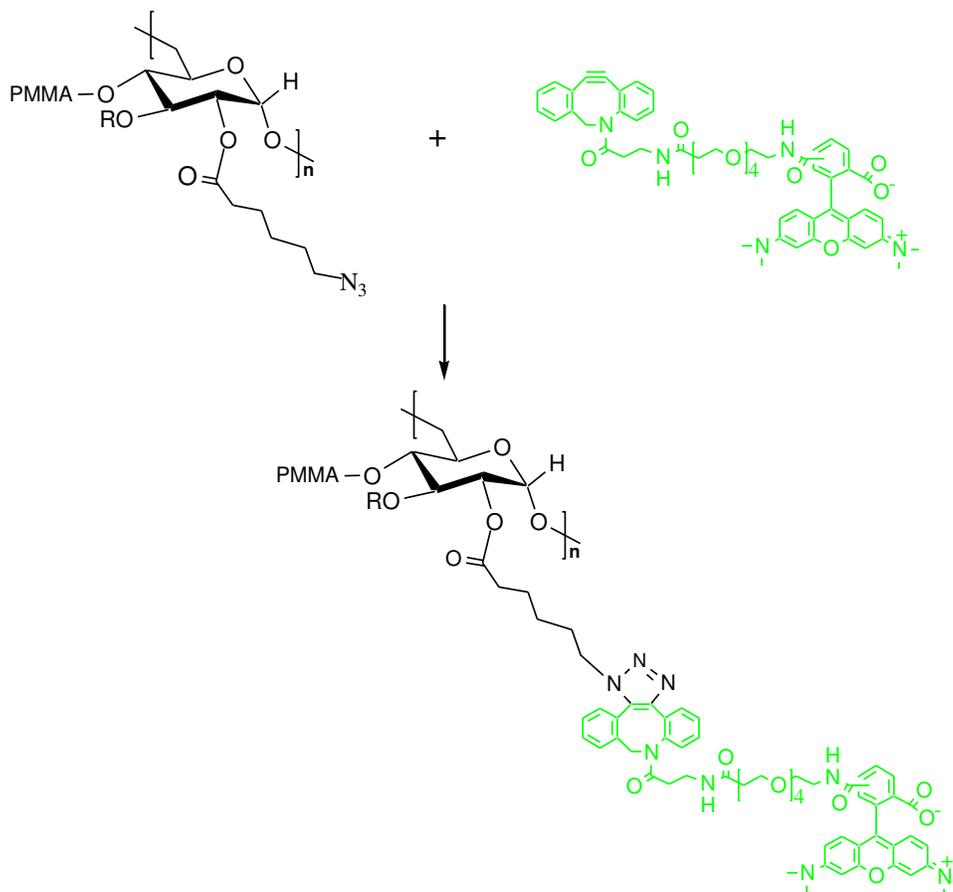


Figure III- 12 : Réaction de chimie-click sans cuivre entre les groupements N_3 disponibles à la surface de NPs et la DBCO-PEG₄-TAMRA.

Paramètres de mesure :

Intervalle de concentration en DBCO-PEG₄-TAMRA: $7 \times 10^{-7}M - 5 \times 10^{-6}M$

$\lambda_{exc} = 545 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 587 \text{ nm}$

Largeur de la bande d'excitation : 2,5 nm

Largeur de la bande d'émission : 2,5 nm

Sensibilité : Moyenne

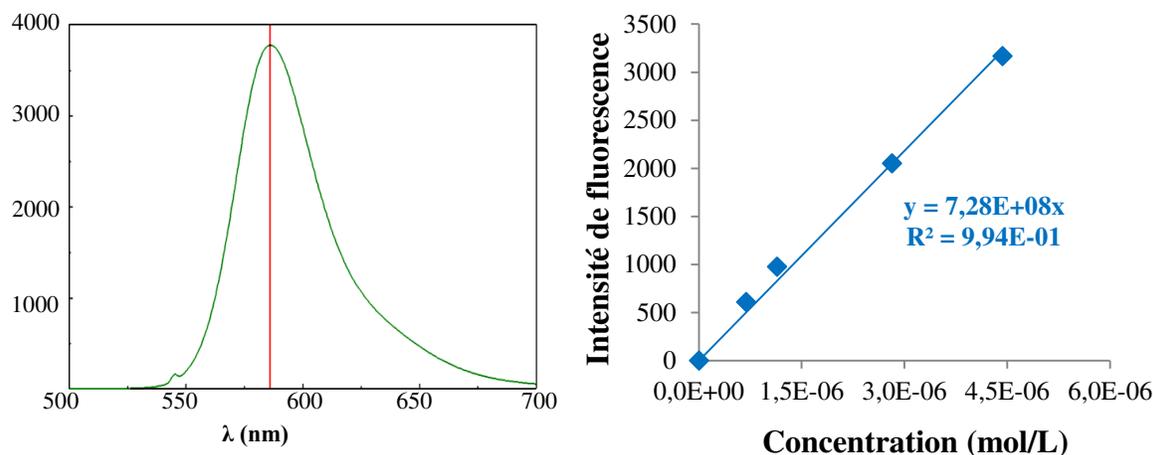


Figure III- 13 : Dosage de la DBCO-PEG₄-TAMRA par fluorimétrie dans l'eau : à gauche un exemple de spectre d'émission ($\lambda_{exc} = 545 \text{ nm}$ et $\lambda_{em-max} = 587 \text{ nm}$), à droite la courbe d'étalonnage.

8. REFERENCES

- [1] W. M. Meylan et P. H. Howard, « Atom/fragment contribution method for estimating octanol–water partition coefficients », *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1995**, 84 (1), 83-92.
- [2] M. Laville, J. Babin, I. Londono, M. Legros, C. Nouvel, A. Durand, R. Vanderesse, M. Leonard, et J.-L. Six, « Polysaccharide-covered nanoparticles with improved shell stability using click-chemistry strategies », *Carbohydrate Polymers* **2013**, 93(2), 537-546.
- [3] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, et V. Zimmermann, « Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds », *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44 (33), 5188-5240.
- [4] P. J. Wyatt, « Light scattering and the absolute characterization of macromolecules », *Analytica Chimica Acta* **1993**, 272 (1), 1-40.
- [5] C. Ren, X. Jiang, G. Lu, X. Jiang, et X. Huang, « Construction of PIB-b-PDEAEMA well-defined amphiphilic diblock copolymers via sequential living carbocationic and RAFT polymerization », *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2014**, 52 (10), 1478-1486.
- [6] R. J. Hunter, « Zeta potential in colloid science: principles and applications », 3^{ème} éd, London: Academic Pr. **1988**, 386p.
- [7] S. R. Deshiikan et K. D. Papadopoulos, « Modified Booth equation for the calculation of zeta potential », *Colloid & Polymer Science* **1998**, 276 (2), 117-124.
- [8] W. G. Eversole et W. W. Boardman, « The Effect of Electrostatic Forces on Electrokinetic Potentials », *The Journal of Chemical Physics*, **1941**, 9 (11), 798.
- [9] A. de Sousa Delgado, M. Leonard, et E. Dellacherie, « Surface modification of polystyrene nanoparticles using dextrans and dextran-POE copolymers: polymer adsorption and colloidal characterization », *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2000**, 11 (12), 1395-1410.

- [10] C. Rouzes, R. Gref, M. Leonard, A. De Sousa Delgado, et E. Dellacherie, « Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique », *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 50 (4), 557-565.
- [11] J. Long, D. W. Osmond, et B. Vincent, « The equilibrium aspects of weak flocculation », *Journal of Colloid and Interface Science* **1973**, 42 (3), 545-553.
- [12] A. J. Barker, B. Cage, S. Russek, et C. R. Stoldt, « Ripening during magnetite nanoparticle synthesis: Resulting interfacial defects and magnetic properties », *Journal of Applied Physics* **2005**, 98 (6), 063528.
- [13] M. Wei, A. J. Ruys, B. K. Milthorpe, et C. C. Sorrell, « Solution ripening of hydroxyapatite nanoparticles: effects on electrophoretic deposition », *Journal of Biomedical Materials Research* **1999**, 45 (1), 11-19.
- [14] N. Chattopadhyay, J. Zastre, H.-L. Wong, X. Y. Wu, et R. Bendayan, « Solid Lipid Nanoparticles Enhance the Delivery of the HIV Protease Inhibitor, Atazanavir, by a Human Brain Endothelial Cell Line », *Pharmaceutical Research* **2008**, 25 (10), 2262-2271.
- [15] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, et D. C. Klenk, « Measurement of protein using bicinchoninic acid », *Analytical Biochemistry* **1985**, 150 (1), 76-85.
- [16] Roche, « Cell proliferation reagent WST-1 ». Instructions for use, Version 16, 2011, [en ligne], disponible sur : < <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/c4c412ae-96ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>> (Consulté le 10/12/2015)
- [17] F. M. J. Vallet, « Ethers of 7-hydroxy-coumarin useful as medicaments », Brevet US4151291 [en ligne] 24 avril 1979, disponible sur : < <http://www.google.co.id/patents/US4151291>> (Consulté le 01/01/2016)
- [18] J. T. Ngo, E. M. Schuman, et D. A. Tirrell, « Mutant methionyl-tRNA synthetase from bacteria enables site-selective N-terminal labeling of proteins expressed in mammalian cells », *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, 110 (13), 4992-4997.
- [19] J. T. Ngo, B. M. Babin, J. A. Champion, E. M. Schuman, et D. A. Tirrell, « State-Selective Metabolic Labeling of Cellular Proteins », *ACS Chemical Biology* **2012**, 7 (8), 1326-1330.

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|----|
| Tableau I- 1 : Ligands de ciblage et cibles moléculaires respectives utilisées dans la formulation de NVs à ciblage actif [28]..... | 11 |
| Tableau I- 2: Exemples de réactions de Chimie « Click » [57]..... | 14 |
| Tableau I- 3: Cyclooctynes utilisées pour mener des réactions de chimie-click sans Cu(I) dans des systèmes biologiques. Les constantes de vitesse (<i>k</i>) ont été obtenues pour la réaction avec l'azoture de benzyle dans l'acétonitrile (1-4, 6, 8, 11) ou le méthanol (5, 7, 9, 10) à température ambiante. | 18 |
| Tableau I- 4: Exemples des liaisons acido-labiles employés pour la fabrication de NVs pH-sensibles [90]. | 22 |
| Tableau I- 5 : Exemples des NCs polymères à cœur liquide utilisées comme NVs des SAs anticancéreuses..... | 35 |
| Tableau I- 6 : Structure de certains polymères naturels et synthétiques utilisés dans la formulation de NCs destinées à la thérapie cancéreuse. | 37 |
| Tableau I- 7 : Structure et composition massique moyenne des certaines huiles utilisées dans la formulation de NCs destinées à la thérapie cancéreuse..... | 38 |
| Tableau I- 8 : Méthodes d'élaboration de NCs à cœur liquide..... | 39 |
| Tableau I- 9 : Fabrication de NPs par ATRP-AGET en miniémulsion en présence d'inisurfs..... | 55 |
| Tableau I- 10: Fabrication de NPs par polymérisation RAFT en miniémulsion directe en présence de transurfs..... | 57 |
| Tableau I- 11 : NCs à cœur aqueux polymérisation RAFT en miniémulsion inverse en présence de transurfs..... | 60 |

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|-----|
| Tableau II- 1 : Agents de transfert RAFT (CTA) utilisés pour la polymérisation RAFT du MMA en solution ou en masse. Classification par nature chimique et par efficacité de contrôle de cette polymérisation..... | 113 |
| Tableau II- 2 : Synthèse des transurfs DexN ₃ τCTAγ par estérification catalysée par l'EDC/DMAP. Réactions menées pendant 48 heures avec [DMAP] ₀ /[CPADB] ₀ = 0,1 et [DexN ₃₋₂₀] ₀ = 0,05 g/L. | 121 |
| Tableau II- 3: Caractéristiques des dérivés DexN ₃ τ et DexN ₃ τCTAγ. Analyses SEC-MALLS (DMSO/NaNO ₃ 0,1M). | 124 |
| Tableau II- 4 : Constituants de la polymérisation RAFT en miniémulsion du MMA. Cas du système modèle et du système en présence du transurf. | 135 |
| Tableau II- 5 : Conditions de réaction utilisées dans la littérature pour la polymérisation RAFT du MMA en présence du CPDB : rapports molaires [MMA] ₀ /[CPDB] ₀ , [CPDB] ₀ /[amorceur] ₀ et température de réaction..... | 147 |
| Tableau II- 6 : Influence de la température de polymérisation sur les caractéristiques des PMMA et des objets obtenus avec [MMA] ₀ /[CPDB] ₀ = 195, [CPDB] ₀ /[AIBN] ₀ = 3, [AIBN] ₀ = 12,6 mM, M810/MMA = 10 % vol., [DexN ₃₋₂₀] = 10 g/L (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. | 152 |

| | |
|--|-----|
| Tableau II- 7 : Influence de la concentration en CPDB sur les caractéristiques des PMMA et des objets obtenus à 80 °C avec [AIBN] = 12,6 mM, M810/MMA = 10 % vol., [DexN ₃₋₂₀] = 10 g/L (Phase aqueuse de 15 mL) et 1,1 mL de MMA. PR correspond à un essai réalisé en absence de CPDB. La teneur en solide est dans tous le cas de 8 % m..... | 158 |
| Tableau II- 8 : Influence de la teneur en M810 sur les caractéristiques des PMMA et des objets obtenus avec [MMA] ₀ /[CPDB] ₀ = 398, [CPDB] ₀ /[AIBN] ₀ = 3 et [DexN ₃₋₂₀] = 10 g/L (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA, 90 minutes de polymérisation à 80 °C..... | 162 |
| Tableau II- 9: Polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion en présence des transurfs DexN ₃ -τCTAγ réalisées à 80 °C, avec [CTA] ₀ /[AIBN] ₀ = 3, [DexN ₃ -τCTAγ] = 10 g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. PR1 a été réalisée avec DexN ₃₋₂₀ | 166 |
| Tableau II- 10 : Comparaison des différents solvants en tant qu'élouants pour la SEC-MALLS du dextrane, des dérivés DexN ₃ -τ, DexN ₃ -τCTAγ et des copolymères à une [Polymère] = 10 g/L. | 174 |
| Tableau II- 11 : Caractéristiques des glycopolymères DexN ₃₋₂₀ -g-PMMA _{Mn} synthétisés par polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion à 80 °C avec [CTA] ₀ /[AIBN] ₀ = 3, [DexN ₃₋₂₀ CTAγ] = 10 g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. | 184 |
| Tableau II- 12 : Conditions de synthèse et caractéristiques des NCs utilisées pour les caractérisations physico-chimiques..... | 194 |
| Tableau II- 13 : Caractéristiques de la couronne de dextrane en surface des objets. Cas de NCs fabriquées par polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence du système modèle DexN ₃₋₂₀ /CPDB (NCs-MOD) et du transurf (NCs-CTA) (conditions voir Tableau II- 12). Les NCs-DexN ₃ ont été préparées par émulsion-évaporation du solvant (voir page III, Paragraphe 3.3) à l'aide d'un PMMA préformé. | 204 |
| Tableau II- 14 : Comparaison des résultats des analyses MDSC de NCs-MOD et NCs-CTA avec ceux du PMMA (8 300 g/mol), du M810 et de leurs mélanges. | 212 |
| | |
| Table 1. RAFT homopolymerization (MMA) and copolymerization (MMA/DEAEMA) carried out from DexN ₃₋₂₀ CTA _{3,7} in miniemulsion: grafts characterization, loading efficiency and NCs size..... | 229 |
| Table 2. Average percentage of living THP-1 after 24 h of incubation at 37°C with 3.3.10 ⁻⁸ to 3.3.10 ⁻³ mg/mL (based on polymer internal shell content) of PMMA-NCs or COPO-NCs determined by the Trypan blue assay. n = 3..... | 239 |

LISTE DES SCHEMAS

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|----|
| Schéma I- 1 : Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire Azoture/Alcyne développée par Huisgen. | 15 |
| Schéma I- 2 : Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire Azoture/Alcyne catalysée par le Cu(I)..... | 15 |
| Schéma I- 3 : Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire Azide/Alcyne non-catalysée. | 16 |
| Schéma I- 4 : Principe du contrôle d'une PRDR. | 62 |
| Schéma I- 5 : Equilibre réversible permettant le contrôle de l'ATRP..... | 64 |
| Schéma I- 6 : Structure générale de l'agent de transfert RAFT (CTA). | 65 |
| Schéma I- 7 : Mécanisme de la polymérisation RAFT proposé par le groupe CSIRO [276]. | 66 |
| Schéma I- 8 : Constantes de transfert caractéristiques du pré-équilibre et de l'équilibre principal d'une polymérisation RAFT..... | 70 |

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|---|-----|
| Schéma II- 1 : Stratégie de synthèse des NCs à cœur huileux (M810) et écorce polymère par ségrégation de phases lors d'un procédé de polymérisation RAFT en miniémulsion en présence d'un transurf dérivé du dextrane. | 102 |
| Schéma II- 2 : Possible évolution de la plateforme de NCs vers l'obtention des objets pH-sensibles permettant un ciblage actif des cellules cancéreuses..... | 103 |
| Schéma II- 3 : Stratégie de synthèse des transurfs dérivés du dextrane | 106 |
| Schéma II- 4 : Synthèse des DexN ₃ . Introduction des groupements hydrophobes dotés d'une fonction azoture sur le dextrane..... | 109 |
| Schéma II- 5 : Mécanisme de la polymérisation RAFT proposé par le groupe CSIRO. Etape de pré-équilibre : consommation de l'agent RAFT initial..... | 112 |
| Schéma II- 6 : Introduction des groupements agents de transfert RAFT (CTA) sur les dérivés DexN ₃ .τ. | 117 |
| Schéma II- 7 : Mécanisme d'activation <i>in situ</i> de la fonction acide carboxylique par le système EDC/DMAP. | 120 |
| Schéma II- 8 : Mécanisme de la réaction de cycloaddition de Huisgen entre N ₃ et C=C | 200 |
| Schéma II- 9 : Mécanisme réactionnel proposé par Ladmiral et al. [8] pour la décomposition du NIPAAM en présence de fonctions N ₃ | 201 |

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

| | |
|---|-----|
| Schéma III- 1 : Synthèse de l'acide 6-azidohéxanoïque | 266 |
| Schéma III- 2 : Synthèse de l'ester activé de l'acide 6-azidohéxanoïque | 268 |

LISTE DES FIGURES

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|---|----|
| Figure I- 1: Types de NVs disponibles pour la thérapie cancéreuse. Inspirée de [6]. | 7 |
| Figure I- 2 : Structure simplifiée d'une tumeur cancéreuse. | 7 |
| Figure I- 3: Ciblage passif des cellules cancéreuses grâce à l'effet EPR. | 9 |
| Figure I- 4 : Ciblage actif des cellules cancéreuses. | 10 |
| Figure I- 5: Introduction de ligands à la surface d'un nanovecteur par couplage covalent. | 12 |
| Figure I- 6: Structure de l'OCT et l'OCT biotinylée développés par Bertozzi et al. [75]. | 17 |
| Figure I- 7 : Libération d'une SA au sein d'une tumeur à partir d'un système stimuli-sensible. | 19 |
| Figure I- 8: Systèmes stimuli-sensibles développés pour les thérapies cancéreuses et mécanismes impliqués dans la libération de la SA. | 20 |
| Figure I- 9 : Structure simplifiée d'une cellule humaine. | 21 |
| Figure I- 10 : Mécanisme de libération d'une SA à partir d'un NV contenant des liaisons acide-labiles. | 22 |
| Figure I- 11: Structure chimique de la doxorubicine (DOX) | 23 |
| Figure I- 12 : Libération d'une SA en milieu acide par gonflage d'un nanovecteur à base de polymère pH-sensible. | 24 |
| Figure I- 13: Polymères pH-sensibles les plus utilisés. Polymères anioniques : 1) Poly(acide acrylique)-PAA, 2) Poly(acide méthacrylique)-PMAA, 3) Acide poly(2-éthyl acrylique)- PEAA, 4) poly(acide 2-propyl acrylique)-PPAA, 5) poly(acide 2-butyl acrylique)-PBAA, 6) Poly (acide glutamique)-PGA, 7) Poly(chlorohydrate d'allylamine)-anhydride citroconique- PAH-cit, 8)polymères contenant des groupements sulfonamide. Polymères cationiques : 9) Poly(méthacrylate de N,N-diméthylaminoéthyle)-PDMAEMA, 10) Poly(méthacrylate de N,N-diéthylaminoéthyle)-PDEAEMA, 11) Poly(4-vinylpyridine)-PVP, 12) Poly(L-histidine)-PHis, 13) Poly(β -amino ester)-PbAE. Inspirée de [90]. | 25 |
| Figure I- 14 : Propriétés pH-sensibles des hydrogels à base des copolymères aléatoires poly(DEAEMA-co-MAA). Inspirée de [125]. | 26 |
| Figure I- 15 : Propriétés pH-sensibles des hydrogels à cœur PDEAEMA et écorce PMAA [127]. | 27 |
| Figure I- 16 : Destins possibles de NVs <i>in vivo</i> après leur administration par voie intraveineuse. Inspirée de [85]. | 29 |
| Figure I- 17 : Conformations possibles du dextrane à la surface d'un NV. Dans le cas d'une configuration « <i>end-on</i> », l'adsorption ou le greffage du dextrane à la surface s'effectue par un point d'ancrage (cas de copolymères dibloc). Dans une configuration « <i>side-on</i> » la fixation du dextrane s'effectue par des nombreux points (cas de copolymères en peigne) et le dextrane adopte une conformation en boucle-trains et queues à la surface du NV. | 31 |
| Figure I- 18 : Cahier de charges d'un NV destiné à l'administration d'anticancéreux par voie intraveineuse. | 32 |
| Figure I- 19: Différentes morphologies des nanoparticules polymères: a) nanosphères, b) nanocapsules | 33 |
| Figure I- 20: Elaboration de NCs par ségrégation de phases. Cas de la fabrication de NCs à écorce PLA et cœur huileux (Labrafac CC) par émulsion-diffusion de solvant. | 40 |
| Figure I- 21 : Elaboration de NCs par adsorption couche par couche des polysaccharides naturels (chitosane et héparine) sur des nanoparticules de silice. | 41 |

| | |
|---|----|
| Figure I- 22 : Différentes stratégies de fabrication de NCs par des réactions à l'interface liquide/liquide d'une émulsion. | 43 |
| Figure I- 23 : Elaboration de NCs à cœur huileux par polymérisation en miniémulsion. | 44 |
| Figure I- 24: Utilisation d'un agent hydrophobe pour limiter le mûrissement d'Oswald. | 45 |
| Figure I- 25 : Possibles morphologies des objets lors d'une ségrégation de phases : a) cœur-écorce, b) double hémisphère c) gouttelette d'huile et particule polymère séparées, d) matrice polymère polynucléaire. | 47 |
| Figure I- 26 : Influence de la polarité de l'écorce polymère sur la morphologie des objets finaux. Inspirée de [233]. | 48 |
| Figure I- 27 : Formation d'une nanocapsule lors de la polymérisation en miniémulsion directe d'un monomère vinylique à partir d'un tensioactif réactif. Les chaînes noires représentent le tensioactif réactif, les points sont les groupements réactifs et les chaînes rouges correspondent au polymère qui formera l'écorce. Inspirée de [243]. | 50 |
| Figure I- 28 : Différentes structures de tensioactifs réactifs utilisés pour la fabrication de NCs par polymérisation interfaciale en miniémulsion. Configuration du recouvrement des objets finaux. | 52 |
| Figure I- 29 : Croissance des chaînes polymères et formation de NCs à partir de transurfs lors d'une polymérisation en miniémulsion a) directe ou b) inverse. | 61 |
| Figure I- 30 : Influence de la terminaison, de l'amorçage lent et du transfert sur (a) la cinétique de polymérisation, (b) l'évolution des masses molaires en fonction de la conversion. | 63 |
| Figure I- 31 : Guide pour sélectionner groupements R et Z du CTA pour la polymérisation RAFT de certains monomères. Pour R, la constante de vitesse de fragmentation (k_{β}) diminue de gauche à droite. Pour Z, la constante vitesse de fragmentation (k_{β}) augmente et celle d'addition (k_{add}) diminue de gauche à droite. La ligne pointillée indique un contrôle partiel de la polymérisation (par exemple bon contrôle de la masse molaire mais une grande dispersité). MMA=Méthacrylate de méthyle, Sty=Styrène, MA=Acrylate de méthyle, AM =Acrylamide, AN=Acrylonitrile, VAc=Acétate de vinyle [280]. | 69 |
| Figure I- 32 : Dépendance de l'évolution de a) X_n et b) \bar{M}_w avec la conversion selon les valeurs des constantes de transfert de chaîne C_{tr} et C_{trP} , respectivement. Prédiction obtenues à partir des équations de Mueller et al. [282], [283] avec une concentration en espèces actives de 10^{-7} mol.L ⁻¹ et un ratio monomère/CTA de 605. Valeurs expérimentales obtenues pour la polymérisation du méthacrylate de méthyle en présence des dithiobenzoates (avec $R=C(Me)_2Ph$ (□) et $R=C(Me)_2CO_2Et$ (○)) à une concentration initiale de 0,0116 M. | 71 |
| Figure I- 33 : Evolution du $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps. Polymérisation RAFT en masse de l'acrylate de méthyle en présence du CDB à différents concentrations. Expériences menées à une température de 80 °C et $[AIBN]_0$ égale à 10 mM [284]. | 74 |
| Figure I- 34 : Formation de NPs par polymérisation RAFT en émulsion. | 76 |

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|-----|
| Figure II- 1 : Plateforme de NCs envisagées pour un ciblage actif des tissus tumoraux. | 100 |
| Figure II- 2 : Structure du tensioactif réactif de type transurf DexN ₃ CTA. | 106 |

| | |
|--|-----|
| Figure II- 3 : Structure chimique du dextrane natif. Les unités glucopyranose sont essentiellement liées par des liaisons α -(1 \rightarrow 6). Des chaînes latérales en α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) et α -(1 \rightarrow 4) peuvent être aussi présentes en moindre proportion. | 107 |
| Figure II- 4: Structure linéaire du dextrane. | 108 |
| Figure II- 5 : Spectre RMN ^1H du dérivé DexN ₃₋₂₀ dans le DMSO- <i>d</i> ₆ | 110 |
| Figure II- 6 : Relation entre la quantité d'acide activée et le taux de modification τ des dérivés DexN _{3-τ} [15] | 111 |
| Figure II- 7 : Groupes R efficaces pour la polymérisation RAFT du MMA [16]. | 114 |
| Figure II- 8 : Structure de l'agent RAFT acide commercial choisi pour la modification du dextrane : l'acide 4-cyano-4-(phénylcarbonothioylthio)pentanoïque (CPADB). | 115 |
| Figure II- 9 : Croissance des greffons PMMA à partir des groupements CTA greffés sur la dorsale du dextrane « R-group approach ». | 116 |
| Figure II- 10 Spectres RMN ^1H des dérivés DexN ₃₋₂₀ et DexN ₃₋₂₀ CTA _{3,7} dans le DMSO- <i>d</i> ₆ | 118 |
| Figure II- 11 : Chromatogrammes SEC du dextrane natif (DexT40) et ses dérivés DexN _{3τ} et DexN _{3τ} CTA γ (Signal RI), dans le DMSO/NaNO ₃ (0,1 M) dn/dc=0,07 ml/g. | 123 |
| Figure II- 12 : Evolution de la tension superficielle des solutions aqueuses des DexN _{3-τ} et DexN _{3-τ} CTA γ en fonction de la concentration en chaînes hydrophobes dans la phase aqueuse. | 125 |
| Figure II- 13 : Etapes et conditions utilisées pour la polymérisation RAFT en miniémulsion du MMA. | 136 |
| Figure II- 14 : Evolution du diamètre moyen en surface des nanogouttelettes (d[3 : 2]) lors du procédé de préparation des NCs. Miniémulsions préparées avec [DexN ₃₋₂₀] = 10 g/L (phase aqueuse de 15 mL), 1,1 mL de MMA et différents ratios M810/MMA : (\blacktriangle) 10, (\blacklozenge) 25 et (\bullet) 50 % vol.. | 138 |
| Figure II- 15 : Distribution de tailles en volume après sonication et en fin de l'essai de stabilité (dégazage + 3 heures de chauffage à 80 °C). Miniémulsions préparées avec [DexN ₃₋₂₀] = 10 g/L (phase aqueuse 15 mL), 1,1 mL de MMA et différents ratios M810/MMA : a) 10, b) 25 et c) 50 % vol.. | 140 |
| Figure II- 16 : Diamètre moyen des nanogouttelettes (d[3 : 2]) des émulsions obtenues en dispersant une phase organique de MMA et de M810 dans une solution aqueuse de DexN ₃₋₂₀ à 10 g/L, en fonction du ratio massique tensioactif/phase organique (α). Chaque courbe correspond à un ratio volumique M810/MMA constant : (\blacklozenge) 10, (\blacksquare) 25, (\blacktriangle) 50 et (\bullet) 100 % vol..... | 141 |
| Figure II- 17 : Evolution de la composition des nanogouttelettes/nano-objets au cours du procédé de préparation des NCs. | 143 |
| Figure II- 18: Evolution de la T _g du PMMA en fonction de la teneur massique en M810. | 144 |
| Figure II- 19 : Thermogrammes MDSC (flux inversible) des mélanges PMMA/M810 avec a) 2% m. M810 et b) 34% m. M810 | 145 |
| Figure II- 20 : Evolution de la conversion et du $\ln([M]_o/[M]_t)$ en fonction du temps : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à (\blacklozenge) 70 °C et (\bullet) 80 °C avec [MMA] _o /[CPDB] _o = 195, [CPDB] _o /[AIBN] _o = 3, [AIBN] _o = 12,6 mM, M810/MMA = 10 % vol., [DexN ₃₋₂₀] = 10 g/L, (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. | 153 |
| Figure II-21 : Evolution des chromatogrammes SEC-MALLS (THF) obtenus pendant des polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à a) 70 °C et b) 80 °C, avec [MMA] _o /[CPDB] _o = 195, [CPDB] _o / [AIBN] _o = 3, [AIBN] _o = 12,6 mM, M810/MMA = 10 % vol., [DexN ₃₋₂₀] = 10 g/L (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. | 154 |

- Figure II- 22 : Evolutions des M_n (symboles pleins) et des \bar{M}_w (symboles creux) en fonction de la conversion. Polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à (♦) 70 °C, (●) 80 °C, avec $[MMA]_o/[CPDB]_o = 195$, $[CPDB]_o/[AIBN]_o = 3$, $[AIBN]_o = 12,6$ mM, M810/MMA = 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. Les lignes pointillée et pleine correspondent aux M_n -th calculées selon l'équation II- 4 avec des ratios $[MMA]_o/[CPDB]_o$ de 195 et 216, respectivement. 155
- Figure II- 23 : Evolution du diamètre moyen en surface des nanogouttelettes/nano-objets ($d[3 : 2]$) au cours des différentes étapes du processus de préparation des NCs et au cours de la polymérisation. Polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à (♦) 70 °C, (●) 80 °C, avec $[MMA]_o/[CPDB]_o = 195$, $[CPDB]_o/[AIBN]_o = 3$, $[AIBN]_o = 12,6$ mM, M810/MMA= 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. L'essai de stabilité à ratio M810/MMA de 10% vol. est donné comme référence (▲), (voir Figure II- 14, page 138)..... 156
- Figure II- 24 : Evolution de la conversion (a) et du $\ln([M]_o/[M]_t)$ (b) en fonction du temps : polymérisations RAFT du MMA réalisées à 80 °C avec $[MMA]_o/[CPDB]_o$: (♦) 86, (●) 195, (▲) 295, $[AIBN]_o = 12,6$ mM, M810/MMA = 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse de 15 mL) et 1,1 mL de MMA. Polymérisation en absence de CPDB pour comparaison (■). 159
- Figure II- 25 : Evolutions des M_n (symboles pleins) et des \bar{M}_w (symboles creux) en fonction de la conversion : polymérisations RAFT du MMA réalisées à 80 °C avec des ratios $[MMA]_o/[CPDB]_o$ de (♦) 86, (●) 195, (▲) 295, $[AIBN] = 12,6$ mM, M810/MMA = 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse de 15 mL) et 1,1 mL de MMA. Les lignes pointillées correspondent aux droites théoriques calculées grâce à l'équation II- 4. 160
- Figure II-26 : Evolution des chromatogrammes SEC (THF) des homopolymères PMMA obtenus lors des polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à 80 °C avec de ratios $[MMA]_o/[CPDB]_o$ de (♦) 86, (●) 195, (▲) 295, $[AIBN]_o = 12,6$ mM, M810/MMA = 10 % vol., $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (Phase aqueuse de 15 mL) et 1,1 mL de MMA. 161
- Figure II- 27 : Evolution de la conversion en fonction du temps : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à 80 °C avec des ratios volumiques M810/MMA de (♦) 10 et (●) 25 % vol., $[MMA]_o/[CPDB]_o = 398$, $[CPDB]_o/[AIBN]_o = 3$, $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. 163
- Figure II- 28 : Evolutions des M_n (symboles pleins) et des \bar{M}_w (symboles creux) en fonction de la conversion : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à 80 °C avec des ratios volumiques M810/MMA de (♦) 10 et (●) 25 % vol., $[MMA]_o/[CPDB]_o = 398$, $[CPDB]_o/[AIBN]_o = 3$, $[DexN_{3-20}] = 10$ g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. La ligne pointillée correspond à la droite théorique calculée grâce à l'équation II- 4. 164
- Figure II- 29 : Evolution de la conversion et du $\ln([M]_o/[M]_t)$ en fonction du temps : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion à partir des transurfs $DexN_{3-20}CTA_{3,7}$: (●, CTA1), (▲, CTA2), (♦, CTA3) et $DexN_{3-20}CTA_{7,5}$: (■, CTA4). réalisées à 80 °C avec $[CTA]_o/[AIBN]_o = 3$, $[DexN_{3-20}CTA] = 10$ g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. Une expérience de polymérisation radicalaire conventionnelle dans les mêmes conditions que l'essai CTA1 est donnée pour comparaison (×, PR1).. 166
- Figure II- 30 : Evolution du diamètre moyen en surface des nanogouttelettes ($d[3 : 2]$) au cours des différentes étapes du processus de préparation des NCs : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion à partir des transurfs $DexN_{3-20}CTA_{3,7}$: (●, CTA1), (▲, CTA2), (♦, CTA3) et $DexN_{3-20}CTA_{7,5}$: (■, CTA4). réalisées à 80 °C avec $[CTA]_o/[AIBN]_o = 3$, $[DexN_{3-20}CTA] = 10$ g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. 169
- Figure II- 31 : Spectres RMN 1H dans le DMSO- d_6 du glycopolymère $DexN_{3-20}$ -g-3,6PMMA7800 issu du macroagent RAFT $DexN_{3-20}CTA_{3,7}$ 171

| | |
|--|-----|
| Figure II- 32: Spectre RMN 2D DOSY ^1H dans le DMSO- d_6 du glycopolymère DexN $_{3-20}$ -g-3,6PMMA7800 issu du macroagent RAFT DexN $_{3-20}$ CTA $_{3,7}$. | 172 |
| Figure II- 33: Spectre RMN 2D DOSY ^1H dans le DMSO- d_6 d'un mélange PMMA $_{7100}$ /DexN $_{3-20}$ CTA $_{3,7}$ avec la même composition massique que le copolymère DexN $_{3-20}$ -g-3,6PMMA7800. | 172 |
| Figure II- 34 : Suivi de chromatogrammes SEC-MALLS (DMF/LiCl (2 g/L)) des copolymères obtenus à partir du macroagent RAFT DexN $_{3-20}$ CTA $_{3,7}$, (Tableau II- 9, expérience CTA1), en fonction de la conversion avant et après lavage des copolymères au THF. | 175 |
| Figure II- 35: Degreffage des chaînes PMMA de la dorsale du dextrane par hydrolyse basique des fonctions ester reliant les greffons au polysaccharide. | 176 |
| Figure II- 36 : Evolutions des chromatogrammes SEC-MALLS (THF) des greffons PMMA issus des glycopolymères DexN $_{3-20}$ -g-nPMMAMn (Tableau II- 9, expérience CTA1) en fonction de la conversion (x). | 177 |
| Figure II- 37 : Chromatogrammes SEC-MALLS (THF) des greffons PMMA issus des glycopolymères DexN $_{3-20}$ -g-nPMMAMn synthétisés dans des systèmes en miniémulsion à différents teneurs M810/MMA, (Tableau II- 9, expériences CTA1, 2 et 3), à des conversions (x) voisines de 60%. | 178 |
| Figure II- 38 : Comparaison de chromatogrammes SEC-MALLS (THF) des greffons et homopolymères PMMA obtenus à la même conversion (x) à partir du macroagent RAFT DexN $_{3-20}$ CTA $_{3,7}$ a) CTA1 , et b) CTA2 (Tableau II- 9). | 179 |
| Figure II- 39 : Evolutions des Mn (symboles pleins) et des Đ (symboles creux) des greffons PMMA : polymérisations RAFT du MMA en miniémulsion réalisées à 80 °C à partir des transurfs a) DexN $_{3-20}$ CTA $_{3,7}$: (●, CTA1), (▲, CTA2), (◆, CTA3) et b) DexN $_{3-20}$ CTA $_{7,5}$: (■, CTA4). avec $[\text{CTA}]_0/[\text{AIBN}]_0 = 3$, $[\text{DexN}_{3-20}\text{CTA}\gamma] = 10$ g/L (phase aqueuse 15 mL) et 1,1 mL de MMA. Les lignes pointillées représentent l'évolution des Mn théoriques (équation II- 4). | 180 |
| Figure II- 40 : NCs fabriquées par polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence du système modèle DexN $_{3-20}$ /CPDB (a, NCS-MOD) et du transurf (b, NCs-CTA). | 194 |
| Figure II- 41 : Distribution de tailles en volume en fin de polymérisation et à l'issue de 5 semaines de stockage à 4 °C de NCs-MOD et NCs-CTA. | 195 |
| Figure II- 42 : Structure chimique du tréhalose et du glucose. | 196 |
| Figure II- 43 : Distribution de tailles en volume en fin de polymérisation et après lyophilisation en présence et en absence de tréhalose. | 197 |
| Figure II- 44 : Evolution de potentiel Zêta de nano-objets dispersés dans une phase aqueuse de NaCl de 10^{-6} à 1 mol/l. Cas des NPs préparées par polymérisation RAFT en miniémulsion : (▲) NCs-MOD et (◆) NCs-CTA ; par polymérisation radicalaire classique en utilisant un stabilisant non-réactif : (●) NCs-RC et (○) NCs-DexC $_6$ et par émulsion-évaporation de solvant : (■) NSs nues, (△) NSs-DexN $_{3-20}$ et (◇) NCs-DexN $_{3-20}$. | 198 |
| Figure II- 45 : Structure des dérivés DexC $_6$. Dextranes modifiés avec des chaînes alkyles à 6 carbones. | 200 |
| Figure II- 46 : Spectre ATR-FTIR du DexN $_{3-20}$ et du DexN $_3$ (MMA) (produit purifié obtenu après réaction du DexN $_3$ avec le MMA). | 202 |
| Figure II- 47 : Spectre ATR-FTIR des NCs-MOD et NCs-CTA déposées à l'état solide. | 203 |
| Figure II- 48 : Stabilité colloïdale de NCs en présence de NaCl. Cas des NPs préparées par polymérisation RAFT en miniémulsion : (▲) NCs-MOD et (◆) NCs-CTA, et par émulsion-évaporation de solvant : (■) NSs nues et (◇) NCs-DexN $_{3-20}$. | 208 |

Figure II- 49 : Stabilité colloïdale de (▲) NCs-MOD et (◆) NCs-CTA en milieu tampon PBS après 24 heures..... 209

Figure II- 50 : Comparaison des spectres RMN ¹H dans le DMSO-*d*₆ des NCs étudiées avant et après traitement avec le SDS. Cas des NCs fabriquées par polymérisation RAFT du MMA en miniémulsion en présence du système modèle DexN₃₋₂₀/CPDB a) NCs-MOD et du transurf b) NCs-CTA..... 211

Figure II- 51 : Micrographies cryo-MET des NCs en suspension dans l'eau: a) NCs-MOD, b) NCs-CTA, c) NCs-CTA endommagées par irradiation. 213

Figure 1. Preparation of dextran-covered PMMA-NCs and COPO-NCs by RAFT miniemulsion polymerization using a dextran-based (DexN₃CTA) transurf. 228

Figure 2. Preparation of dextran-covered PMMA-NCs and COPO-NCs by RAFT miniemulsion polymerization using a dextran-based (DexN₃CTA) transurf. 231

Figure 3. pH-responsive swelling of NCs. Average hydrodynamic particle diameter (determined by DLS) as a function of pH at 25 °C: (○) PMMA-NCs (PBS-0.148M) and COPO-NCs (▲) in PBS-0.148M.... 234

Figure 4. pH-triggered release of Cou1 at 37°C from PMMA-NCs in (●) PBS (Run 3, Table 1) or (▲) PBS/SDS (Run 4, Table 1) and from COPO-NCs in (◆) PBS (Run 5, Table 1). Full symbols (pH = 4.0) and open symbols (pH= 7.4). 236

Figure 5. BSA fluorescence intensities in presence (F) or in absence (Fo) of NCs (a) and percentage of fibrinogen recovered after PMMA-NCs and COPO-NCs incubation (b), n=3. 238

Figure 6. Cytocompatibility of 3.3.10⁻⁸ to 3.3.10⁻³ mg/mL (based on polymer internal shell content) of PMMA-NCs or COPO-NCs incubated during 24 h at 37°C with human monocytes (THP-1). (A) Metabolic activity (WST-1 assay) 100% represents control cells incubated with PBS, n = 3. (B) Ratio of the metabolic activity (WST-1 absorbance at 450 nm) to the number of living cells determined by the Trypan blue assay, n = 3..... 239

Figure 7. NCs post-functionalization strategies by click chemistry. 240

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

Figure III- 1: Spectre RMN ¹H de l'acide 6-azidohéxanoïque dans CDCl₃. 267

Figure III- 2: Spectre RMN ¹H de l'ester activé de l'acide 6-azidohéxanoïque dans CDCl₃. 268

Figure III- 3 : Spectre RMN ¹H des NCs en fin de polymérisation et après lavage dans DMSO-*d*₆. 281

Figure III- 4 : Modélisation de la double-couche électrostatique autour d'une particule chargée. 285

Figure III- 5 : Détermination de ΔPZ, d'après les valeurs de potentiel ζ des NCs-CTA. Les calculs sont réalisés en utilisant l'équation d'Eversole et Boardman (Equation III- 14) en fonction du paramètre de Debye-Hückel (κH). 287

Figure III- 6 : Exemple d'un spectre RMN ¹H des NCs à écorce PMMA encapsulant la Cou1. 291

Figure III- 7 : Dosage indirect de la Cou1 par fluorimétrie. Courbes d'étalonnage et exemples de spectre d'émission (λ_{exc} = 372 nm et λ_{em-max} = 455 nm) dans a) PBS/Ethanol et b) (PBS+SDS)/Ethanol. 294

Figure III- 8 : Dosage de la Cou1 contenue dans les NCs par fluorimétrie dans le DMSO : à gauche un exemple de spectre d'émission (λ_{exc} = 338 nm et λ_{em-max} = 437 nm), à droite la courbe d'étalonnage en présence de NCs (non-chargées en principe actif, à une concentration de 0,126 g/L). 295

| | |
|--|-----|
| Figure III- 9: Molécule fluorescente utilisée pour la fonctionnalisation des NCs par chimie-click en présence de cuivre (Cou-click)..... | 299 |
| Figure III- 10 : Réaction de chimie-click catalysée par le cuivre entre les groupements N ₃ disponibles à la surface de NPs et le dérivé Cou-click..... | 300 |
| Figure III- 11: Molécule fluorescente utilisée pour la fonctionnalisation des NCs par chimie-click sans cuivre (). | 301 |
| Figure III- 12 : Réaction de chimie-click sans cuivre entre les groupements N ₃ disponibles à la surface de NPs et la | 302 |
| Figure III- 13 : Dosage de la par fluorimétrie dans l'eau : à gauche un exemple de spectre d'émission ($\lambda_{exc} = 545 \text{ nm}$ et $\lambda_{em-max} = 587 \text{ nm}$), à droite la courbe d'étalonnage. | 303 |

Elaboration de nanocapsules par polymérisation radicalaire contrôlée à partir d'un tensioactif réactif dérivé du dextrane

Résumé :

Des nanocapsules (NCs) biocompatibles destinées à l'administration intraveineuse d'agents anticancéreux hydrophobes ont été élaborées par polymérisation RAFT en miniémulsion, confinée à l'interface liquide/liquide. La polymérisation RAFT a été utilisée pour contrôler la croissance des greffons polymères constituant l'écorce des NCs à partir d'un transurf (macroagent RAFT et tensioactif) multifonctionnel dérivé du dextrane (DexN₃- τ CTA γ). Des NCs constituées d'une écorce en polymère hydrophobe (poly(méthacrylate de méthyle)) entourant un cœur liquide huileux (Miglyol[®]810) et recouvertes d'une couronne hydrophile polysaccharide (dextrane) ont ainsi été obtenues. Ces nano-objets ont été caractérisés en termes de taille, de recouvrement en dextrane (quantité de polysaccharide, épaisseur et stabilité), de stabilité colloïdale et de morphologie. La fabrication de NCs à écorce polymère pH-sensible a également été abordée. Enfin, le potentiel biomédical de ces nano-objets a été évalué grâce à différentes études : i) encapsulation et libération d'une substance active modèle, ii) cytotoxicité de NCs, iii) interactions des NCs avec les protéines plasmatiques et iv) fonctionnalisation de la surface des NCs par chimie « click ».

Mots clés : nanocapsules, dextrane, transurf, polymérisation par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (polymérisation RAFT), miniémulsion, poly(méthacrylate de méthyle), encapsulation.

Nanocapsules elaboration via controlled radical polymerization using a dextran derivative as reactive surfactant.

Abstract :

Biocompatible nanocapsules (NCs) for intravenous administration of hydrophobic anticancer agents were produced by interfacial Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer (RAFT) miniemulsion polymerization. Controlled growth of polymeric grafts constituting NCs shell was obtained using a multi-reactive dextran-based transurf called DexN₃- τ CTA γ (acting both as macroRAFT agent and surfactant) to mediate RAFT polymerization at the liquid/liquid interface. NCs composed of a hydrophobic polymer shell (poly(methyl methacrylate)), an oily liquid core (Miglyol[®]810) and a hydrophilic polysaccharide coating (dextran) were obtained. These nano-objects were characterized in terms of size, dextran coverage (density, thickness and stability), colloidal stability and morphology. Synthesis of NCs with a pH-sensitive polymer shell was approached. Finally, potential of these nano-objects for biomedical applications was evaluated by studies on different aspects: i) encapsulation and delivery of a model active substance, ii) NCs cytotoxicity, iii) NCs interactions with plasma proteins, and iv) surface functionalization of NCs by "click chemistry".

Keywords : nanocapsules, dextran, transurf, Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer (RAFT) polymerization, miniemulsion, poly(methyl methacrylate), encapsulation.