/\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/

## Université de Provence Aix-Marseille I

École Doctorale des Sciences Chimiques de Marseille

## THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 12 décembre 2011 par :

## Nadège HANDKÉ

### INGÉNIEUR ENSC DE RENNES

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Provence, Mention Sciences chimiques

### \*\*\*\*\*

## Élaboration de nanoparticules de poly(acide lactique)

## multifonctionnelles comme adjuvants potentiels de vaccination

\*\*\*\*\*

Directeur de Thèse

Pr. Denis BERTIN

 $Devant \ le \ jury \ composé \ de \ :$ 

F. D'AGOSTO	Chargé de recherche, Université Claude Bernard	Rapporteur
R. GREF	Directeur de recherche, Université Paris Sud	Rapporteur
M. GINGRAS	Professeur, Université de la Méditerranée	Président
D. BERTIN	Professeur, Université de Provence	Directeur de thèse
D. GIGMES	Directeur de recherche, Université de Provence	Co-directeur de thèse
T. TRIMAILLE	Maître de conférences, Université de Provence	Encadrant
B. VERRIER	Directeur de recherche, Université Claude Bernard	Examinateur
T. DELAIR	Professeur, Université Claude Bernard	Examinateur

À ma mère

 $\dot{A}\ mes\ amis$ 

À mon père

À ma famille

## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Philipe Knauth pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR 6264 "Laboratoire Chimie Provence" ainsi que le Docteur Bernard Verrier pour m'avoir acceptée au sein de la FRE 3310 "Dysfonctionnement de l'Homéostasie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique" en dernière année.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance aux Docteurs Ruxandra Gref et Franck D'Agosto pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse et pour leur analyse critique et leurs remarques constructives. Je remercie également le Professeur Marc Gingras pour avoir accepté de présider mon jury de thèse et pour avoir examiné avec attention et intérêt ce travail. Je remercie également le Professeur Denis Bertin, le Docteur Didier Gigmes, le Docteur Thomas Trimaille, le Docteur Bernard Verrier et le Professeur Thierry Delair de s'être libérés pour participer à ce jury de thèse et pour avoir procédé au bilan de ces trois années de travail de recherche.

Un grand merci au Professeur Denis Bertin et au Docteur Didier Gigmes pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe de Chimie Radicalaire, Organique et Polymères de Spécialité et pour m'avoir fait confiance pour ce projet, sans quoi cette belle expérience n'aurait jamais eu lieu.

J'adresse mes remerciements à Denis : nos rencontres furent assez brèves mais toujours efficaces pour discuter du projet.

Je tiens également à remercier ici Didier pour son dynamisme, son optimisme et pour les discussions scientifiques qui tombaient toujours à point nommé. Tu m'as fait confiance en me laissant indépendante, mais tout en restant disponible en cas de soucis. Par ailleurs, tu as tenu ta promesse en me soutenant pour poursuivre l'aspect biologique du projet. Pour tout ça, je t'en remercie.

Je souhaite exprimer ici toute ma gratitude à mon encadrant marseillais/lyonnais : le Docteur Thomas Trimaille. Tout ce que je pourrais écrire ici ne pourrait pas suffire pour te remercier à la hauteur de la qualité de ton encadrement, mais aussi de ton aide (inestimable) lors de mon transfert Marseille/Lyon. Vraiment un immense merci pour ces trois années, durant lesquelles j'ai beaucoup appris.

J'adresse un grand merci au Docteur Bernard Verrier, qui a accepté que j'intègre son équipe Nanovecteurs Biodégradables et Ingénierie Tissulaire au cours de cette dernière année de thèse. Ce fut vraiment une expérience très enrichissante, qui m'a permis de m'épanouir pleinement en immunologie/vaccinologie. Un grand merci pour ton soutien, ton optimisme et ton enthousiasme.

Je remercie également le Professeur Thierry Delair pour son implication dans le projet. Merci pour toutes vos remarques et questions toujours très constructives, votre disponibilité pour discuter du projet et votre sympathie. Je souhaite remercier le Docteur Kamel Mabrouk pour l'aspect peptidique de ce beau projet. J'aurais souhaité travailler davantage avec toi, que tu me transmettes un peu de ton grand savoir, mais je suis partie trop tôt. Je remercie également Marion Rollet pour son aide précieuse pour les analyses CES DMF (quelle galère ce PNAS!), les nombreuses discussions et les quelques séances culturelles cinématographiques. Un grand à Yohann Guillaneuf pour les grandes discussions bibliographiques, les quelques tentatives de RAFT de la NVP, les parties de squash et la conversion Apple (je ne regrette pas ce changement informatique).

J'adresse également ici mes remerciements à Perrine Mercier et Vincent Pavot pour leur savoir en immunologie et vaccinologie, leur disponibilité pour discuter science et pour m'avoir (re)formée à la culture cellulaire et à la cytométrie. Avec toi, Vincent et la cyto, j'ai appris que la faim n'était que psychologique, que notre corps est sacrément bien régulé : quelle belle machine ce système immunitaire ! Un grand merci au Docteur Damien Ficheux pour ses précieuses analyses HPLC sur les peptides et son savoir. Merci au Docteur Franck Gaudin pour le partage (équitable) de l'HPLC, ses conseils/discussions sur l'HPLC et l'encapsulation. Merci à Elsa Luciani pour m'avoir initiée à la nanoprécipitation et pour sa bonne humeur. Merci à Éric Diesis pour son aide lors de mon emménagement et les discussions sur les peptides (et les voyages).

Je souhaite également remercier ici tous les membres (permanents, doctorants, post-docs et stagiaires) de mes deux laboratoires de thèse pour m'avoir accueillie très chaleureusement et pour m'avoir beaucoup appris en chimie des polymères avec les Marseillais et en particules/immunologie avec les Lyonnais. Je remercie aussi toutes les personnes qui m'ont aidée à déménager et à emménager : un vrai travail d'équipe. Ainsi, dans l'ordre chronologique.

Pour les deux premières années de thèse (et bien sûr après), je souhaite remercier tous les membres du LCP (bientôt Institut de Chimie Radicalaire) et de l'équipe CROPS.

Un grand merci à Trang Phan et Sébastien Maria d'avoir été d'excellents colocataires de paillasse, riches en conseils et avec qui l'ambiance a toujours été agréable dans la salle polymère. Merci à Cathy Lefay pour les discussions carrière, ta bonne humeur et ton dynamisme (et tes conseils culinaires). Merci à Jean-Louis Clément pour ta sympathie et ta "délicieuse paella" : dommage que je sois partie avant que tu n'intègres pleinement l'équipe. Merci à Emmanuel Beaudoin pour les quelques tentatives de caractérisation de polymères et à Frédéric Dumur pour les discussions sur les dysfonctionnements. Un grand merci également à notre ACMO, Laurent Autissier, de belles discussions et une belle philosophie de vie, merci pour m'avoir fait découvrir les petits lieux sympas de Marseille : bonne continuation avec la sécurité du laboratoire !

Au futur Docteur David Glé, un grand merci pour ton soutien durant ces trois années (désolée pour

l'épisode Danone ...), merci pour toutes ces belles discussions qui font avancer la science et la vie. Une attention toute particulière à un ancien haut lieu de Marseille : les "Trois Saucisses", tenu par David, Romain (alias Berrichou : quel punch et quel humour!) et Michaël (Mika "tantôt cuisinier, tantôt photographe"). Merci à ma saucissette Emily : Miss Alsace et geekette, que de fous rires durant ces années ! Un grand merci aux "VIP des Trois Saucisses" : Maud et Etienne, Didier et Giselle, Sandrine et Cédric. Merci à tous pour les discussions, les (très bons) repas, les restos, les Trolley (et aussi les soirées foot/pizza) : j'en garderai toujours un agréable souvenir. Je remercie également Benoît pour m'avoir fait redécouvrir les Chemical Brothers, le poker et me faire comprendre que 8h d'électro en une soirée, c'est beaucoup trop pour moi (comme beaucoup d'autres choses). Merci à Cathie M. pour m'avoir (re)motivée à courir (sous 35°C à l'ombre et en côte... dure la reprise) et pour ton énergie. Merci également à Jessica pour ton dynamisme sans limite. Merci à tous les petits nouveaux, que j'ai peu connus mais grâce à qui, je pense que la relève de la bonne ambiance et de la bonne science au sein de l'équipe est assurée pour quelques années : Thomas F., Antoine, Marion T., Marco, Temoc, Emmanuel, Guillaume, Élodie et Marion V.. Je remercie les quelques anciens du CROPS, que j'ai eu l'occasion de rencontrer en congrès et/ou au CROPS, pour les discussions sur le monde du travail toujours intéressantes et les anecdotes sur le CROPS : Nelly, Jérôme, Benoit, Emmanuel et Arnaud. En dehors du laboratoire mais toujours à Marseille, je tiens également à remercier Nat, Fred et JB pour leur sympathie, les soirées poker et leur bonne humeur.

À présent, je tiens à remercier ici tous les membres de l'IBCP et tous les membres de l'équipe de Nanovecteurs Biodégradables et Ingénierie Tissulaire, rencontrés en cette dernière année.

Un grand merci à Séverine Mugnier pour avoir passé LA commande qui a sauvé le délai d'envoi du manuscrit provisoire : quelle imprimante efficace tu nous as choisie! Une très agréable ambiance dans les bureaux et laboratoires, grâce à Séverine (toujours dynamique et quelle répartie), Agnès (toujours sympathique, bon courage pour la suite!) et Perrine (Merci encore pour ta sympathie, ton aide et ta disponibilité). Je n'oublie pas nos voisins de bureau Vincent P. (bon courage pour la dernière année et vive les NOD), Sophie (la nouvelle thésarde, bonne chance pour la suite avec les drosophiles (et les voitures)), Vincent L. (Mr. NP, le "petit jeune fashion" très sympa et toujours en forme sauf que : sérieusement Lenny Kravitz peu connu ?). Un grand merci aussi à Astrid pour les discussions philosophiques et pour m'avoir présentée à d'autres personnes de l'IBCP, je te souhaite bon courage pour l'après IBCP. Je remercie également chaleureusement : Alexandra (alias Alexandrino ou une Marseillaise à Lyon, quel punch! bon courage pour la fin), Alexis (le rollerman SAV informatique), Magalie D. (toujours la patate), Matthieu (le Lorrain, encore un), Juliette, Marco P., Lucia, Benjamin et Valentine pour leur sympathie, les soirées poker et les Ninkasi. Merci également à Charlotte Primard et Céline Terrat, toujours très sympathiques. À Charlotte : ta thèse m'aura bien aidée à mieux comprendre le VIH. Et un grand merci (encore) à Astrid C., Vincent P., Sophie L. et Vincent L., pour m'avoir fait la très belle surprise de venir à la soutenance (en voiture, très tôt le matin) : j'ai été très heureuse de partager cet évènement avec vous !

Par ordre chronologique et de laboratoire, un grand merci aux différentes gestionnaires, qui m'ont aidée lors des différentes missions et commandes, Mesdames Nathalie Blanchi, Marie-Pierre Carvin, Julia Boussat, Corinne Uberty et Ouahida Mzoughi. Et un grand merci à Madame Gaude pour avoir fait de nombreuses procédures "dernière minute" et pour la relecture minutieuse de ce manuscrit.

Je remercie infiniment mes amis qui m'ont soutenue, supportée et changé les idées depuis que je les connais. Mes amis de Chimie Rennes à Paris, les filles : ML (merci pour l'immense soutien, la prise régulière de nouvelles par téléphone avant et surtout pendant la rédaction), Clochette (binôme à la ville comme sur le dancefloor) et Jen (soutien entre thésardes : courage c'est la fin!) et les garçons : David et Laurent M. pour apporter un peu de masculinité dans notre monde de filles. Mes amis de Chimie Rennes à Lyon : Carole, Florian, Christophe et Vince pour les soirées découvertes de Lyon bien sympathiques et pour le soutien entre doctorants. Une attention particulière pour Cat, mon acolyte depuis le lycée : tant de choses se sont passées depuis, mais nous avons bien avancé dans nos vies, toujours prêtes à se soutenir : merci pour tout ! Une dédicace spéciale à ma "colocataire téléphonique" Mag toujours là depuis la prépa pour donner de bonnes petites recettes, faire d'excellents repas et discuter de la vie en général : merci pour ton soutien et ton dynamisme ! Un grand merci encore à ML, Claire, Jen et Mag de vous être libérées, malgré des emplois du temps chargés, pour partager ma journée de soutenance.

Et enfin, je tiens à remercier infiniment ma mère pour avoir cru en moi depuis mon plus jeune âge, jusqu'au bout et quelles qu'aient été les circonstances. Un immense merci pour toutes les belles valeurs que tu m'as transmises. À présent, je te laisse (enfin) prendre ta retraite : profites-en bien !

Pour finir, je vous souhaite une excellente continuation. J'ai été vraiment ravie de tous vous rencontrer. Bon courage à tous les thésards pour leur thèse, aux post-docs pour trouver le travail de leur rêve et aux permanents pour leurs projets.

Merci!

# Table des matières

Li	Liste des abréviations xi Introduction xvii							
In								
1	Étu	ıde bib	liographique					
	1.1	Génér	alités sur	le système immunitaire	. 2			
		1.1.1	Passé, p	présent et futur	. 2			
		1.1.2	L'immu	nité innée	. 4			
			1.1.2.1	Composante physique : les muqueuses	. 5			
			1.1.2.2	Composante chimique : les molécules de l'immunité et les phénomènes de				
				reconnaissance associés	. 6			
			1.1.2.3	Composante cellulaire : les acteurs de l'immunité	. 11			
		1.1.3	L'immu	nité adaptative	. 12			
			1.1.3.1	Le lien entre les deux immunités	. 12			
			1.1.3.2	La polarisation de l'immunité	. 14			
			1.1.3.3	Étape finale : la mémoire immunitaire	. 15			
		1.1.4	Conclus	sion	. 16			
	1.2	La va	ccination		. 17			
		1.2.1	Le vacci	in idéal $\ldots$	. 17			
		1.2.2	Vaccina	tion traditionnelle	. 19			
		1.2.3	Les diffé	érents types d'adjuvants	. 20			
			1.2.3.1	Généralités	. 20			
			1.2.3.2	$ m \acute{E}mulsions$	. 22			
			1.2.3.3	Liposomes	. 24			
			1.2.3.4	Particules de type virus (VLP) et virosomes	. 25			
			1.2.3.5	Vaccins vectorisés par des virus	. 27			
			1.2.3.6	Complexes immunostimulants	. 28			
			1.2.3.7	Nanoparticules de phosphate de calcium	. 29			

			1.2.3.8	Composés immunostimulants (ou immunomodulateurs)	29
		1.2.4	Conclusi	on	30
	1.3	Les ad	juvants à	base de particules de polymère	32
		1.3.1	Polymèr	es naturels	33
		1.3.2	Polymèr	es synthétiques	35
			1.3.2.1	Biocompatibilité et biodégradabilité	36
			1.3.2.2	Propriétés adjuvantes	37
		1.3.3	Vers des	nanoparticules biomimétiques	39
			1.3.3.1	Généralités	39
			1.3.3.2	Fonctionnalisation de surface	40
	1.4	Projet	de thèse		42
		1.4.1	Choix de	es ligands	42
		1.4.2	Stratégie	e de couplage des ligands de surface	43
	1.5	Conclu	usion		44
ე	Syn	thàsa (	du copol	vmère amphinhile PLA- $b$ - $P(NAS-co-NVP)$	15
4	2 1	Banne	ls hibliog	raphiques	40
	2.1	2 1 1	Cénérali	tés sur la polymérication radicalaire contrôlée et vivante	40
		2.1.1	9111	Polymérisation radicalaire conventionnelle	40
			2.1.1.1	Polymérisation vivante	40
			2.1.1.2	La appratàre contrôlé	40
		919	Log gyati	Le caractère contrôle $\ldots$ and $\alpha$ approximation radicalaire contrôlée (PPC)	49 51
		2.1.2	2121		51
			2.1.2.1	Powereible Addition Fragmentation chain Transfer (PAFT)	52
			2.1.2.2	Atom Transfer Padical Polymonization (ATPD)	50
			2.1.2.0	Nitrovido Modiated Dolymonization (NMD)	55
			2.1.2.4	Companying description (NMP)	55
		019	2.1.2.0 Dalama (m	Comparaison des methodes	-09 -09
		2.1.3	Polymer.	Cánánalitán	60
			2.1.3.1		00
			2.1.3.2	Reactions secondaires de transesterifications	62
			2.1.3.3	ROP ioniques	63
			2.1.3.4	ROP par coordination/insertion	65
		2.1.4	Synthèse	e de copolymères à blocs par couplage ROP/PRC	67
			2.1.4.1	Synthèse par couplage macromoléculaire de deux homopolymères	67
			2.1.4.2	Synthèse à partir d'un amorceur $\alpha$ - $\omega$ difonctionnel	68
			2.1.4.3	Synthèse à partir d'un macroamorceur par modification des bouts de chaînes $% \mathcal{A}^{(n)}$	69

		2.1.5	Quelque	es notions sur la copolymérisation	71
			2.1.5.1	Définitions et principes généraux	71
			2.1.5.2	Méthodes de détermination des rapports de réactivité	73
			2.1.5.3	Influence des valeurs des coefficients de réactivité $r_1$ et $r_2$	74
	2.2	Étude	de la syr	nthèse d'homo- et copolymères à base de NAS	74
		2.2.1	Étude d	e la NMP du NAS amorcée par la MAMA-SG1	75
			2.2.1.1	Études cinétiques de la NMP du NAS amorcée par la MAMA-SG1 :	
				influence des facteurs température et pour centage de SG1 libre	75
			2.2.1.2	Contrôle de la NMP du NAS	77
			2.2.1.3	Influence du solvant sur le contrôle de la NMP du NAS $\ . \ . \ . \ .$	79
			2.2.1.4	Caractère vivant	80
		2.2.2	Étude d	e la NMP du NAS et de la NVP amorcée par la MAMA-SG1	82
			2.2.2.1	Détermination des rapports de réactivité du NAS et de la NVP	82
			2.2.2.2	Étude de la NMP du NAS et de la NVP	85
	2.3	Synth	èse du co	polymère à blocs PLA- $b\mbox{-}P(\mbox{NAS-}\mbox{\it co-NVP})$ par couplage ROP/NMP $\ .$	86
		2.3.1	Synthès	e de la macro-alcoxyamine PLA-SG1	87
			2.3.1.1	$\mathrm{ROP}_{c,i}$ du D,L-LA amorcée par le HEA et catalysée par le $\mathrm{Sn}(\mathrm{Oct})_2$	87
			2.3.1.2	Addition radicalaire intermoléculaire de type 1-2 de la MAMA-SG1 sur le	
				PLA-HEA	89
		2.3.2	Copolyr	nérisation du NAS et de la NVP amorcée par le PLA-SG1	91
			2.3.2.1	Détermination des rapports de réactivité	91
			2.3.2.2	Caractérisation du copolymère PLA- $b\mbox{-}P(\mbox{NAS-}co\mbox{-}N\mbox{VP})$	92
	2.4	Concl	usion .		95
3	Pré	parati	on de m	icelles multifonctionnelles	97
	3.1	Rappe	els bibliog	raphiques sur les micelles	98
		3.1.1	Concent	ration Micellaire Critique	98
		3.1.2	Méthod	es de préparation de micelles	99
			3.1.2.1	Dissolution directe	99
			3.1.2.2	Méthodes basées sur l'utilisation de co-solvant	99
	3.2	Prépa	ration de	micelles	100
		3.2.1	Micelles	de copolymère PLA- $b$ -P(NAS- $co$ -NVP)	100
		3.2.2	Micelles	de copolymères modifiés par des sucres	102
			3.2.2.1	Synthèse de copolymères modifiés par des sucres	102
			3.2.2.2	Élaboration et caractérisation de micelles de copolymères modifiés par des	
				sucres	105

		3.2.3	Étude de l'encapsulation de l'imiquimod dans les micelles	106
	3.3	Conclu	usion	108
4	Élal	ooratio	on de NP de PLA multifonctionnelles	11
	4.1	Rappe	els sur les techniques d'élaboration de NP	112
		4.1.1	Émulsification-évaporation de solvant	112
		4.1.2	Double émulsion W/O/W	112
		4.1.3	Émulsion-changement de solubilité (ou <i>salting-out</i> )	113
		4.1.4	Émulsification-diffusion de solvant	113
		4.1.5	Nanoprécipitation (ou déplacement de solvant)	113
		4.1.6	Diafiltration (ou dialyse)	114
		4.1.7	Stratégie utilisée	115
	4.2	Prépa	ration et caractérisation de NP de PLA-copolymère	115
		4.2.1	Diafiltration	115
		4.2.2	Nanoprécipitation	117
			4.2.2.1 Base de travail	117
			4.2.2.2 Élaboration de NP de 100 nm de diamètre moyen	118
			4.2.2.3 Élaboration de NP de 150-200 nm de diamètre moyen	119
		4.2.3	Conclusion et comparaison des méthodes diafiltration versus nanoprécipitation	121
	4.3	Quant	ification des fonctions ester de NS disponibles et de leur hydrolyse	122
		4.3.1	Quantification des fonctions ester de NS disponibles	122
		4.3.2	Évolution du taux d'hydrolyse des fonctions ester de NS au cours du temps	124
		4.3.3	Conclusion	126
	4.4	Prépa	ration de NP de PLA fonctionnelles	126
		4.4.1	Couplage de la séquence active de l'IL-1 $\beta$ à la surface des NP de PLA-copolymère $-$	127
			4.4.1.1 Quelques notions sur le couplage de peptides	127
			4.4.1.2 Étude du couplage de peptides à la surface des NP	127
			4.4.1.3 Densité de peptides à la surface des NP	130
			4.4.1.4 Taille et potentiel zêta des NP fonctionnalisées par le peptide	131
			4.4.1.5 Conclusion	132
		4.4.2	Encapsulation de l'imiquimod dans les NP	132
			4.4.2.1 Mise au point du procédé de nanoprécipitation	132
			4.4.2.2 Efficacité d'encapsulation	133
			4.4.2.3 Conclusion	135

5	Éva	luation	ns prélin	ninaires du potentiel vaccinal	137		
5.1 Apport des ligands				$\operatorname{nds}$	137		
		5.1.1	Études 1	menées sur une lignée de DC immortalisées de souris	137		
		5.1.2	Études 1	menées sur des DC humaines	140		
	5.2	Cytote	oxicité de	s NP	143		
	5.3	Conclu	usion		143		
Co	onclu	sions	et persp	ectives	145		
Pa	rtie	expéri	imentale		149		
	6.1	Réacti	ifs et solv	ants utilisés	150		
	6.2	Analy	ses de mo	lécules et macromolécules organiques	150		
		6.2.1	Résonan	ce Magnétique Nucléaire (RMN)	150		
		6.2.2	Résonan	ce Paramagnétique Électronique (RPE)	151		
		6.2.3	Analyse	élémentaire	152		
		6.2.4	Chroma	tographie d'Exclusion Stérique (CES)	152		
		6.2.5	Chroma	tographie en phase liquide haute performance (HPLC) $\ldots \ldots \ldots \ldots$	154		
		6.2.6	UV et fl	uorescence	155		
	6.3	Synthe	èse d'hom	ao- et copolymères à base de NAS	155		
		6.3.1	Synthèse	e du NAS	155		
		6.3.2	NMP du	1 NAS à partir de la MAMA-SG1	156		
		6.3.3	NMP du	NAS et de la NVP à partir de la MAMA-SG1	157		
		6.3.4	Synthèse	e du copolymère à blocs PLA- <i>b</i> -P(NAS- <i>co</i> -NVP)	158		
			6.3.4.1	Synthèse du PLA $\alpha$ -acrylate : ROP du D,L-lactide	158		
			6.3.4.2	Synthèse du PLA-SG1 : Addition intermoléculaire radicalaire de type 1-2			
				de la MAMA-SG1 sur le PLA $\alpha\text{-acrylate}$	159		
			6.3.4.3	NMP du NAS et de la NVP à partir du PLA-SG1	159		
	6.4	Prépa	ration de	micelles fonctionnalisées	160		
		6.4.1	Élabora	tion de micelles de PLA- $b$ -P(NAS- $co$ -NVP)	160		
		6.4.2	Élabora	tion de micelles à partir de copolymères modifiés par des sucres $\ldots$ .	160		
			6.4.2.1	Couplage de sucre sur le PLA- <i>b</i> -P(NAS- <i>co</i> -NVP)	160		
			6.4.2.2	Élaboration de micelles fonctionnalisées par un sucre $\ \ .\ .\ .\ .\ .$ .	161		
		6.4.3	Détermi	nation de la concentration micellaire critique (CMC)	161		
		6.4.4	Encapsu	llation de l'imiquimod dans les micelles	162		
		6.4.5	Dosage	de l'imiquimod encapsulé dans les micelles par fluorescence	162		
	6.5	Prépa	ration de	tion de NP fonctionnalisées			

	6.5.1	Diafiltra	$tion\ldots$	162
	6.5.2	Nanopré	cipitation	163
	6.5.3	Couplag	e covalent de peptides dérivés de l'interleukine-1 $\beta$	163
		6.5.3.1	Couplage de peptides sur des NP de PLA-copolymère	163
		6.5.3.2	Couplage de peptides sur des NP de PLA nues	164
	6.5.4	Encapsu	lation de l'imiquimod dans les NP	164
		6.5.4.1	Nanoprécipitation en présence d'imiquimod	164
		6.5.4.2	Dosage de l'imiquimod dans le surnageant des NP par HPLC	164
		6.5.4.3	Dosage par fluorescence de l'imiquimod encapsulé dans les NP $\ . \ . \ .$	164
	6.5.5	Caractér	isation des NP	165
		6.5.5.1	Diffusion quasi-élastique de la lumière	165
		6.5.5.2	Mobilité électrophorétique	165
		6.5.5.3	Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	165
		6.5.5.4	Stabilité colloïdale des NP	165
		6.5.5.5	Quantification des fonctions ester de NS disponibles à la surface des NP .	166
		6.5.5.6	Étude de l'hydrolyse des fonctions ester de NS	166
		6.5.5.7	Calcul des paramètres d'interaction	167
6.6	Évalua	tion biol	ogique des NP et micelles	168
	6.6.1	Études s	sur les SRDC	168
		6.6.1.1	Culture cellulaire	168
		6.6.1.2	Stimulation des SRDC	168
		6.6.1.3	Dosage de l'IL-12 sécrétée par les SRDC	169
		6.6.1.4	Dosage de l'IFN- $\alpha$ sécrétée par les SRDC	170
	6.6.2	Études s	sur des cellules dendritiques humaines	171
		6.6.2.1	Extraction, culture de monocytes humains et leur différenciation en DC .	171
		6.6.2.2	Stimulation de DC humaines	172
	6.6.3	Cytotox	icité des NP	173
Bibliog	raphie	•		174
Liste d	es figu	$\mathbf{res}$		199
Liste des tableaux 20			204	

# Liste des abréviations

AA	:	Acide Acrylique
ACN	:	Acétonitrile
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
AIBN	:	2,2-azo-bis-(iso-butyronitrile)
APC	:	Allophy cocyanin
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNdb	:	Acide ribonucléique double brin
ARNm	:	Acide ribonucléique messager
ARNsb	:	Acide ribonucléique simple brin
ATRA	:	Atom Transfer Radical Addition
ATRP	:	Atom Transfer Radical Polymerization
BPO	:	Peroxyde de benzoyle
c.o.	:	cut-off
CAC	:	Concentration d'Agrégation Critique
CES	:	Chromatographie d'Exclusion Stérique
CFA	:	Complete Freund's Adjuvant
$\operatorname{CL}$	:	$\epsilon$ -caprolactone
CLR	:	C-type Lectin Receptor
CMC	:	Concentration Micellaire Critique
CMH	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	:	Cellule Présentatrice d'Antigène
CTA	:	Agent de transfert de chaîne (Chain Transfert Agent)
CTL	:	Cytotoxic T Lymphocyte
$C_{tr}$	:	Constante de transfert
D-gluc	:	D-glucosamine

D-man	:	D-mannosamine
Da	:	Dalton
DAP	:	Acide diaminopimélique
DC	:	Dendritic Cell
DC-SIGN	:	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DCC	:	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DCP	:	Peroxyde de dicumyle
DDL	:	Diffusion Dynamique de la Lumière
DMA	:	N, N-diméthylacrylamide
DMAP	:	N, N-diméthylaminopyridine
DMF	:	N, Ndiméthylformamide
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
DO	:	Densité Optique
DPAIO	:	Radical 2,2-diphényl-3-phénylimino-2,3-dihydroindol-1-yl-N-oxyl
$DP_n$	:	Degré de polymérisation moyen en nombre
$E_a$	:	Énergie d'activation
EC	:	Carbonate d'éthylène
EDC	:	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EE	:	Efficacité d'Encapsulation
ELISA	:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EMA	:	European Medicines Agency
FACS	:	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDA	:	Food and Drug Administration
FITC	:	$Fluorescein\ isothiocyanate$
$\operatorname{gp}$	:	Glycoprotéine

HA : Hémagglutinine HEA : Acrylate de 2-hydroxyéthyle

- ${\it HEPES} \qquad : \quad 4\mbox{-}(2\mbox{-}hydroxyethyl)\mbox{-}1\mbox{-}piperazinee than esulfonic\ acid$
- HPLC : High-performance liquid chromatography
- IFA : Incomplete Freund's Adjuvant
- IFN : Interféron

IFM	:	Intensité de Fluorescence Moyenne
Ig	:	Immunoglobuline
IL	:	Interleukine
IMDM	:	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
imi	:	Imiquimod
$I_p$	:	Indice de polymolécularité
IP	:	Indice de Polydispersité
$K_{eq}$	:	Constante d'équilibre
$k_{act}$	:	Constante d'activation (s <sup>-1</sup> )
$k_c$	:	Constante de vitesse de recombinaison $(M^{-1}.s^{-1})$
$k_d$	:	Constante de vitesse de dissociation (s <sup>-1</sup> )
$k_{desact}$	:	Constante de désactivation (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
$k_p$	:	Constante de vitesse de propagation (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
$k_t$	:	Constante de vitesse de terminaison (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
$\lambda_{ex}$	:	Longueur d'onde d'excitation
$\lambda_{\acute{e}m}$	:	Longueur d'onde d'émission
LA	:	Lactide
LiBr	:	Bromure de lithium
LPS	:	Lipopolysaccharide
MADIX	:	MAcromolecular Design via the Interchange of Xanthates
MAMA-SG1	:	$\label{eq:acide} \mbox{Acide 2-méthyl-2-} [N-tert-butyl-N-(1-diéthoxyphosphoryl-2,2-diméthylpropyl) aminomorphic and a statement of the stat$
		noxy] propanoïque
MBL	:	Mannose-Binding Lectin
MDP	:	Dipeptide de muramyle
MEB	:	Microscopie Électronique à Balayage
MMA	:	Méthacrylate de méthyle
$M_n$	:	Masse molaire moyenne en nombre
MONAMS	:	$2\mbox{-}[N\mbox{-}tertiobutyl-N\mbox{-}(1\mbox{-}diéthoxyphosphoryl-2,2\mbox{-}diméthylpropyl)aminoxy] \ \ propanoate$
		de méthyle
$M_p$	:	Masse molaire au pic
MP	:	Microparticules
MPL	:	Lipide A monophosphorylé

$M_w$	:	Masse molaire moyenne en masse
NA	:	Neuramidase
NAM	:	N-acryloylmorpholine
NAS	:	N-acryloxysuccinimide
NHS	:	N-hydroxysuccinimide
NIPAM	:	N-isopropylacrylamide
NK	:	Natural Killer
NLR	:	NOD-Like Receptor
NMP	:	Nitroxide Mediated Polymerization
NOD	:	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NP	:	Nanoparticules
NS	:	N-succinimidyle
NVP	:	N-vinylpyrrolidone
PAMP	:	$Pathogen-Associated\ Molecular\ Pattern$
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PC	:	Carbonate de propylène
PCL	:	$\operatorname{Poly}(\epsilon ext{-caprolactone})$
PE	:	R-phycroerythrin
PE-Cy5	:	Tandem PE et colorant cyanine
PEG	:	Poly(éthylène glycol)
PHEA	:	Poly(acrylate de 2-hydroxyéthyle)
PLA	:	Poly(acide lactique)
PLGA	:	Poly(lactide-co-glycolide)
PAM	:	Poly(acrylate de méthyle)
PMMA	:	Poly(méthacrylate de méthyle)
PNAS	:	Poly(N-acryloxy succinimide)
PNVP	:	Poly(N-vinylpyrrolidone)
POE	:	Poly(oxyde d'éthylène)
POP	:	Poly(oxyde de propylène)
PRC	:	Polymérisation Radicalaire Contrôlée
PRR	:	Pattern Recognition Receptor
$\mathbf{PS}$	:	Polystyrène

PTFE	:	Poly(tétrafluoroéthylène)
rAd5	:	Adénovirus 5 recombinant
RAFT	:	Reversible Addition Fragmentation Transfert
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
ROP	:	Ring Opening Polymerization
RPE	:	Résonance Paramagnétique Électronique
rpm	:	rotation par minute
SG1	:	$\label{eq:rescaled} Radical \ \textit{N-tert-butyl-N-(1-diethoxyphosphoryl-2,2-dimethylpropyl)} aminoxy$
SIDA	:	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
$\operatorname{Sn}(\operatorname{Oct}_2)$	:	Octanoate d'étain ou 2-éthylhexanoate d'étain
SVF	:	Sérum de Veau Fœtal
t	:	Temps
ТА	:	Température Ambiante
TC	:	Taux de couplage (%)
TE	:	Taux d'encapsulation (%)
TEA	:	Triéthylamine
TEMPO	:	Radical 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle
TFA	:	Acide trifluoroacétique
$T_g$	:	Température de transition vitreuse
$\mathrm{Th}$	:	T helper
$T_H$	:	Taux d'hydrolyse (%)
$\mathrm{THF}$	:	Tétrahydrofurane
TIPNO	:	Radical 2,2,5-triméthyl-4-phényl-3-azaoxyhexyle
TLR	:	Toll-Like Receptor
$\operatorname{TNF}$	:	Facteur de nécrose tumorale
u.a.	:	unité arbitraire
UV	:	Ultra-violet
VHB	:	Virus de l'hépatite B
VHC	:	Virus de l'hépatite C
VHS	:	Virus de l'herpès simplex
VLP	:	Virus-Like Particle

## Introduction

L'orsque notre organisme est confronté à des pathogènes (virus, bactéries, parasites), notre immunité se déclenche. L'immunité est dispersée partout dans nos organismes, mais elle est retrouvée en grande partie sur les sites fréquemment investis par les pathogènes, i.e. nos muqueuses (gastro-intestinale, génitale, urinaire, pulmonaire et la peau). Lorsqu'un pathogène a envahi une première fois notre organisme, des éléments de notre immunité (lymphocytes, anticorps) spécifiques du pathogène apparaissent et persistent dans notre organisme durant une période plus ou moins longue, de plusieurs années à toute une vie. Ces éléments assurent la protection de l'organisme lors de contaminations ultérieures, en se mettant en place beaucoup plus rapidement et plus massivement. Nous devenons donc immunisés, ce qui nous permet généralement de combattre le pathogène sans déclarer de symptôme lors de futures contaminations. C'est sur ce phénomène fondamental que repose la vaccination.

Depuis qu'Edward Jenner a réussi à immuniser l'homme avec la vaccine contre la variole, la vaccination s'est fortement développée, pour permettre une réduction drastique des maladies infectieuses d'origine virale, telles que la poliomyélite, la rougeole, la rubéole, les oreillons, l'hépatite B ou encore la grippe, et d'origine bactérienne comme la diphtérie, la coqueluche et le tétanos (Tableau 1).<sup>1,2</sup>

Maladie	Maximum de cas (année concernée)	Cas reportés en 2001	Réduction
Variole	48200 (1901)	0	100%
Poliomyélite	21300 (1952)	0	100%
Rougeole	894100(1941)	96	99.99%
Rubéole	57700(1969)	19	99.97~%
Oreillons	$152200 \ (1968)$	216	99.86%
Gripe	20000 (1992)	51	99.75%
Diphtérie	207000 (1921)	2	99.99%
Coqueluche	265300(1934)	4800	98.20%
Tétanos	1560(1923)	26	98.34%

Tableau 1 – Impact de le vaccination sur les maladies aux États-Unis, avec le pic de la maladie, un état du nombre de cas reportés en 2001 et le pourcentage de réduction de la maladie, source O'Hagan et  $coll.^2$ 

Les vaccins actuellement sur le marché depuis plusieurs décennies représentent un réel succès de la

xviii

Introduction

médecine moderne et ont permis une diminution drastique de la morbidité et de la mortalité à travers le monde.<sup>2</sup> Des maladies, d'origine virale ou bactérienne, qui autrefois pouvaient être de vrais fléaux et causer de grandes épidémies, ont pu être contenues voire éradiquées. Avec les antibiotiques et l'amélioration des conditions d'hygiène, la vaccination est l'intervention de la médecine la plus sûre, avec des milliards de doses distribuées, et la plus efficace actuellement disponible pour l'éradication de certains pathogènes.<sup>2</sup> Ceci est à tel point vrai, que parfois les populations actuelles et particulièrement les parents ne voient plus forcément l'utilité de se vacciner ou de vacciner leurs enfants.

Un vaccin a pour ultime objectif de prévenir une maladie; il ne doit donc en aucun cas la provoquer. Il comporte généralement deux parties distinctes ou non, que sont l'antigène et l'adjuvant. L'antigène permet de développer la réponse immunitaire adaptative spécifique du pathogène concerné; l'adjuvant, de son origine latine *adjuvare* ou aide, a pour rôle d'aider, d'accroître et de prolonger la réponse immunitaire humorale et/ou la réponse immunitaire cellulaire ou encore de cibler des cellules immunitaires nécessaires au combat de l'infection. C'est en 1925, que la notion d'adjuvant a été découverte par Ramon,<sup>3</sup> qui a démontré que l'ajout de chapelure, d'agar-agar, de tapioca, d'huile d'amidon, de lécithine ou encore de saponine aux toxines diphtérique ou tétanique permettait d'augmenter les titres des anticorps dirigés contre ces toxines. Depuis cette découverte il y a plus de 85 ans, des adjuvants sont utilisés pour augmenter la réponse immunitaire et font l'objet de nombreux travaux.

Cependant, malgré ce succès, il existe encore de nombreuses maladies qui n'ont pas de candidat vaccin, telles que les pathologies causées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le *Plasmodium* (responsable du paludisme) ou encore le virus de l'hépatite C (VHC). Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est responsable d'un million de morts chaque année et le paludisme de trois millions; en cause : l'absence de vaccin sur le marché et des thérapies coûteuses et peu efficaces.

Les techniques traditionnelles de vaccination par l'emploi de virus vivants atténués ou tués se révèlent respectivement soit trop dangereuses, soit inefficaces pour le développement de certains vaccins, comme c'est notamment le cas pour le VIH. La recherche tente donc de développer de nouvelles formulations vaccinales à base de sous-unités de pathogènes (protéines, glycoprotéines) en présence d'un adjuvant. Actuellement, seuls deux adjuvants sont acceptés par la *Food and Drug Administration* (FDA) : les sels d'aluminium, auxquels s'ajoutent les "*Virus-Like Particles*" (VLP) depuis peu, cependant ils ne permettent pas de proposer un candidat vaccin contre les grandes épidémies actuelles.

L'amélioration de l'efficacité d'un vaccin requiert la mise au point d'adjuvants, permettant d'accroître la qualité et l'amplitude de la réponse immunitaire. Ainsi, les particules de polymères et particulièrement de poly(acide lactique) (PLA) ont démontré à plusieurs reprises leur efficacité dans l'augmentation de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène, lorsqu'il est encapsulé<sup>4</sup> ou adsorbé<sup>5</sup> à la surface des particules. Afin de renforcer leur potentiel vaccinal, ce travail de recherche a eu pour objectif d'élaborer des nanoparticules (NP) de PLA décorées en surface par des molécules immunostimulantes, le D-mannose ou un peptide dérivé de l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), et au cœur par de l'imiquimod. Notre stratégie repose sur l'utilisation d'un tensioactif macromoléculaire composé d'un bloc hydrophobe de PLA et d'un bloc hydrophile fonctionnalisable de poly(*N*-acryloxysuccinimide-*co-N*-vinylpyrrolidone) P(NAS-*co*-NVP), dont les fonctions ester de *N*-succinimidyle (NS) des unités NAS permettent le couplage de biomolécules dotées d'amines primaires.

Dans une première partie, quelques bases de l'immunologie seront décrites pour comprendre notre stratégie. Puis un état des lieux sera dressé sur les adjuvants actuellement commercialisés et ceux en cours de développement, avec un intérêt particulier pour les particules de polymères.

Dans un deuxième chapitre, la synthèse du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) par combinaison des techniques de polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du D,L-lactide et de la polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (NMP) du NAS et de la NVP, via l'utilisation d'une macroalcoxyamine PLA-SG1, sera abordée. Quelques rappels bibliographiques seront effectués sur les différentes techniques employées.

Le troisième chapitre sera consacré à l'utilisation du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) pour la préparation de micelles multifonctionnelles à leur surface (D-mannose) et en leur cœur (imiquimod).

Dans un quatrième chapitre, nous nous intéresserons à l'utilisation du copolymère PLA-b-P(NAS-co-NVP) comme modifiant de surface dans la préparation de NP de PLA, auxquelles seront incorporés un peptide dérivé de l'IL-1 $\beta$  (couplage en surface) et l'imiquimod (encapsulation).

La capacité de ces systèmes multifonctionnels à induire la maturation des cellules dendritiques (DC), qui sont de réels pivots de l'immunité, sera présentée dans un dernier chapitre avec quelques tests préliminaires.

La réalisation de cette thèse pluridisciplinaire a été possible grâce à l'association de trois laboratoires aux compétences complémentaires : (i) l'équipe de Chimie Radicalaire, Organique et Polymères de Spécialité (CROPS, Laboratoire Chimie Provence UMR-CNRS 6264), (ii) l'équipe de Nanovecteurs biodégradables et ingénierie tissulaire (Laboratoire de Dysfonctionnements de l'Homéostasie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique FRE 3310) et (iii) l'équipe de matériaux polymères à l'interface avec les sciences de la vie (Laboratoire des Matériaux Polymères et des Biomatériaux de l'Ingénierie des Matériaux Polymères UMR-CNRS 5223).

## Chapitre 1

# Étude bibliographique

### Sommaire

1.1	Gén	éralités sur le système immunitaire	2
	1.1.1	Passé, présent et futur	2
	1.1.2	L'immunité innée	4
	1.1.3	L'immunité adaptative	12
	1.1.4	Conclusion	16
1.2	La v	raccination	17
	1.2.1	Le vaccin idéal	17
	1.2.2	Vaccination traditionnelle	19
	1.2.3	Les différents types d'adjuvants	20
	1.2.4	Conclusion	30
1.3	Les	adjuvants à base de particules de polymère	32
	1.3.1	Polymères naturels	33
	1.3.2	Polymères synthétiques	35
	1.3.3	Vers des nanoparticules biomimétiques	39
1.4	Pro	$ et de th ese \ldots \ldots$	42
	1.4.1	Choix des ligands	42
	1.4.2	Stratégie de couplage des ligands de surface	43
1.5	Con	clusion	44

L'immunité regroupe l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme de reconnaître et de tolérer ce qui lui est propre (le soi) et de reconnaître et de rejeter ce qui lui est étranger (le non-soi), tels que ses composés altérés comme les cellules tumorales et les pathogènes. Ainsi le système immunitaire est un remarquable moyen de défense, rencontré dans de nombreux organismes comme les plantes et les insectes mais dont la forme la plus évoluée est retrouvée chez les vertébrés supérieurs, à laquelle nous nous intéresserons dans la première partie de cette étude bibliographique. Un état de l'art des vaccins et adjuvants actuellement commercialisés ou en cours de recherche et développement sera dressé avec un accent particulier sur les adjuvants à base de polymères.

### 1.1 Généralités sur le système immunitaire

### 1.1.1 Passé, présent et futur

Historiquement, la vaccination ou l'exploitation de la mémoire immunitaire peut être considérée comme l'un des premiers travaux d'immunologie. En effet, un historien grec du nom de Thucydide décrivait la guerre du Péloponnèse, en mentionnant que la peste, fléau mortel d'Athènes, n'attaquait jamais deux fois le même homme.<sup>6</sup> Alors même que les hommes n'avaient pas encore la moindre idée de la cause de nos maladies, le principe de se protéger, avec l'utilisation volontaire de sécrétions vieillies de malades de la variole, était déjà mis à l'essai par les Chinois au 16<sup>ème</sup> siècle.<sup>6</sup> En effet, lors de l'épidémie de fièvre typhoïde, il avait été constaté que seules les personnes ayant déjà contracté la maladie et survécu pouvaient s'occuper des malades sans tomber à nouveau malade, ni mourir. Edward Jenner en 1796 fut le premier à démontrer que la vaccine (la variole de la vache) induisait une protection contre la variole humaine. On retrouve donc ici l'origine du mot vaccination, du latin *vaccinia*. Une autre étape clé en immunologie est franchie par Louis Pasteur avec l'élaboration d'un vaccin contre la rage en 1885 pour l'homme.

Au 20<sup>ème</sup> siècle, les avancées sur l'immunologie fondamentale ont pris le pas sur l'immunologie empirique. L'étude prend alors deux voies : immunologie humorale (immunité des éléments solubles du sang ou des fluides corporels) *versus* immunologie cellulaire (immunité à médiation cellulaire). Le phénomène d'anaphylaxie, réaction violente du système immunitaire d'origine allergique, est mis en évidence. À la fin des années 1950, les structures des anticorps et du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, molécule du système de reconnaissance du soi et du non-soi) sont élucidées. Avec l'avancée de la médecine sur les greffes, l'immunosuppression est plus amplement étudiée. Les caractéristiques fondamentales des cellules immunitaires et tout particulièrement des fonctions et de la différenciation des lymphocytes B et T sont mises à jour.

Les scientifiques avaient jadis fait l'hypothèse de deux immunités bien distinctes : immunité humorale versus immunité cellulaire. Ils ont alors compris qu'il fallait associer ces deux études pour les assimiler à deux immunités complémentaires travaillant en collaboration. La cellule dendritique (DC pour *Dendritic Cell*), sentinelle et pivot de l'immunité, est découverte dans les années 1970 avec sa caractéristique fondamentale de présentation d'antigène par le CMH. Dans les années 1980, la réponse immunitaire dévoile sa double orientation (polarisation de l'immunité), avec le développement de cellules T auxiliaires 1 ou 2, aussi appelées cellules Th pour cellules T *helper*. La réponse Th1 est orientée contre les cellules infectées avec la production de lymphocytes T cytotoxiques (CTL pour *Cytotoxic T Lymphocyte*), tueurs de cellules infectées. La réponse Th2 est dirigée contre les pathogènes libres extracellulaires et leurs éléments solubles avec la production de plasmocytes B sécréteurs d'anticorps neutralisants.

Par la suite, nous nous intéresserons uniquement aux mécanismes de reconnaissance et de réponse mis en place pour combattre les pathogènes. Un pathogène peut être défini simplement comme étant un organisme capable de surmonter les mécanismes de défenses du corps et de causer des changements délétères dans cet organisme hôte.<sup>7</sup>

Le pathogène doit, dans un premier temps, se confronter à notre immunité innée : immunité nonspécifique dont le but est de reconnaître en amont le pathogène et de développer des mécanismes proinflammatoires, dans des délais très courts de l'ordre de la minute à quelques heures, comme nous le verrons dans la partie 1.1.2.<sup>8</sup>

Puis il se confrontera à notre immunité adaptative, ou acquise, qui se développe en des temps plus longs, de l'ordre de quelques jours à quelques semaines, dès lors que l'immunité innée a été activée.<sup>9</sup> L'immunité adaptative est spécifique d'un pathogène donné et permet bien souvent d'éradiquer le pathogène, ou *a minima* de le maîtriser et de développer une mémoire immunitaire comme nous le détaillerons dans la partie 1.1.3.<sup>10</sup>

Cette mémoire immunitaire est le fondement de base de la vaccination, puisque la réactivation de cette immunité provoque une réponse immunitaire plus forte et plus rapide, permettant généralement d'éliminer le pathogène, avant même que la pathologie ne se déclare. L'immunité dans sa globalité regroupe un ensemble de composantes physiques, chimiques et cellulaires qui collaborent étroitement dans le but de protéger l'organisme et d'éradiquer tout élément étranger.<sup>7</sup> Le plus souvent, l'immunité innée est suffisante, nous n'avons alors aucun indice qu'un pathogène a essayé de s'introduire dans notre organisme, dans le cas contraire nous devenons "malades".

Grâce à leur capacité de reproduction et d'évolution rapides, les pathogènes peuvent s'implanter en masse dans notre organisme. Ils sont définis selon leur pouvoir pathogène, i.e. leur capacité à provoquer des troubles, communément appelés maladies, dont quelques exemples sont exposés dans le Tableau 1.1. Le pouvoir pathogénique dépend de plusieurs critères, tels que son pouvoir invasif (sa capacité à se répandre dans les différents tissus et à y établir des foyers infectieux) et son pouvoir toxinogène (capacité à produire des toxines). Les pathogènes sont aussi caractérisés par leur structure, leur mode d'exploitation du corps humain et le type de dommages causés. Ils peuvent être des virus à ADN ou à ARN, des bactéries Gram positif ou Gram négatif, des parasites protozoaires ou des vers. L'espace dans lequel ils prolifèrent dirige les réactions immunitaires. En effet, ceux qui se multiplient au sein des cellules provoquent des infections intracellulaires et sont reconnus par la présence de cellules infectées vivantes ou détruites. Les pathogènes responsables des infections extracellulaires sont détectés directement par leurs particules libres et indirectement par la présence de molécules solubles qu'ils sécrètent.

Classe de pathogène	Exemple	Pathologie associée
	Salmonella typhimurium	Salmonellose
Bactéries	Mycobacterium tuberculosis	Tuberculose
	Listeria monocytogenes	Listeria
	Virus de l'Influenza	Grippe
Vinua	Virus Epstein-Barr	Mononucléose
VIIUS	Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	SIDA
	Virus de l'hépatite C (VHC)	Hépatite, cirrhose, cancer
Champignons, Levures	Candida Albicans	Candidose
Davagitag	Toxoplasma gondii	Toxoplasmose
1 arasites	Plasmodium falciparum	Paludisme

Tableau 1.1 – Les différentes classes de pathogènes illustrées par quelques exemples de pathogènes connus

À mesure que les découvertes avancent, le système immunitaire devient de plus en plus complexe et c'est dans cette complexité que l'on retrouve toute la cohérence de la régulation de notre immunité. Cependant, le système immunitaire n'est pas le seul à se diversifier, il en va de même pour les pathogènes, qui réussissent parfois à développer des mécanismes de furtivité vis-à-vis de notre immunité. Plusieurs maladies infectieuses subsistent encore en l'absence actuelle de thérapie et/ou de moyens de prévention par la vaccination. C'est le cas du paludisme, du VHC, des maladies nosocomiales ou encore du VIH. Tous les secrets de l'immunologie et des interactions entre système immunitaire et pathogène ne nous sont pas encore révélés, c'est pourquoi l'immunologie et l'infectiologie suscitent toujours un vif intérêt chez les chercheurs et présentent encore un bel avenir empli de découvertes.

### 1.1.2 L'immunité innée

L'immunité innée est notre première ligne de défense contre un élément du non-soi. Elle est composée de plusieurs composantes : physique, chimique et cellulaire.

#### 1.1.2.1 Composante physique : les muqueuses

La composante physique est constituée de barrières majeures que sont l'épiderme et les muqueuses. Tout ceci forme une enveloppe cellulaire continue séparant l'organisme du milieu extérieur, appelée épithélium (ensemble de cellules épithéliales étroitement juxtaposées non vascularisées) et recouvrant parfois un tissu vascularisé, appelé chorion ou *Lamina propria*. Cette barrière composée, soit d'une seule couche de cellules épithéliales (épithélium monostratifié), soit de plusieurs couches (épithélium pluristratifié), s'oppose à la pénétration des micro-organismes via différents mécanismes physiques, chimiques et biologiques non spécifiques.

L'épiderme forme une première protection majeure grâce à son épithélium kératinisé étanche. Les moyens de protection non spécifique, qu'il met en place, sont de nature chimique avec la sécrétion par les glandes sébacées de sébum toxique pour les bactéries, un pH acide empêchant la prolifération bactérienne mais aussi biologique avec la présence de cellules dendritiques de la peau : les cellules de Langerhans.

Les muqueuses intestinales sont dotées d'une flore bactérienne qui empêche l'implantation de pathogènes en masse. Les muqueuses génitales, particulièrement chez la femme, sont aussi caractérisées par un pH acide, compris entre 4 et 5, une flore antimicrobienne et la sécrétion de mucus. Les poumons, qui forment la muqueuse respiratoire, sont également un lieu de défense important contre les pathogènes, grâce au flux d'air continu, à la sécrétion de mucus protecteur et à la présence de cils. En soi, le mucus sécrété sur des zones sensibles constituent une barrière physique de piégeage de pathogènes et chimique via la présence d'enzymes et de peptides antimicrobiens.

De par leur localisation, les muqueuses sont donc les principaux sites d'entrée des pathogènes. Les autres voies d'entrée, moins fréquentes, peuvent être les morsures d'animaux, les coupures ou encore les piqûres par seringues, où le pathogène peut entrer directement dans le flux sanguin. Parce que les muqueuses sont sans cesse exposées de façon directe ou indirecte à l'environnement extérieur et par conséquent aux pathogènes, elles se sont dotées d'un système immunitaire très spécialisé et cloisonné, distinct de l'immunité systémique.<sup>11</sup>

Une fois que le pathogène a traversé la barrière mucosale, les muqueuses sont le lieu effecteur des premières réponses immunitaires cellulaires, avec la neutralisation des pathogènes et la lyse des cellules infectées, via la présence de cellules naturelles tueuses (NK pour *Natural Killer*), de macrophages et de lymphocytes naïfs B et T.<sup>12</sup>

### 1.1.2.2 Composante chimique : les molécules de l'immunité et les phénomènes de reconnaissance associés

La *composante chimique* de l'immunité innée est constituée de molécules de communication intercellulaire (cytokines sécrétées par les cellules de l'immunité) et de molécules de reconnaissance d'agents étrangers (récepteurs de reconnaissance de motifs, en anglais PRR abréviation de *Pattern Recognition Receptor*).

Les cytokines comprennent entre autre les interférons (IFN), les interleukines (IL) et les facteurs de nécrose tumorale (TNF). Les chimiokines sont une classe de cytokines au pouvoir chimio-attractif, i.e. ayant la capacité d'influencer la migration cellulaire. Le profil de sécrétion des cytokines dépend notamment des phénomènes de reconnaissance qui s'établissent entre le pathogène et l'organisme hôte. La sécrétion de ces composantes chimiques permet d'envoyer des signaux dangers aux cellules de l'immunité, de renforcer la réponse immunitaire innée puis d'orienter la réponse immunitaire préférentiellement vers une réponse immunitaire cellulaire (réponse Th1) ou humorale (réponse Th2). Cette polarisation de l'immunité est détaillée plus loin (Section 1.1.3.2). Brièvement, il s'agit de la différenciation des lymphocytes T CD4+ (cellule exprimant le récepteur CD4) sous l'influence des cytokines sécrétées notamment par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) en lymphocytes T auxiliaires 1 (lymphocytes Th1), médiateurs de la réponse cellulaire ou en lymphocytes T auxiliaires 2 (lymphocytes Th2), médiateurs de la réponse humorale.

Les phénomènes de reconnaissance d'un pathogène par l'organisme hôte sont dus à la présence de récepteurs de reconnaissance de motifs de pathogène (PRR) dans l'organisme hôte, qui interagissent avec des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP abréviation de *Pathogen-Associated Molecular Pattern*). Les PAMP sont des structures hautement conservées par les pathogènes. Ces phénomènes de reconnaissance PRR-PAMP chez l'hôte activent l'expression de cytokines et d'immunorécepteurs.<sup>13</sup>

Il existe de nombreux PRR : TLR (Toll-like Receptor), NLR (NOD-like Receptor) ou encore CLR (récepteurs lectines de type C). Dans la suite de ce manuscrit, l'accent est mis sur les principaux PRR et leurs PAMP associés, et tout particulièrement sur les conséquences de l'activation des PRR par les PAMP sur l'immunité. Les questions structurales des PRR et de la régulation de leur expression génétique ne seront pas abordées.

Les **TLR**, au nombre de dix chez l'homme, sont les récepteurs de la réponse innée les plus largement exprimés par les CPA et les plus étudiés. Le Tableau 1.2 dresse une liste des TLR et des motifs qu'ils reconnaissent, l'origine de ces motifs et la conséquence de la reconnaissance TLR-PAMP.

TLR	Ligand associé (source du ligand)	Fonctions principales
TLR1	Triacyle lipopeptide (bacterie) Lipoprotéine synthétique (Pam3Cys-Ser-(Lys)4)	Co-récepteur de TLR2
TLR2	Peptidoglycane, lipoprotéines, lipopeptides, lipopolysac- charide (LPS), acide lipotéichoïque (bactérie) Zymozan, lipoarabinomannan (champignons) Glycolipides (protozoaire) Protéine d'enveloppe de virus Lipoprotéine synthétique (Pam3Cys-Ser-(Lys)4)	Reconnaissance bactérienne : interaction avec TLR1 et TLR6 et sécrétion d'IL-10 et de TNF- $\alpha$ . Reconnaissance virale
TLR3	ARNdb (virus) ARNm de l'hôte Poly(I :C) (ARNsb synthétique)	Rôle dans l'activité antivirale
TLR4	LPS, acide lipotéichoïque, polymères d'acide mannuronique (bactérie) Mannane, glucoronoxylomannane (champignons) Protéine 60 choquée à la chaleur, phospholipide glyco- inositol (protozoaire) Protéine d'enveloppe, protéine F (virus) Protéine 60 et protéine 70 choquées à la chaleur, fragments de polysaccharide de sulfate d'héparine, acide hyaluronique, fibrinogène (hôte)	Rôle pour la polarisation vers la réponse Th2. Augmentation de la présentation d'antigène par les DC. Travail avec les récepteurs lectines de type C
TLR5	Flagelline (bactérie)	
TLR6	Lipopeptide diacyle, facteur soluble de la tuberculose (bac- térie)	
TLR7	ARNsb (virus) ARNsb (hôte) Imidazoquinolines (antiviraux synthétiques) Loxoribine (analogue de la guanine)	Implication principale dans la reconnaissance d'ARN hôte et virale. Implication possible dans les maladies auto-immunes. Activation de la réponse cellulaire
TLR8	ARNsb (virus) ARNsb (hôte)	Réponse antivirale
TLR9	ADN CpG non-méthylé (bactérie, protozoraire et virus) Hémozoïne (oligonucléotide synthétique riche en CpG) Complexe chromatine-IgG (hôte)	Réponse antivirale et implication possible dans les maladies auto-immunes par reconnaissance de l'ADN
TLR10	Inconnu	

Tableau 1.2 – Les TLR et quelques ligands de reconnaissance associés, sources principales Nasu $et\ coll.^9$ et Akira $et\ coll.^{13}$ 

Les TLR peuvent se distinguer en deux sous-familles.<sup>10</sup> Les TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6, ainsi que les TLR5 et TLR10, ont la particularité de reconnaître de manière générale des motifs lipidiques de membrane microbienne et sont placés à la surface des cellules. Les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 reconnaissent principalement des acides nucléiques et sont localisés à l'intérieur des cellules.<sup>14</sup> Les TLR7 et TLR9 sont situés dans le réticulum endoplasmique et sont particulièrement exprimés par les macrophages, les DC et les cellules B.<sup>14, 15</sup>

Les TLR7 et TLR8 reconnaissent les ARN simple brin (ARNsb), humains ou pathogènes, et des

composés organiques de type imidazoquinolines comme l'imiquimod et le resiquimod (Figures 1.1 (a) et (b)). Les TLR7 reconnaissent particulièrement les ARNsb riches en nucléosides guanosine ou uridine du soi ou provenant de virus tels que le VIH et le virus de la grippe. L'activation des TLR7 par l'imiquimod et des TLR7/8 par le resiquimod induit l'activation et la maturation des DC.<sup>16</sup> Il peut être remarqué une légère ressemblance structurale de l'imiquimod avec les bases azotées ou nucléobases guanine et adénine (Figures 1.1 (c) et (e)).

L'activation des TLR7 et TLR9, principalement exprimés par les DC, provoque l'expression de cytokines favorisant le développement des cellules T auxiliaires de type 1 (cellules Th1), telles que l'IFN de type 1 et INF- $\gamma$ , les IL-6 et IL-12. En revanche, leur activation n'induit pas de cytokines favorisant le développement des cellules Th2.<sup>14</sup>



FIGURE 1.1 – Structures chimiques de l'imiquimod (a), du resiquimod (b), et des bases azotées (c) guanine, (d) uracile et (e) adénine respectivement des nucléosides guanosine, uridine et adénosine

L'objectif de la reconnaissance des PAMP par les TLR est de provoquer la maturation des CPA dont celle des DC et la migration des DC dans les ganglions lymphatiques, pour la présentation aux cellules T des peptides obtenus après digestion de l'antigène.<sup>17</sup>

Les NLR, NOD (*Nucleotide-binding and Oligomerization Domain*)-*like Receptors*, sont des récepteurs intracellulaires (au nombre de vingt-deux chez l'homme), parmi lesquels on retrouve NOD1, NOD2 et aussi les NLRC4, NAIP, NLRP1, NLRP3. Le Tableau 1.3 reporte une liste non exhaustive des NLR et des motifs et/ou signaux dangers associés.<sup>18</sup> Leur étude est plus récente que celle des TLR. De manière générale, ils permettent de détecter des organismes étrangers, comme les TLR, et contribuent à la régulation des réponses inflammatoires et de mort cellulaire.<sup>19</sup>

Les récepteurs NOD1 et NOD2 sont bien connus pour la reconnaissance de motifs de bactéries, tels que les peptidoglycanes et plus précisément le motif d'acide de D-glutamyl-meso-diaminopimélique et le fragment dipeptide de muramyle (MDP) respectivement.<sup>20</sup> La reconnaissance de MDP par les NOD orchestre la réponse immunitaire vers une polarisation Th2.<sup>21</sup> En association avec la stimulation de TLR, celle de NOD1 peut provoquer une polarisation de réponse Th1 ou Th2, mais aussi Th17, la voie Th17 étant suspectée d'être impliquée dans les phénomènes de tolérance antigénique.<sup>21</sup> Récemment, il a été

démontré que NOD2 agirait aussi en tant que PRR d'ARN viral et jouerait un rôle important dans l'activité antivirale par sa capacité à sécréter de l'IFN de type I.<sup>19</sup> L'activation des récepteurs NOD1 et NOD2 conduit à la production de molécules inflammatoires et influence la défense de notre organisme en participant à la régulation de la réponse immunitaire.<sup>19, 20, 22</sup>

NLR	Ligand ou signaux danger associé	
NLRC4	Flagelline	
	Sécrétion de type III	
	Sécrétion de type IV	
NAIP	Flagelline	
NLRP1	Toxine létale de l'antrax	
	MDP	
	Une faible concentration en K <sup>+</sup>	
NLRP3	ATP	
	ARN viral	
	Imidazoquinolines	
	Cristaux d'acide urique	
	Silice	
	Sels d'aluminium (hypothèse)	
	Chitosane et Quil A	
	Poly(I :C)	
	ARNdb	
NOD1	Acide diaminopimélique (DAP) retrouvé dans les	
	peptidoglycanes de toutes les bactéries Gram-négatif	
	et quelques bactéries Gram-positif	
NOD2	Dipeptide de muramyle (MDP) contenu dans les	
	peptidoglycanes de bactéries Gram-négatif et Gram-	
	positif	

Tableau 1.3 – Les récepteurs NLR et leurs ligands ou signaux dangers associés, source Geddes  $et\ coll.^{18}$ et Shaw $et\ coll.^{22}$ 

Les récepteurs lectines de type C (CLR) représentent une grande famille de protéines exprimées par les macrophages et les DC aux propriétés variées.<sup>16</sup> Les CLR comprennent notamment les récepteurs DC-SIGN (abréviation de l'anglais *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), les MBL (*Mannose-Binding Lectin*), les récepteurs au mannose ou encore les dectines; ces dernières étant davantage affiliées à la reconnaissance des champignons et travaillant en collaboration avec les TLR.<sup>23</sup>

Les DC-SIGN sont situés sur les DC et interagissent avec les glycanes, les polysaccharides de Dmannose ou de D-fucose, dont les structures chimiques sont rappelées dans la Figure 1.2. L'interaction avec des pathogènes présentant des motifs mannoses, tels que le VIH, provoque la sécrétion d'IL-12 et d'IL-6, alors que l'interaction avec des motifs fucoses induit la sécrétion d'IL-10 et une baisse de la sécrétion d'IL-12 et d'IL-6.<sup>24</sup> Le profil de cytokines produites, en synergie avec l'activation des TLR, induit une polarisation de la réponse Th1 pour la reconnaissance des motifs mannoses, et une inhibition de cette même réponse avec une réponse Th2 favorisée pour la reconnaissance des motifs fucoses. La fonction principale des DC-SIGN est d'aider l'interaction entre DC et cellules T mais aussi la migration des DC en dehors des vaisseaux sanguins et lymphatiques.<sup>17</sup>

Les MBL sont des protéines circulant dans le sérum qui se lient au motifs D-mannose, L-fucose ou encore N-acétyl-D-glucosamine (Figure 1.2).



FIGURE 1.2 – Structures chimiques de la N-acétyl-D-glucosamine, du D-mannose et du D-fucose

Elles sont synthétisées par le foie et se lient à leur motif selon un mode Ca<sup>2+</sup> dépendant. Elles ont un rôle important dans le processus de phagocytose via l'opsonisation et l'activation du complément.<sup>25</sup> Pour information, le système du complément comprend un panel de trente protéines circulantes et membranaires, dont le rôle est de reconnaître les pathogènes et les débris cellulaires et de les recouvrir d'opsonines, protéines du complément reconnues par les cellules phagocytaires. Ainsi le système du complément via l'opsonisation permet de favoriser la phagocytose et l'activation de la lyse de micro-organismes. L'activation du complément par la liaison de ligand au MBL permet aussi de développer la réponse humorale par les cellules B.<sup>26</sup>

Les récepteurs au mannose sont exprimés par les macrophages, les DC et les endothéliums lymphatique et hépatique. Ils se lient selon un mode Ca<sup>2+</sup>-dépendant à une large variété de bactéries, champignons et virus présentant une structure riche en mannose, tel que le mannane (polyose de mannose).<sup>17, 27</sup> Les récepteurs au mannose fixent et internalisent à la fois du matériel endogène et exogène.<sup>28</sup> Ils permettent la reconnaissance de nombreux pathogènes, tels que la mycobactérie responsable de la tuberculose, le virus de la Dengue et le VIH.<sup>28</sup> Ils favorisent la capture d'antigène par les DC immatures avec présentation de l'antigène via le CMH II.<sup>27</sup> Le CMH II est lié au peptide antigénique obtenu après digestion d'un antigène exogène. Plus de détails seront donnés sur la présentation d'antigène par le CMH I ou le CHM II, dans la section 1.1.3.2.

Comme nous pouvons le remarquer, de nombreux PAMP sont des ligands communs à plusieurs PRR. Il existe notamment d'importantes collaborations entre les TLR et CLR.<sup>23</sup> À titre d'exemple, nous pouvons constater qu'un pathogène présentant une structure riche en mannose pourra à la fois interagir avec les TLR4 et les CLR (DC-SIGN, récepteur au mannose et encore MBL). De même, les ARNdb interagissent avec les TLR3 et NLRP3. L'ARNsb se lie aux TLR7 et TLR8. Les molécules synthétiques de type imidazoquinoline peuvent interagir avec les TLR7 et les NLRP3.

#### 1.1.2.3 Composante cellulaire : les acteurs de l'immunité

La composante cellulaire naturellement présente mais contrôlée par la sécrétion de cytokines, est constituée de nombreuses cellules : cellules NK, cellules polynucléaires, macrophages, mastocytes et lymphocytes T et B dans leur état naïf. La grande majorité de ces cellules dérivent de cellules souches hématopoïétiques, présentes dans la moelle osseuse. Elles se différencieront en cellules fonctionnelles suivant le profil de cytokines sécrétées suite à la reconnaissance d'un pathogène. Les cellules immunitaires sont localisées dans tout l'organisme : thymus, moelle osseuse, ganglions lymphatiques, rate et tissus associés aux muqueuses mais avec une densité locale de population variée.

Les **leucocytes**, également appelés globules blancs, comprennent les lymphocytes, les granulocytes et les monocytes. Ils sont omniprésents dans l'organisme et sont recrutés sur le site d'infection. Les lymphocytes agissent dans un premier temps pour l'immunité innée. Ils englobent les lymphocytes T, les lymphocytes B et les lymphocytes NK.

Les lymphocytes NK répondent rapidement à l'infection et ont la capacité de lyser les cellules étrangères de l'organisme de façon non spécifique d'un antigène donné.

Un lymphocyte B est recouvert d'un type d'immunoglobuline (Ig), récepteur de surface, mais l'ensemble des lymphocytes B que nous possédons présente une gamme quasi infinie d'Ig pour permettre une reconnaissance quasi spécifique d'une grande variété d'antigènes. Lorsqu'il y a compatibilité entre l'Ig d'une cellule B et le pathogène, l'immunité adaptative se met en place. Les lymphocytes B sélectionnés se différencient et se multiplient alors en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

Les lymphocytes T ont deux types de récepteurs de surface : CD8 ou CD4, qui interagissent respectivement avec les complexes issus de l'association d'une molécule du CMH I et d'un peptide antigénique (issu du morcellement de l'antigène) ou avec les complexes CMH II - peptide. Une fois la reconnaissance établie entre le complexe CMH I - peptide et le lymphocyte T CD8+ (i.e. lymphocyte T exprimant le récepteur CD8), ces derniers se différencient et prolifèrent en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui détruisent les cellules infectées. Quand il s'agit de reconnaissance entre le complexe CMH II - peptide et le lymphocyte T CD4+, ils se différencient et prolifèrent en lymphocytes Th1 ou Th2. Ces différentes étapes seront davantage détaillées dans la section suivante 1.1.3.2, puisque dès que les lymphocytes se différencient et prolifèrent, ils agissent dans notre immunité adaptative.

Les granulocytes, ou leucocytes polynucléaires, englobent les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles.

Les neutrophiles sont de petites cellules phagocytaires de faible longévité au pouvoir microbicide. Ils sont présents en plus grand nombre que les macrophages, ces derniers recrutant les neutrophiles pour migrer rapidement vers le site d'infection. Ils ont la capacité de travailler en conditions anaérobiques et sont retrouvés dans le pus, constitué de débris cellulaires et de cellules mortes.

Les basophiles permettent d'attirer les lymphocytes au niveau du foyer infectieux.

Les éosinophiles ont un rôle dans la lutte contre les parasites, en se fixant à eux pour y déverser des enzymes de destruction.

Les cellules phagocytaires, parmi lesquelles sont retrouvés les macrophages et les neutrophiles, sont importantes dans la réponse immunitaire innée, puisque leur capacité à détruire les pathogènes peut empêcher ces derniers de se répandre dans tout l'organisme. Ces cellules constituent une défense immédiate sur les sites d'entrée des pathogènes.<sup>29</sup> Si les macrophages résidents ne suffisent pas à éradiquer les pathogènes, ils sécrètent alors de l'IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-8 pour recruter les neutrophiles dans le sang et les activer.<sup>7</sup> Après avoir digéré un pathogène, le macrophage devient une CPA (Cellule Présentatrice d'Antigène) et contribue alors à la réponse immunitaire adaptative. L'IL-12 sécrétée par les macrophages permet d'activer le pouvoir cytotoxique des lymphocytes NK. Réciproquement les cellules NK produisent des cytokines, telles que le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , qui attirent les macrophages pour augmenter le taux de mortalité des pathogènes intracellulaires.<sup>7</sup>

Notre deuxième arme de défense est le développement de l'immunité adaptative suite à la réponse innée.<sup>29</sup> Ce lien entre les deux réponses immunes est obtenu par les CPA, que sont les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B et les DC. Ces dernières sont les plus efficaces pour l'activation des cellules Th, des CTL et des cellules B. Ainsi les DC sont de réels pivots, liant l'immunité innée à l'immunité adaptative.

### 1.1.3 L'immunité adaptative

#### 1.1.3.1 Le lien entre les deux immunités

Les étapes d'activation et de modulation des réponses immunitaires adaptative et innée sont schématisées dans la Figure 1.3, qui représente un condensé de la revue de Banchereau *et coll.*<sup>30</sup> Les cellules dendritiques répondent à deux types de signaux : reconnaissance directe du pathogène via ses PRR et reconnaissance indirecte de l'infection via le profil de cytokines inflammatoires sécrétées et la présence d'antigène.


FIGURE 1.3 – Mécanisme simplifié de l'activation et de la modulation de la réponse immunitaire adaptative par capture, digestion et présentation de l'antigène par les DC. Les principales étapes de l'activation de l'immunité sont indiquées en bleu et les cytokines sécrétées sont indiquées en vert (DC : cellule dendritique, Ag : antigène, IL : interleukine, RII : réponse immunitaire innée, RIA : réponse immunitaire adaptative, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, Th : cellule T auxiliaire, IFN : interféron)

La toute première étape est donc celle de l'endocytose du pathogène ou de l'antigène soluble.<sup>29</sup> Seules les DC dites immatures sont pourvues d'excellents systèmes de capture d'antigène. L'avantage des DC est la capture d'antigène à faibles concentrations de l'ordre du nanomolaire voire picomolaire, contrairement aux autres CPA, qui nécessitent des concentrations de l'ordre du micromolaire.<sup>30</sup> La maturation des DC provoque une perte de sa capacité à capturer un pathogène ou un antigène et entraîne l'apparition de marqueurs de surface, tels que CD40, CD54, CD86, qui interagissent avec les cellules T pour les stimuler.<sup>30</sup> Lorsque le pathogène se retrouve dans le cytosol par phagocytose, la DC digère alors le pathogène en peptides antigéniques qui sont associés à des molécules du CMH I. Lorsque la capture se fait par endocytose, l'antigène est digéré puis associé à une molécule du CMH II.<sup>29</sup> Cette capture provoque la maturation et la migration des DC vers les tissus lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate) et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (plaques de Peyer et amygdales essentiellement), où elles finissent leur maturation, attirent et activent les lymphocytes B et T par libération de cytokines et par interaction cellulaire. La capture de l'antigène associée à la migration des DC peut être une voie choisie par un pathogène pour se disséminer dans un organisme hôte, comme c'est notamment le cas pour le VIH.<sup>29</sup> En plus de la capture d'antigènes, la détection de cytokines inflammatoires provoquées par la présence de pathogènes, telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , et l'interaction Igantigène activent également les DC.<sup>29</sup> En outre, lors d'une infection virale, les DC sécrètent de l'IFN- $\alpha$ , avant des propriétés antivirales.<sup>14, 31</sup>

Une fois les peptides antigéniques associés aux molécules du CMH, le complexe CMH-peptide est présenté à la surface des DC (d'où leur appartenance à la famille des CPA). Ces dernières sont les meilleures CPA, puisqu'elles permettent la présentation en leur surface de 10 à 100 fois plus de complexes CMH-peptide, que les autres CPA.<sup>30</sup> Ainsi les DC sont les meilleures CPA en terme de sensibilité de l'antigène et en terme de densité de complexes CMH-peptide en leur surface. Cette phase de présentation d'antigène via le CMH I ou le CMH II est une phase importante, puisque sans elle les cellules T restent dans leur état naïf, dit aussi de latence.<sup>32</sup>

#### 1.1.3.2 La polarisation de l'immunité

Lorsqu'il y a présence d'un peptide antigénique avec une molécule du CMH I à la surface de CPA, les cellules T CD8+ naïves sont activées par l'interaction du récepteur CD8 avec le complexe CMH I peptide et se différencient en cellules T cytotoxiques (CTL). Les CTL sécrètent alors de l'IL-2, qui permet d'amplifier la différenciation des cellules T CD8+ naïves en CTL.

Lorsqu'il y a présence d'un peptide antigénique avec une molécule du CMH II à la surface de CPA, les cellules T CD4+ (cellules exprimant la molécule de surface CD4) naïves sont activées par l'interaction du récepteur CD4 avec le complexe CMH II - peptide et peuvent se différencier soit en cellules Th1 soit en cellules Th2.

Il s'agit là du phénomène de **polarisation**, qui se manifeste par le développement soit d'une immunité à dominante cellulaire, en développant des cellules Th1, soit d'une immunité à dominante humorale, en développant des cellules Th2. L'avantage d'activer les lymphocytes T CD4+ naïfs en lymphocytes Th est de leur permettre de proliférer et de sécréter plus de cytokines à de plus faibles doses de peptide antigénique présenté.<sup>33</sup>

Les cellules Th1 appartiennent à l'immunité cellulaire, puisque leur sécrétion d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2, d'IL-12

et de TNF- $\alpha$  renforce la prolifération des CTL, qui jouent un rôle majeur dans l'immunité protectrice contre les virus, les bactéries intracellulaires et les cellules tumorales.<sup>34, 35</sup> Cette réponse est aussi favorisée par l'expression du récepteur de surface CD40 par les cellules dendritiques, qui interagit avec les ligands CD40 présents à la surface des lymphocytes T; cette interaction provoque la sécrétion d'IL-12 et d'IL-6, qui amplifie la réponse cellulaire.<sup>35</sup>

Les cellules Th2 appartiennent à l'immunité humorale, puisque leur sécrétion d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10 et d'IL-13 active les éosinophiles et renforcent la prolifération clonale (après sélection du clone de lymphocyte qui interagit le mieux avec l'antigène) et la différenciation des cellules B (qui interagissent avec l'antigène) en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.<sup>34</sup>

La polarisation est gouvernée par le profil de cytokines sécrétées par les DC, suite à l'activation des différents PRR par les PAMP. En résumé, s'il y a une sécrétion abondante d'IL-6, d'IL-12, d'IL-18 et d'IFN- $\gamma$ , la réponse Th1 sera favorisée, mais elle peut être inhibée ou diminuée s'il y a sécrétion d'IL-10. S'il y a sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13, la réponse Th2 sera favorisée.<sup>34</sup>

En définitive, la polarisation pour la réponse Th1 est donc nécessaire pour la défense de l'organisme contre les virus et les bactéries intracellulaires et la polarisation pour la réponse Th2 est nécessaire pour la neutralisation des virus et des toxines par les anticorps.<sup>36</sup>

Une étape clé de l'immunité adaptative est la sécrétion d'anticorps spécifiques, qui sont des glycoprotéines, composées donc d'une partie polysaccharide et d'une chaîne polypeptidique, appartenant à la famille des Ig (immunoglobulines). Il existe cinq isotypes d'anticorps : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Leur fonction est la neutralisation de pathogènes ou de leurs composés solubles. Les principaux anticorps présents dans le sang sont les IgM et les IgG. Les IgA sont surtout présentes au niveau des muqueuses et les IgE sont associées à des réactions d'ordre allergique.

#### 1.1.3.3 Étape finale : la mémoire immunitaire

La grande caractéristique de la réponse immunitaire adaptative est le développement d'une mémoire immunitaire avec la formation de cellules B et T mémoires, spécifiques du pathogène déclencheur. Cette mémoire est en soi une altération de la réponse immunitaire suite à l'exposition d'un pathogène à l'organisme.<sup>33</sup> Elle a pour objectif de protéger l'organisme d'une nouvelle infection, de contrôler les infections persistantes et de protéger l'organisme immunologiquement immature des primo-infections grâce à la présence d'anticorps maternels.<sup>37</sup> Certaines études montrent que les cellules T CD4+ et T CD8+ mémoires peuvent persister jusqu'à des dizaines d'années après une seule exposition au pathogène. En effet, il semblerait que l'antigène ne soit pas forcément nécessaire au maintien des populations de cellules T mémoires. La stabilité des cellules T CD8+ mémoires serait due à leur continuelle division à faible fréquence, sous l'influence de l'IL-15 et de l'IL-7.<sup>32,37</sup> L'avantage des cellules T mémoires par rapport aux cellules T naïves, est leur capacité à sécréter toute une gamme de cytokines. L'activation de leur prolifération et de la production de cytokines est plus facile que pour les cellules naïves, bien qu'elle nécessite une co-stimulation large pour obtenir une réponse optimale et particulièrement lorsque la concentration en antigène est basse.<sup>32,33</sup> En résumé, la réponse des cellules T peut se décrire en trois phases : expansion, mort (ou contraction) et phase mémoire.<sup>6</sup> De 90 à 95 % des cellules T effectrices activées meurent par apoptose, seules 5 à 10% des cellules T effectrices activées survivent pour entrer dans la phase finale mémoire.<sup>6</sup>

L'immunité humorale peut également persister pendant plusieurs dizaines d'années chez l'homme et toute une vie chez la souris. Le maintien d'une haute concentration d'anticorps dans le sérum est appelé mémoire sérologique, qui peut être transmise chez le fœtus et gardée pendant plusieurs mois chez le nouveau-né. Malgré un temps de demi-vie des anticorps de 7 à 21 jours dans le sérum, la mémoire séro-logique peut exister et serait la conséquence d'une sécrétion continue d'anticorps.

De manière générale, il est important de noter que la réponse immunitaire par les cellules mémoires est une réponse plus rapide, plus forte en intensité et plus efficace suite à une nouvelle exposition.<sup>33</sup> Leurs mécanismes de développement et de persistance sont finalement encore assez méconnus.

#### 1.1.4 Conclusion

Le système immunitaire est un ensemble complexe d'interactions pathogènes-cellules, cellules-cellules, cellules-cytokines, où les immunités innée et adaptative se succèdent pour se compléter.

L'immunité innée est notre première ligne de défense contre les pathogènes. Elle est répartie efficacement dans notre organisme pour intervenir le plus rapidement possible lors d'une agression. Il est donc normal de la retrouver sur les premiers lieux de rencontre entre pathogènes et organisme et tout particulièrement au niveau des muqueuses. Nos organismes étant constamment exposés à des agents pathogènes, cette immunité est bien souvent suffisante pour que l'on ne se rende pas compte qu'un pathogène a tenté d'envahir notre organisme. Cependant, étant une immunité peu spécifique du pathogène rencontré, elle utilise des phénomènes de reconnaissance généraux entre PRR et PAMP. L'interaction PRR-PAMP provoque de multiples réponses chimiques aux profils de cytokines différents suivant le motif rencontré (PAMP), permettant d'orchestrer la réponse immunitaire adaptative contre le pathogène de manière plus efficace.

Lorsque l'immunité innée ne suffit pas, la réponse immunitaire adaptative est nécessaire, mais parfois insuffisante, à l'éradication des pathogènes. Son développement est l'ultime phase de combat qui permet de renforcer et de prendre le relais de l'immunité innée en déployant des cellules fonctionnelles plus compétentes et spécifiques du pathogène à détruire.

Les deux grands atouts de la réponse adaptative sont la polarisation de la réponse Th et le développement des mémoires cellulaire et sérologique. La polarisation permet de renforcer l'immunité cellulaire ou humorale, suivant le PAMP rencontré et en fonction du pathogène intra- ou extracellulaire rencontré. Lors d'une première exposition à un antigène, il y a apparition de cellules immunitaires B et T persistantes, dites mémoires, qui aideront le système immunitaire à développer une réponse plus forte, plus rapide et plus efficace lors de contaminations ultérieures. C'est sur ce principe de mémoire immunitaire que repose le fondement de la vaccination, qui n'est autre qu'une stimulation artificielle de notre organisme. Nous allons à présent nous attacher à décrire quels sont les moyens mis en œuvre pour la vaccination et leurs perspectives.

# 1.2 La vaccination

Parce que la science fait face à des infections chroniques (à titre d'exemple le SIDA, le paludisme et l'hépatite C) contre lesquelles l'élaboration d'un vaccin est difficile, la recherche essaie de mettre au point de nouvelles formulations vaccinales. Nous allons voir quels sont les critères indispensables d'un candidat vaccin, quels sont les systèmes de vaccination actuellement sur le marché et quels sont les futurs adjuvants/vaccins potentiels.

#### 1.2.1 Le vaccin idéal

Deux types de vaccins existent : le vaccin thérapeutique, dont le but est d'aider un patient à combattre une maladie, et le vaccin préventif, pour protéger le patient et lui éviter de devenir malade suite à infection. Seul le vaccin préventif contre les agents infectieux sera abordé dans la suite de ce manuscrit. Le vaccin préventif permet d'obtenir une immunité protectrice qui dépend de plusieurs facteurs : la reconnaissance de l'antigène associé au vaccin et sa capacité à activer les réponses immunitaires humorales et/ou cellulaires, et notamment à activer les CPA, telles que les DC.<sup>38</sup> L'objectif clé est d'induire une réponse immunitaire effectrice spécifique d'un pathogène qui permet d'empêcher l'infection et/ou la maladie causée par ce pathogène avec, dans l'idéal, une éradication complète.<sup>39</sup> Il s'agit donc d'exploiter la capacité du système immunitaire à produire des mémoires sérologique et cellulaire, respectivement par les lymphocytes B et T lors d'une première contamination. Ces derniers interviennent et agissent plus rapidement lors de contaminations ultérieures. Les anticorps déjà en place peuvent ainsi neutraliser le pathogène dès son entrée. Tout ceci dans l'unique but d'éradiquer le pathogène invasif sans même que la patient ne développe la pathologie.

Un vaccin ne doit provoquer aucun effet secondaire (ne sont tolérés que les effets secondaires modérés très peu fréquemment rencontrés) et ne présenter aucune toxicité, tout particulièrement parce qu'il est administré chez des patients sains et notamment chez les nourrissons et les enfants qui possèdent une immunité peu développée ou encore chez les personnes âgées qui peuvent présenter une immunité défaillante. Les vaccins sont soumis à une réglementation plus stricte que celles des thérapies. La balance risque/bénéfice doit impérativement tendre vers zéro. Pour cela, les vaccins sont soumis à des études précliniques strictes durant lesquelles les propriétés biologiques du vaccin sont établies, les risques encourus par l'administration du vaccin sont évalués et les plans de vaccination avec les doses maximales et leur fréquence pour une efficacité de protection maximale sont définis.<sup>40</sup>

L'utilisation d'adjuvants dans une formulation vaccinale entraîne l'émergence de vaccins aux effets différents d'un antigène à l'autre sur l'immunité. En effet, l'initiation, la qualité et l'amplitude de la réponse immunitaire face à un antigène peuvent être influencées par de nombreux facteurs. Le type et la dose d'antigène administré, le planning de vaccination, l'âge et l'état de santé du patient sont autant de paramètres à prendre en compte.<sup>41</sup> Un manque d'universalité d'un adjuvant pour une large gamme d'antigènes est à déplorer, comme nous le verrons par la suite. Par conséquent, toutes les études précliniques et cliniques s'imposent pour chaque nouvelle formulation.

Les interrogations sur le profil de sécurité d'une formulation vaccinale et l'absence de modèles animaux adéquats sont autant de facteurs critiques qui freinent le développement et la mise sur le marché de nouveaux vaccins et notamment de vaccins adjuvantés. Le profil de sécurité peut être moins contraignant pour un vaccin thérapeutique puisqu'il peut représenter la dernière aide thérapeutique suite à des échecs considérables des traitements classiques. Ainsi diverses autorités compétentes sont mises en place pour vérifier l'innocuité et l'utilité d'une nouvelle formulation vaccinale. Elles seules auront l'autorité de la mise sur le marché d'un vaccin ou d'une thérapie. Pour le marché américain, le vaccin devra passer la barrière de la *Food and Drug Administration* (FDA) et pour le marché européen celui de l'*European Medicines Agency* (EMA).

Un vaccin idéal devra fournir une efficacité maximale avec un dosage minimum et être sans dan-

ger pour une administration facile chez le patient sain. Il doit pouvoir stimuler la réponse adéquate pour l'éradication du pathogène. Une réponse humorale peut parfois suffire. Mais actuellement les maladies qui ne sont pas enrayées par l'utilisation d'un vaccin semblent nécessiter l'étroite collaboration des réponses immunes humorale et cellulaire. Le développement de nouvelles formulations se complique proportionnellement au manque de connaissance des mécanismes immunitaires mis en place et nécessaires à l'organisme pour combattre le pathogène, comme c'est notamment le cas pour le VIH.

#### 1.2.2 Vaccination traditionnelle

Historiquement les vaccins ont été élaborés et le sont encore, à partir de pathogènes vivants, qui ont été atténués ou tués/inactivés.

L'emploi de pathogènes vivants atténués ne nécessite pas l'ajout d'adjuvants, puisqu'ils miment de façon exemplaire l'infection naturelle par le pathogène. Actuellement, les vaccins dits "vivants" sont ceux qui induisent les réponses immunitaires les plus puissantes et les plus durables. Dans ce cas précis, le pathogène est capable de se répliquer dans l'organisme hôte pour provoquer une infection modérée et limitée de façon similaire à l'infection naturelle. Pour des raisons de sécurité, les vaccins vivants sont atténués pour réduire la virulence du pathogène.<sup>42</sup> L'atténuation peut être obtenue par passage répété (10 à 1000 fois) du micro-organisme *in vitro* ou du virus dans un organisme hôte non humain ou encore par des changements génétiques du pathogène.<sup>42</sup> Un inconvénient potentiel de l'utilisation de pathogène vivant atténué peut être l'apparition de lots sensiblement différents. La stratégie de vaccination par virus atténué dans le cas du VIH a été abandonnée surtout à cause de la capacité du virus atténué à redevenir virulent ou encore des risques d'intégration de son génome dans celui de l'hôte.

L'utilisation de pathogènes tués ou inactivés ou de protéines recombinantes nécessite l'usage d'adjuvants pour obtenir une immunité protectrice contrairement aux pathogènes atténués.<sup>38</sup> Les vaccins inactivés sont composés du pathogène, traité chimiquement ou thermiquement pour lui enlever sa capacité de réplication. La composition cellulaire est maintenue, seule la structure du pathogène est détruite. Ils présentent des avantages certains, tels que l'absence de réplication et donc l'absence d'infection chez le patient et une augmentation de la stabilité au stockage. Leurs inconvénients sont la nécessité d'utiliser des adjuvants et un coût élevé de production pour obtenir une immunité cellulaire, qui peut être relativement faible.<sup>42</sup>

Depuis plus de 80 ans, les sels d'aluminium,<sup>43</sup> également appelés "alum", parmi lesquels figurent  $Al(OH)_3$ ,  $AlPO_4$  et  $KAl(SO_4)_2.12H_2O$ , sont utilisés en tant qu'adjuvants et sont les seuls actuellement

autorisés par la FDA, avec les vaccins à base de particules de type virus (VLP pour *Virus-Like Particle*) tout récemment autorisés et détaillés ci-après.<sup>44,45</sup> Les vaccins à base d'aluminium sont préparés soit par précipitation des composés d'aluminium en présence de l'antigène, soit par adsorption de l'antigène sur un gel d'aluminium préformé.<sup>46</sup> Le choix du gel d'aluminium,  $Al(OH)_3$  ou  $AlPO_4$ , est dépendant de la charge de l'antigène à pH neutre. En effet, le phosphate d'aluminium est chargé négativement à pH neutre, alors que l'hydroxyde d'aluminium est chargé positivement. Le maintien de la conformation de l'antigène lors de la fabrication du vaccin semble dépendre de l'antigène, de la taille des particules d'alum et de l'efficacité d'association de l'antigène à ces particules.<sup>47,48</sup>

Le mécanisme originel d'action supposé par Glenny<sup>49</sup> était celui de l'effet dépôt sur le site d'injection où les antigènes adsorbés sur les particules d'aluminium étaient libérés lentement après leur administration.<sup>46</sup> Cette théorie a été remise en question par Holt<sup>50</sup> qui a démontré que, même après l'excision du site d'injection, la production d'anticorps continue suggérant donc une capture et une migration rapides de l'antigène.<sup>46</sup> D'autres études récentes ont corroboré cette hypothèse en démontrant que l'antigène disparaît du site d'injection quelques heures après son administration.

Ce type d'adjuvant est particulièrement efficace pour la première immunisation en induisant une production significative d'anticorps spécifiques de l'antigène via la réponse immunitaire Th2. Bien qu'il permette une certaine prolifération des cellules T, la réponse Th1 est plus que modérée.<sup>2</sup> Les adjuvants à base d'aluminium ont d'autres limitations, telles que l'absence d'efficacité pour tout antigène (problème d'adsorption de l'antigène) et la production d'anticorps IgE responsables d'allergies, qui peuvent induire très occasionnellement des réactions locales sévères. Toutes ces caractéristiques représentent des limitations majeures dans le développement de certains nouveaux vaccins.<sup>51</sup>

Cependant les adjuvants à base d'aluminium restent des adjuvants économiques et ont fait leurs preuves en vaccinant des centaines de millions de personnes, notamment contre la diphtérie, le tétanos et la poliomyélite, avec de bonnes protections et très peu de complications rapportées. Ils restent donc le *benchmark* de l'adjuvant, mais ceci implique que la recherche continue d'avancer pour trouver des solutions au manque de réponses cellulaires (et mucosales) nécessaires pour la protection contre les pathogènes intracellulaires et particulièrement les virus comme c'est le cas pour la vaccination préventive contre le paludisme et le SIDA.<sup>38</sup>

#### 1.2.3 Les différents types d'adjuvants

#### 1.2.3.1 Généralités

L'intérêt des scientifiques pour les adjuvants est en constante augmentation pour plusieurs raisons<sup>51</sup> :

1. Une douzaine de nouveaux candidats vaccins ont émergé ces dernières années pour prévenir ou traiter des maladies infectieuses, le cancer, la fertilité, l'allergie ou encore les maladies auto-immunes. Tous requièrent l'utilisation d'adjuvants.

- 2. Récemment, les vaccins sont devenus plus rentables, ce qui encourage leur utilisation.
- 3. La Children's Vaccine Initiative amorcée en 1990 et la Global Alliance for Vaccines initiée en 1999 ont contribué à l'augmentation de l'intérêt politique et public envers les adjuvants, grâce à la définition d'objectifs ambitieux concernant le renforcement de la couverture vaccinale actuelle et le développement de nouveaux vaccins.
- 4. L'amélioration des techniques d'analyses biochimiques et de purification de macromolécules, le développement de la technologie des recombinants mais également l'amélioration de la compréhension des mécanismes immunologiques et de la pathogénicité des pathogènes ont permis d'augmenter le développement et l'application des adjuvants.
- 5. L'échec considérable des adjuvants à base d'aluminium : (i) pour augmenter la réponse immune des vaccins à base de sous-unités de pathogène chez les animaux et (ii) pour stimuler la réponse cellulaire (médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL)), nécessaire au contrôle et à l'éradication de pathogènes intracellulaires est un facteur de développement de nouvelles formulations vaccinales.

Pour pallier les limites des vaccins traditionnels, la recherche a développé et continue de développer de nouvelles alternatives. Celles-ci, bien que nombreuses, sont pour la plupart encore absentes du marché pour diverses raisons : innocuité et efficacité chez l'homme insuffisantes ou encore incertaines et faisabilité industrielle difficile. Les adjuvants modernes peuvent être divisés en deux catégories : (i) les systèmes particulaires de délivrance d'antigènes et (ii) les composés immunostimulants (associés aux antigènes) (Tableau 1.4).

(i) Les systèmes particulaires de délivrance d'antigènes regroupent les sels minéraux (comme les sels d'aluminium), les émulsions, les liposomes, les VLP, les virosomes, les complexes immunostimulants (ISCOMs), les vecteurs recombinants, les particules de phosphates de calcium et les particules de polymères. Ces dernières feront l'objet d'une attention particulière dans la section 1.3.

(ii) Les composés immunostimulants sont typiquement des lipides monophosphorylés (MPL) et leurs dérivés synthétiques, des molécules organiques synthétiques, des saponines, des oligonucléotides et certains motifs de pathogènes.<sup>2,51</sup>

Les adjuvants doivent répondre à plusieurs critères<sup>2</sup> :

- l'augmentation du titre d'anticorps total ou du titre d'anticorps fonctionnels
- l'induction d'une réponse immunitaire au niveau des muqueuses
- la faisabilité industrielle
- l'augmentation de la réponse la réponse immunitaire en fonction de la tranche d'âge ciblée : soit chez les jeunes personnes, soit chez les personnes âgées

- l'augmentation de la vitesse et de la durée de la réponse immune
- la diminution des doses et du nombre de doses de l'antigène
- le développement de combinaison de vaccins (une seule injection pour plusieurs vaccins)

Systèmes de délivrance d'antigènes	Composés immunostimulants
Sels d'aluminium	MPL et dérivés synthétiques
Émulsions	MDP et dérivés
Liposomes	Oligonucléotides (CpG)
VLP et Virosomes	ARNdb
ISCOMs	PAMP alternatifs
Vecteurs recombinants	Molécules synthétiques (imiquimod)
Phosphate de calcium	Saponines et dérivés
Micro- et nanoparticules de polymères	

Tableau 1.4 – Adjuvants alternatifs en cours de développement, source O'Hagan<sup>2</sup>

#### 1.2.3.2 Émulsions

#### - Eau dans huile : Adjuvants de Freund

Ce type de formulation consiste en l'élaboration de micro-gouttelettes d'eau, stabilisées par un tensioactif, typiquement le monooléate de mannide, dans une phase continue d'huile, comme le squalène.<sup>52</sup> Le squalène est un intermédiaire de la biosynthèse d'hormone stéroïde chez l'homme et un précurseur du cholestérol, ce qui le rend biocompatible.<sup>53</sup> Il existe deux types d'adjuvant de Freund : complet et incomplet.

Freund a développé un mélange de paraffine et d'une mycobactérie tuée pour former l'adjuvant complet de Freund (CFA abréviation de *Complete Freund's Adjuvant*), qui reste l'un des adjuvants les plus puissants.<sup>54</sup> Il a l'avantage de développer une forte réponse immunitaire cellulaire, mais demeure justement trop réactif pour être utilisé chez l'homme.<sup>55</sup>

L'objectif a donc été de purifier les composantes de la mycobactérie pour aboutir, dans les années 1970, au dipeptide de muramyle (MDP), qui est le plus petit fragment actif de la mycobactérie. Cependant, même l'utilisation de ce composé purifié aboutit à un adjuvant particulièrement pyrogène et trop toxique pour l'homme.<sup>55</sup> Des centaines de dérivés du MDP ont été synthétisés pour obtenir l'activité adjuvante tout en réduisant la toxicité, en vain. Les bactéries à Gram négatif possèdent généralement une endotoxine : le lipopolysaccharide (LPS), dont la fraction lipide A du LPS est responsable du pouvoir immunogène des bactéries. Le lipide A a donc été testé, mais présente une réactivité trop intense. Les études ont alors convergé vers la détoxification du LPS pour aboutir à un adjuvant prometteur, le lipide A monophosphorylé (MPL), aux propriétés adjuvantes similaires mais avec une toxicité 100 fois plus faible que le LPS.<sup>55,56</sup> Le MPL est reconnu pour son interaction avec les TLR4.

En parallèle, l'idée d'utiliser cet adjuvant sans la mycobactérie est née pour aboutir à l'adjuvant incomplet de Freund (IFA de l'anglais *Incomplete Freund's Adjuvant*). L'effet adjuvant serait dû à un effet dépôt agrémenté d'une libération lente de l'antigène. La réponse immunitaire est augmentée lorsque l'antigène est piégé dans les gouttelettes d'eau.<sup>55</sup> Toutefois, malgré une utilisation sur plus d'un million de personnes en Grande Bretagne pour un vaccin contre la grippe, il a été retiré du marché, car suspecté d'être cancérigène chez la souris.<sup>55</sup>

#### - Huile dans l'eau : MF59

Le MF59 consiste en une émulsion d'huile (le squalène) dans l'eau (le tampon citrate) composée de gouttelettes de 200 à 300 nm. Sa composition comprend 4.5% de squalène (w/v), 0.5% de Tween (polysorbate 80) (w/v) et 0.5% de Span 85 (trioléate de sorbitant) (w/v). Elle est actuellement l'une des émulsions pharmaceutiques les plus stables.<sup>57</sup> Cependant, cette formulation provoquerait un changement de conformation de certaines protéines antigéniques, et notamment de la gp120, glycoprotéine antigénique d'intérêt pour le développement d'un vaccin contre le VIH.<sup>58</sup>

Les études de toxicologie, de réactivité chez l'animal et l'homme et de faisabilité industrielle lui ont permis d'être le seul adjuvant de taille nanométrique à avoir été autorisé depuis 1997 chez l'homme dans l'Union Européenne en plus des adjuvants sels d'aluminium et VLP, sans l'être toutefois aux Etats-Unis.<sup>53,59</sup> Le MF59 provoque la polarisation de l'immunité vers la production de cellules Th2 avec des titres d'anticorps supérieurs à ceux obtenus avec les sels d'aluminium, égaux ou supérieurs à ceux obtenus par l'IFA et égaux ou inférieurs à ceux obtenus avec le CFA.<sup>44,57</sup> Le MF59 active le système immunitaire même en l'absence d'antigène. Ceci serait dû au recrutement des CPA (cellules présentatrices d'antigène) et notamment de macrophages sur le site d'injection et à la capture importante de l'émulsion provoquant ainsi la production de cytokines.<sup>57,58</sup> L'antigène lorsqu'il est piégé dans l'émulsion est donc lui aussi capturé et présenté efficacement par les CPA. Le MF59 aurait par ailleurs un effet favorable au développement de l'immunité cellulaire mais ceci reste dépendant de l'antigène utilisé.<sup>55,58</sup>

L'émulsion immunostimulante MF59 est actuellement produite et commercialisée par Novartis pour le vaccin contre la grippe (Fluad)<sup>58</sup> ou en présence d'autres adjuvants pour des vaccins contre la grippe, contre l'hépatite B ou encore contre le virus du papillome humain, commercialisés par GlaxoSmithKline.<sup>53</sup>

#### 1.2.3.3 Liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une bicouche lipidique qui entoure un cœur aqueux, dont la taille varie entre 50 nm et plusieurs microns. Historiquement, Gregoriadis *et coll.*<sup>60,61</sup> les ont élaborés pour encapsuler et délivrer des enzymes et des principes actifs avec l'objectif de prévenir et de retarder leur dégradation trop rapide et de pouvoir les transporter dans des endroits cibles.

Ils peuvent être utilisés en tant que véhicules d'antigènes ou en tant qu'immunostimulants. Ils peuvent être associés à la catégorie des VLP (détaillés ci-après), lorsqu'ils sont constitués de lipides viraux. L'absence de toxicité est certaine lorsque ces liposomes sont produits à partir de phospholipides naturels retrouvés au sein des cellules de mammifères. Cependant, l'utilisation de phospholipides naturels présente des inconvénients certains, comme une sensibilité aux enzymes phospholipidases présentes dans notre organisme, une certaine instabilité au stockage sous forme liquide et une difficulté de production à l'échelle industrielle associée à un fort coût de production.

En tant que tels, les liposomes composés de lipides non viraux ne sont pas immunogènes. Ils le deviennent indirectement lorsqu'ils présentent un ligand, un antigène ou un autre lipide immunogène à l'organisme. L'antigène peut être encapsulé dans le cœur aqueux, piégé au sein de la bicouche lipidique ou encore être adsorbé à la surface de la bicouche.<sup>62</sup> Lorsqu'il est encapsulé dans le cœur aqueux, l'antigène est protégé de sa dégradation naturelle dans l'organisme. Les liposomes permettent de réduire les effets secondaires de certains immunostimulants, tels que le MDP, le LPS ou encore le MPL, en les libérant progressivement au cours du temps.

Le pouvoir d'adjuvantation serait dû à un effet dépôt au niveau du site d'injection et à une présentation de l'antigène durable et efficace grâce à sa libération progressive. L'immunité développée, humorale ou cellulaire, serait dépendante de plusieurs facteurs.

Le premier est la manière dont l'antigène est associé aux liposomes. Lorsque ce dernier est associé au cœur des liposomes par encapsulation, l'immunité humorale est davantage développée.<sup>63</sup> Lorsque l'antigène est retrouvé à la surface des liposomes, l'immunité cellulaire est alors privilégiée.<sup>63</sup>

Un second facteur serait la nature du lipide utilisé. En effet, lorsque l'antigène est associé à des lipides de type acide gras insaturé, les titres d'anticorps IgG, l'incorporation de l'antigène dans les macrophages, la digestion de l'antigène et la production d'IL-2 sont beaucoup plus importants que lorsque l'antigène est associé à des acides gras saturés. Un autre phénomène important est la présentation efficace de l'antigène envers les cellules T CD4+ et T CD8+, avec production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD8+, lorsque des acides gras insaturés sont employés. En revanche, avec des acides gras saturés, seule la présentation aux cellules T CD4+ est effective, avec une absence d'IFN- $\gamma$  sécrété.<sup>63</sup> L'utilisation d'antigène à la surface des liposomes présente plusieurs avantages : une meilleure efficacité d'association de l'antigène au liposome, une réduction de la production d'IgE allergisants et une meilleure présentation de l'antigène aux CPA, lorsque des ligands de type mannose sont associés à des lipides inertes.<sup>63</sup>

Aux États-Unis, des médicaments formulés à base de liposomes sont déjà sur le marché. En revanche, aucune formulation vaccinale à base de liposomes n'a encore été commercialisée. L'utilisation de formulations à base de VLP, virosome ou ISCOM, détaillées ci-après, est préférée pour des raisons de stabilité.

#### 1.2.3.4 Particules de type virus (VLP) et virosomes

En soi, les virus sont des véhicules de 15 à 400 nm environ, qui transportent leur information génétique par auto-assemblage de plusieurs protéines sous-unitaires au sein d'une bicouche phospholipidique.<sup>64</sup> L'enveloppe virale est typiquement constituée de phospholipides de la membrane du cytoplasme ou du noyau de la cellule hôte, dans laquelle peuvent être incorporées des protéines ou des glycoprotéines virales, comme la gp41 pour le VIH. Ils ont évolué naturellement de sorte à pouvoir infecter des cellules spécifiques de l'hôte et y délivrer leur matériel génétique. C'est donc par analogie à ces systèmes évolués que l'idée d'utiliser des particules de type virus a émergé.

Ainsi, les VLP et les virosomes sont structurés pour mimer les mécanismes naturels de l'immunité par les virus. Ils sont de manière générale des complexes macromoléculaires qui stimulent le système immunitaire en libérant du matériel mimant certaines propriétés virales. Ils présentent une morphologie et une capacité de pénétration cellulaire similaires aux particules virales infectieuses.



FIGURE 1.4 – Du virus aux vecteurs viraux, VLP et virosomes. (a) Le gène viral est remplacé par des gènes d'intérêt. (b) La capside dérivée de virus est assemblée en VLP. (c) Des lipides et protéines viraux sont reconstitués pour former des virosomes. En dessous, des images de microscopie correspondant à chacun des systèmes. Source directe Mitragotri *et coll.*<sup>45</sup>

Les VLP sont obtenues par auto-assemblage de protéines de capsides virales et sont non-infectieuses puisque dépourvues de matériel génétique (Figure 1.4 (b)).<sup>45,64</sup>

Les virosomes, quant à eux, sont des vésicules sphériques de 20 à 150 nm, constituées d'une bicouche phospholipidique, contenant des glycoprotéines du virus contre lequel on souhaite vacciner (Figure 1.4 (c)).<sup>45</sup>

Ces systèmes sont connus pour stimuler les deux immunités, humorale et cellulaire.<sup>44</sup>

Les VLP sont capables d'intégrer les deux voies du CMH (CMH I et CMH II) et donc de stimuler les cellules T CD8+, mais aussi les cellules T CD4+ et les cellules  $B^{.64}$ 

De plus, la taille des VLP semble favoriser leur capture par les cellules dendritiques (DC) par macropinocytose et par endocytose.<sup>64</sup> Les VLP sont souvent produites à partir de cellules d'insectes infectées par un virus recombinant, typiquement le baculovirus. Les avantages de son utilisation sont une production efficace de protéines n'appartenant pas à son génome, son incapacité à se répliquer dans les cellules mammifères, une faible cytotoxicité et l'absence d'immunité contre ce virus chez l'homme.<sup>64</sup>

L'administration de la souche sauvage de ce virus semble être associée à la sécrétion de cytokines, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-12 et les IFN- $\alpha$ /- $\beta$  via l'activation des TLR9 grâce à la présence de motifs CpG dans son ADN, ce qui suggère la présence de ce virus lors de la récupération des VLP.<sup>64</sup> Les impuretés présentes après purifications sont donc suspectées d'être en partie à l'origine du pouvoir d'adjuvantation des VLP.

Deux vaccins à base de VLP contre l'hépatite B se sont vus accordés leur licence pour un usage chez l'homme : le Recombivax (Merck) et l'Engerix-B (GlaxoSmithKline). Bien que très efficaces (90-95% de patients répondant au vaccin), ils peuvent souffrir d'une faible immunogénicité. Les vaccins de type VLP les plus récemment commercialisés et approuvés par la FDA sont le Gardasil<sup>®</sup> (Merck) et le Cervarix (GlaxoSmithKline), pour la prévention du cancer du col de l'utérus et des condylomes génitaux provoqués par certains virus du papillome humain.<sup>44,45</sup> Ce type de vaccin permet de développer de hauts titres d'anticorps neutralisants, qui permettent de protéger le patient contre l'infection.<sup>65</sup>

Des vaccins à base de virosomes ont déjà atteint le marché depuis la fin des années 90. Le vaccin contre l'hépatite A Epaxal<sup>®</sup> (Crucell) est le premier autorisé dans plusieurs pays européens, asiatiques et sud-américains. Il est possible d'être vacciné contre la grippe par les vaccins Inflexal V<sup>®</sup> (Crucell) et Invivac (Solvay Influenza Vaccine).

Ils sont constitués de virosomes de grippe reconstituée obtenus par solubilisation du virus de la grippe dans des détergents et reconstitution en virosomes en présence de deux glycoprotéines (l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA)), de phospholipides et de phosphatidylcholines (lécithine), naturellement présentes chez l'homme. Les deux glycoprotéines, HA et NA, permettent la stabilisation de la structure de ces virosomes mais surtout la fusion de ces particules avec les DC ainsi que la présentation de l'antigène par le CMH I et le CMH II, via la liaison de la HA avec les récepteurs d'acide sialique des CPA.<sup>64</sup> La glycoprotéine de la grippe entraîne aussi l'opsonisation des virosomes et par conséquent leur capture par les cellules de l'immunité.<sup>66</sup> L'avantage du vaccin Inflexal<sup>®</sup> est son administration sans risque et efficace pour toutes catégories d'âges confondues, de l'enfant à la personne âgée.<sup>39</sup>

Ces systèmes sont aussi une plateforme de particules facilement modifiables au cœur et en couronne.<sup>67, 68</sup> Il existe cependant une limitation importante, commune à de nombreux adjuvants : l'absence d'universalité d'utilisation. En effet, chaque nouvelle formulation nécessite la production de nouvelles particules et chaque adjuvant biologique dérivant d'un virus doit être étudié afin d'en déterminer tous les effets secondaires. De plus, comme expliqué précédemment, en fonction des cellules utilisées pour leur production, la présence d'impuretés reste inévitable et peut provoquer des immunisations très différentes.

#### 1.2.3.5 Vaccins vectorisés par des virus

Les vaccins vectorisés par des virus (*viral vectored*) sont des virus non répliquants, dans lesquels une partie du matériel génétique du pathogène d'intérêt a été introduite. Ils sont aussi appelés virus recombinants vivants.<sup>44</sup> Ces vaccins ont l'avantage d'être facile à produire et de posséder un bon profil d'innocuité. De plus, ils induisent généralement de fortes réponses immunitaires cellulaire et humorale puisque d'origine virale. Plusieurs vecteurs viraux existent, tels que l'adénovirus (Ad), le virus de la vaccine Ankara, le virus de la variole du canari.<sup>69</sup>

Une phase clinique II, proposée par Merck, a été réalisée sur 3 000 patients séronégatifs au VIH, en 2005 avec l'utilisation d'un adénovirus recombinant (rAd5), exprimant certains gènes clés du VIH de type 1 (gag, pol et nef).<sup>70</sup> Le virus adénovirus 5 (Ad5) est un virus inoffensif puisque responsable de pharyngite.

Chez les participants séronégatifs aux virus Ad5, le taux de contamination par le VIH était le même pour les participants ayant reçu le placebo ou le vaccin testé. En revanche, la vitesse de contamination a été deux fois plus rapide chez les participants masculins séropositifs à Ad5 ayant reçu le candidat vaccin que chez les personnes ayant reçu le placebo.<sup>70</sup>

Malgré un bon profil de sécrétion d'IFN- $\gamma$ , ce vaccin n'empêche ni l'infection ni la diminution de la virémie (charge virale dans le sang) après contamination.<sup>70</sup> Plusieurs hypothèses sont en cours d'étude pour comprendre cet échec. L'hypothèse retenue est que les personnes, ayant été immunisées au préalable contre l'adénovirus 5, ont probablement développé une réponse immunitaire cellulaire très importante, lorsque le vecteur a été administré. Or le VIH infecte plus aisément les cellules T CD4+ activées et s'y

réplique plus facilement. Ainsi, avec l'augmentation potentielle de cellules T CD4+ causée par l'administration du vecteur rAd5, la contamination a été deux fois plus rapide chez les patients séropositifs à l'Ad5 ayant reçu le candidat vaccin que chez les personnes ayant reçu le placebo.

Une phase III a été effectuée sur 16 000 Thaïlandais séronégatifs au VIH entre 2003 et 2005, pour étudier un système de "*prime*" (amorce) (ALVAC-HIV, virus recombinant (gènes exprimés : gag, pol, env et gp120), Sanofi Pasteur) et de "*boost*" (rappel) (AIDSVAC B/E, sels d'aluminium avec la glycoprotéine recombinante rgp120, Global Solutions for Infectious Diseases).<sup>71</sup>

Peu de réactions locales sévères attestent de l'innocuité de ce candidat vaccin.<sup>71</sup> L'apport d'un tel vaccin sur la virémie et le nombre de cellules T CD4+ après infection est nul, aucune différence n'étant à constater entre le placebo et le vaccin étudié.

Toutefois, il a été démontré une efficacité sur la prévention de la contamination de 26.4%.<sup>71</sup> Ceci est bien évidemment insuffisant pour accepter ce vaccin sur la marché, mais démontre cependant une avancée considérable, puisqu'alors aucune protection n'avait encore été obtenue contre le VIH par la vaccination.

#### 1.2.3.6 Complexes immunostimulants

Ces complexes immunostimulants sont communément appelés ISCOM lorsque l'antigène (classiquement une protéine hydrophobe de membrane) est piégé dans une cage d'environ 40 nm, composée de cholestérol, de phospholipide et d'un immunostimulant comme la saponine Quil A. Le système général sans antigène est commercialisé sous le nom ISCOMATRIX<sup>TM</sup>. Le cholestérol et la saponine interagissent pour former des anneaux micellaires, qui forment des cages en présence des phospholipides.<sup>72</sup>

L'antigène peut être associé à la région hydrophobe des ISCOMATRIX. Les systèmes peuvent être modifiés pour obtenir des surfaces chargées négativement ou positivement. L'antigène peut aussi être modifié pour être rendu plus hydrophobe ou pour être chélaté à des métaux ioniques.<sup>72</sup>

Leurs mécanismes d'action conjuguent la présentation d'antigène par les CMH I et CMH II et le pouvoir immunomodulateur de la saponine. Leur composition lipidique et leur nature de type particule leur permettent d'intégrer très facilement l'antigène dans les cellules en favorisant son endocytose dans les DC, les monocytes et les macrophages. Ils ont la capacité d'induire pour un large panel d'antigènes une forte réponse humorale ou cellulaire spécifique de l'antigène utilisé.<sup>72</sup> Le développement des réponses humorale et cellulaire est rapide, durable pour la réponse des anticorps, même en présence de faibles concentrations d'antigène. Ces systèmes ont l'avantage de développer une réponse des lymphocytes T cytotoxiques mémoires spécifiques de la grippe, contrairement à d'autres adjuvants. Le système en soi est immunostimulant puisque des cytokines inflammatoires semblent être sécrétées même en l'absence d'antigène, grâce à la présence de saponine qui permet de stimuler les cellules dendritiques et d'initier l'immunité adaptative spécifique.<sup>72</sup> Les ISCOM et ISCOMATRIX<sup>TM</sup> ont aussi le potentiel d'induire une réponse mucosale et la capacité spéciale de provoquer une réponse intense et durable des cellules T CD4+ et T CD8+ et/ou des cellules T cytotoxiques chez le primate et chez l'homme.<sup>72</sup>

#### 1.2.3.7 Nanoparticules de phosphate de calcium

Il s'agit de particules inférieures au micron, obtenues par combinaison de chlorure de calcium, de phosphate de sodium et de citrate de sodium. Le phosphate de calcium étant naturellement présent dans notre organisme, le problème de sécurité est réduit. L'absence de toxicité a été vérifiée en phase clinique I. Ce système présente un fort potentiel pour l'induction d'une immunité des muqueuses et notamment contre le virus de l'herpès simplex de type 2 (VHS-2). Actuellement, il est en phase pré-clinique pour des vaccins contre l'anthrax, le virus de l'hépatite B (VHB), la grippe (aviaire et saisonnière) et contre le VHS-2.<sup>44</sup>

#### 1.2.3.8 Composés immunostimulants (ou immunomodulateurs)

Comme détaillé dans les généralités de l'immunité, il existe de nombreux PRR (TLR, NLR, CLR) répondant à une large gamme de PAMP. La découverte et la compréhension de ces interactions ont permis de dresser un panel de composés naturels ou synthétiques, qui permettent de moduler l'immunité en envoyant des "signaux dangers" comme le font les pathogènes.

Une grande partie de ces composés sont des ligands des TLR : lipide A monophosphorylé (MPL), séquence d'ADN CpG, et molécules organiques de type imidazoquinoline.

- Le lipide A monophosphorylé, ou 3-*O*-desacyl-4-monophosphoryl lipid A (MPL, R595) est un agoniste du récepteur TLR-4. Il est extrait d'un lipopolysaccharide (LPS) détoxifié chimiquement de *Salmonella minnesota*.<sup>39</sup> Le MPL agit comme le LPS, puisqu'il appartient à la partie lipide A : fragment immunogène du LPS. Son administration stimule l'expression de molécules co-stimulantes et de cytokines, permettant une augmentation quantitative et qualitative des réponses humorale et cellulaire en fonction de l'antigène employé.<sup>39, 52</sup>

- Certains TLR répondent positivement aux séquences d'ADN microbien. Des séquences immunostimulantes de ces ADN ont donc été extraites pour amplifier les réponses immunitaires adaptatives. L'utilisation de motifs CpG de l'ADN, excellents agonistes des TLR9, entraîne la sécrétion de cytokines inflammatoires telles le TNF- $\alpha$ , l'Il-1, l'Il-6, l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , avec une polarisation de la réponse vers Th1 et le développement des réponses CTL.

- Des composés organiques de type **imidazoquinoline**, comme l'imiquimod et le resiquimod, se lient aux TLR7 et TLR8, respectivement, pour provoquer une forte activité antivirale par mime de l'infection naturelle par les ARN. L'imiquimod a la capacité d'augmenter les réponses des cellules T et d'apporter une immunité protectrice anti-virale chez la souris.<sup>73</sup> La co-délivrance d'imiquimod dans un vaccin permettrait d'augmenter la durée et la protection contre les récurrences dans un modèle animal d'infection à VHS.<sup>74</sup>

D'autres molécules se sont révélées intéressantes, comme la saponine ou certaines cytokines.

- La saponine naturelle Quil A est extraite d'un arbre sud-américain mais présente une trop forte réactivité. Le Quil A a été purifié pour obtenir le QS21. Ce dernier permet d'accroître la présentation d'antigène par les CPA, provoquant une augmentation des réponses cytotoxiques et une sécrétion de cytokines favorisant les réponses Th1 et Th2. Malgré des résultats préliminaires qui concluaient sur son utilisation acceptable chez l'homme, il s'avère que les cellules présentes sur le site d'injection sont fortement lysées.<sup>39</sup> Différentes saponines peuvent être utilisées pour orienter la réponse soit en Th1 soit en Th2.<sup>75</sup>

- Les cytokines font partie intégrante de la composante chimique permettant la régulation de l'immunité. Leur administration en tant que telle pourrait entraîner de violentes réactions inflammatoires. L'objectif est donc d'extraire les séquences peptidiques actives de certaines cytokines, afin d'être utilisées en amont de la réponse immune. Ainsi, Beckers *et coll.*<sup>76</sup> ont démontré que le nonapeptide VQGEESNDK (position 163-171 de la séquence de l'IL-1 $\beta$ ) couplé à une protéine antigénique pouvait augmenter l'immunogénicité de cette dernière *in vivo*. Travailler avec le peptide et non l'IL-1 $\beta$  dans sa totalité permet de s'affranchir des propriétés pyrogènes et/ou pro-inflammatoires tout en conservant le pouvoir immunostimulant de toute la cytokine.<sup>77</sup> Cependant, l'administration de peptides nécessite l'emploi de formulations particulières avec leur couplage ou leur encapsulation dans des véhicules afin d'éviter leur dégradation prématurée.

#### 1.2.4 Conclusion

La vaccination par l'utilisation de systèmes soit à base de pathogène vivant atténué soit à base de pathogène tué adjuvanté par des sels d'aluminium a atteint ses limites en ne permettant pas le développement de formulations vaccinales efficaces et sans danger contre le VIH, le virus de l'hépatite C ou

#### 1.2 La vaccination

encore contre le *Plasmodium* (responsable du paludisme) par exemple.

Quelques formulations ont réussi à franchir la barrière des organismes FDA (*Food and Drug Administration*) et EMA (*European Medicines Agency*) depuis une dizaine d'années, comme le MF59, les virosomes et les VLP dans certains cas précis. Cependant ils ne suffisent pas encore pour le développement de candidats vaccins contre les infections chroniques citées ci-avant.

Les chercheurs, qui s'emploient à développer des vaccins contre le VIH notamment, ont fait face récemment à des échecs importants lors de phases cliniques. Des systèmes de vecteurs recombinants présentent des résultats mitigés, entre complète défaillance et dangerosité, avec l'utilisation du virus recombinant rAd5,<sup>70</sup> et immunisation partielle, avec l'utilisation des systèmes ALVAC-HIV et AIDSVAX B/E.<sup>71</sup> Les échecs de vaccins pourraient être évités si (i) il existait des modèles animaux fiables et (ii) si tous les mécanismes immunitaires nécessaires, pour éradiquer ou *a minima* contrôler, le pathogène étaient bien connus.<sup>78</sup>

De nombreux adjuvants sont toujours à l'étude, entre le stade recherche et les phases cliniques. Plusieurs limitations sont cependant à constater : faible immunogénicité, instabilité au stockage, difficulté de transposition d'échelle, absence fréquente de modèles animaux adéquats et manque d'efficacité pour une large gamme d'antigènes.

Actuellement les sels d'aluminium restent la valeur sûre en terme d'innocuité, puisque nous avons plus de 80 ans de recul sur leur utilisation. Les nouveaux adjuvants tels que le MF59, les VLP et les virosomes commencent eux aussi à prouver un bon profil de sécurité sur une décennie. La recherche de nouveaux adjuvants ne pose plus de problème avec les avancées considérables en biotechnologies. Néanmoins, le ralentissement dans le développement d'un vaccin est surtout la conséquence de phases de développement et cliniques qui se doivent d'être plus longues pour s'assurer que le candidat vaccin est efficace et non toxique. Ainsi nous pouvons constater qu'en 30 ans, la répartition du temps des différentes étapes d'élaboration d'un vaccin s'est complètement modifiée, en mettant l'accent sur l'évaluation des profils de sécurité, comme en témoigne la Figure 1.5.<sup>78</sup>

Avec les progrès effectués sur la compréhension des phénomènes d'interaction pathogène/organisme, la tendance actuelle est au mime artificiel de la structure du pathogène en y incorporant des éléments à l'origine de l'activation de notre immunité. C'est grâce à cette stratégie que les vecteurs viraux recombinants, les VLP et les virosomes ont pu être développés et ont démontré leur efficacité. Les systèmes à base de nano- ou microparticules de polymères, dans lesquels peuvent être incorporés des antigènes afin d'éviter leur dégradation prématurée (et donc la perte du pouvoir immunogène), constituent une plateforme prometteuse d'adjuvants modulables avec un profil de sécurité facilement contrôlable. Une large gamme d'antigènes et de composés immunostimulants peuvent être incorporés à ces vecteurs, permettant de composer des structures particulaires "mimes" d'un pathogène donné, comme nous allons le voir dans la suite de cette étude bibliographique.



FIGURE 1.5 – Évolution de la répartition du temps d'élaboration d'un vaccin entre sa découverte et son développement depuis 30 ans, source Rappuoli  $et \ coll.^{78}$ 

# 1.3 Les adjuvants à base de particules de polymère

Les nano- et microparticules sont des colloïdes solides dispersés dans l'eau, très souvent sphériques, de 10 à 1000 nm et de 1 à 100  $\mu$ m, respectivement. Toujours dans une optique d'augmentation de délivrance et de présentation d'antigène, les nano- et microparticules représentent une alternative intéressante et notamment dans l'élaboration de vaccin à dose unique. L'étude des particules de polymères en vaccination a commencé avec les microparticules (MP), mais l'utilisation des nanoparticules (NP) est en plein essor, puisqu'elles sont capturées plus facilement que les microparticules dans les compartiments intracellulaires et qu'elles pénètrent les couches mucosales.<sup>79</sup> Les nanoparticules peuvent être divisées en deux catégories : les nanosphères et les nanocapsules. Les premières sont des particules présentant une matrice polymère,

pouvant être poreuse, les secondes sont des vésicules avec un cœur liquide entouré par une membrane de polymère.<sup>80</sup> Le polymère doit répondre aux exigences de biocompatibilité et de bioélimination auxquelles peut s'ajouter la biodégradabilité. Nous décrivons ici les principaux systèmes étudiés comme adjuvants à base de polymères naturels et synthétiques.

#### 1.3.1 Polymères naturels

Les polymères naturels particulièrement utilisés pour l'élaboration de NP comme vecteur de vaccination sont typiquement des polysaccharides : chitosane et dextrane et dans une moindre mesure les  $\beta$ -glucanes et les mannanes.

Le chitosane est un polysaccharide linéaire, non toxique et biodégradable, comprenant des motifs D-glucosamine et N-acétyle-D-glucosamine, liés par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1-4) (Figure 1.6).<sup>81</sup>



FIGURE 1.6 – Structure chimique du chitosane

Le chitosane est produit par hydrolyse enzymatique ou chimique des groupes N-acétyl de la chitine ou désacétylation. La chitine est retrouvée en grande quantité dans la cuticule des arthropodes : insectes, arachnides, crustacées (crabe, homard, crevette et endosquelette des calamars). La principale source reste les exosquelettes de crevettes. La chitine est alors déminéralisée par traitement à l'acide chlorhydrique, puis déprotéinée en présence de soude ou de potasse, pour être éventuellement décolorée par un agent oxydant tel que le permanganate de potassium. Le chitosane est dégradé *in vivo* par des enzymes, telles que le lysozyme et la chitosanase, en oligomères puis en résidus N-glucosamine, endogènes au corps humain.<sup>81</sup> Cependant la biocompatibilité et la biodégradabilité restent dépendantes de plusieurs facteurs, dont le degré de déacétylation puisqu'au-delà de 70% le chitosane est peu dégradé.<sup>81</sup> L'utilisation du chitosane est intéressante pour ses propriétés reconnues de muco-adhésion, d'augmentation de la perméabilité des muqueuses au niveau des cellules épithéliales et de diminution de la vitesse de clairance par les cils des muqueuses.<sup>82,83</sup> Le chitosane peut être associé à de l'ADN ou à des sous-unités de pathogènes pour former soit des complexes soit des particules, qui se révèlent tout aussi efficaces que le LPS pour la maturation des cellules dendritiques (seuls ils ne provoquent aucune maturation), induisant une immunité protectrice des muqueuses<sup>84</sup> et favorisant leur capture par les cellules présentatrices d'antigène.<sup>83</sup> Des particules de chitosane, encapsulant une protéine, peuvent être obtenues selon différentes voies : gélation ionique avec le polyanion tripolyphosphate, précipitation ou coacervation.<sup>85</sup>

Le sulfate de dextrane est un glycopolymère composés de motifs  $\alpha$ -D-glucose, reliés par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1-6), pouvant présenter de nombreux branchements liés en (1-6) et (1-4), dont la charge négative est assurée par la présence de sulfates. L'association du chitosane chargé positivement au sulfate de dextrane chargé négativement permet d'obtenir des complexes poly(électrolytes) dans des conditions douces, dans lesquels ou à la surface desquels peuvent être associés des peptides et/ou protéines pour aboutir à des vecteurs efficaces de ces biomolécules.<sup>86</sup> Bachelder *et coll.*<sup>87,88</sup> ont transformé les fonctions hydroxyle du dextrane en acétal, pour aboutir à un polymère hydrophobe et pH sensible, qui a été utilisé pour la préparation de MP, dans lesquelles peuvent être encapsulées l'imiquimod (ligand des TLR7). Ce dernier encapsulé dans les MP induit une immunostimulation plus importante que sous sa forme libre. La même équipe a exploité la *click chemistry* avec la cycloaddition 1,3 dipolaire entre un azoture et un alcyne pour synthétiser des particules de dextrane acétal fonctionnalisées en surface par du D-mannose et encapsulant en leur cœur une protéine antigénique modèle (ovalbumine).<sup>89</sup> Ces particules mannosylées se sont révélées améliorer la présentation de l'antigène par les DC via le CMH I, en comparaison avec les particules non mannosylées.

Les  $\beta$ -glucanes contiennent généralement des chaînes de  $\beta$ -D-glucose liées en  $\beta$ -(1-3), qui peuvent présenter des greffages de glucane en  $\beta$ -(1-6).<sup>75</sup> La distribution et la taille des chaînes sont dépendantes de la source biologique. Ils sont facilement purifiables, présentent une faible variabilité moléculaire, sont stables sur une large gamme de pH et de température, ont une charge neutre en solution aqueuse et présentent un temps de demi-vie long en raison de l'absence de  $\beta$ -glucanase chez les vertébrés et de  $\beta$ -hydrolase chez l'homme. Des particules de  $\beta$ -glucanes sont obtenues par une série d'extractions acidobasiques de la paroi des levures. La fraction  $\beta$ -glucane (1-3) est insoluble dans l'eau et forme alors des particules. Une protéine peut être encapsulée dans ces particules<sup>90</sup> ou peut être adsorbée à leur surface.<sup>91</sup> Les  $\beta$ -glucanes ne provoquent pas de réponse allergique et ne présentent pas d'anticorps inhibiteurs ou compétitifs anti- $\beta$ -glucane chez les mammifères.<sup>92</sup> La FDA les considère comme avant un bon profil d'innocuité. Les  $\beta$ -glucanes semblent posséder une fonction d'inhibition d'infection par certaines bactéries, champignons, protozoaires, virus et même contre certains types de tumeurs.<sup>92</sup> Plusieurs récepteurs sont associés à la reconnaissance de ce type de polysaccharides, tels que le lactosylcéramide, les récepteurs des LDL ("low-density lipoproteins"), les TLR2 et TLR6, la dectine-1 chez la souris, homologue du récepteur  $\beta$ -glucane chez l'homme. Cependant pour être complètement efficace, il peut être nécessaire de les associer à des vecteurs comme par exemple les émulsanes composés de trois sucres aminés : D-galactosamine, acide de D-galactosaminouronique et l'hexose de didéoxydiamino, dans les travaux de Castro et coll.<sup>92</sup>

Les mannanes sont des polyoses retrouvés naturellement à la surface de bactéries et de champignons. Ils sont intéressants puisqu'ils se lient aux DC-SIGN, aux TLR4 des DC et aux récepteurs au mannose des cellules de l'immunité. Leur interaction avec ces récepteurs permet de déclencher et d'augmenter la réponse Th1.<sup>13,52</sup> Ils peuvent être utilisés pour saturer les récepteurs au mannose et les DC-SIGN *in vitro*.<sup>93,94</sup> Le mannane est souvent associé soit à des antigènes,<sup>95,96</sup> soit à des lipides pour former des particules solides de lipides afin de favoriser le ciblage des DC et des macrophages.<sup>97</sup> Tang *et coll.*<sup>98</sup> ont démontré qu'en fonction de l'oxydation ou de la réduction du mannane, la réponse peut être orientée Th1 ou Th2 et ils ont associé le mannane à des vaccins pour l'immunothérapie de cancer. De plus, des nanoparticules de poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(éthylène glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL-*b*-PEG-*b*-PCL) recouvertes de mannane permettent d'augmenter la réponse immunitaire humorale selon les travaux de Gou *et coll.*<sup>99</sup>

#### 1.3.2 Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques possèdent plusieurs avantages par rapport aux polymères naturels, comme une très bonne reproductibilité des lots, des coûts de préparation restreints, des propriétés faciles à ajuster via des méthodes de synthèse généralement bien contrôlées et l'absence d'épitopes potentiellement antigéniques ou allergisants, qui peuvent être présents dans les polymères naturels, même après purifications, lors de l'utilisation de dérivés animaux ou végétaux.<sup>42</sup> Les polyesters aliphatiques, les polyanhydrides<sup>100</sup> et les poly(acides aminés) constituent les trois grandes familles de polymères synthétiques utilisés pour la vaccination.<sup>101</sup>

Les polyesters aliphatiques pour un usage chez l'homme comprennent entre autres le poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) (PLG) et le copolymère poly(lactide-coglycolide) (PLGA) (Figure 1.7 (a), (b) et (c)). Nous nous intéressons ici uniquement à ces polyesters aliphatiques et plus particulièrement aux particules de PLA et de PLGA, qui sont les plus reportées pour le développement de nouvelles formulations vaccinales.



FIGURE 1.7 – Structures chimiques de polyesters aliphatiques et de polyanhydrides

Plusieurs méthodes permettent d'accéder à des NP et MP de PLA/PLGA (et seront détaillées dans la section 4.1); elles sont dépendantes du caractère hydrophobe/hydrophile du principe actif à encapsuler (ici l'antigène ou un ligand).

(i) Si l'antigène (ce qui est plutôt rare) est hydrophobe, il sera encapsulé au sein de la matrice polymère grâce à la formation de particules suivant des méthodes de précipitation/évaporation de solvant, d'émulsion (huile dans l'eau)/évaporation de solvant ou encore de dialyse.

(ii) Si l'antigène est hydrophile, la méthode de choix pour son encapsulation est celle de la double émulsion (eau dans l'huile dans l'eau).<sup>102</sup>

L'adsorption d'antigènes<sup>103</sup> (ou de ligands) sur les particules est une approche possible pour les différentes méthodes reportées ci-dessus.

#### 1.3.2.1 Biocompatibilité et biodégradabilité

Les profils de biocompatibilité et de biodégradabilité du PLA et du PLGA sont bien connus puisqu'utilisés depuis de nombreuses années en tant que matériaux de suture résorbable (commercialisation du premier produit à base de PLGA en 1970) et de système de délivrance de principes actifs.<sup>104,105</sup> Ils sont approuvés par la FDA. Environ 12 produits à base de microsphères ou d'implants de PLGA sont commercialisés dans 10 compagnies différentes à travers le monde.<sup>59</sup>

Les PLA/PLGA sont biodégradables par hydrolyse *in vitro* et *in vivo* des fonctions ester en résidus acide lactique et/ou acide glycolique, qui sont intégrés dans le cycle cellulaire de Krebs pour être potentiellement éliminés en CO<sub>2</sub>. La fonction cellulaire n'est pas transformée suite à la prise en charge d'acides lactiques et glycoliques tant que leur apparition et donc la vitesse de dégradation du polymère restent modérées.

Les particules de PLGA inférieures à 300 microns subissent une dégradation homogène au cœur et en surface par érosion en masse des sphères.<sup>106,107</sup> De nombreux facteurs influencent la vitesse de dégradation de ces particules de PLA/PLGA, tels que le ratio de monomères LA/GA, la dimension des particules, la masse molaire, etc ...<sup>108</sup>

L'augmentation du ratio LA/GA du PLGA utilisé pour l'élaboration de particules améliore leur longévité en raison de la liaison ester de l'acide lactique moins susceptible à l'hydrolyse que celle de l'acide glycolique.<sup>109</sup> De même l'utilisation de poly(L-lactide) au lieu de poly(D,L-lactide) provoque une dégradation plus lente, en raison de la cristallinité du poly(L-lactide) qui rend plus difficile la pénétration de l'eau au sein de la matrice de polymère et diminue par conséquent sa vitesse d'hydrolyse.

#### 1.3.2.2 Propriétés adjuvantes

En tant que telles, les particules de polyesters aliphatiques sont peu immunogènes. L'objectif principal a été le même que pour leur utilisation en thérapie, i.e. protéger, vectoriser et libérer l'antigène de manière contrôlée. Ainsi il a été démontré que l'administration d'antigènes piégés dans des microparticules de PLGA permet d'induire des immunisations efficaces systémique et mucosale.<sup>105</sup> C'est donc l'encapsulation ou l'adsorption d'antigène au cœur ou à la surface des particules qui rend le système immunogène. L'encapsulation d'antigènes dans des MP de PCL semble induire une réponse immunitaire très modérée, avec l'absence d'anticorps neutralisant par voie orale ou intranasale, à l'inverse des particules de PLGA.<sup>110</sup>

Les mécanismes d'adjuvantation, comme pour de nombreux adjuvants, sont peu connus, mais il est fait l'hypothèse que les particules agissent :

- suivant un effet dépôt de l'antigène, qui est progressivement libéré sur plusieurs semaines voire plusieurs mois,<sup>52</sup>
- en induisant une inflammation qui permet le recrutement des CPA<sup>102</sup> et
- en induisant la phagocytose de l'antigène associé aux particules.<sup>111</sup>

Le pouvoir d'adjuvantation de ces systèmes semble être largement dû à leur capture par les cellules dendritiques, la délivrance d'antigènes suivie de leur digestion et de leur présentation selon les deux voies CMH I et CMH II, avec l'induction de réponses humorale et cellulaire satisfaisantes.<sup>57</sup> Les nanoparticules (NP) de PLA/PLGA dans lesquelles sont encapsulées des protéines semblent faire intégrer leur antigène dans la voie du CMH I et induisent une réponse humorale plus faible que les MP.<sup>112,113</sup>

Un des atouts de la vectorisation par l'encapsulation d'antigènes dans les particules est leur capacité à les libérer suivant un mode continu ou pulsé, mimant ainsi les doses répétées des plannings de vaccination traditionnelle, dans une optique de vaccin à dose unique.<sup>114</sup> Lorsqu'une protéine ou un principe actif est encapsulé dans les particules de PLA/PLGA, il semble se produire une libération en deux temps. Les travaux de Panyam *et coll.*<sup>115</sup> sur le relargage de la BSA (Bovine Serum Albumin), encapsulée dans des particules de PLGA de tailles variées, semble indiquer un "*burst*" initial (libération rapide d'une forte quantité), accompagné d'une phase, où la protéine est peu, voire pas du tout libérée. L'intégrité de l'antigène peut être touchée soit pendant le processus d'encapsulation,<sup>116</sup> soit lorsqu'il est administré et que le processus d'hydrolyse se met en place, provoquant alors un micro-environnement acide au cœur des particules pouvant dénaturer l'antigène,<sup>115,117</sup> ou encore pendant le stockage.<sup>4</sup> Or selon la FDA, un produit pharmaceutique est considéré stable, lorsqu'il ne se détériore pas à plus de 10 % après 2 ans.

Différentes stratégies ont été alors adoptées pour augmenter la stabilité d'une protéine encapsulée

dans des nanoparticules et le maintien de sa conformation. La plupart consiste en l'ajout d'additifs, tels que des polymères (poly(éthylene glycol) PEG), des sucres, des tensioactifs, des protéines, des alcools, des acides aminés ou encore des sels.<sup>116</sup>

Une alternative est l'adsorption de protéines à la surface des particules. Cette approche est moins sujette à la dégradation de l'antigène puisque celui-ci est simplement post-adsorbé sur les NP préalablement préparées. Le passage de l'antigène du cœur à la surface des particules ne semble pas altérer la qualité de la réponse immunitaire. En effet, l'adsorption de protéines à la surface de vecteurs à base de PLA induit une réponse cellulaire importante.<sup>5,118</sup> L'adsorption de la p24 du VIH à la surface de nanoparticules de PLA chargées négativement permet d'obtenir une réponse sérologique puissante chez la souris, le lapin et le macaque, mais aussi une réponse forte des cellules T cytotoxiques avec la sécrétion de cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2) chez la souris et d'IFN- $\gamma$  produit par les cellules T CD4+ et T CD8+ chez le macaque.<sup>119,120</sup> Les travaux de Lamalle-Bernard *et coll.*<sup>103</sup> offrent même des perspectives de co-adsoprtion, puisque celle de la p24 et de la gp120 sur des NP de PLA anioniques permet d'induire de bonne réponse humorale anti-p24 et anti-gp120 sans toucher à l'intégrité des deux antigènes. Les travaux de Guillon *et coll.*<sup>121</sup> montrent cependant que l'adsorption d'antigène, bien qu'elle ne touche pas à l'amplitude du titre d'anticorps, peut modifier en revanche le spectre d'anticorps produits, puisque certaines parties des protéines peuvent être masquées et que la libération de la protéine antigénique peut être lente.

De plus, Primard *et coll.*<sup>122</sup> ont démontré que des NP de PLA d'environ 200 nm sont capables de traverser des muqueuses modèles *ex vivo* et *in vivo*, faisant la preuve du concept que l'administration orale par gavage permettrait aussi de faire passer les particules à travers la muqueuse intestinale, sans dégrader le système. Ceci est très intéressant dans l'optique de développer un vaccin contre les maladies des muqueuses telles que le VIH, la maladie de Crohn ou les maladies colorectales.

La charge de surface des NP de PLA est généralement négative, en raison du procédé de synthèse du PLA qui entraîne l'apparition de fonctions acide carboxylique (déprotonées à pH neutre) présentes en bout de chaîne de PLA. Des modifications de surface peuvent être effectuées pour obtenir des NP cationiques, par adsorption de polycation à la surface des NP, comme le poly(éthylènimine), le chitosane ou encore le poly((2-diméthyl-amino)éthyl méthacrylate).<sup>123, 124</sup> Rendre les particules cationiques est intéressant, lorsqu'on souhaite adsorber, condenser et stabiliser des acides nucléiques, dans une optique de vaccination ADN.<sup>125</sup>

#### 1.3.3 Vers des nanoparticules biomimétiques

#### 1.3.3.1 Généralités

Avec les progrès effectués dans les domaines de l'immunologie et des biotechnologies, la recherche tend à développer des systèmes en s'inspirant des pathogènes, puisqu'ils ont développé des mécanismes efficaces pour envahir notre organisme tout en essayant de contourner notre immunité.<sup>45</sup> Ils demeurent donc les systèmes les plus compétents pour stimuler et activer notre immunité. S'inspirer de ces systèmes et développer des systèmes biomimétiques (du latin *bio* : vie et *mimesis* : imiter) est donc complètement justifié. Jusqu'alors lorsque le vaccin vivant atténué ne pouvait être utilisé, l'utilisation de vaccins inactivés agrémentés de sels d'aluminium pour augmenter la réponse immunitaire était la seule option envisageable. Néanmoins, l'utilisation de ces systèmes ne permet d'obtenir que des réponses humorales, efficaces certes, mais exemptes de réponses cytotoxiques. La conception de vaccins par analogie de structure au virus a clairement fait ses preuves en études pré-cliniques et en usage chez l'homme. Des systèmes de mime, tels que les vecteurs viraux, les virosomes et les VLP, ont vu le jour et permettent généralement d'obtenir des titres élevés d'anticorps et d'excellentes réponses cellulaires cytotoxiques.<sup>45</sup>

Les NP et MP de polymères sont des plateformes technologiques, dont la taille et la forme peuvent être bien maîtrisées. Grâce à leur taille et leur forme sphérique les nanoparticules de PLA représentent ainsi d'excellents analogues structuraux aux virus.

Cependant, les particules de PLA sont complètement dépourvues de tout le matériel nécessaire pour aboutir aux mêmes mécanismes de reconnaissance qui s'établissent entre l'hôte et le pathogène. Or un pathogène véhicule de nombreux ligands, spécifiques ou non sur sa surface et en son cœur, comme nous l'avons vu dans la section 1.1.2.

Afin de copier la nature, la recherche s'emploie à développer, de plus en plus, des particules de polymères possédant un ou plusieurs ligands. Nous avons déjà vu que l'ajout de protéines antigéniques dans le cœur ou à la surface des particules permettait d'augmenter les réponses immunitaires dirigées contre l'antigène employé. Des ligands de PRR propres aux cellules de l'immunité et particulièrement aux cellules dendritiques, pivots de l'immunité peuvent également être associés aux particules<sup>111, 126</sup> pour en améliorer leur potentiel vaccinal.

Ainsi dans une optique de mime, la préparation de particules génériques adjuvantes peut être envisagée. De manière logique, les éléments qui sont retrouvés dans la matrice du pathogène (ou leurs analogues synthétiques), généralement hydrophobes, pourront être préférentiellement encapsulés. L'encapsulation d'une large gamme de biomolécules est facilement réalisable dans les nanoparticules en choisissant une méthode appropriée d'élaboration de particules, dépendante de la nature chimique du ligand à piéger. Les ligands de surface des pathogènes pourront être retrouvés à la surface des particules. Ces différentes stratégies ont pour objectif d'obtenir des systèmes polyvalents d'adjuvants, comme exposé dans la Figure 1.8, qui peuvent activer différents PRR.



FIGURE 1.8 – Biomimétisme de structures entre le VIH, donné en exemple, et les systèmes génériques de particules en développement pour mimer les structures de pathogènes, où des biomolécules naturelles ou synthétiques se retrouvent au cœur  $(\bullet)$  et à la surface  $(\blacktriangle)$  des particules.

#### 1.3.3.2 Fonctionnalisation de surface

À l'inverse de la fonctionnalisation de surface par adsorption de protéines antigéniques (plusieurs milliers de Da), il est préféré le couplage covalent pour la fonctionnalisation de surface par des ligands qui sont généralement de petites molécules (quelques centaines de Da). Cependant, le couplage covalent de biomolécules est difficilement réalisable en tant que tel sur des particules de PLA nues. Ces dernières présentent pour seules fonctions réactives de surface les acides carboxyliques de bouts de chaînes du PLA. Ainsi, plusieurs stratégies existent pour coupler des biomolécules à la surface des particules : l'activation des fonctions acide carboxylique ou l'utilisation d'un copolymère à blocs bioconjugué.

#### - Modification de l'acide carboxylique terminal du PLA

Le couplage covalent peut se faire (i) soit en milieu organique sur le PLA fonctionnalisé en bout de chaîne par l'acide carboxylique avant l'élaboration de particules, (ii) soit sur la suspension de particules préalablement formées dont les fonctions acide carboxylique sont présentes à la surface des particules. Des particules fonctionnelles schématisées dans la Figure 1.9 (a) sont obtenues dans les deux cas.

(i) Bondioli *et coll.*<sup>127</sup> ont synthétisé un PLGA terminé en bout de chaînes par l'acide sialique. L'acide carboxylique terminal du PLGA est activé en ester de *N*-succinimidyl (NS), en présence de DCC (dicy-clohexylcarbodiimide) et de NHS (*N*-hydroxysuccinimide), pour réaction avec le dérivé d'acide sialique

préalablement aminé. Le polymère PLGA-acide sialique ainsi obtenu est utilisé pour la fabrication de particules décorées en surface par cet acide.

(ii) Hamdy *et coll.*<sup>96</sup> ont choisi la voie de l'activation des fonctions acides présentes à la surface des particules par l'EDC (1-éthyl-3-(3- diméthylaminopropyl) carbodiimide) en présence de sulfo-NHS pour faire réagir le mannane préalablement aminé. Cette stratégie a été également exploitée par Brandhonneur *et coll.*<sup>128</sup> pour le couplage de plusieurs ligands : un peptide contenant la séquence RGD (interaction avec les intégrines) ou la séquence RAD, un résidu mannose (mannose-PEG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>), l'agglutinine de germes de blé et l'albumine sérique bovine.



FIGURE 1.9 – Systèmes génériques obtenus par fonctionnalisation de surface (a) à partir des fonctions acide carboxylique activées et (b) à l'aide d'un copolymère amphiphile

#### - Utilisation d'un copolymère à blocs comme tensioactif

Il peut être aussi intéressant d'utiliser un copolymère à blocs sur lequel sera couplé le ligand d'intérêt, avant ou après élaboration des particules, de manière à favoriser l'accessibilité de la biomolécule par les cellules cibles.

Rieger *et coll.*<sup>129</sup> ont synthétisé un copolymère amphiphile PCL-*b*-POE (POE : poly(oxyde d'éthylène)), qui peut être fonctionnalisé en bout de chaînes POE par une biomolécule, ici le D-mannose, et être utilisé comme tensioactif dans l'élaboration de nanoparticules fonctionnalisées de PLA (Figure 1.9 (b)). Les fonctions hydroxyle du D-mannose sont préalablement acétylées, glycosylées en  $\alpha$  par le 2bromoéthanol et déprotégées pour aboutir à un dérivé bromé de la fonction anomérique  $\alpha$  du D-mannose acétylé, le 2-bromo-éthyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside. Ce dernier est utilisé pour quaterniser l'amine tertiaire terminale du POE du copolymère à blocs PCL-*b*-POE. Le copolymère amphiphile ainsi obtenu est ensuite utilisé pour la formation de NP en présence de PLA par nanoprécipitation.<sup>130</sup> Cette stratégie a aussi été privilégiée par Fievez *et coll.*<sup>131</sup> pour le couplage de différents ligands non peptidiques pour la vaccination orale.

Gref *et coll.*<sup>132</sup> ont aussi utilisé un copolymère à blocs PCL-*b*-PEG fonctionnalisé en bout de chaîne du bloc hydrophile PEG par une biotine. Cette stratégie permet d'associer de nombreux ligands, via un système PCL-*b*-PEG-biotine/streptavidine/biotine-ligand grâce à l'interaction spécifique non covalente entre la biotine et la streptavidine. Cette interaction présente de nombreux avantages, tels que l'obtention rapide de la liaison, une absence d'influence du pH, de la température, des solvants organiques et une résistance à la protéolyse enzymatique qui a lieu dans le tube digestif. Ils ont pu ainsi associer efficacement une lectine biotinylée modèle, telle que l'agglutinine de germes de blé.

### 1.4 Projet de thèse

#### 1.4.1 Choix des ligands

L'objectif principal actuel des formulations vaccinales est de cibler efficacement les CPA, tout particulièrement les DC. Ainsi, notre objectif est de développer de nouvelles NP de PLA décorées par différents ligands immunostimulants : (i) en surface : le D-mannose ou le nonapeptide du segment 163-171 de l'IL-1 $\beta$ et (ii) au cœur : l'imiquimod.

Le D-mannose est la plus petite unité reconnue par les TLR4 et les CLR. À titre d'exemple, lorsqu'il est couplé à la surface de liposomes, il permet d'augmenter la capture et la présentation de ces systèmes aux cellules T par les CPA avec l'initiation des réponses immunitaires associées, de façon plus efficace qu'un système sans mannose.<sup>93, 133, 134</sup>

L'IL-1 $\beta$  est impliquée en tant que telle dans le développement et le maintien de la réponse inflammatoire et est responsable notamment d'une augmentation de la température lors de l'infection.<sup>135</sup> Elle joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire en participant à l'activation et l'expansion clonale des cellules T et à la différenciation et la prolifération des lymphocytes B en favorisant la production d'IL-2 et d'IL-4.<sup>135</sup> Le résidu hautement hydrophile correspondant au fragment situé en position 163-171 de l'IL-1 $\beta$  est composé de neuf acides dont la séquence est VQGEESNDK. Son administration *in vivo* développe certaines propriétés immunostimulantes de manière similaire à l'IL-1 $\beta$  dans son intégralité sans toutefois être pyrogène. De ce fait, sa présence à la surface de NP devrait permettre d'accroître les réponses immunes cellulaire et humorale.

Notre choix de ligand de cœur s'est porté sur l'utilisation d'une molécule approuvée par la FDA, qu'est l'imiquimod ou 1-(2-methylpropyl)-1*H*-imidazo[4,5-c]quinoline-4 amine, encore connu sous les phrases

sécurité et risque S-26308 et R-837. Comme vu précédemment, il est un excellent ligand synthétique des TLR7 et des NLRP3. Son administration permet d'augmenter la réponse immunitaire cellulaire. L'administration par voie topique de ce principe actif permet d'induire la sécrétion d'IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  et d'IL-12,<sup>136</sup> entre autres, qui viennent donc activer la composante cellulaire de notre immunité. Son caractère hydrophobe doit permettre son encapsulation dans les NP de PLA.

#### 1.4.2 Stratégie de couplage des ligands de surface

Pour effectuer le couplage des ligands en surface, notre stratégie repose sur l'utilisation d'un copolymère à blocs amphiphile comme tensioactif (de manière similaire à la stratégie précédemment exposée), comprenant :

(i) un bloc hydrophobe de PLA pour permettre l'ancrage du copolymère dans les NP de PLA,

(ii) un bloc hydrophile composé d'unités *N*-vinylpyrrolidone (NVP) hydrophiles et d'unités *N*-acryloxysuccinimide (NAS), dont les fonctions ester de *N*-succinimidyle (NS) permettent le couplage de ligands.

Cette stratégie permet la fonctionnalisation tout le long du bloc hydrophile (Figure 1.10 (a)) et non plus uniquement en bout de chaîne, comme c'est le cas pour les particules stabilisées par des copolymères de PCL-*b*-PEG précédemment décrites, et donc d'obtenir une densité de biomolécules en surface potentiellement bien plus importante.



FIGURE 1.10 – (a) Schéma du système final souhaité pour ce projet de thèse avec une fonctionnalisation au cœur (● imiquimod) et à la surface (▲ peptide ou D-mannose). (b) Structure chimique du copolymère amphiphile sélectionné PLA-b-P(NAS-co-NVP)

Le monomère vinylique NAS est bien connu et très utilisé pour la capacité de son ester activé de NS à réagir avec des biomolécules dotées d'amines primaires.<sup>137</sup> Quant à la NVP, son polymère correspondant PNVP représente une alternative prometteuse aux PEG classiquement utilisés.<sup>138,139</sup>

## 1.5 Conclusion

Ce chapitre bibliographique a permis d'établir les bases fondamentales de l'immunité, avec notamment les phénomènes de reconnaissance entre les PRR de nos cellules et les PAMP des pathogènes. Ces phénomènes de reconnaissance permettent de développer l'immunité adaptative avec notamment la mémoire immunitaire.

Or c'est grâce à l'existence d'une mémoire immunitaire après une première contamination qu'il a été possible de développer des vaccins, ce qui a permis de contribuer à la diminution drastique de nombreuses maladies infectieuses potentiellement mortelles.

Hormis pour les vaccins à base de pathogènes vivants atténués, un vaccin requiert l'utilisation d'adjuvants. Les seuls actuellement approuvés par les grandes autorités sont les sels d'aluminium depuis plus de 80 ans, les VLP et les virosomes depuis une décennie environ. Toutefois les vaccinations contre le VIH, le *Plasmodium* (responsable du paludisme) ou encore le virus de l'hépatite C ne sont pas encore d'actualité.

C'est pourquoi la recherche tend à développer de nouvelles alternatives et notamment celles à base de particules de polymères, qui constituent une plateforme modulable d'adjuvants. Parmi les NP les plus utilisées, les NP de PLA ont montré leur efficacité pour augmenter l'immunogénicité d'antigènes encapsulés ou adsorbés en leur surface.

Dans le but d'accroître encore leur potentiel vaccinal, l'objectif de cette thèse est la préparation de NP de PLA fonctionnalisées par des ligands immunostimulants. Notre stratégie repose sur l'utilisation d'un tensioactif macromoléculaire de poly(acide lactique)-*b*-poly(*N*-acryloxysuccinimide-*co-N*vinylpyrrolidone) PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP), dont les fonctions ester de NS permettront le couplage en surface d'une densité présumée importante de ligands pour une efficacité vaccinale espérée accrue.

# Chapitre 2

# Synthèse du copolymère amphiphile PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP)

#### Sommaire

<b>2.1</b>	Rap	pels bibliographiques	46
	2.1.1	Généralités sur la polymérisation radicalaire contrôlée et vivante $\ . \ . \ . \ .$	46
	2.1.2	Les systèmes de polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) $\hdots$	51
	2.1.3	Polymérisation par ouverture de cycle (ROP) d'esters cycliques	60
	2.1.4	Synthèse de copolymères à blocs par couplage ROP/PRC $\hfill \ldots \ldots \ldots \ldots$	67
	2.1.5	Quelques notions sur la copolymérisation	71
<b>2.2</b>	Étuc	le de la synthèse d'homo- et copolymères à base de NAS	74
	2.2.1	Étude de la NMP du NAS amorcée par la MAMA-SG1	75
	2.2.2	Étude de la NMP du NAS et de la NVP amorcée par la MAMA-SG1	82
2.3	Synt	hèse du copolymère à blocs $PLA-b-P(NAS-co-NVP)$ par couplage	
	ROF	P/NMP	86
	2.3.1	Synthèse de la macro-alcoxyamine PLA-SG1	87
	2.3.2	Copolymérisation du NAS et de la NVP amorcée par le PLA-SG1	91
2.4	Con	clusion	95

E deuxième chapitre de ce manuscrit est consacré à la synthèse et à la caractérisation du copolymère dibloc amphiphile poly(D,L-lactide)-b-poly(N-acryloxysuccinimide-co-N-vinylpyrrolidone)(PLA-b-P(NAS-co-NVP)). Ce copolymère à blocs est obtenu par la combinaison de la polymérisation par ouverture de cycle et de la polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes. Il sera utilisé comme tensioactif macromoléculaire dans l'élaboration de nouvelles micelles et particules fonctionnelles. La polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) du NAS n'étant que très peu répertoriée dans la littérature et la PRC du couple de monomères NAS/NVP n'ayant jamais été effectuée, dans un premier temps, l'homopolymérisation du NAS et sa copolymérisation avec la NVP par NMP à partir d'une alcoxyamine modèle, la MAMA-SG1, seront étudiées. Leur copolymérisation par NMP à partir de la macro-alcoxyamine PLA-SG1 sera ensuite abordée pour aboutir au copolymère désiré. Les travaux décrits dans ce chapitre ont fait l'objet d'une partie de la publication : Handké, N.; Trimaille, T.; Luciani, E.; Rollet, M.; Delair, T., Verrier, B.; Bertin, D. and Gigmes, D., J. *Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.* **2011**, 49 :1341-1350.

# 2.1 Rappels bibliographiques

Notre objectif est la synthèse du copolymère à blocs PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP), qui nécessite l'association de deux voies de polymérisation : la polymérisation par ouverture du cycle (ROP pour *Ring Opening Polymerization*) du D,L-lactide et la polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (NMP abréviation de *Nitroxide Mediated Polymerization*) du NAS et de la NVP. Quelques rappels bibliographiques sont donc effectués dans un premier temps sur les différentes polymérisations employées (PRC et ROP), sur les différentes stratégies de combinaison de ces deux voies et sur les généralités concernant la copolymérisation.

#### 2.1.1 Généralités sur la polymérisation radicalaire contrôlée et vivante

#### 2.1.1.1 Polymérisation radicalaire conventionnelle

Plus de 50 % des matières plastiques et 70% des polymères vinyliques sont obtenus par Polymérisation Radicalaire (PR). La PR a plusieurs avantages, que sont la facilité de mise en œuvre, une bonne tolérance à l'eau (une simple purge de l'oxygène est suffisante), une utilisation sur une large gamme de monomères dans des milieux homogènes (i.e. masse, solvant) ou hétérogènes (suspension, émulsion).

La PR est un procédé de polymérisation en chaîne, basé sur la propagation d'un centre actif radicalaire, et se divise en trois grandes étapes réactionnelles : l'amorçage, la propagation et la terminaison (Figure 2.1).

L'étape d'amorçage consiste en la décomposition homolytique d'un amorceur A-A pour former deux radicaux primaires A•, qui s'additionnent sur une unité monomère M pour former un radical AM•. L'homolyse de l'amorceur peut être la conséquence d'une activation thermique, photochimique ou d'une réaction d'oxydoréduction. Cette étape est caractérisée par deux constantes cinétiques : une constante de dissociation de l'amorceur  $(k_d)$  et une constante d'addition des radicaux primaires A• sur le monomère M  $(k_{add})$ .



FIGURE 2.1 – Mécanisme de polymérisation radicalaire conventionnelle

L'espèce AM• obtenue est donc la première unité monomère activée et constitue ainsi l'espèce amorçante. Elle peut s'additionner sur d'autres monomères M au cours de l'étape de propagation, caractérisée par une constante de vitesse de propagation  $(k_p)$ , pour former des espèces AM•<sub>n</sub> qui peuvent s'additionner sur une nouvelle unité monomère M. La croissance des chaînes de polymères est la conséquence de la répétition du processus d'addition des radicaux propagateurs sur des unités monomères. La croissance des chaînes peut être stoppée soit par un processus de terminaison par recombinaison de deux chaînes de polymères entre elles  $(k_{tc})$ , soit par terminaison par dismutation  $(k_{td})$ , ou encore par des réactions de transfert d'un atome d'hydrogène situé en  $\beta$  du centre radicalaire sur un autre radical. Le processus de terminaison inactive les chaînes de polymères, i.e. les rend incapables d'additionner d'autres unités monomères.

En plus de ces trois étapes élémentaires de la PR, il peut se produire des réactions de transfert de chaînes qui entraînent la formation de masses molaires plus faibles que celles attendues. Les réactions de transfert sont caractérisées par une constante de vitesse notée  $k_{tr}$  pour un transfert d'atome X, comme l'hydrogène provenant d'une molécule du milieu réactionnel (R-X) : monomère, solvant, amorceur ou chaînes de polymères en croissance.

En somme, les PR sont caractérisées par des étapes de terminaisons irréversibles, qui limitent le réamorçage de nouvelles polymérisations et donc l'obtention de copolymères à blocs. Une grande hétéro-

généité des chaînes de polymères formées est à constater en raison des centres radicalaires qui naissent et meurent à tout instant de la polymérisation, à cause d'un amorçage lent et des réactions de transfert et de terminaison, qui ont lieu tout au long de la polymérisation. En conséquence, la synthèse de polymères à architecture complexe et bien définis est difficile par cette technique.

#### 2.1.1.2 Polymérisation vivante

Les polymérisations ioniques permettent la synthèse de polymères vivants. En effet, ces systèmes, qui impliquent comme amorceur une espèce nucléophile pour la voie anionique et une espèce électrophile par la voie cationique, sont caractérisés par des chaînes propagatrices dotées d'un centre actif ionique (anion ou cation), qui empêche la terminaison des chaînes de polymères en croissance par réactions de centres actifs entre eux. C'est en 1956 que Szwarc<sup>140</sup> fut le premier à décrire les polymérisations vivantes comme procédés de polymérisation exempts de réaction de terminaison et de réaction de transfert, permettant le maintien du centre actif en bout de chaînes de polymères en fin de réaction. Ainsi, par voie anionique, un copolymère tribloc polyisoprène-*b*-polystyrène-*b*-polyisoprène (PI-*b*-PS-*b*-PI) a pu être synthétisé en deux étapes : polymérisation du styrène amorcée par un anion dérivé du naphtalène puis ajout du monomère isoprène en fin de polymérisation du styrène pour qu'il se polymérise à son tour.<sup>141</sup> Il a donc démontré que les chaînes de PS restent actives en fin de polymérisation pour réamorcer la polymérisation d'un autre monomère. Dans un procédé de polymérisation vivante, la croissance des chaînes de polymères cesse dès lors que la totalité du monomère est consommée, mais peut recommencer avec l'ajout de nouvelles unités monomères.

Cependant, les systèmes de polymérisations ioniques sont aussi susceptibles de subir des réactions de terminaison provoquant la désactivation des chaînes en croissance en présence d'impuretés (eau, molécules protiques) dans le milieu réactionnel. Les polymérisations ioniques nécessitent donc des conditions drastiques de mise en œuvre, avec une purification poussée des composants de réaction (monomère, solvant, amorceur...). La gamme de monomères polymérisables par cette voie est restreinte, puisque la sensibilité de ces polymérisations empêche l'utilisation de monomères dotés de groupements fonctionnels, qui peuvent interférer avec les espèces ioniques pour désactiver le centre actif propagateur. De plus, contrairement à la PR, à cause des problèmes de sensibilité à l'eau, l'utilisation de cette technique n'est pas envisageable pour obtenir des polymères en émulsion ou en suspension.

Ainsi le développement de procédés de polymérisation radicalaire contrôlée et vivante (PRC) a été stimulé par la volonté d'associer les avantages de la polymérisation ionique (synthèse de copolymères à blocs, contrôle des bouts de chaînes) à ceux de la PR (facilité de mise en œuvre, large gamme de mono-
mères exploitables).

C'est en 1982, que le concept de polymérisation radicalaire vivante a été décrit pour la première fois par Otsu et Yoshida.<sup>142</sup> Ces derniers ont développé des iniferters, qui, par clivage réversible, donnent accès à des molécules capables d'amorcer (INItiator) puis d'effectuer des réactions de transfert (trans-FER) et de terminaison (TERminaison). Les auteurs ont ainsi polymérisé le styrène et le méthacrylate de méthyle (MMA) à partir d'iniferters et ont obtenu des homopolymères PS et PMMA, caractérisés par un bout de chaînes issu de l'iniferter. Ils ont prouvé le caractère vivant en réussissant à polymériser du styrène et du MMA à partir de chacun des deux macro-iniferters obtenus précédemment. La synthèse de copolymères à blocs est dès lors possible par voie radicalaire. Le caractère vivant est assuré par un mécanisme de terminaison réversible entre les macro-radicaux et les chaînes dormantes inactives sous forme de macro-iniferters.<sup>143</sup>

Cependant, bien que les terminaisons irréversibles soient bien moins probables que lors d'une PR classique, elles ne peuvent être complètement supprimées. C'est pourquoi ce type de polymérisation radicalaire est davantage caractérisé comme une polymérisation radicalaire "pseudo-vivante".

# 2.1.1.3 Le caractère contrôlé

Le caractère vivant permet de contrôler la fonctionnalité des bouts de chaînes des polymères. Néanmoins, il n'induit pas obligatoirement une masse molaire contrôlée du polymère synthétisé avec une distribution des masses molaires étroite (polymolécularité faible). Pour atteindre ces objectifs d'homogénéité en masse molaire, il faut introduire le concept de polymérisation radicalaire contrôlée (Figure 2.2).



FIGURE 2.2 – Illustration de l'affinement de la distribution des masses molaires par l'utilisation de la polymérisation contrôlée (—) par rapport à la polymérisation classique (—)

L'indice de polymolécularité  $(I_p)$  caractérise la distribution des masses molaires et reflète donc l'hétérogénéité de la taille des chaînes. Il est défini comme étant le rapport de la masse molaire moyenne en masse du polymère  $(\overline{M_w})$  sur sa masse molaire moyenne en nombre  $(\overline{M_n})$  (Équations 2.1). Idéalement l' $I_p$  vérifie une distribution de Poisson définie par  $I_p = 1 + 1/DP_n$  pour un système contrôlé. Si toutes les chaînes d'un polymère avaient la même masse molaire, alors l' $I_p$  prendrait la valeur idéale de 1.

$$\overline{M_w} = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \qquad \overline{M_n} = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \qquad I_p = \frac{\overline{M_w}}{\overline{M_n}}$$
(2.1)

où N représente le nombre de moles de l'espèce i de masse molaire  $M_i$ .

Pour des polymérisations ioniques contrôlées, l' $I_p$  est généralement compris entre 1.0 et 1.2. Pour des polymérisations radicalaires, le système est considéré contrôlé lorsque l' $I_p$  est inférieur à 1.5. Lorsqu'une polymérisation est contrôlée, il devient alors possible de prévoir la masse molaire obtenue, puisque celle-ci évolue linéairement avec la conversion du monomère. Pour cela, il est nécessaire qu'aucune réaction de transfert et de terminaison n'ait lieu pendant l'étape de propagation ; la masse molaire pourra alors être prédite suivant l'équation 2.2 :

$$M_n = \left(\frac{[M]_0}{[A]_0} \times M_{monom\,\grave{e}re} \times C\right) \tag{2.2}$$

où  $[M]_0, [A]_0, M_{monomère}$  et C représentent respectivement les concentrations initiales en monomère et en amorceur, la masse molaire du monomère et sa conversion.

Cependant il ne faut pas confondre polymérisation vivante et contrôlée, puisqu'une polymérisation peut être contrôlée sans être vivante et réciproquement. La Figure 2.3 illustre les différents cas rencontrés.



FIGURE 2.3 – Représentation schématique des caractères vivant et contrôlé d'une polymérisation.

Ainsi pour obtenir des copolymères à blocs bien définis, il est nécessaire de combiner les caractères vivant et contrôlé, permettant d'aboutir à des polymères homogènes en taille et capables de réamorcer une polymérisation. Dans la suite de ce mémoire, le terme PRC pour Polymérisation Radicalaire Contrôlée sera utilisé pour englober les systèmes de polymérisation à la fois contrôlée et vivante, par opposition à la PR conventionnelle.

# 2.1.2 Les systèmes de polymérisation radicalaire contrôlée (PRC)

# 2.1.2.1 Généralités

L'objectif majeur du développement des PRC est de réussir à diminuer les réactions de terminaisons et de transferts irréversibles. Ainsi depuis plus de 20 ans, trois principales techniques de PRC ont vu le jour. Le contrôle de ces polymérisations repose sur la terminaison ou le transfert réversible des espèces radicalaires en croissance, pour former des espèces dites dormantes, toujours dans l'optique de protéger l'espèce radicalaire d'une terminaison prématurée. Les trois procédés majeurs développés dans ce but sont la RAFT (*Reversible Addition Fragmentation chain Transfer*), l'ATRP (*Atom Transfer Radical Polymerization*) et la NMP (*Nitroxide Mediated Polymerization*).

La technique RAFT repose sur un mécanisme de transfert dégénératif réversible, correspondant à un échange entre un radical en croissance et un agent de transfert selon un mécanisme d'addition/fragmentation (Figure 2.4). Les espèces polymères en croissance participent alors à un équilibre et se trouvent alternativement sous leurs formes dormantes  $M_n$ -X et actives  $M_n^{\bullet}$  réduisant ainsi la probabilité que les chaînes de polymères subissent des terminaisons.



FIGURE 2.4 – Mécanisme de transfert dégénératif, sur lequel repose le procédé RAFT

C'est en s'inspirant des travaux d'Otsu et Yoshida,<sup>142, 143</sup> que les méthodes ATRP et NMP ont vu le jour, en s'appuyant sur un mécanisme de terminaisons réversibles caractérisé par un transfert d'atome pour l'ATRP ou d'un groupe d'atomes pour la NMP entre espèces actives  $M_n^{\bullet}$  et dormantes  $M_n$ -X, via la création d'une liaison covalente (Figure 2.5).



FIGURE 2.5 – Mécanisme de terminaison réversible, sur lequel reposent les procédés ATRP et NMP

Cet équilibre est fortement déplacé dans le sens de la formation des espèces dormantes  $M_n$ -X, la constante de vitesse d'activation  $(k_{act})$  étant faible par rapport à la constante de vitesse de désactivation  $(k_{desact})$  et de propagation  $(k_p)$ . Cela permet de diminuer la concentration en radicaux dans le milieu et donc la probabilité des réactions de terminaison bimoléculaire. Les chaînes dormantes  $M_n$ -X peuvent à tout moment être activées pour additionner de nouvelles unités monomères et revenir très rapidement sous leurs formes dormantes. Cet équilibre est généralement gouverné par l'Effet Radical Persistant (ERP) mis en évidence par Fischer.<sup>144, 145</sup>

Pour qu'une polymérisation soit qualifiée de vivante et de contrôlée, elle se doit de répondre simultanément à plusieurs critères :

- La durée de l'étape d'amorçage doit être courte, pour que toutes les chaînes de polymères croissent en même temps contrairement à la PR classique.
- La vitesse d'échange entre chaînes dormantes et chaînes propagatrices doit être au moins aussi rapide que la vitesse de propagation pour contrôler la vitesse de croissance des chaînes de polymères.
- L'expression logarithmique de la conversion, donnée par le  $(\ln[M]_0/[M])$ , évolue linéairement en fonction du temps t (si la réaction est d'ordre 1 par rapport à [M]) ou en fonction de  $t^{2/3}$  (si la réaction est gouvernée par l'EPR), [M] étant la concentration en monomère. La linéarité indique que la concentration des chaînes en croissance est sensiblement constante au cours du temps. Une

déviation positive ou négative par rapport à la linéarité indique respectivement un amorçage lent ou la présence de réactions de terminaisons (Figure 2.6 (a)).



FIGURE 2.6 – Évolution (a) de l'expression logarithmique de la conversion en fonction du temps et (b) de la masse molaire et de l'indice de polymolécularité en fonction de la conversion en monomère.

– La masse molaire moyenne en nombre  $\overline{M_n}$  doit croître linéairement avec la conversion et suivre la droite théorique définie par l'équation 2.2 (p 50).

Ceci indique que le nombre de chaînes reste constant au cours du temps. Des masses molaires expérimentales supérieures aux valeurs théoriques sont la cause d'un amorçage inefficace ou de réactions de terminaison bimoléculaire. Des masses molaires inférieures aux valeurs théoriques sont le résultat de réactions de transfert (Figure 2.6 (b)).

- L'indice de polymolécularité  $I_p$  ( $\geq 1$ ) diminue avec la conversion en monomère pour tendre vers une distribution de Poisson définie par  $I_p=1+1/\text{DP}_n$  (Figure 2.6 (b)). Un  $I_p$  généralement faible est obtenu (<1.5).
- Le polymère obtenu doit être capable de réamorcer la polymérisation d'un monomère différent ou identique.

#### 2.1.2.2 Reversible Addition Fragmentation chain Transfer (RAFT)

La polymérisation RAFT est un procédé de PRC, basé sur le transfert réversible de chaînes par addition/fragmentation entre des chaînes propagatrices (macro-radicaux) et un agent de transfert (CTA de l'anglais *Chain Transfer Agent*). Elle est la seule technique à ne pas reposer sur l'ERP. Le transfert réversible à un composé doté d'une fonction dithio (-(C=S)-S) permet de diminuer la fréquence des réactions de terminaison sans modifier la concentration en macro-radicaux.

Pour obtenir un amorçage rapide et quantitatif, il est nécessaire d'utiliser un agent de transfert  $\underline{1}$  caractérisé par une constante de transfert  $C_{tr}$  élevée. Le choix du CTA est donc crucial pour le succès de la polymérisation. Rizzardo, en partenariat avec la société DuPont de Nemours,<sup>146,147</sup> a utilisé les

dithioesters  $\underline{2}$  et les trithiocarbonates  $\underline{3}$ . En parallèle, Zard, en partenariat avec la société Rhodia,<sup>148,149</sup> a développé une technique de PRC semblable au procédé RAFT, mais basé sur l'utilisation de xanthates  $\underline{4}$  et de dithiocarbamates  $\underline{5}$ , comme agents de transfert. Cette technique est appelée MADIX, pour *Macromolecular Design via the Interchange of Xanthate.* 



FIGURE 2.7 – Structures des agents de transfert

Le bon contrôle de cette technique est fortement dépendant de la structure du CTA et notamment de la nature des groupements R et Z, qui vont influencer les coefficients  $k_{add}$  (caractérisant l'addition du (macro)-radical sur le CTA) et  $k_{frag}$  (caractérisant la fragmentation du radical obtenu par l'addition du (macro)-radical sur le CTA) par effet de résonance, de polarité et d'encombrement stérique. Pour plus de précisions sur la RAFT, le lecteur est invité à se référer aux travaux de Chiefari et Rizzardo,<sup>150</sup> de Perrier et Takolpuckdee,<sup>151</sup> et de Favier et Charreyre.<sup>152</sup> La RAFT permet la polymérisation d'une large gamme de monomères.<sup>151–153</sup>

# 2.1.2.3 Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)

Le procédé ATRP dérive historiquement de la réaction de Kharasch,<sup>154, 155</sup> qui décrit l'addition du tétrachlorure de carbone CCl<sub>4</sub> sur des oléfines catalysée par des peroxydes, connue aussi sous le nom d'Addition Radicalaire par Transfert d'Atome (ATRA pour Atom Transfert Radical Addition).<sup>156</sup>

Le procédé ATRP a été développé en parallèle par Matyjaszewski<sup>157</sup> et Sawamoto<sup>158</sup> et repose sur des terminaisons réversibles mettant en jeu l'homolyse d'une liaison carbone-halogène C-X, catalysée par un complexe métallique suivant un processus d'oxydo-réduction (Figure 2.8). Le contrôle de la polymérisation est basé sur un système comprenant un métal de transition Mt de nombre d'oxydation n complexé par mmolécules de ligand L. Pendant le processus d'ATRP, ce complexe métallique arrache l'atome d'halogène porté par la chaîne de polymère R-M<sub>n</sub>-X. Le métal passe à un degré d'oxydation n + 1. La chaîne propagatrice R-M<sub>n</sub>• libérée peut alors s'additionner sur le monomère et propager jusqu'à recombinaison avec le radical halogène. Les constantes d'activation  $(k_{act})$  et de désactivation  $(k_{desact})$  dépendent directement de la nature du métal et du ligand. De manière semblable à la NMP, le système est ajusté afin de répondre à la condition  $(k_{act}) \ll ((k_{desact}), (k_p))$  et la cinétique de polymérisation est régie par l'effet radical persistant.



FIGURE 2.8 – Mécanisme de transfert réversible régissant la polymérisation radicalaire par transfert d'atome

Ainsi un paramètre important pour le contrôle de cette polymérisation est le couple métal/ligand. Le métal couramment utilisé en ATRP est le cuivre de degré d'oxydation I (Cu<sup>+</sup>), introduit généralement sous la forme de CuBr ou CuCl. D'autres métaux comme le nickel, le fer, le cobalt et le ruthénium ont fait leur preuve dans le bon contrôle de la polymérisation. Dans une moindre mesure, le molybdène, le palladium et le rhodium peuvent être aussi utilisés. Les ligands employés sont souvent des composés aminés, comme la bipyridine ou des dérivés de tri- ou tétraamine.<sup>159</sup>

#### 2.1.2.4 Nitroxide Mediated Polymerization (NMP)

La technique NMP s'appuie sur les travaux d'Otsu et Yoshida,<sup>142, 143</sup> dans lesquels les auteurs suggèrent que les réactions de terminaison pourraient être minimisées si les chaînes de polymère en croissance étaient engagées dans des réactions de terminaison réversible avec des espèces radicalaires stables.

La PR contrôlée par les nitroxydes est basée sur un équilibre entre chaînes dormantes et chaînes actives (Figure 2.9). Cet équilibre est régi par la rupture homolytique de la liaison NO-C d'une alcoxyamine libérant un radical en croissance et un radical nitroxyle  $R_1R_2NO^{\bullet}$ . Le radical libéré  $RM_n^{\bullet}$  peut alors s'additionner sur le monomère et propager tandis que le radical nitroxyle est dit persistant. Le radical propagateur reste très peu de temps sous sa forme active et recombine alors avec le radical nitroxyle pour former une macro-alcoxyamine, dite forme dormante.

Les coefficients de vitesse de dissociation  $(k_d)$  et de recombinaison  $(k_c)$  sont influencés par les substituants présents sur les nitroxyde (R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>). D'une manière similaire à l'ATRP, le contrôle de la croissance des chaînes de polymères est assuré quand  $k_d \ll (k_c, k_p)$ .<sup>160</sup>



FIGURE 2.9 – Mécanisme régissant la NMP

Comme précisée précédemment, la cinétique de la NMP peut être régie par l'effet radical persistant, phénomène décrit en 1986 par Fischer.<sup>144, 145</sup> Durant l'étape d'amorçage, une alcoxyamine, schématisée R-Y, se dissocie thermiquement pour former, à la même vitesse et en quantité égale, un nitroxyde stable Y<sup>•</sup> et un radical transitoire R<sup>•</sup> (Réaction A, Figure 2.10). Cependant, ce radical R<sup>•</sup> peut subir dans les premiers instants de la polymérisation des réactions de terminaison irréversible, telles que des dimérisations (Réaction B, Figure 2.10), provoquant un excès de nitroxydes Y<sup>•</sup>, dits persistants, dans le milieu. Ce même radical R<sup>•</sup> participe également à l'amorçage de la polymérisation en s'additionnant sur les unités monomères. L'excès de ces radicaux nitroxyle dans le milieu déplace alors l'équilibre de la réaction dans le sens de la formation des espèces R-Y. Les radicaux R<sup>•</sup> formés par la suite lors de la polymérisation ne peuvent alors plus que recombiner majoritairement avec les espèces Y<sup>•</sup>, entraînant une chute des radicaux R<sup>•</sup> et par conséquent une chute des réactions de terminaison (Réaction C, Figure 2.10).



FIGURE 2.10 – Mécanisme régissant l'effet radical persistant

La NMP est régie par la constante d'équilibre  $K_{eq}$  (Equation 2.3), qui relie la constante de vitesse de dissociation  $(k_d)$  et la constante de vitesse de recombinaison du nitroxyde avec les chaînes propagatrices  $M_n^{\bullet}(k_c)$ .

$$K_{eq} = \frac{k_d}{k_c} \tag{2.3}$$

Lorsque la constante de dissociation réversible est suffisamment faible pour abaisser la concentration en radicaux, le temps de demi-vie du radical propagateur est alors très faible et seules quelques unités monomères peuvent s'additionner avant la recombinaison avec le radical persistant. La succession d'une multitude de cycles activation/désactivation permet une croissance linéaire de la longueur de chaînes de polymères. Pour une étude approfondie des équations analytiques régissant l'ERP, le lecteur pourra se référer aux travaux de Fukuda<sup>161</sup> et Fischer.<sup>162</sup>

Les nitroxydes de formule générale  $R_1R_2NO^{\bullet}$  ont une forte capacité à réagir avec des radicaux carbonés. A l'origine, ces radicaux qualifiés de persistants et stables ont été utilisés comme agents de "spintrapping",<sup>163</sup> avant d'être valorisés en polymérisation radicalaire contrôlée par Solomon *et coll.*,<sup>164</sup> qui développèrent le TEMPO (2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle) en 1985 (Figure 2.11). Ce nitroxyde se révèle particulièrement efficace dans le contrôle de la polymérisation du styrène,<sup>165,166</sup> mais ne permet cependant que le contrôle de ce type de monomère. Tordo *et coll.*<sup>167</sup> ont élaboré par la suite des nitroxydes  $\beta$ -substitués, comme le TIPNO (2,2,5,5-tétraméthyl-4-héxyl-3-azahexane-3-oxyle)<sup>168,169</sup> puis le SG1 (*N*-tert-butyl-*N*-1-diéthylphosphoryl-2,2-diméthylpropyle)<sup>168,170-172</sup> (Figure 2.11), qui permettent un meilleur contrôle de la polymérisation des monomères styréniques. Les travaux avec le nitroxyde SG1 ont permis ensuite d'élargir la gamme de monomères polymérisables par NMP aux acrylates,<sup>168,171,172</sup> aux 1-3 diènes<sup>173</sup> mais aussi à l'acide acrylique<sup>174</sup> et à l'acrylonitrile.<sup>169</sup> Le principal inconvénient de la NMP reste tout de même son incompatibilité d'utilisation avec la famille des méthacrylates, même si récemment Guillaneuf *et coll.* ont réussi à contrôler la polymérisation du méthacrylate de méthyle (MMA)<sup>175</sup> grâce au nitroxyde DPAIO alors que jusqu'à présent elle nécessitait la présence de styrène en tant que co-monomère.<sup>176,177</sup>



FIGURE 2.11 – Structures chimiques de quelques nitroxydes utilisés en NMP

A l'origine de la NMP, des systèmes bicomposants<sup>168, 170, 178</sup> ont été utilisés pour amorcer la polymérisation. Ils sont composés d'un amorceur radicalaire classique comme l'azobisisobutyronitrile (AIBN), le peroxyde de benzoyle (BPO) ou encore le peroxyde de dicumyle (DCP) et d'un nitroxyde. Mais très rapidement, l'idée d'utiliser un système monocomposant<sup>166, 171</sup> a émergé pour s'imposer et conduire au développement d'alcoxyamines dérivées des nitroxydes TEMPO, TIPNO ou SG1 (Figure 2.11) pour l'amorçage de la NMP (Figure 2.12).



FIGURE 2.12 – Structures chimique de quelques alcoxyamines utilisées en NMP

Si l'utilisation du système monocomposant s'est imposé en masse, c'est parce qu'il permet un amorçage de meilleure qualité et l'obtention de polymères avec une distribution des masses molaires plus étroite. En effet, la liaison NO-C de l'alcoxyamine subit une dissociation homolytique, illustrée dans la Figure 2.13 avec l'alcoxyamine MAMA-SG1, pour produire à la fois le radical transitoire amorçant et le radical nitroxyle stable, qui joue son rôle de contrôleur.



Alcoxyamine MAMA-SG1

Radical alkyle

Nitroxyde SG1

FIGURE 2.13 – Dissociation thermique de la MAMA-SG1 en un radical alkyle instable et un radical nitroxyle SG1 persistant

Les monomères de type acrylate, comme le NAS qui nous intéresse dans le cadre de cette thèse, sont caractérisés par une constante de propagation  $k_p$  élevée. La polymérisation par NMP de ces monomères peut entraîner un temps de dissociation totale de l'alcoxyamine de départ supérieur au temps nécessaire pour obtenir 90 % de conversion en monomère. Le polymère est alors vivant mais le contrôle ne peut être assuré. Ainsi, il peut être nécessaire d'ajouter un excès de nitroxyde libre au début de la polymérisation, afin d'avoir une concentration en nitroxyde suffisante pour piéger les radicaux alkyle dès l'amorçage et pour empêcher que la conversion ne devienne trop importante pendant la phase de pré-équilibre. L'ajout de nitroxyde libre contribue au déplacement de l'équilibre vers la formation des chaînes dormantes, favorisant un meilleur contrôle de la cinétique de polymérisation. Grâce à cette stratégie, Gnanou *et coll.*<sup>171</sup> et Charleux *et coll.*<sup>174</sup> ont pu respectivement synthétiser par NMP du poly(acrylate de *n*-butyle) (PBA) et du poly(acide acrylique).

Toutefois la synthèse d'alcoxyamines hautement thermolabiles permet d'avoir une phase d'amorçage suffisamment rapide pour entrevoir la NMP des acrylates sans excès initial de nitroxyde libre, comme c'est le cas de la MAMA-SG1 contrairement à la MONAMS, ces deux alcoxyamines dérivant toutes deux du nitroxyde SG1. Cependant la MAMA-SG1 se dissocie 100 fois plus rapidement que la MONAMS, en raison de la formation d'un radical alkyle tertiaire plus stable que le radical alkyle secondaire obtenu après dissociation de la MONAMS (Tableau 2.1). L'influence du fragment alkyle sur la force de liaison NO-C de l'alcoxyamine et donc sur les coefficients de vitesse a été mise en évidence par Guillaneuf *et coll.*<sup>179</sup> La vitesse d'homolyse de la MAMA-SG1 100 fois plus rapide que celle de la MONAMS permet ainsi un amorçage efficace des monomères de type acrylate, sans nécessité d'ajout de SG1 libre, comme l'a démontré Chauvin *et coll.* dans ses travaux sur l'influence de la vitesse de dissociation sur le contrôle de la polymérisation.<sup>180</sup>

	MAMA-SG1		MONAMS		
	$90^{\circ}\mathrm{C}$	$120^{\circ}\mathrm{C}$	$90^{\circ}\mathrm{C}$	$120^{\circ}\mathrm{C}$	
$E_a \ (kJ.mol^{-1})$	111,7		$128,4 \ / \ 130,9$		
$k_d \; ({\rm s}^{-1})$	$1.7\times10^{-2}$	0,34	$5 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-3}$	
$t_{1/2}$	$35 \mathrm{s}$	2 s	16 h	$5 \min$	

Tableau 2.1 – Caractéristiques de deux alcoxyamines basées sur le nitroxyde SG1

#### 2.1.2.5 Comparaison des méthodes

Comme il a été vu dans cette section, trois procédés majeurs, que sont la RAFT, l'ATRP et la NMP, sont utilisés et développés pour la polymérisation radicalaire contrôlée de monomères vinyliques.

La RAFT et la l'ATRP sont deux techniques de choix pour la PRC d'une large gamme de monomères. Cependant ces deux techniques peuvent nécessiter la mise au point de la polymérisation avec le développement de nouveaux agents de transfert pour la RAFT ou de nouveaux ligands pour l'ATRP, parfois spécifiques du monomère à polymériser. L'avantage de la NMP réside dans sa simplicité de mise en œuvre mais ne présente pas actuellement une aussi large gamme de monomères polymérisables que celle proposée par les techniques RAFT et ATRP. Pour une comparaison plus poussée de ces techniques, le lecteur pourra se référer aux revues sur la RAFT.<sup>151,152,181</sup> l'ATRP<sup>157,158,182,183</sup> et la NMP.<sup>184,185</sup>

Dans notre contexte, le copolymère à blocs amphiphile PLA-b-P(NAS-co-NVP) sera intégré lors du processus d'élaboration de nanoparticules ou utilisé en tant que tel pour former des micelles, avec à terme l'objectif d'administrer ces systèmes chez l'homme. Il est donc crucial de bien établir le profil de toxicité lié à l'utilisation de ces techniques. Ainsi bien que l'utilisation de l'ATRP permette d'élaborer des polymères  $\alpha, \omega$ -téléchéliques facilement substituables, cette technique fait intervenir dans son milieu de réaction une importante quantité de métaux, en particulier de cuivre, dont l'élimination n'est pas toujours aisée. Plusieurs solutions ont été apportées pour diminuer la sensibilité de l'ATRP vis-à-vis de l'oxygène (introduction de Cu<sup>0</sup>,<sup>186</sup> ATRP inverse<sup>187</sup> et ARGET-ATRP<sup>188</sup> (Activator ReGenerated by Electron Transfer)) et la quantité de cuivre utilisée (techniques de purification<sup>189</sup> et nouveaux systèmes ATRP comme ARGET-ATRP<sup>188,190</sup> et ICAR-ATRP<sup>191</sup> (Initiators for Continuous Activator Regeneration)).

Le procédé RAFT quant à lui présente plusieurs inconvénients, tels qu'une forte odeur et la coloration des polymères obtenus, en raison de la présence de fonctions thiocarbonyle terminales, même si certains traitements ont été développés pour les supprimer.<sup>181</sup> Par ailleurs, les fonctionnalités des bouts de chaînes peuvent présenter une certaine toxicité, due à l'utilisation d'agent RAFT (trithiocarbonates, dithiocarbonates, xanthates) ce qui limite son potentiel d'utilisation pour l'élaboration de biomatériaux. La technique NMP semble permettre l'élaboration de polymères sans utiliser de composés toxiques. Le point faible pourrait être la présence d'un bout de chaînes thermolabile pouvant entraîner une dégradation du polymère par des réactions secondaires de fragmentation si la température de rupture homolytique de la liaison NO-C est atteinte. Cependant des travaux récents de Chénal *et coll.*<sup>192</sup> et Clément *et coll.*<sup>193</sup> montrent que des polymères à base d'acrylate de PEG et de 2-hydroxyéthyle obtenus par NMP ne sont pas cytotoxiques.

Parce qu'elle n'utilise *a priori* pas de composés toxiques et permet d'aboutir à des polymères biocompatibles dont la fonction de bout de chaînes SG1 n'est pas cytotoxique,<sup>192</sup> la NMP représente une méthode de choix dans l'élaboration de polymères à usage médical. De plus au regard de la littérature, les synthèses de copolymères de P(NAS-*co*-NVP) et d'homopolymères de NAS n'ont encore jamais été étudiées par NMP, privilégiant les polymérisations radicalaires conventionnelles pour le copolymère et les techniques RAFT et ATRP pour l'homopolymère. Ceci représente donc un défi intéressant.

# 2.1.3 Polymérisation par ouverture de cycle (ROP) d'esters cycliques

# 2.1.3.1 Généralités

Parmi les monomères cycliques, les esters cycliques, comme les lactones représentent une famille de monomères, qui suscitent un engouement général, puisque leur polymérisation permet d'aboutir à des polyesters aliphatiques aux remarquables propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité, deux caractéristiques très recherchées dans l'élaboration de biomatériaux. Les principaux polyesters aliphatiques étudiés sont le poly(lactide) (PLA), le poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) et le poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL).

La synthèse de polyesters aliphatiques peut s'effectuer suivant deux voies principales de polymérisation. La première voie traditionnelle consiste en la polycondensation de diols, de diacides ou d' $\alpha$ -hydroxy acides comme l'acide lactique (Figure 2.14). Cependant, cette technique présente quelques limitations, en particulier celles de la nécessité de travailler avec des températures élevées sur des temps longs de polymérisation. De plus, cette technique provoque l'apparition de nombreux produits secondaires, qu'il faudra extraire. Ces produits secondaires parasitent le bon déroulement de la polymérisation, entraînant un mauvais contrôle des masses molaires et limitant l'obtention de polymères de hauts poids moléculaires avec des indices de polymolécularité faibles ( $I_p \sim 2$ ).<sup>194</sup> La synthèse de polyesters à hauts poids moléculaires nécessite d'atteindre une conversion élevée et d'utiliser une parfaite stoechiométrie entre fonctions acides -COOH et fonctions alcools.<sup>195</sup> C'est pourquoi, les différentes limitations de la polycondensation et l'intérêt croissant pour ces polymères ont largement contribué au développement de la polymérisation par ouverture de cycle ou ROP (*Ring Opening Polymerization*)<sup>196–199</sup> de lactones.



FIGURE 2.14 – Les voies de synthèse du PLA

La première ROP du L-lactide a été mise au point en 1932 par Carothers<sup>199</sup> et a permis d'obtenir des PLA de basses masses molaires. L'amélioration des techniques de purification du lactide permettra par la suite d'obtenir des PLA de plus hauts poids moléculaires, plus de 100 000 g.mol<sup>-1</sup> avec des temps de polymérisation plus courts.<sup>200</sup> Le monomère est obtenu par cyclisation du dimère d'acide lactique sous pression réduite (Figure 2.14). Le plus souvent, la ROP est réalisée en masse ou en solvant, bien que des expériences aient été menées avec succès en suspension<sup>198</sup> et de façon plus ponctuelle en émulsion.<sup>196</sup>

Deux principaux procédés sont utilisés pour effectuer la ROP de lactones : la ROP ionique (anionique ou cationique) et la ROP par coordination/insertion  $(\text{ROP}_{c/i})$ , qui nécessite la présence de catalyseurs métalliques. D'autres procédés ROP non basés sur l'utilisation de catalyseurs métalliques existent mais ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. Ces ROP non métalliques comprennent principalement les ROP enzymatiques, dont les pionniers sont Uyama et Kobayashi,<sup>201</sup> procédés confirmés dans plusieurs travaux,<sup>197, 202, 203</sup> et les ROP par catalyse organique, avec des dérivés de la pyridine comme la N,N-diméthylaminopyridine (DMAP) ou des carbènes, détaillées dans la revue de Kamber *et coll.*<sup>204</sup> Actuellement, l'amélioration des techniques de ROP a permis d'aboutir à des systèmes de polymérisations vivantes et contrôlées.<sup>198</sup> En conséquence, le degré de polymérisation du polymère  $(DP_n _{visé})$ est déterminé à partir du rapport initial  $[M]_0$  sur  $[A]_0$ , quantités initiales de monomère et d'amorceur, suivant :  $DP_n _{visé} = [M]_0/[A]_0$ .

#### 2.1.3.2 Réactions secondaires de transestérifications

Lors de la ROP de lactones, quelle que soit la voie de polymérisation employée, il se produit des réactions secondaires parasites de transestérifications intermoléculaire et/ou intramoléculaire. Ces réactions, lorsqu'elles ont lieu, entrent alors en compétition avec la réaction de propagation, perturbant le contrôle et le caractère vivant de ces polymérisations<sup>205, 206</sup> et conduisant à la rupture des chaînes propagatrices.

La transestérification intermoléculaire fait intervenir deux chaînes de polymères en croissance donc actives pour former deux nouvelles chaînes actives (Figure 2.15(a)). Le nombre de centres actifs et celui des chaînes de polymères restent inchangés (peu d'influence sur le  $M_n$ ) mais la distribution des masses molaires s'élargit (augmentation de l' $I_p$ ).<sup>205</sup>

La transestérification intramoléculaire, appelée *back-bitting*, fait intervenir une seule chaîne de polymère active (Figure 2.15(b)).<sup>205</sup> Elle se replie sur elle-même et transestérifie avec un motif ester de la chaîne pour former un macro-ester cyclique et une chaîne de polymère active. Le nombre total des chaînes de polymères en croissance augmente alors par rapport aux quantités initiales en amorceur et en monomère. La masse molaire du polyester obtenu devient inférieure à la masse molaire théorique.

Les réactions de transestérifications sont favorisées à haute conversion, il est donc conseillé d'arrêter la ROP d'esters cycliques avant d'atteindre 100 % de conversion. La formation de cycles de polyesters, bien que thermodynamiquement inévitable, peut être minimisée voire supprimée en ajustant les conditions de cinétique.<sup>207</sup> Cependant, la formation de cycles lors de la ROP du lactide est moins importante que lors de la ROP de l' $\epsilon$ -caprolactone, grâce à la présence des groupements méthyle contribuant à l'encombrement stérique.<sup>205</sup>

Ci-après sont exposés les deux principales voies d'obtention de polyesters : ROP ionique et ROP par coordination/insertion. La dernière voie sera davantage détaillée, puisqu'elle est la voie choisie pour accéder à notre bloc de PLA.



FIGURE 2.15 – Mécanismes de réactions de transestérifications (a) intermoléculaire et (b) intramoléculaire

# 2.1.3.3 ROP ioniques

ROP anionique

La ROP anionique de lactones utilise des dérivés organométalliques : des carboxylates et des alcoolates de métaux alcalins, tels que le lithium (Li), le sodium (Na) et le potassium (K).

Lorsque la ROP anionique d'un monomère cyclique comprenant plus de quatre chaînons est effectuée, le mécanisme repose sur une attaque nucléophile de l'amorceur sur le carbone électropositif de la fonction carbonyle du monomère, suivie de la rupture de la liaison oxygène-acyle, l'espèce active propagatrice est alors un alcoolate (Figure 2.16, voie A). La ROP du D,L-lactide suit en effet ce mécanisme, confirmé par les travaux de Kricheldorf<sup>208</sup> et de Hofman.<sup>207</sup>



FIGURE 2.16 – Mécanismes d'amorçage de la ROP anionique des lactones

Lorsque le monomère est un cycle à quatre chaînons, tel que la  $\beta$ -propiolactone, il présente une forte tension de cycle et ne nécessite que l'utilisation de nucléophiles faibles, comme les carboxylates, pour être polymérisé. Dans ce cas, l'ouverture du cycle se fait par rupture de la liaison alkyle-oxygène (Figure 2.16, voie B). Si l'amorceur est un nucléophile fort, les deux types de ruptures sont possibles et il peut y avoir coexistence de centres actifs alcoolate et carboxylate.

Généralement, plus la nucléophilie de l'amorceur est forte, plus la polymérisation peut être effectuée à basse température, ce qui permet de limiter les réactions secondaires. Toutefois, la forte réactivité des espèces anioniques rend difficile le contrôle de la polymérisation des lactones par cette voie et les réactions de transestérifications inter- et intramoléculaires ne peuvent être supprimées.<sup>207, 209</sup>

#### - ROP cationique

La ROP cationique utilise des amorceurs dont les plus classiques peuvent être scindés en quatre catégories : acides protiques de Brönsted (chlorure d'hydrogène HCl, acides carboxyliques  $RCO_2H$  ou acides sulfoniques  $RSO_3H$ ), acides de Lewis (AlCl<sub>3</sub>, BF<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub>), agents alkylants (CF<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>O<sup>+</sup>BF<sub>4</sub><sup>-</sup>) ou encore agents acylants (CH<sub>3</sub>CO<sup>+</sup>, OCl<sub>4</sub><sup>-</sup>).

Les mécanismes cationiques génèrent généralement moins de réactions de transestérifications que les mécanismes anioniques, mais sont beaucoup moins efficaces en terme d'amorçage. Cette voie reste peu utilisée pour la ROP d'esters cycliques, puisque les masses molaires obtenues sont généralement faibles.<sup>210</sup> Les résultats les plus prometteurs en ROP cationiques de lactones ont été obtenus par Kriecheldorf et Dunsing,<sup>211</sup> avec l'utilisation de l'acide trifluorométhanesulfonique ( $CF_3SO_3H$ ) et le trifluorométhanesulfonate ( $CF_3SO_3CH_3$ ) particulièrement efficaces pour la ROP cationique du lactide, comparés à l'efficacité d'une large gamme d'amorceurs testés. Le mécanisme actuellement admis pour cette voie de polymérisation est une alkylation de l'oxygène endocyclique du LA, suivie de la rupture de la liaison oxygène-alkyle du cycle (Figure 2.17).



FIGURE 2.17 – Mécanismes d'amorçage de la ROP cationique du LA où R = H pour l'acide trifluorométhanesulfonique et  $R = CH_3$  pour le trifluorométhanesulfonate

Généralement associée à des temps longs de réaction (48h à 50°C pour obtenir 90% de conversion<sup>207</sup>) et de faibles masses molaires, la ROP cationique ne représente donc pas une voie clé pour l'élaboration de polyesters aliphatiques, puisque quelques min peuvent parfois suffire pour atteindre 100% de conversion en ROP anionique.

#### 2.1.3.4 ROP par coordination/insertion

La différence entre les ROP ioniques et la ROP par coordination/insertion  $(\text{ROP}_{c/i})$  se situe au niveau de l'espèce active propagatrice. Cette dernière est caractérisée par des liaisons covalentes et non plus ioniques, les espèces propagatrices sont donc plus stables. Ceci permet de diminuer la fréquence des réactions de transestérifications inter- et intramoléculaires.<sup>195,198</sup>

Les amorceurs/catalyseurs ou les catalyseurs utilisés en  $\text{ROP}_{c/i}$  sont généralement des alcoxydes ou des carboxylates de métaux, notamment d'aluminium (Al) et d'étain (Sn).<sup>205</sup>

Les alcoxydes d'aluminium sont tout particulièrement étudiés en  $\text{ROP}_{c/i}$ , avec notamment les trialcoxydes d'aluminium (Al(OR)<sub>3</sub>). Depuis leur introduction à la fin des années 1970 par Teyssié *et coll.*,<sup>212</sup> ils ont prouvé leur efficacité pour amorcer la ROP de lactones, et notamment de lactides, en permettant la synthèse de polyesters vivants avec des  $I_p$  compris entre 1.1 et 1.2.

Les carboxylates étant des nucléophiles plus faibles que les alcoxydes, ils sont généralement combinés à un alcool pour former des alcoxydes de métal. Les carboxylates se comportent donc comme des catalyseurs et non comme de réels amorceurs. Pour qu'ils puissent amorcer la polymérisation, ils doivent être en présence de composés présentant un proton, comme des alcools, qui vont jouer le rôle d'amorceur. En l'absence de co-amorceur, les impuretés du milieu contenant des fonctions hydroxyle jouent alors ce rôle.<sup>213</sup>

Le mécanisme général de la  $\operatorname{ROP}_{c/i}$  consiste en la complexation (ou coordination) de l'oxygène du carbonyle de l'ester cyclique, suivie de l'insertion de l'alcoxyde dans la liaison oxygène-acyle (Figure 2.18).



FIGURE 2.18 – Mécanisme général de la  $\text{ROP}_{c/i}$  du lactide. (1) Coordination du métal sur le carbonyle de l'ester cyclique et (2) insertion de l'alcoxyde dans la liaison oxygène-acyle

Parmi les dérivés à base d'étain, les carboxylates ont démontré une forte efficacité en terme de contrôle de la  $\text{ROP}_{c/i}$  d'esters cycliques. L'octanoate d'étain, ou 2-éthylhexanoate d'étain ou encore octoate d'étain

 $(Sn(Oct)_2)$  (Figure 2.19), demeure le catalyseur métallique le plus utilisé en  $ROP_{c/i}$ .<sup>198</sup> Ses avantages sont multiples : disponibilité commerciale et solubilité dans les solvants organiques les plus courants et dans les esters cycliques. De plus, il est accepté par la FDA en tant qu'additif alimentaire à hauteur de 20 ppm, en raison de sa faible toxicité.<sup>214</sup> Il est donc un catalyseur de choix pour la synthèse de biomatériaux.



FIGURE 2.19 – Structure chimique de l'octanoate d'étain

Le mécanisme mis en jeu au cours de la  $\text{ROP}_{c/i}$  du lactide, catalysée par  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ , a longtemps été controversé, celui qui prévaut aujourd'hui a été démontré par Penczek *et coll.*<sup>205, 209, 215</sup> (Figure 2.20).



FIGURE 2.20 – Mécanisme de la ROP du D,L-lactide, catalysée par l'octanoate d'étain

La première étape consiste en la formation de l'alcoxyde d'étain, par réaction entre l'octanoate d'étain et l'espèce porteuse de la fonction hydroxyle (Figure 2.20 A(1) et A(2)). La seconde étape est celle de l'initiation du mécanisme par coordination/insertion par l'alcoxyde précédemment obtenu. Ainsi, le carbonyle de l'ester cyclique est activé par l'étain, puis le groupement alcoxyde est inséré dans la liaison oxygène-acyle du monomère (Figure 2.20 B(1)). Ainsi, chaque molécule d'alcool peut amorcer une chaîne de polymères par réaction de transfert des centres actifs -Sn-OR sur l'amorceur R-OH n'ayant pas réagi (Figure 2.20 B(2)). Comme pour toute ROP, chaque molécule d'eau présente dans le milieu est susceptible d'amorcer des chaînes de polymères et donc de modifier le degré de polymérisation visé. Ces impuretés peuvent aussi ralentir la cinétique de polymérisation en désactivant le catalyseur selon la réaction C de la Figure 2.20. De plus, la littérature rapporte que l'acide octanoïque formé durant la ROP peut conduire à l'estérification de l'alcool,<sup>205,216</sup> en libérant de l'eau dans le milieu, qui peut donc réagir avec le catalyseur pour former l'hydroxyde d'étain.

Les stratégies possibles pour la combinaison de ces deux techniques (PRC et ROP), nécessaires à l'obtention de notre copolymère à blocs d'intérêt, sont maintenant présentées.

# 2.1.4 Synthèse de copolymères à blocs par couplage ROP/PRC

La synthèse du copolymère à blocs amphiphile PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) nécessite donc l'association judicieuse de la ROP du D,L-lactide et de la copolymérisation du NAS et de la NVP par PRC. Typiquement lorsqu'un copolymère à blocs AB possède deux blocs obtenus par des techniques différentes de polymérisation, trois stratégies peuvent être envisagées pour sa synthèse :

- Synthèse par couplage macromoléculaire des blocs d'homopolymères A et B
- Synthèse à partir d'un amorceur  $\alpha$ - $\omega$  difonctionnel
- Synthèse par modification des bouts de chaînes du premier bloc A pour amorcer la polymérisation de B

#### 2.1.4.1 Synthèse par couplage macromoléculaire de deux homopolymères



FIGURE 2.21 – Stratégie de synthèse d'un copolymère dibloc par couplage macromoléculaire de deux homopolymères fonctionnels en bout de chaînes

Cette technique consiste à coupler de manière covalente deux homopolymères A et B, préalablement synthétisés et fonctionnalisés en leurs extrémités pour qu'ils puissent réagir ensemble comme schématisé dans la Figure 2.21. À titre d'exemple, la présence d'une extrémité acide carboxylique -COOH et d'une extrémité amine  $-NH_2$  peut être exploitée pour former une liaison covalente amide entre les deux homopolymères et aboutir à un copolymère dibloc AB.

La synthèse d'homopolymères fonctionnels bien définis est aisée par les procédés de polymérisations vivantes décrits précédemment (ATRP, RAFT, NMP, ROP, etc.), qui permettent d'obtenir des groupements terminaux de type hydroxyle, thiol, amine, halogène, etc. Néanmoins, il est parfois nécessaire de modifier en plusieurs étapes le bout de chaînes pour coupler les deux homopolymères souvent de manière non quantitative.

Cependant, avec l'apparition de la *click chemistry* grâce à Sharpless,<sup>217</sup> les rendements de couplage sont améliorés, notamment avec l'utilisation de la réaction de cycloaddition d'Huisgen<sup>218</sup> entre une fonction alcyne et une fonction azoture, aboutissant à la formation d'un triazole cyclique (Figure 2.22).

$$R_1 \longrightarrow + N_3 - R_2 \longrightarrow \bigcup_{R_1}^{N \setminus N} N - R_2$$

FIGURE 2.22 – Réaction de cycload dition d'Huisgen où  ${\rm R}_1$  et  ${\rm R}_2$  peuvent ainsi représenter deux homopolymères

Concernant le couplage des techniques ROP et PRC, Opsteen et van Hest<sup>219</sup> ont obtenu un copolymère de POE et de PMMA en couplant par *click chemistry* un POE obtenu par ROP et terminé par une fonction azoture et un PMMA obtenu par ATRP et terminé par une fonction alcyne. Pour plus d'informations sur le couplage d'homopolymères par *click chemistry*, le lecteur peut se référer aux revues.<sup>220, 221</sup>

#### 2.1.4.2 Synthèse à partir d'un amorceur $\alpha$ - $\omega$ difonctionnel



FIGURE 2.23 – Stratégies de synthèse de copolymères diblocs AB à partir d'un amorceur difonctionnel.
(1) Polymérisations séquencées et (2) polymérisations simultanées des monomères A et B.

Une autre stratégie pour élaborer des copolymères diblocs AB est l'utilisation d'un amorceur difonctionnel, de type X-R-Y, permettant d'amorcer la polymérisation de A et la polymérisation de B, de manière séquencée (Figure 2.23 (1)) ou simultanée (Figure 2.23 (2)).

Les combinaisons  $ROP/ATRP^{222-224}$  et  $ROP/RAFT^{225-227}$  via l'utilisation d'amorceur difonctionnel sont plus abondamment décrites que la combinaison ROP/NMP qui nous intéresse plus particulièrement.

Les principaux travaux sur cette combinaison ont été menés par Hawker *et coll.*,<sup>228</sup> qui ont synthétisé des amorceurs difonctionnels ROP/NMP à partir de TEMPO et de TIPNO. Ces amorceurs ont été ensuite utilisés avec succès par Sogah *et coll.*,<sup>229–231</sup> puis par Hawker et Jérôme.<sup>232, 233</sup>

Récemment au sein de l'équipe CROPS, il a été synthétisé le premier amorceur difonctionnel basé sur le SG1, en mettant à profit la fonction acide de l'alcoxyamine MAMA-SG1, suivant le schéma réactionnel de la Figure 2.24.<sup>234</sup> Grâce à cet amorceur, les approches *one-step* (polymérisations par ROP et par NMP simultanées) et NMP *first* (NMP puis ROP) ont été validées par Chagneux *et coll.*<sup>235</sup> et ont permis l'élaboration de copolymères à blocs PCL-*b*-PBA bien définis. L'approche ROP *first* à partir de cet amorceur ne permet cependant pas d'obtenir des copolymères à blocs de manière contrôlée, en raison de réactions parasites entre le nitroxyde SG1 et le catalyseur Sn(Oct)<sub>2</sub>.



FIGURE 2.24 – Schéma réactionnel permettant d'aboutir à l'amorceur difonctionnel ROP/NMP basé sur le SG1

#### 2.1.4.3 Synthèse à partir d'un macroamorceur par modification des bouts de chaînes

Une troisième voie d'accès aux copolymères à blocs de type AB par couplage ROP/PRC est la stratégie du macro-amorçage. Elle se décompose en trois étapes. La première consiste en la polymérisation du monomère A, la deuxième étape en la fonctionnalisation d'un des deux bouts de chaînes par une fonctionnalité Y capable d'amorcer dans une troisième et dernière étape la polymérisation du monomère B (Figure 2.25). Le polymère de type A devient alors un macroamorceur de type A-Y pour la polymérisation du monomère B.<sup>236</sup>



FIGURE 2.25 – Stratégie de synthèse de copolymères diblocs AB à partir d'un macroamorceur, obtenu par modification de bouts de chaînes de l'homopolymère A

Là encore, les combinaisons ROP/ATRP<sup>237, 238</sup> et ROP/RAFT<sup>239, 240</sup> ont été largement reportées. Concernant la combinaison ROP/NMP, Clément *et coll.*<sup>193</sup> ont récemment développé au sein de l'équipe CROPS deux macro-alcoxyamines PLA-SG1 et PCL-SG1, par addition radicalaire 1-2 de la MAMA-SG1 respectivement sur un PLA ou un PCL  $\alpha$ -acrylate, obtenu au préalable par ROP du D,L-LA ou de la CL. Ces deux macro-alcoxyamines permettent la synthèse de copolymères à blocs bien définis de PLA-*b*-PS, PLA-*b*-PHEA et PCL-*b*-PHEA (HEA : acrylate de 2-hydroxyéthyle).

Concernant plus particulièrement la synthèse de copolymère à blocs comprenant un bloc de PLA et un bloc de NAS ou de NVP, quelques travaux sont reportés mais aucun ne concerne la synthèse d'un copolymère dibloc PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP).

Il a été effectué, à titre d'exemple, une combinaison ROP/ATRP pour la synthèse d'un copolymère en étoile à six bras de copolymères diblocs PLA-b-P(St-co-NAS). Pour aboutir à ce copolymère, la ROP du LA, catalysée par le  $Sn(Oct)_2$ , a été effectuée à partir d'un amorceur doté de six fonctions hydroxyle. Les six fonctions hydroxyle terminales des branches de PLA du copolymère étoilé sont ensuite modifiées en dérivé bromé, capable d'amorcer la copolymérisation par ATRP du styrène et du NAS.<sup>241</sup>

Au regard de la littérature, les copolymères diblocs de type PLA/PCL-*b*-PNVP sont généralement obtenus en deux étapes : une première étape de synthèse du bloc PNVP par polymérisation radicalaire classique amorcée par de l'AIBN en présence d'un agent de transfert (généralement le mercaptoéthanol) présentant une fonction hydroxyle capable d'amorcer la ROP du LA ou CL soit par voie anionique<sup>242, 243</sup> soit par voie de coordination/insertion.<sup>244, 245</sup> Aucune voie ne combine la PRC de la NVP et la ROP du LA/CL, excepté depuis les travaux récents de Mishra *et coll.*,<sup>246</sup> qui allient la ROP<sub>c/i</sub> de la  $\epsilon$ -caprolactone et la RAFT de la NVP, par l'utilisation d'un macro-agent de RAFT obtenu par modification du bout de chaînes du PCL préalablement synthétisé.

Il est à noter enfin l'utilisation classique de PEG hydroxylé comme macro-amorceur de la ROP d'esters cycliques pour la synthèse de copolymères à blocs de type PEG-*b*-PLA/PCL. Bien que cette stratégie ne combine pas les deux techniques ROP et PRC, elle mérite d'être citée ici de par son utilisation massive pour la synthèse de ce type de copolymères à blocs, exploités en pharmacie soit pour former des micelles pour la délivrance de principes actifs, soit pour modifier la surface de nano- et microparticules.<sup>247–250</sup>

Il existe finalement assez peu d'exemples de modifications chimiques de bouts de chaînes pour le couplage des techniques ROP et NMP, et tout particulièrement avec l'utilisation de SG1, excepté celle développée par Clément *et coll.*<sup>193</sup> C'est cette technique que nous avons choisie pour la synthèse de notre copolymère dibloc PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP).

# 2.1.5 Quelques notions sur la copolymérisation

Notre segment hydrophile fonctionnalisable est un copolymère d'unités NAS et NVP. Il conviendra de déterminer les coefficients de réactivité pour ce couple de monomères, afin de déterminer l'enchaînement (alterné, statistique, aléatoire, gradient) de ces unités dans le copolymère final P(NAS-co-NVP). Ainsi, quelques rappels sont ici présentés sur la copolymérisation de systèmes à deux monomères.

#### 2.1.5.1 Définitions et principes généraux

La copolymérisation de deux monomères, symbolisés par  $M_1$  et  $M_2$ , impliquent la formation de deux sites actifs radicalaires, l'un formé par  $M_1$  et l'autre formé par  $M_2$ , qui seront représentés respectivement par  $M_1^*$  et  $M_2^*$ . Avec l'hypothèse que seul le monomère en bout de chaînes influence la réactivité (modèle terminal ou copolymérisation de type Markovnien du premier ordre), on obtient alors quatre réactions de propagations possibles, supposées irréversibles :

Lorsqu'un centre actif s'additionne sur le même monomère, on parlera d'homopropagation.

 $M_1^*+M_1 \rightarrow M_1^*$ , réaction régie par la constante de vites se d'addition de  $M_1$  sur  $M_1^* k_{11}$ 

 $M_2^*+M_2 \rightarrow M_2^*$ , réaction régie par la constante de vitesse d'addition de  $M_2$  sur  $M_2^* k_{22}$ 

Lorsqu'un centre actif s'additionne sur l'autre monomère, on parlera de propagation croisée.

 $M_1^*+M_2 \rightarrow M_2^*$ , réaction régie par la constante de vitesse d'addition de  $M_2$  sur  $M_1^* k_{12}$  $M_2^*+M_1 \rightarrow M_1^*$ , réaction régie par la constante de vitesse d'addition de  $M_1$  sur  $M_2^* k_{21}$ 

La vitesse de consommation de chacun des deux monomères représente leur vitesse d'incorporation dans le copolymère, donnée par les équations suivantes :

$$-\frac{d[M_1]}{dt} = k_{11} [M_1^*] [M_1] + k_{21} [M_2^*] [M_1]$$
(2.4)

$$-\frac{d[M_2]}{dt} = k_{12} [M_1^*] [M_2] + k_{22} [M_2^*] [M_2]$$
(2.5)

En divisant l'équation (2.4) par l'équation (2.5), on obtient ainsi la vitesse d'incorporation des deux monomères dans le copolymère, i.e. la composition instantanée de ce dernier :

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{k_{11} [M_1^*] [M_1] + k_{21} [M_2^*] [M_1]}{k_{12} [M_1^*] [M_2] + k_{22} [M_2^*] [M_2]}$$
(2.6)

En supposant l'état stationnaire pour chacune des espèces  $M_1^*$  et  $M_2^*$ , les concentrations des deux espèces ne seront constantes que si leurs vitesses d'interconversion sont égales, soit :

$$k_{21} [M_2^*] [M_1] = k_{12} [M_1^*] [M_2]$$
(2.7)

Ainsi, en définissant les paramètres  $r_1$  et  $r_2$ , qui expriment les rapports de réactivité d'un macro-amorceur vis-à-vis des monomères :

$$r_1 = \frac{k_{11}}{k_{12}}$$
  $et$   $r_2 = \frac{k_{22}}{k_{21}}$  (2.8)

On obtient une équation simplifiée de l'équation (2.6), dite **équation de copolymérisation** ou encore **équation de composition instantanée du copolymère** également appelée **équation de Mayo et** Lewis :

$$\frac{d [M_1]}{d [M_2]} = \frac{[M_1] (r_1 [M_1] + [M_2])}{[M_2] ([M_1] + r_2 [M_2])}$$
(2.9)

L'équation de copolymérisation peut être exprimée en terme de fractions molaires. Ainsi, en définissant  $f_1$  et  $f_2$  les fractions molaires des monomères  $M_1$  et  $M_2$  présents dans le milieu réactionnel à un instant t, et  $F_1$  et  $F_2$  les fractions molaires de  $M_1$  et  $M_2$  présents dans le copolymère formé, on obtient ainsi :

$$f_1 = 1 - f_2 = \frac{[M_1]}{[M_1] + [M_2]} \quad et \quad F_1 = 1 - F_2 = \frac{d[M_1]}{d[M_1] + d[M_2]}$$
(2.10)

La combinaison des deux équations donne une autre expression de l'équation de copolymérisation :

$$F_1 = \frac{r_1 f_1^2 + f_1 f_2}{r_1 f_1^2 + 2f_1 f_2 + r_2 f_2^2} \tag{2.11}$$

Cette équation de copolymérisation permet de calculer la composition instantanée du copolymère i.e. la composition du copolymère obtenue à très faible taux de conversion ( $\leq 5\%$ ), à partir d'un mélange de monomères de composition donnée.

Pour déterminer la composition instantanée d'un copolymère en fonction de la conversion quelles que soient les fractions molaires des deux monomères, la forme intégrée de l'équation de Skeist est utilisée (Équation 2.14). Il s'agit de considérer un système contenant au total M moles de monomères et d'appliquer le principe de conservation de la matière qui se traduit par :

$$Mf_1 - (M - dM)(f_1 - df_1) = F_1 dM$$
(2.12)

Le terme  $df_1 dM$  est négligé de par son faible poids au sein de l'équation (2.12), la forme intégrale de l'équation devient :

$$\int_{M_0}^M \frac{dM}{M} = \ln \frac{M}{M_0} = \int_{(f_1)_0}^{f_1} \frac{df_1}{F_1 - f_1}$$
(2.13)

où  $M_0$  et  $(f_1)_0$  représentent les valeurs initiales de M et de  $f_1$ .

En intégrant l'équation (2.13) entre les limites  $(f_1)_0$  et  $f_1$ , la variation de la composition du copolymère et celle du mélange de monomères en fonction du taux de conversion (égal à  $1-[M]/[M]_0$ ) peuvent être déterminées. Sa solution analytique a pour forme :

$$1 - \frac{[M_1]}{[M_1]_0} = 1 - \left[\frac{f_1}{(f_1)_0}\right]^{\alpha} \left[\frac{f_2}{(f_2)_0}\right]^{\beta} \left[\frac{(f_1)_0 - \delta}{f_1 - \delta}\right]^{\gamma}$$
(2.14)

L'indice zéro se réfère aux quantités initiales et  $\alpha, \beta, \delta$  et  $\gamma$  sont définis comme suit :

$$\alpha = \frac{r_2}{1 - r_2}, \beta = \frac{r_1}{1 - r_1}, \delta = \frac{1 - r_2}{2 - r_1 - r_2}, \gamma = \frac{1 - r_1 r_2}{(1 - r_1)(1 - r_2)}$$
(2.15)

Ainsi l'équation (2.14), appelée **équation de Skeist**, ou encore équation de composition/conversion, et toute autre équation équivalente peuvent être utilisées pour relier la composition instantanée du copolymère à la conversion, quelle que soit la composition initiale du mélange de monomères.

#### 2.1.5.2 Méthodes de détermination des rapports de réactivité

Plusieurs méthodes s'offrent à nous pour déterminer les rapports de réactivité de deux monomères. Pour la plupart des méthodes, il s'agit de déterminer expérimentalement la composition des copolymères issus de compositions initiales en monomères différentes.

Les méthodes les plus connues sont celles de Mayo-Lewis (1944),<sup>251</sup> de Fineman-Ross  $(1950)^{252}$  et Kelen-Tüdos (1975).<sup>253</sup> Elles reposent sur l'utilisation de l'équation différentielle de copolymérisation (2.11) et nécessitent de se placer à de faibles taux de conversion, typiquement inférieurs à <5%, pour que les compositions soient exploitées, exception faite pour la méthode étendue de Kelen-Tüdos. Pour obtenir les coefficients de réactivité, l'équation de copolymérisation est réarrangée pour aboutir à une équation linéaire reliant les rapports de réactivité.

Lorsque les copolymérisations sont caractérisées par une cinétique très rapide, l'extraction de données expérimentales à faible conversion devient difficile et par conséquent les méthodes énoncées ci-avant deviennent inexploitables. Pour pallier ce phénomène, la méthode numérique non linéaire des moindres carrés permet une exploitation des données expérimentales pour toute conversion, puisqu'elle utilise la forme intégrée de l'équation de Skeist.

Les rapports de réactivité sont déterminés par ajustement des données expérimentales de la fraction molaire d'un des deux monomères dans le milieu en fonction de la conversion molaire globale et des données théoriques obtenues à partir de l'équation intégrée de Skeist par la méthode non linéaire des moindres carrés. Les paramètres  $r_1$  et  $r_2$  sont des paramètres qu'il faudra moduler pour minimiser la somme des carrés des écarts entre données expérimentales et théoriques.

#### **2.1.5.3** Influence des valeurs des coefficients de réactivité $r_1$ et $r_2$

Plusieurs enchaînements de monomères peuvent se produire selon la grandeur des rapports de réactivité  $r_1$  et  $r_2$ .

Lorsque  $r_1 \approx r_2 \approx 1$ , les deux sites actifs ont sensiblement la même préférence pour les deux espèces propagatrices rencontrées. Les monomères sont intégrés dans le copolymère de manière aléatoire.

Le copolymère obtenu est strictement alterné, lorsque  $r_1=r_2=0$ . Chaque site réagit préférentiellement avec l'autre monomère, ce qui provoque l'alternance des monomères, quelle que soit la composition initiale en monomères. Il se produit une alternance modérée lorsque le produit  $r_1r_2$  tend vers 0 ou lorsqu'une des deux valeurs de rapport de réactivité est égale à zéro.

Lorsque les rapports de réactivité vérifient  $r_1>1$  et  $r_2<1$  ou inversement, l'un des monomères est plus réactif que l'autre vis-à-vis des sites actifs. Le copolymère obtenu contiendra alors une plus grande fraction du monomère le plus réactif.

Lorsque les rapports de réactivité vérifient  $r_1>1$  et  $r_2>1$ , le copolymère obtenu aura une structure de copolymère à blocs, où le premier bloc formé correspondra au bloc de monomère ayant le rapport de réactivité le plus élevé, s'ensuivra alors la formation du second bloc de monomère ayant le rapport de réactivité le plus faible. Il s'agit d'un cas assez peu rencontré.

# 2.2 Étude de la synthèse d'homo- et copolymères à base de NAS

Avant de s'intéresser à la copolymérisation par NMP du NAS et de la NVP à partir de la macroalcoxyamine PLA-SG1, nous avons souhaité étudier l'homopolymérisation du NAS, très peu reportée par PRC et jamais décrite par NMP, et sa copolymérisation avec la NVP par NMP à partir d'une alcoxyamine modèle, la MAMA-SG1.

# 2.2.1 Étude de la NMP du NAS amorcée par la MAMA-SG1

Le NAS est un monomère intéressant pour sa capacité à réagir avec des molécules dotées d'amines primaires, grâce à la présence d'une fonction réactive ester de *N*-succinimidyle (NS), ce qui a suscité un intérêt important pour son homopolymère correspondant, le PNAS, hautement fonctionnalisable.

Le NAS a déjà été homopolymérisé par polymérisation radicalaire conventionnelle,<sup>254</sup> ATRP<sup>255</sup> et RAFT,<sup>256</sup> mais le plus souvent ce monomère a été copolymérisé principalement par RAFT (avec le N-isopropylacrylamide (NIPAM),<sup>257</sup> le HEA,<sup>258</sup> le N,N-diméthylacrylamide (DMA),<sup>259–261</sup> la N-acryloyl-morphine (NAM)<sup>262–264</sup> et la NVP<sup>265</sup>) et dans une moindre mesure par ATRP avec le styrène<sup>241</sup> et par NMP avec le DMA.<sup>266</sup> En revanche, les études d'homopolymérisation et de caractérisation du PNAS sont succinctes dans la littérature.

# 2.2.1.1 Études cinétiques de la NMP du NAS amorcée par la MAMA-SG1 : influence des facteurs température et pourcentage de SG1 libre

La NMP du NAS a été conduite dans le DMF (25% de NAS dans le solvant), en utilisant la MAMA-SG1 comme alcoxyamine. Les masses molaires  $M_n$  visées sont de 10 000 g.mol<sup>-1</sup>. L'influence de la température et celle du SG1 libre ont été étudiées en vue d'un contrôle optimal de la polymérisation.

Une évolution non linéaire de l'expression logarithmique  $\ln([M]_0/[M])$  en fonction du temps est observée lorsque le milieu de polymérisation ne contient aucun SG1 libre, quelles que soient les température utilisées (Figures 2.26 (a), (c) et (e)), ce qui suggère fortement une absence de contrôle de la polymérisation. Ceci peut être dû à une forte constante de propagation  $(k_p)$  du monomère NAS, dont la structure est proche d'un monomère acrylate. Il n'est donc pas aberrant d'avoir à ajouter du SG1 libre dans le milieu pour assurer un meilleur contrôle de la polymérisation en aidant l'effet radicalaire persistant à se mettre en place pour la polymérisation de monomères acrylates, comme expliqué dans les travaux de Chauvin *et coll.*<sup>160</sup>

Ainsi l'ajout de SG1 libre dans le milieu de polymérisation permet d'améliorer la linéarité de l'expression logarithmique  $\ln([M]_0/[M])$  en fonction du temps, suggérant un meilleur contrôle de la polymérisation pour toutes les températures testées (Figures 2.26 (a), (c) et (e)).



FIGURE 2.26 – Influence des paramètres température et quantité initiale de SG1 libre sur la cinétique de polymérisation du NAS par NMP dans le DMF,  $M_n$  visée 10 000 g.mol<sup>-1</sup>. Les figures (a), (c) et (e) représentent l'évolution du ln([M]<sub>0</sub>/[M]) en fonction du temps et les figures (b), (d) et (f) celle de la conversion en fonction du temps : à différentes températures : respectivement à 100, 110 et 120°C, avec ■ : 0%, • : 2.5%, ▲ : 5% et ▼ : 7.5% molaire de SG1 libre par rapport à la MAMA-SG1

Lorsque toutes les polymérisations sont conduites sans SG1 libre, il peut être constaté que le NAS est converti à plus de 80% (Figures 2.26 (b), (d) et (f)). Dès lors que le nitroxyde libre est ajouté dans le milieu, la conversion est ralentie pour atteindre un plateau à 40% de conversion à 100°C. A 120°C, le contrôle de la polymérisation n'est pas assuré même en présence de SG1 libre. Les meilleures condi-

tions de polymérisation pour un bon compromis entre temps de polymérisation et linéarité de la fonction  $\ln([M]_0/[M])=f(t)$  sont une température de 110°C et l'ajout de 5% de SG1 libre dans le milieu. Elles seront les conditions retenues pour la suite de l'étude de l'homopolymérisation du NAS dans ce manuscrit.

#### 2.2.1.2 Contrôle de la NMP du NAS

En sélectionnant ces conditions de polymérisation, un déplacement des chromatogrammes du PNAS obtenus par chromatographie d'exclusion stérique (CES) au cours de la polymérisation (Figure 2.27(a)) peut être constaté. Les masses molaires apparentes déterminées par CES dans le DMF tendent à augmenter et les indices de polymolécularité tendent à diminuer avec la conversion, quels que soit les standards de calibration utilisés (PS, PMMA ou PEG), ce qui suggère un contrôle relativement correct de la polymérisation (Figure 2.27(b)), conforté par des indices de polymolécularité faibles.



FIGURE 2.27 – Influence du choix des standards dans la détermination des  $M_n$  et  $I_p$  apparents de PNAS obtenus par NMP. (a) CES dans le DMF suivant l'évolution de la conversion, de droite à gauche à 25, 30, 35, 40, 45 et 50 min de polymérisation. (b) Évolution des  $M_n$  apparents (symboles pleins) et  $I_p$  (symboles creux) en fonction de la conversion pour différents standards  $(\blacksquare, \square)$  : PS,  $(\blacktriangle, \triangle)$  : PMMA et  $(\bigcirc, \bigcirc)$  : PEG

Il est important de noter ici l'influence du choix des standards sur la détermination des masses molaires. La CES est en effet une méthode d'analyse des polymères basée sur la séparation de ces derniers suivant leur volume hydrodynamique dans le solvant d'élution et non suivant leur masse moléculaire. Les masses molaires vraies d'un polymère étudié peuvent être déterminées par l'utilisation de standards de ce même polymère. Lorsqu'aucun standard n'existe, l'utilisation d'une courbe de calibration universelle permet de relier les masses molaires du polymère étudié et des standards choisis. Pour ce faire, il est nécessaire de connaître les coefficients de Mark-Houwink K et  $\alpha$  du polymère de la gamme et du polymère à analyser, dans les mêmes conditions d'analyse (éluant, température). Or dans notre cas, les paramètres de Mark-Houwink du PNAS n'ont jamais été déterminés. Nous n'aurons donc pas accès aux masses vraies mais seulement aux masses apparentes du polymère, dépendantes du polymère standard utilisé. C'est pourquoi il est intéressant et nécessaire de discuter l'influence des standards choisis sur les valeurs de masses molaires apparentes.

Récemment, l'influence des standards de calibration utilisés sur la détermination des masses molaires apparentes a été reportée par Guillaneuf *et coll.*<sup>267</sup> en effectuant des simulations basées sur les coefficients de Mark-Houwink. Les auteurs ont ainsi démontré que la masse molaire apparente est surestimée lorsque le solvant utilisé est un moins bon solvant pour le standard polymère que pour le polymère étudié. Ceci semble concorder pour notre étude avec l'utilisation de standards de PS, pour lequel le DMF est plutôt un mauvais solvant ( $\alpha$ =0.603 à 35°C<sup>268</sup>) (Figure 2.27 (b), ■).

A l'inverse, les auteurs ont aussi démontré que l'utilisation d'un meilleur solvant pour le standard que pour le polymère à analyser entraîne une sous-estimation des masses molaires apparentes. Ceci semble correspondre ainsi à l'utilisation d'une calibration à base de standards de PEG entraînant la détermination des masses molaires bien en-dessous de nos masses molaires théoriques. En effet, le DMF est un très bon solvant pour le PEG avec une valeur de  $\alpha$  à 25°C de 0.73<sup>268</sup> (Figure 2.27 (b),  $\bullet$ ). De par la nature structurale proche d'un acrylate, le PMMA ( $\alpha$ =0.65 à 30°C<sup>269</sup>) aurait sans doute le comportement le plus proche du PNAS dans le DMF, ce qui tendrait à expliquer la relative bonne adéquation avec ce standard (Figure 2.27 (b),  $\bigstar$ ).

La transformation chimique du PNAS en poly(acrylate de méthyle) (PAM) a été tentée en deux étapes : (i) hydrolyse des fonctions ester de NS en milieu basique organique et (ii) méthylation du poly(acide acrylique) en PAM. Cette transformation chimique est intéressante puisque les masses molaires vraies des PAM peuvent être déterminées avec l'utilisation d'une calibration universelle à partir de standards PS ( $K_{PS}$ =11.4 10<sup>-5</sup> dL.g<sup>-1</sup>,  $\alpha_{PS}$ =0.716 et  $K_{PAM}$ =9.5 10<sup>-5</sup> dL.g<sup>-1</sup>,  $\alpha_{PAM}$ =0.719 en CES THF 30°C). Cependant, bien que le suivi de ces différentes étapes par RMN <sup>1</sup>H atteste le caractère quantitatif des deux réactions, les chromatogrammes analysés par CES THF présentent des distribution bimodales, difficilement exploitables.

Le profil observé pour l'évolution du  $M_n$  en fonction de la conversion est une fonction affine ne passant pas par l'origine. Ceci pourrait être la conséquence d'une constante de propagation élevée du NAS, qui entraînerait la formation de masses molaires plus élevées à faible conversion si l'amorçage n'est pas assez efficace.<sup>160</sup>

Un spectre RMN <sup>1</sup>H d'un PNAS typiquement obtenu après précipitation dans l'éther diéthylique froid est présenté dans la Figure 2.28. Le spectre révèle la présence des signaux correspondants aux protons -CH<sub>2</sub>- de la chaîne carbonée (1.8-2.2 ppm), aux protons -CH<sub>2</sub>- de l'unité NHS (2.7-2.9 ppm) et aux protons -CH- de la chaîne carbonée du polymère (3-3.2 ppm). Les signaux relatifs aux protons des deux groupes *tert*-butyle du SG1 sont détectés vers 1 ppm.



FIGURE 2.28 – Spectre RMN <sup>1</sup>H d'un PNAS obtenu après précipitation dans l'éther diéthylique (DMSO-*d6*, 400 MHz).

# 2.2.1.3 Influence du solvant sur le contrôle de la NMP du NAS

Lorsque des masses molaires plus élevées (typiquement 50 000 g.mol<sup>-1</sup>) sont visées dans ces mêmes conditions (25% en DMF, 110C°, 5% molaire de SG1 libre), le contrôle de la polymérisation n'est plus observé, avec des masses molaires bien plus faibles que celles attendues (Figure 2.29,  $\bigcirc$ ).



FIGURE 2.29 – Évolution des  $M_n$  et  $I_p$  en fonction de la conversion, avec les valeurs de  $M_n$  (symboles pleins) et  $I_p$  (symboles creux) obtenues pour deux polymérisations du NAS par NMP (110°C, 5% molaire SG1 libre,  $M_{n,vise} = 50\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ ) dans le PC ( $\blacksquare,\Box$ ) et dans le DMF ( $\bigcirc,\bigcirc$ ). CES DMF avec une calibration relative en PMMA.

Nous avons donc fait l'hypothèse de réactions de transfert du monomère NAS au solvant DMF. Un autre solvant de polymérisation présentant un faible pouvoir transférant a été recherché. Une solubilité a pu être remarquée pour le NAS et le PNAS dans l'éthylène carbonate (EC) et le propylène carbonate (PC), dont les points de fusion de l'EC et du PC sont respectivement de 35-38°C et -55°C. Si l'on souhaite rester dans les mêmes conditions expérimentales que pour les polymérisations précédemment effectuées dans le DMF, i.e. solubilisation du NAS, de la MAMA-SG1 et du SG1 dans le DMF puis dégazage, il est nécessaire de chauffer l'EC dont la température de fusion est de l'ordre de 35°C. Or à cette température, l'alcoxyamine MAMA-SG1 commence sa dissociation. Nous avons donc préféré l'utilisation de PC pour effectuer la polymérisation.

Dans le PC, on peut constater une augmentation linéaire des  $M_n$  par rapport à la conversion avec des valeurs d' $I_p$  plus faibles (Figure 2.29, ( $\blacksquare$ , $\Box$ )). Pour les procédés RAFT et ATRP, l'utilisation de ce type de solvant est parfois privilégiée, lorsque cela est nécessaire, comme par exemple l'EC pour la polymérisation de l'acrylonitrile comme alternative au DMF.<sup>270</sup> Dans ce cas, il a été fait l'hypothèse d'un rôle du radical issu de l'abstraction d'un atome d'hydrogène d'un des groupements méthyle du DMF. Or dans notre situation, des réactions de transfert à solvant peuvent aussi être envisagées pour expliquer la baisse des valeurs des masses moléculaires par rapport à celles attendues (amorçage d'unités NAS par les radicaux issus du DMF).

#### 2.2.1.4 Caractère vivant

Bien qu'il ne soit pas un aspect fondamental pour ce projet, le caractère vivant de la polymérisation du NAS par NMP à partir de la MAMA-SG1 demeure une caractéristique intéressante et utile pour la synthèse ultérieure de copolymères à blocs à partir d'un macroamorceur de type PNAS-SG1. Pour l'étudier, différentes analyses ont été réalisées.

Tout d'abord un test de reprise de polymérisation du styrène à partir du macro-amorceur (supposé PNAS-SG1 d'une masse molaire de 9 600 g.mol<sup>-1</sup>) pour une  $M_n$  visée de 40 000 g.mol<sup>-1</sup> en PS a été effectué. La polymérisation a dû être effectuée dans le DMF en raison de l'insolubilité du PNAS dans le styrène. Il a pu être constaté un déplacement des chromatogrammes en CES DMF vers les hautes masses molaires, en passant du PNAS-SG1 au PNAS-*b*-PS. Ce déplacement nous indique l'amorçage de la polymérisation du styrène par le PNAS-SG1 (Figure 2.30). Toutefois, le chromatogramme du PNAS-*b*-PS présente une légère traînée observée aux basses masses ne nous permettant pas de conclure de manière précise sur l'efficacité d'amorçage.



FIGURE 2.30 – Chromatogrammes obtenus par CES DMF du PNAS-SG1 (—) et du PNAS-b-PS (- -) obtenu par NMP du styrène à partir du PNAS-SG1 dans le DMF

Sur l'échantillon PNAS-*b*-PS obtenu, il a été effectué une RMN du solide du <sup>13</sup>C par rotation à l'angle magique pour pallier l'absence de solubilité dans les solvants deutérés (Figure 2.31). Les signaux relatifs aux carbones aromatiques du styrène apparaissent sur le spectre entre 128.6 et 146.0 ppm et ceux des protons de la chaîne aliphatique entre 26.5 et 40.6 ppm, le signal des carbonyles du NAS à 171.1 ppm. En comparant les valeurs d'intégrale des signaux relatifs aux carbones des motifs styrène avec celles des signaux relatifs aux carbones des motifs NAS, il a été déterminé que le copolymère dibloc obtenu présente trois fois plus de moles de PS que de PNAS, soit un taux de chaînes vivantes estimé à environ 50%.



FIGURE 2.31 – RMN  $^{13}\mathrm{C}$  solide par rotation à l'angle magique (NH-21 : PNAS-SG1 et NH-22 : PNAS-b-PS, 400 MHz)

Une mesure du taux de chaînes vivantes a été enfin effectuée par l'analyse du PNAS-SG1 par résonance paramagnétique électronique (RPE). L'analyse a été conduite dans le DMF avec l'utilisation de SG1 comme standard et conforte le taux de chaînes vivantes de 50%.

# 2.2.2 Étude de la NMP du NAS et de la NVP amorcée par la MAMA-SG1

Après une étude approfondie du comportement du NAS en homopolymérisation, sa copolymérisation avec la NVP a été étudiée pour générer le segment hydrophile/fonctionnel P(NAS-*co*-NVP) envisagé dans le cadre de ce projet.

#### 2.2.2.1 Détermination des rapports de réactivité du NAS et de la NVP

L'étude de la copolymérisation du NAS et de la NVP par NMP a été conduite à 100°C (pour prévenir la dégradation de la NVP<sup>271</sup> au-delà de 95°C) dans le DMF (1 mol.L<sup>-1</sup> totale en monomères) avec l'utilisation de la MAMA-SG1 comme amorceur. Plusieurs fractions molaires initiales en monomère NAS ont été réalisées afin de déterminer le couple de rapports de réactivité  $r_{NAS}$  et  $r_{NVP}$ .

Comme discuté dans la partie bibliographique, la majorité des procédures de calculs de rapports de réactivité exploitent les données expérimentales à de faibles taux de conversion (<5%), puisqu'elles sont basées sur l'équation différentielle de copolymérisation. C'est le cas pour les techniques de Mayo-Lewis, de Fineman-Ross et de Kelen-Tüdos. Pour des données expérimentales obtenues pour des taux de conversion moyens (40-50%), la méthode Kelen-Tüdos étendue peut être appliquée.

Cependant, la copolymérisation du NAS et de la NVP par NMP suit une cinétique de copolymérisation très rapide avec des conversions élevées en monomères en des temps courts (environ 60 minutes). À ce phénomène, s'ajoute le fait que lorsque le NAS est en défaut molaire par rapport à la NVP, comme par exemple pour des fractions molaires initiales de 20 et 30% de NAS, le NAS est converti en moins de 10 minutes de polymérisation ce qui provoque un arrêt de la conversion de la NVP. Par conséquent, la méthode des moindres carrés a été choisie pour corréler les données expérimentales et théoriques, obtenues suivant l'équation intégrée de copolymérisation rappelée dans l'équation (2.16), pour déterminer les rapports de réactivité  $r_{NAS}$  et  $r_{NVP}$ .

$$1 - \frac{[M_1]}{[M_1]_0} = 1 - \left[\frac{f_1}{(f_1)_0}\right]^{\alpha} \left[\frac{f_2}{(f_2)_0}\right]^{\beta} \left[\frac{(f_1)_0 - \delta}{f_1 - \delta}\right]^{\gamma}$$
(2.16)

avec :

$$\alpha = \frac{r_2}{1 - r_2}, \beta = \frac{r_1}{1 - r_1}, \delta = \frac{1 - r_2}{2 - r_1 - r_2}, \gamma = \frac{1 - r_1 r_2}{(1 - r_1)(1 - r_2)}$$
(2.17)

Pour déterminer, les rapports de réactivité  $r_{NAS}$  et  $r_{NVP}$ , il s'agit de tracer les valeurs expérimentales de la fraction molaire dans le milieu d'un des deux monomères (dans notre cas le NAS,  $f_{NAS}$ ) en fonction de la conversion globale. L'équation de Skeist intégrée est ensuite utilisée pour tracer les courbes théoriques d'évolution des fractions molaires  $f_{NAS}$  en fonction de la conversion.

Les paramètres  $\alpha, \beta, \delta$  et  $\gamma$  de l'équation de copolymérisation intégrée étant dépendants des rapports de réactivité, ces derniers deviennent des paramètres modulables. Les valeurs des rapports  $r_{NAS}$  et  $r_{NVP}$ sont définies par l'utilisateur de sorte à ajuster les données expérimentales avec les valeurs théoriques suivant la méthode non-linéaire des moindres carrés en minimisant la somme des carrés des écarts entre données théoriques et expérimentales, définie par l'équation 2.18.

$$ss(r_1, r_2) = \sum_{i=1}^{n} w_i (y_i - f(f_i, r_1, r_2))^2$$
(2.18)

avec  $w_i = \frac{1}{y_i^2}$  et dans laquelle  $y_i$  représente la conversion molaire globale expérimentale et où  $f(f_i, r_1, r_2)$ représente la conversion molaire globale calculée selon l'équation (2.14).

Les différents graphiques d'ajustement entre données expérimentales et théoriques de la fraction molaire du NAS en fonction de la conversion molaire globale sont exposés dans la Figure 2.32.

Les données expérimentales et théoriques sont en bonne adéquation. Les rapports de réactivité  $r_{NAS}$  et  $r_{NVP}$  ont été calculés en présence et en l'absence de SG1 libre dans le DMF et dans le PC avec SG1 libre. Les résultats sont répertoriés dans le Tableau 2.2, où il est constaté que les différentes conditions expérimentales (présence versus absence de SG1 libre et DMF versus PC) ont peu d'influence sur les rapports de réactivité.



(c) 100°C, PC , 5% molaire de SG1 libre

FIGURE 2.32 – Graphiques des fractions molaires du NAS  $(f_{NAS})$  ( $\blacksquare$  expérimentales et — théoriques) dans le milieu réactionnel en fonction de la conversion molaire globale (a) dans le DMF, sans SG1 libre et (b) avec 5% molaire de SG1 libre et (c) en présence de 5% de SG1 libre dans le PC

$[SG1]_0/[MAMA-SG1]_0$	DP visé	Solvant	$r_{NAS}$	$r_{NVP}$	Composition azéotropique (% mol NAS)
0	300	DMF	0.15	0	54
0.05	300	DMF	0.12	0	53
0.05	300	$\mathbf{PC}$	0.10	0	53

Tableau 2.2 – Influence des conditions expérimentales sur les valeurs des rapports de réactivité  $r_{NAS}$  et  $r_{NVP}$  déterminées suivant l'équation intégrée de copolymérisation par corrélation des données expérimentales et théoriques par la méthode des moindres carrés. Résultats obtenus avec une erreur maximale de 5%.

Le produit des rapports de réactivité étant égal à 0, avec  $r_{NVP}=0$  et  $r_{NAS} \neq 0$ , indique que la propagation croisée est préférée, provoquant une intégration des monomères suivant un comportement qui tend à l'alternance. En définitive, la technique de polymérisation n'a aussi que très peu d'influence sur les rapports de réactivité, puisque Erout *et coll.*<sup>265</sup> avaient déterminé des valeurs de rapports de réactivité  $r_{NAS}=0.27$  et  $r_{NVP}=0.01$ , avec l'obtention d'un produit  $r_{NAS} \ge r_{NVP}$  tendant vers 0 et donc d'un copolymère avec un enchaînement alterné des monomères NAS et NVP. Ces valeurs étaient relativement attendues. En effet, lorsque la NVP est copolymérisée avec des acrylates, et notamment avec des ester activés d'acide insaturé, la valeur  $r_{NVP}$  approche toujours la valeur 0, provoquant la formation de copolymères dont la structure présente une tendance à l'alternance des monomères.<sup>265, 272</sup>
La composition azéotropique, i.e.  $F_1=f_1$ , déduite des rapports de réactivité, est sensiblement la même quelles que soient les conditions opératoires utilisées avec 53/54% molaire de NAS et 47/46% molaire de NVP.

#### 2.2.2.2 Étude de la NMP du NAS et de la NVP

La suite de cette étude portant sur la copolymérisation du NAS et de la NVP est menée avec les paramètres suivants : 100°C, 1M totale de monomères dans le DMF, 5% de SG1 libre pour assurer un meilleur contrôle de la copolymérisation et une fraction molaire initiale de NAS dans le milieu à 60%, proche de la composition azéotropique. Malgré une dilution des monomères à 1M, la copolymérisation du NAS et de la NVP est plus rapide que l'homopolymérisation du NAS (Figure 2.33(a) en comparaison avec la Figure 2.26 (a) et (b)). Cette rapidité est un atout pour la future copolymérisation du NAS et de la NVP à partir du PLA-SG1. En effet, la polymérisation à partir de cette macro-alcoxyamine devra être effectuée à 120°C pour avoir une meilleure efficacité d'amorçage. Or si la NVP n'est pas intégrée au polymère, elle se dégrade au bout de 6h. Par conséquent, avec une cinétique aussi rapide nous pouvons envisager sereinement la copolymérisation à partir de la macro-alcoxyamine PLA-SG1.



FIGURE 2.33 – (a) Évolution de la conversion (symboles pleins) et du  $\ln([M]_0/[M])$  (symboles vides) en fonction du temps. (b) Évolution des  $M_n$  (symboles pleins) et  $I_p$  (symboles vides) en fonction de la conversion pour différentes  $M_n$  visées (10 000 g.mol<sup>-1</sup> :  $\blacktriangle$ ) (20 000 g.mol<sup>-1</sup> :  $\bigcirc$ ) et (40 000 g.mol<sup>-1</sup> :  $\square$ ), respectivement. NMP du NAS et de la NVP à 100°C, 1M total de monomères dans le DMF, [SG1]/[MAMA-SG1]=0.05

L'expression logarithmique  $\ln([M]_0/[M])$  augmente linéairement avec le temps pour différentes  $M_n$  visées (10 000, 20 000 et 40 000 g.mol<sup>-1</sup>). La masse molaire augmente également avec la conversion et les polymères formés présentent des  $I_p$  inférieurs à 1.4 nous indiquant un contrôle relatif de la copolymérisation du NAS et de la NVP par NMP dans ces conditions (Figure 2.33(b)). Un spectre RMN <sup>1</sup>H d'un P(NAS-*co*-NVP) typiquement obtenu après précipitation dans l'éther diéthylique froid est présenté dans la Figure 2.34. Le spectre révèle la présence des signaux correspondants aux protons -CH<sub>2</sub>- de la chaîne carbonée du NAS, aux protons des groupements -CH<sub>2</sub>- du cycle en  $\alpha$ et en  $\beta$  du carbonyle de la NVP (1.4-2.4 ppm), aux protons -CH<sub>2</sub>- de l'unité NS (2.7-2.9 ppm) et aux protons -CH- de la chaîne carbonée correspondant aux motifs NAS et NVP, ainsi que les signaux des groupements méthylène en  $\alpha$  de l'azote de la NVP (3.0-3.6 ppm). Les signaux relatifs aux protons des groupements *tert*-butyle du SG1 apparaissent vers 1 ppm.



FIGURE 2.34 – Spectre RMN <sup>1</sup>H d'un P(NAS-*co*-NVP) après précipitation dans l'éther diéthylique (DMSO-*d*6, 300MHz)

La composition finale du copolymère obtenu après purification par précipitation dans l'éther diéthylique a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm des anions NHS libérés dans le milieu après réaction quantitative de l'éthanolamine sur les fonctions ester. Ainsi, la composition obtenue est de 54 et de 46% molaire de NAS et NVP respectivement et est en bon accord avec la détermination théorique obtenue précédemment à l'aide des rapports de réactivité.

# 2.3 Synthèse du copolymère à blocs PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) par couplage ROP/NMP

Le copolymère dibloc PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) est élaboré suivant une stratégie de couplage ROP/NMP, qui repose sur la fonctionnalisation du bout de chaînes du premier bloc, ici le PLA, par le nitroxyde SG1, afin d'obtenir une macro-alcoxyamine PLA-SG1 capable d'amorcer la NMP du NAS et de la NVP. Cette stratégie requiert trois étapes exposées dans la Figure 2.35. La première est celle de la polymérisation du D,L-LA par  $\text{ROP}_{c,i}$  catalysée par le  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ , amorcée par l'acrylate de 2-hydroxéthyle (HEA). Cette étape <u>1</u> permet d'aboutir à un PLA  $\alpha$ -acrylate fonctionnel, doté d'une double liaison vinylique en bout de chaînes sur laquelle sera effectuée l'addition radicalaire intermoléculaire de type 1-2 de l'alcoxyamine MAMA-SG1 dans l'étape <u>2</u>. La macro-alcoxyamine PLA-SG1 ainsi obtenue permettra d'amorcer la NMP du NAS et de la NVP dans l'étape <u>3</u> pour accéder ainsi au copolymère dibloc PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP). Ces trois étapes vont donc être abordées dans la suite de ce manuscrit.



FIGURE 2.35 – Schéma de synthèse du copolymère à blocs PLA- $b\mbox{-}P(\mbox{NAS-}co\mbox{-}NVP)$  par couplage ROP/NMP

#### 2.3.1 Synthèse de la macro-alcoxyamine PLA-SG1

Pour aboutir à la macro-alcoxyamine PLA-SG1, les étapes  $\underline{1}$  et  $\underline{2}$  du schéma réactionnel de la Figure 2.35 sont réalisées successivement.

#### 2.3.1.1 ROP<sub>c,i</sub> du D,L-LA amorcée par le HEA et catalysée par le Sn $(Oct)_2$

Les travaux de Clément<sup>273</sup> décrivent tout particulièrement la  $\text{ROP}_{c,i}$  du D,L-LA amorcée par le HEA et catalysée par le  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ . Nous nous sommes basés sur ses travaux, i.e. en utilisant les conditions de polymérisation : rapport initial  $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]_0/[\text{HEA}]_0=0.05$  et température de polymérisation de 135°C.

Selon cette méthode, il a été obtenu des PLA  $\alpha$ -acrylate avec de faibles  $I_p$ , généralement inférieurs à 1.2 (Tableau 2.3). Les masses molaires ont été déterminées par CES THF avec l'utilisation d'une calibration universelle reliant la masse molaire des standards PS avec celle des échantillons PLA (coefficients de Mark-Houwink du PLA (K=0.055 et  $\alpha$ =0.639) et du PS (K=0.0114 et  $\alpha$ =0.716), dans le THF à

30°C). Les masses molaires peuvent être également déterminées par la relation de Save *et coll.*<sup>274</sup> où  $M_{n\ exp} = 0.58 \pm 0.05 \times M_{n\ calibration\ PS}$  grâce à la calibration PS utilisée. Les masses molaires obtenues par la calibration universelle ou par la relation de Save sont proches des valeurs visées (en tenant compte de la conversion), comme en témoigne le Tableau 2.3.

Code	$M_n$ visée	Conversion (RMN <sup>1</sup> H)	$M_n$ attendue	$M_n(I_p)$ (a)	$M_n$ (b)
	$(g.mol^{-1})$	(%)	$(g.mol^{-1})$	$(g.mol^{-1})$	$(g.mol^{-1})$
PLA1	27  000	75	$20 \ 250$	$19\ 100\ (1.14)$	$17 \ 900$
PLA2	20  000	50	10000	$11 \ 340 \ (1.14)$	10  850
PLA3	10  000	91	9 100	$8\ 670\ (1.15)$	8 500
PLA4	14000	83	11 620	12 880 (1.08)	$12\ 240$

Tableau 2.3 – Récapitulatif des masses molaires obtenues pour plusieurs PLA suivant différentes méthodes en comparaison avec les valeurs théoriques attendues. (a)  $M_n$  déterminées par calibration universelle par CES THF et (b)  $M_n$  obtenues suivant la méthode de Save



FIGURE 2.36 – Spectre RMN <sup>1</sup>H d'un PLA  $\alpha$ -acrylate après précipitation dans le méthanol (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Le spectre RMN <sup>1</sup>H typique d'un PLA  $\alpha$ -acrylate obtenu après précipitation dans le méthanol froid est exposé dans la Figure 2.36. Le spectre montre la présence des signaux correspondant aux bouts de chaînes du PLA  $\alpha$ -acrylate, avec les pics caractéristiques des protons de la double liaison vinylique (3H, 5.75-6.50 ppm), des protons des groupements -CH<sub>2</sub>- du HEA et du proton -CH- adjacent à la fonction hydroxyle du bout de chaînes  $\omega$  (5H, 4.25-4.5 ppm). Le spectre présente bien les signaux relatifs aux protons de la chaîne aliphatique du PLA avec les groupements -CH- entre 5.1 et 5.3 ppm et les groupements -CH<sub>3</sub>entre 1.5 et 1.6 ppm.

L'efficacité d'amorçage par le HEA peut être déterminée en utilisant comme référence l'intégrale des

protons -CH- du PLA correspondant à la masse molaire absolue obtenue par CES, la valeur de l'intégrale des protons vinyliques de HEA étant de 3 si l'amorçage est efficace à 100%. Le rapport de la valeur expérimentale sur la valeur théorique (3) donne accès à l'efficacité d'amorçage de la ROP par le HEA. L'efficacité d'amorçage par le HEA est typiquement de 85-90%.

# 2.3.1.2 Addition radicalaire intermoléculaire de type 1-2 de la MAMA-SG1 sur le PLA-HEA

La deuxième étape de synthèse est celle de l'addition radicalaire intermoléculaire de type 1-2 de l'alcoxyamine MAMA-SG1 sur l'extrémité vinylique du PLA  $\alpha$ -acrylate obtenu précédemment, conduisant à la macro-alcoxyamine PLA-SG1, qui constituera le macro-amorceur de la NMP du NAS et de la NVP.

Les travaux à l'origine de cette synthèse sont ceux de Dufils *et coll.*,<sup>245</sup> qui ont récemment proposé une approche innovante pour l'élaboration de nouvelles alcoxyamines comme amorceurs de NMP. L'addition radicalaire intermoléculaire radicalaire de type 1,2 de la MAMA-SG1 sur des oléfines activées donne accès à des alcoxyamines dites de deuxième génération suivant le schéma réactionnel de la Figure 2.37.



FIGURE 2.37 – Mécanisme de l'addition radicalaire intermoléculaire de type 1,2 de l'alcoxyamine MAMA-SG1 sur des oléfines  $\alpha$ -substituées pour l'obtention d'alcoxyamines secondaires comme adduit 1-2

L'homolyse sous l'influence de la chaleur de la liaison NO-C de l'alcoxyamine MAMA-SG1 produit deux radicaux : un radical alkyle tertiaire et un radical nitroxyle SG1 stable. Lorsque l'effet radical persistant est mis en place, le radical alkyle peut soit s'additionner sur l'oléfine activée pour conduire à un radical transitoire, soit recombiner avec le nitroxyde SG1 pour redonner l'alcoxyamine de départ. L'adduit 1,2 de cette réaction, plus stable thermiquement que l'alcoxyamine de départ, est obtenu par recombinaison irréversible du radical transitoire avec le nitroxyde SG1, dans des conditions opératoires adaptées.

Le succès de cette réaction repose sur la différence de stabilité thermique entre l'alcoxyamine de départ

et l'alcoxyamine finale. Marque *et coll.*<sup>160, 275</sup> ont démontré que les alcoxyamines tertiaires avaient des énergies d'activation de dissociation (*Ea*) inférieures à celles des alcoxyamines secondaires de structure proche (Figure 2.38). Ainsi, la température de cette réaction doit être supérieure à celle de la dissociation de l'alcoxyamine de départ et inférieure à celle de la dissociation de l'alcoxyamine finale.



FIGURE 2.38 – Profil réactionnel de la dissociation des alcoxyamines initiales et finales lors d'une réaction d'addition radicalaire intermoléculaire de type 1-2. Source E. Dufils<sup>276</sup>

Dufils a effectué une fine mise au point des conditions expérimentales de la température et du temps de réaction, afin que la dissociation de l'alcoxyamine de départ se produise mais sans provoquer la dissociation de l'alcoxyamine finale. Ainsi, il a été déterminé qu'une température de  $100^{\circ}$ C, avec un temps de réaction de 1h et une concentration initiale en MAMA-SG1 de 1M étaient des conditions idéales pour aboutir à un rendement optimal. Grâce à cette mise au point, une nouvelle gamme variée d'alcoxyamines a pu être obtenue grâce à la diversité des substituants Y des oléfines disponibles à partir de *n*-butyle acrylate, d'acide acrylique, d'acrylamide ou encore de styrène, avec des rendements de fonctionnalisation proches de 85%.

Les conditions expérimentales déterminées par Dufils pour l'addition radicalaire intermoléculaire de type 1-2 sur le PLA  $\alpha$ -acrylate ont été retenues : température de réaction de 100°C, atmosphère inerte d'argon et solvant THF avec une concentration initiale en MAMA-SG1 de 0.2M. Afin d'augmenter le rendement de fonctionnalisation de 75% obtenu par l'utilisation de quantités stoechiométriques de MAMA-SG1 et de PLA  $\alpha$ -acrylate, la réaction a été conduite en présence de 10 équivalents de MAMA-SG1 par double liaison vinylique.<sup>193</sup> La solution finale obtenue est refroidie pour être précipitée dans le méthanol froid, afin d'éliminer l'excès de MAMA-SG1 n'ayant pas réagi.



FIGURE 2.39 – Spectres <sup>1</sup>H (a) du PLA  $\alpha$ -acrylate et (b) de la macro-alcoxyamine PLA-SG1 après précipitation dans le méthanol (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

Le précipité est analysé par RMN <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P. Le spectre RMN <sup>1</sup>H de la Figure 2.39 révèle la disparition des protons vinyliques acrylates (5.75 - 6.50 ppm) et l'apparition des signaux correspondant aux protons des deux groupements *tert*-butyle du fragment nitroxyde (1.1 - 1.2 ppm). Les intégrations de ces différents signaux sont en bon accord avec celles attendues.

Le spectre RMN <sup>31</sup>P révèle la présence d'un seul pic à 25 ppm caractéristique du nitroxy de SG1, confirmant l'absence de pic résiduel de la MAMA-SG1. L'analyse RMN <sup>31</sup>P en présence de diéthylphosphite comme étalon interne à la même concentration que le PLA-SG1 (10 <sup>-2</sup> M) confirme un taux de fonctionnalisation typique de 70 à 90% selon l'efficacité d'amorçage par le HEA lors de la ROP du D,L-LA.

Une analyse RPE a été effectuée pour déterminer le taux de fonctionnalisation en SG1 dans le *tert*butylbenzène. Ce solvant est choisi parce qu'il représente le solvant de choix de la RPE : inerte et apolaire. Cependant, des valeurs inférieures à celles obtenues précédemment par RMN <sup>31</sup>P sont à constater probablement en raison d'une solubilité incomplète du PLA dans ce solvant.

### 2.3.2 Copolymérisation du NAS et de la NVP amorcée par le PLA-SG1

#### 2.3.2.1 Détermination des rapports de réactivité

La copolymérisation du NAS et de la NVP à partir du PLA-SG1 a été conduite dans les mêmes conditions que celle amorcée par la MAMA-SG1, i.e. 1M totale de monomères dans le DMF en présence de 5% de SG1 libre. L'utilisation du propylène carbonate aurait été judicieux pour un meilleur contrôle des masses molaires mais la solubilité du PLA n'étant pas complète, nous avons préféré conserver le DMF. La macro-alcoxyamine PLA-SG1 ( $k_d = 1.09 \ge 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  et  $E_a = 122.9 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) est plus stable que la MAMA-SG1 ( $k_d = 0.34 \text{ s}^{-1}$  et  $E_a = 117 \text{ kJ.mol}^{-1}$  à  $120^{\circ}$ C). Par conséquent, pour avoir un amorçage efficace, il est nécessaire de conserver la température de  $120^{\circ}$ C utilisée par Clément *et coll.*<sup>193, 273</sup> pour la NMP du HEA amorcée par le PLA-SG1.



FIGURE 2.40 – Fraction molaire du NAS ( $f_{NAS}$ ) dans le milieu réactionnel en fonction de la conversion molaire globale. NMP du NAS et de la NVP amorcée par le PLA-SG1 (8 500 g.mol<sup>-1</sup>) 120°C, 5% de SG1 libre avec 1M totale de monomères dans le DMF (DP visé 300)

De la même manière que pour la NMP du NAS et de la NVP amorcée par la MAMA-SG1, les rapports de réactivité ont été déterminés pour la NMP de nos deux co-monomères amorcée par le PLA-SG1 (8500 g.mol<sup>-1</sup>) par la méthode numérique non linéaire des moindres carrés. Il est retrouvé la même tendance que pour l'utilisation de l'alcoxyamine MAMA-SG1, i.e. un produit  $r_{NAS} \times r_{NVP}$  tendant vers zéro avec des valeurs  $r_{NAS}=0.17$  et  $r_{NVP}=0.02$  et une composition azéotropique à 54% molaire de NAS et 46% molaire de NVP dans le copolymère (Figure 2.40). Ainsi, quelles que soient les conditions (amorceurs, solvant, température), la copolymérisation de ce couple de co-monomères entraîne la formation d'un bloc P(NAS-*co*-NVP) avec une alternance des monomères.

#### 2.3.2.2 Caractérisation du copolymère PLA-b-P(NAS-co-NVP)

Concernant la cinétique de copolymérisation, avec une hausse de la température de 100 à 120°C, le temps de copolymérisation est réduit à 30 min, rampe de température jusqu'à 120°C comprise, pour atteindre des conversions molaires proches de 100% en se plaçant à une fraction molaire de NAS dans le milieu proche de la composition azéotropique (60%).

Les analyses par CES DMF révèlent clairement un déplacement des chromatogrammes vers les hautes masses en passant du PLA-SG1 au PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) quelles que soient les masses visées (Figure 2.41 (a)). Ceci suggère la formation du copolymère à blocs, sans pouvoir conclure précisément sur l'efficacité d'amorçage. Toutefois, par analyse RMN <sup>1</sup>H des bruts de polymérisation au cours de la conversion, on peut noter que les signaux des protons des groupements *tert*-butyle (1-1.5 ppm) du SG1 se déplacent durant la polymérisation (Figure 2.41(b)). Ceci résulte d'un changement d'environnement du SG1 qui était à l'origine lié en  $\alpha$  du PLA et qui devient alors adjacent aux monomères NAS et NVP. Ceci nous indique un amorçage relativement efficace de la NMP par le PLA-SG1. Les  $I_p$  sur les bruts réactionnels sont tous inférieurs à 1.5. Cependant, une augmentation de ces derniers est constatée sur les copolymères précipités avec des valeurs inférieures à 1.8. Ces  $I_p$ , bien qu'élevés, demeurent acceptables.



FIGURE 2.41 – (a) Chromatogrammes obtenus par CES DMF du PLA-SG1 (—), du PLA-b-P(NAS-co-NVP) pour une  $M_n$  visée de 10 000 g.mol<sup>-1</sup> (--) et une  $M_n$  visée de 20 000 g.mol<sup>-1</sup> (···). (b) Spectres RMN <sup>1</sup>H de bruts réactionnels à 15, 30, 45 et 60 min de haut en bas. Copolymérisation du NAS et de la NVP à partir du PLA-SG1, 5% de SG1 libre, 1M totale de monomères,  $f_{NAS,0}=0.61$ 

Les masses molaires du copolymère sont déterminées par RMN <sup>1</sup>H sur le copolymère précipité, en exploitant l'intégrale des signaux des protons -CH- du PLA, correspondant à la masse molaire vraie du PLA déterminée par CES THF, et l'intégrale correspondant aux protons -CH<sub>2</sub>- des groupes NS (Figure

2.42). Les masses molaires obtenues sont en relativement bonne adéquation avec celles visées. Les valeurs légèrement supérieures aux valeurs visées peuvent s'expliquer par un amorçage non total de la NMP du NAS et de la NVP depuis la macro-alcoxyamine PLA-SG1 (Tableau 2.4).

Code	$M_n$ PLA-SG1	$M_{n,vis\acute{e}e}$	$C_{NAS}$	$\mathrm{C}_{\mathrm{NVP}}$	$M_n$	I (b)
		P(NAS-co-NVP)			P(NAS-co-NVP) (a)	$I_p(0)$
	$(g.mol^{-1})$	$(g.mol^{-1})$			$(g.mol^{-1})$	
Copo1	$19\ 000,\ 1.14$	20 000	0.95	0.90	22 000	1.79
Copo2	$19\ 000,\ 1.14$	10000	0.94	0.92	13000	1.74
Copo3	11 400, 1.14	20 000	0.96	0.90	30 000	1.79
Copo4	$11\ 400,\ 1.14$	10000	0.98	0.96	16000	1.49

Tableau 2.4 – Liste de quelques copolymères PLA-b-P(NAS-co-NVP) utilisés dans la suite de l'étude pour l'élaboration de nanoparticules et/ou micelles, avec les valeurs de  $M_n$  des différents blocs,  $M_n$ obtenues (a) par RMN <sup>1</sup>H et (b) par CES dans le DMF



5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2 1.0 0. fl (ppm)

 $\label{eq:FIGURE 2.42-Spectre ^1H d'un PLA-b-P(NAS-co-NVP) purifié par précipitation dans un mélange méthanol/éther diéthylique (v/v) (CDCl_3, 400MHz)$ 

Le spectre RMN <sup>1</sup>H typiquement obtenu pour le copolymère révèle en outre la présence des signaux caractéristiques des protons -CH- et -CH<sub>3</sub>- du PLA respectivement à 5.3-5.1 ppm et 1.65-1.50 ppm, la présence des signaux des protons -CH<sub>2</sub>- des groupements NS à 2.8 ppm, ainsi que les signaux des protons -CH- de la chaîne carbonée des motifs NAS et NVP et ceux des protons -CH<sub>2</sub>- en  $\alpha$  de l'azote de la NVP entre 3.5 et 3.1 ppm. Les signaux relatifs aux protons -CH<sub>2</sub>- de la chaîne carbonée des motifs NAS et NVP ainsi que du cycle à 5 en  $\alpha$  et  $\beta$  du carbonyle se situent sous un massif entre 2.6 et 1.7 ppm.

# 2.4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié l'influence des facteurs température et quantité de SG1 libre sur l'homopolymérisation du NAS et sur la copolymérisation du NAS et de la NVP par NMP amorcée par la MAMA-SG1, pour obtenir le meilleur contrôle de ces polymérisations afin de produire des polymères PNAS et P(NAS-*co*-NVP) présentant des distributions étroites des masses molaires.

La NMP du NAS permet de donner accès à des homopolymères fonctionnalisables bien définis. La linéarité de la fonction  $\ln([M]_0/[M])$  en fonction du temps, l'augmentation des masses molaires avec la conversion et les faibles indices de polydispersité (<1.4) suggèrent le contrôle de ce type de polymérisation.

Le taux de chaînes vivantes déterminées à environ 50% peut être le résultat d'un amorçage peu efficace de la MAMA-SG1 sur le NAS associé à une constante de propagation élevée. Afin d'élargir le champ d'application du PNAS et de l'envisager en tant que macro-amorceur de NMP, il serait intéressant d'approfondir l'étude du taux de chaînes vivantes, en suivant notamment son évolution en fonction de la conversion.

La  $\text{ROP}_{c,i}$  du D,L-lactide, amorcée par l'HEA et catalysée par le  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ , associée à l'addition intermoléculaire radicalaire de type 1-2 de la MAMA-SG1 sur la liaison vinylique de PLA  $\alpha$ -acrylate est une méthode efficace dans l'obtention de PLA-SG1 comme macro-amorceur de NMP.

La copolymérisation du NAS et de la NVP par NMP amorcée par l'alcoxyamine modèle MAMA-SG1 puis par la macro-alcoxyamine PLA-SG1 donne accès à des copolymères bien définis avec alternance des monomères. Le comportement à l'alternance de ces deux monomères ne nous permettra pas toutefois de moduler les fractions molaires de NAS et de NVP incorporées dans le copolymère final. Cependant, notre objectif principal est d'avoir une grande fraction de monomères fonctionnalisables et ce type de copolymérisation nous permet d'ores et déjà d'obtenir des copolymères avec une fraction molaire de NAS très importante. Ce dernier point est très intéressant puisque cela devrait permettre de fonctionnaliser le bloc P(NAS-*co*-NVP) avec une quantité importante de biomolécules.

En conclusion, la combinaison de la ROP du D,L-LA et de la NMP du NAS et de la NVP, via l'utilisation d'une macro-alcoxyamine PLA-SG1, s'est révélée être une stratégie judicieuse et efficace, pour accéder aisément au copolymère à blocs PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP).

# Chapitre 3

# Préparation de micelles multifonctionnelles

#### Sommaire

3.1 Rap	opels bibliographiques sur les micelles
3.1.1	Concentration Micellaire Critique
3.1.2	Méthodes de préparation de micelles
<b>3.2</b> Pré	paration de micelles
3.2.1	Micelles de copolymère PLA- <i>b</i> -P(NAS- <i>co</i> -NVP)
3.2.2	Micelles de copolymères modifiés par des sucres
3.2.3	Étude de l'encapsulation de l'imiquimod dans les micelles 106
3.3 Cor	1000000000000000000000000000000000000

 $A^{\text{Près avoir réalisé la synthèse du copolymère à blocs PLA-b-P(NAS-co-NVP), notre premier objectif a été la formation de micelles à partir de ce copolymère préalablement synthétisé. }$ 

D'une part, la formation de micelles permet d'attester le caractère amphiphile de ce copolymère, qui est un point important de notre travail de recherche.

D'autre part, outre leur utilisation depuis des décennies pour la délivrance de principes actifs (encapsulés en leur cœur),<sup>277–280</sup> les micelles sont décrites tout récemment comme moyen de vaccination  $ADN^{281}$  et pour le le ciblage des cellules dendritiques (DC).<sup>282</sup> Après leur administration par voie souscutanée, les micelles, grâce à leur petite taille (<100 nm), sont aisément transportées jusqu'aux ganglions lymphatiques via les vaisseaux lymphatiques et constituent par conséquent un excellent moyen de délivrance de biomolécules dans ces foyers aux nombreuses cellules immunitaires.<sup>283, 284</sup> Il était donc judicieux d'élaborer des micelles fonctionnelles à partir du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP).

# 3.1 Rappels bibliographiques sur les micelles

Avant d'exposer et de discuter nos résultats obtenus pour l'élaboration de micelles fonctionnelles à partir du copolymère PLA-*b*-P-(NAS-*co*-NVP), nous allons détailler quelques rappels sur la concentration micellaire critique (CMC) et les différentes méthodes de préparation de micelles à partir de copolymères à blocs.

#### 3.1.1 Concentration Micellaire Critique

Les micelles sont des agrégats colloïdaux obtenus par auto-assemblage de molécules amphiphiles (communément appelées tensioactifs) dans un solvant sélectif. De manière générale, dans un solvant sélectif aqueux, les molécules de tensioactif sont disposées de telle sorte que leur partie hydrophobe soit dirigée vers l'intérieur des micelles, tandis que leur partie hydrophile est dirigée vers la phase aqueuse.

Les micelles sont caractérisées par une concentration en tensioactifs, à partir de laquelle la formation de ces systèmes est observée. Cette concentration est communément appelée concentration micellaire critique (CMC), et plus rarement concentration d'agrégation critique (CAC). En effet, comme illustré dans la Figure 3.1, qui reporte l'évolution de la tension superficielle en fonction de la concentration en tensioactifs (molécules/copolymères amphiphiles), on dénombre deux régimes. Dans un premier régime correspondant à une faible concentration en tensioactifs dans le milieu aqueux, ces derniers se positionnent à l'interface eau/air pour former un film monomoléculaire, diminuant ainsi la tension de surface entre l'air et l'eau proportionnellement à la concentration en tensioactifs suivant la loi de Gibbs (Figure 3.1 (A)). Lorsque la surface devient saturée en tensioactifs, la tension superficielle reste constante et tout ajout supplémentaire de molécules/copolymères amphiphiles provoque leur auto-assemblage sous forme de micelles. Ces dernières sont en équilibre avec la forme libre de la molécule/copolymère amphiphile (Figure 3.1 (B)). Outre la méthode de détermination de la CMC par le suivi de la tension superficielle en fonction de la concentration en tensioactifs, la CMC est souvent déterminée grâce à l'utilisation de molécules sondes fluorescentes hydrophobes, telles que le pyrène<sup>285</sup> et le Nile Red,<sup>286</sup> qui se logent dans les régions hydrophobes des micelles.

La CMC dépend de la balance hydrophobe/hydrophile du tensioactif mais aussi de facteurs externes tels que la température ou encore la force ionique pour des molécules amphiphiles ioniques. La CMC est d'autant plus faible que la longueur du bloc hydrophobe est grande devant celle du bloc hydrophile.<sup>287</sup>



FIGURE 3.1 – Détermination de la CMC par l'étude de l'évolution de la tension superficielle en fonction de la concentration en tensioactifs

#### 3.1.2 Méthodes de préparation de micelles

Plusieurs techniques sont couramment employées pour l'élaboration de micelles à partir de copolymères amphiphiles, dont les plus utilisées sont décrites ci-après. Elles peuvent être divisées en deux grandes catégories : dissolution directe et utilisation de co-solvants.

#### 3.1.2.1 Dissolution directe

Si le copolymère amphiphile utilisé présente un caractère hydrophobe modéré, tel que le poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(oxyde d'éthylène) (POE-*b*-POP-*b*-POE) (Pluronics), les micelles peuvent être obtenues par dissolution directe dans un solvant aqueux.<sup>287</sup> La micellisation peut être favorisée par chauffage de la solution de copolymères.<sup>287</sup> Lorsque le polymère est trop peu hydroso-luble, les procédés utilisant un co-solvant sont préférés.

#### 3.1.2.2 Méthodes basées sur l'utilisation de co-solvant

#### A- La dialyse

Le copolymère est dissous dans un solvant organique miscible à l'eau, tel que le DMF, le DMSO, l'acétone ou encore le THF. Une dialyse contre l'eau est effectuée pour éliminer le solvant organique et provoquer la formation de micelles, puisque le copolymère se retrouve progressivement dans le solvant sélectif du bloc hydrophile.<sup>244, 287</sup> Lorsque le principe actif à encapsuler est hydrophobe, il peut être dissous dans la phase organique en même temps que le tensioactif.

#### B- Évaporation de solvant (ou nanoprécipitation)

Ce procédé repose sur l'utilisation d'un solvant organique du polymère amphiphile miscible à l'eau.<sup>288</sup> Cette phase organique est ajoutée à une phase aqueuse, ce qui provoque l'assemblage du copolymère en micelles. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation. Le principe actif à encapsuler peut être ajouté à la phase organique.

#### C- Émulsion de solvant dans l'eau

Le polymère est solubilisé dans un solvant organique non miscible à l'eau, typiquement de l'acétate d'éthyle, du dichlorométhane ou encore du chloroforme.<sup>287</sup> De l'eau est ajoutée rapidement dans cette phase organique, qui est ensuite émulsifiée par sonication ou par agitation. La phase d'émulsification permet de produire des gouttelettes de taille nanométrique dispersées dans la phase aqueuse. Le polymère s'agence ainsi à l'interface entre l'eau et le solvant organique pour stabiliser la gouttelette. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation. Cette technique permet aussi l'encapsulation de principes actifs en l'intégrant à la phase organique avant son émulsification.

# 3.2 Préparation de micelles

Dans un premier temps, il est étudié ici l'élaboration et la caractérisation de micelles à partir du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP). Puis nous nous consacrerons aux résultats obtenus pour l'élaboration de micelles à partir de copolymères modifiés par des sucres.

## 3.2.1 Micelles de copolymère PLA-b-P(NAS-co-NVP)

Dans notre projet, les copolymères PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) présentent un bloc hydrophobe de PLA de taille conséquente, par conséquent la dissolution directe n'a pas été possible. Le copolymère étant soluble dans un solvant organique volatil et miscible à l'eau tel que l'acétonitrile (ACN), la méthode d'évaporation de solvant a donc été choisie. Concrètement le copolymère est dissous dans l'ACN (10 mg.mL<sup>-1</sup>), la phase organique est ajoutée sous agitation à une phase d'eau stérile (un volume de phase organique pour deux volumes d'eau), le solvant est évaporé sous pression réduite à 30°C. Cette technique est simple et rapide à mettre en œuvre pour la préparation de micelles.

Grâce à cette technique, des micelles à base des copolymères Copo1 à Copo4 (Mic-Copo1 à Mic-Copo4) ont été élaborées, caractérisées par des tailles (i.e. diamètres hydrodynamiques déterminés par

diffusion dynamique de la lumière : DDL) variant de 53 à 75 nm et des indices de polydispersité (IP) faibles compris entre 0.021 et 0.040 (Tableau 3.1). L'influence de la longueur des blocs sur la taille des micelles reste limitée. Cependant, nous pouvons tout de même noter qu'à taille de bloc PLA identique, l'augmentation du  $M_n$  du bloc hydrophile P(NAS-*co*-NVP) entraîne une légère augmentation du diamètre des micelles. En effet, pour un  $M_n$  du bloc PLA constant et égal à 19 000 g.mol<sup>-1</sup>, l'augmentation du  $M_n$  du bloc P(NAS-*co*-NVP) de 13 000 g.mol<sup>-1</sup> à 22 000 g.mol<sup>-1</sup> entraîne une augmentation du diamètre des micelles de 53 nm (Mic-Copo2) à 59 nm (Mic-Copo1). Le même phénomène est observé avec les micelles Mic-Copo3 et Mic-Copo4, où une augmentation plus forte du  $M_n$  du bloc P(NAS-*co*-NVP) de 16 000 g.mol<sup>-1</sup> à 30 000 g.mol<sup>-1</sup> provoque une variation à la hausse de 9 nm, pour un même bloc de PLA d'un  $M_n$  de 11 400 g.mol<sup>-1</sup>. Le faible caractère hydrophile du bloc P(NAS-*co*-NVP) peut expliquer les faibles variations de taille des micelles en fonction de celle de la masse molaire du bloc hydrophile. En effet, le bloc P(NAS-*co*-NVP) présente environ 54% molaire d'unités NAS contre 46% d'unités NVP.

Code	$M_n$ PLA	$M_n$ P(NAS-co-NVP)	Taille	IP	CMC
	$(g.mol^{-1})$	$(g.mol^{-1})$	(nm)		$(mg.L^{-1})$
Mic-Copo1	19 000	22000	$59 {\pm} 0.15$	$0.021{\pm}0.006$	20
Mic-Copo2	19000	13000	$53 \pm 0.24$	$0.042{\pm}0.020$	20
Mic-Copo3	$11 \ 400$	30 000	$75 {\pm} 0.51$	$0.021 {\pm} 0.016$	20
Mic-Copo4	$11 \ 400$	16 000	$66 {\pm} 0.34$	$0.040{\pm}0.006$	15

Tableau 3.1 – Caractéristiques des micelles de PLA-b-P(NAS-co-NVP)

Les CMC sont déterminées à 25°C avec l'utilisation de Nile Red (9-(diethylamino)-5H-benzo[ $\alpha$ ]phenoxazin-5-one), comme sonde fluorescente.<sup>289,290</sup> Cette molécule étant quasi insoluble dans l'eau, lorsqu'elle est ajoutée dans l'eau, elle se niche dans les régions hydrophobes des micelles lorsqu'elle est ajoutée dans l'eau. Par conséquent la fluorescence du milieu est augmentée dès que les micelles se forment puisqu'elles solubilisent le Nile Red en leur cœur (Figure 3.2(a)).



FIGURE 3.2 – Graphiques (a) de l'intensité de fluorescence émise par le Nile Red et (b) de la longueur d'onde d'émission maximale  $(\lambda_{\acute{em},max})$  en fonction de la concentration de copolymère pour Copo1 ( $\blacksquare$ ), Copo2 ( $\bigcirc$ ) et Copo3( $\blacktriangle$ ) et Copo4 ( $\checkmark$ )

De plus, la diminution de polarité de l'environnement du Nile Red lorsqu'il est encapsulé au sein des micelles provoque une diminution de la longueur d'onde maximale d'émission ( $\lambda_{\acute{em},max}$ ), qui est exploitée pour mesurer de manière précise la CMC au point d'inflexion de la courbe  $\lambda_{\acute{em},max}=f([copolymère])$ (Figure 3.2(b)).<sup>290</sup>

La CMC des quatre copolymères étudiés est d'environ 20 mg.L<sup>-1</sup>. Ces valeurs de CMC relativement faibles sont typiques de celles des micelles de copolymère à base de PLA-*b*-PEG,<sup>291, 292</sup> de PLA-*b*-PNVP<sup>242</sup> ou encore de PCL-*b*-PNVP.<sup>246</sup>

#### 3.2.2 Micelles de copolymères modifiés par des sucres

Comme détaillé dans le chapitre d'étude bibliographique, un intérêt tout particulier est porté actuellement sur l'utilisation de ligands simples, tels que le D-mannose. Nous l'avons choisi pour fonctionnaliser la couronne des micelles, parce qu'il est un excellent ligand des récepteurs lectines de type C et des TLR4. Le D-glucose sera utilisé comme molécule contrôle non supposée interagir avec les cellules de l'immunité.

Afin d'obtenir des micelles fonctionnalisées en surface par un sucre à partir du copolymère PLA-b-P(NAS-co-NVP), deux stratégies sont envisageables : (i) élaboration de micelles, puis couplage de la D-mannosamine ou de la D-glucosamine sur les solutions micellaires ou (ii) couplage en milieu organique du sucre aminé sur le copolymère PLA-b-P(NAS-co-NVP), puis élaboration de micelles à partir du co-polymère obtenu. Nous avons opté pour cette seconde approche, pour deux raisons : (i) les couplages en milieu organique permettent d'envisager de très bons rendements et (ii) par cette méthode, la formation de micelles se produit pendant la même étape que la purification du copolymère de ses impuretés de réaction par dialyse.

Par la suite, les copolymères obtenus par le couplage avec la D-mannosamine et la D-glucosamine seront appelés respectivement copolymères mannosylé et glucosylé.

#### 3.2.2.1 Synthèse de copolymères modifiés par des sucres

Le couplage des deux sucres aminés, D-mannosamine et D-glucosamine, a été effectué sur le copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP), dans le DMSO (10 mg.mL<sup>-1</sup>), en présence de triéthylamine (TEA) (deux équivalents par rapport au sucre) pendant quatre jours.

Les spectres RMN des copolymères mannosylé et glucosylé typiquement obtenus après dialyse du milieu réactionnel contre l'eau et lyophilisation sont présentés dans la Figure 3.3. Les spectres des réactifs





FIGURE 3.3 – Spectres RMN <sup>1</sup>H, de bas en haut : (a) PLA-b-P(NAS-co-NVP), (b) copolymère glucosylé, (c) D-glucosamine, (d) copolymère mannosylé et (e) D-mannosamine (2.7 équivalents de sucre par rapport aux fonctions ester de NS, température ambiante) (DMSO-d6, 400 MHz)

L'apparition des signaux caractéristiques de chacun des protons des deux sucres est constatée dans les plages de déplacement chimique 3.4-5.1 ppm et 3.0-3.2 ppm.

De plus, dans la gamme 6.2-7.9 ppm, les signaux des protons des fonctions hydroxyle des sucres (4H) sont révélés. Ces derniers sont les seuls signaux réellement distincts et éloignés des autres signaux relatifs aux protons du copolymère. Ainsi en prenant comme référence l'intégrale correspondant aux protons -CH- du PLA (5.0-5.3 ppm), l'intégrale des pics compris entre 6.2 et 7.9 ppm, comparée à celle du pic de -CH<sub>2</sub> (4H, 2.8 ppm) du résidu NS sur le spectre PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) de référence, donne accès au taux de couplage.

Pour les spectres ici présentés, des taux de couplages de 60% et 100%, respectivement pour la Dmannosamine et la D-glucosamine, sont déterminés. Ils corroborent les valeurs de taux d'ester de NS résiduels, respectivement de 40% et 0%, obtenus par le rapport de l'intégrale du signal des -CH<sub>2</sub>- du groupement NS après couplage sur celle avant couplage (en prenant toujours pour référence l'intégrale des signaux -CH- du PLA). L'influence du nombre d'équivalents de sucre et de la température sur le rendement de couplage est reportée dans le Tableau 3.2.

Un minimum de 2.7 équivalents de D-glucosamine par rapport aux fonctions ester de NS nécessite d'être ajoutés pour obtenir une réaction quantitative, après quatre jours de réaction à température ambiante (Tableau 3.2).

Sucre	Température	Nb d'équivalents	Rendement de	Taux de fonctions
	(°C)		couplage $(\%)$	ester de NS résiduels (%)
		1.2	28	22
D clue		1.7	85	26
D-gluc	IA	2.7	100	0
		5	100	0
		1.2	0	17
	<b>T A</b>	1.7	52	48
D-man	IA	2.7	60	40
		5	60	40
	45	2.7	57	0

Tableau 3.2 – Influence du nombre d'équivalents de sucre et de la température sur l'aminolyse des fonctions ester de NS du Copo2 par la D-glucosamine (D-gluc) et la D-mannosamine (D-man). TA : température ambiante (25°C)

À température ambiante, l'augmentation du nombre d'équivalents de la D-mannosamine (de 1.7 à 5) ne permet pas d'augmenter de manière considérable les rendements de couplage, le maximum de couplage (60%) étant obtenu pour 2.7 équivalents (Tableau 3.2). La température de couplage a donc été augmentée de 25°C à 45°C pour favoriser le couplage, mais sans effet positif. En revanche, il peut être constaté qu'avec la hausse de la température, l'intégralité des fonctions ester est consommée, ce qui suggère une importante compétition entre leur aminolyse avec la D-mannosamine et leur hydrolyse avec l'eau résiduelle potentiellement contenue dans le DMSO et la TEA à cette température.

Ces résultats nous indiquent une certaine différence de réactivité entre les deux sucres étudiés. On peut s'interroger sur l'implication de la gêne stérique liée à la position de l'amine primaire (axiale pour la D-mannosamine et équatoriale pour la D-glucosamine, Figure 3.4) dans la différence de réactivité entre ces deux sucres.



FIGURE 3.4 – Conformation chaise de la D-mannosamine et de la D-glucosamine

De manière intéressante, la dialyse nécessaire à la purification du copolymère (élimination du DMSO, de la TEA et du sucre en excès) permet en même temps la formation de micelles. Celles-ci sont caractérisées par des tailles de 80-90 nm, avec des IP d'environ 0.216. Une légère augmentation de la taille des micelles est donc à constater suite au couplage des sucres sur le copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP), en raison de l'apparition d'un bloc de surface hautement hydrophile, suite à la substitution des fonctions ester de NS par les sucres.

Cependant, notamment pour la réaction de couplage entre le copolymère et la D-mannosamine, il subsiste des fonctions ester de NS, qui doivent être éliminées dans l'optique d'une administration chez l'homme. Les meilleures conditions ont été obtenues par l'ajout d'éthanolamine directement sur le milieu réactionnel après quatre jours de couplage. La phase organique du copolymère dans le DMSO est diluée dans deux volumes d'eau avant sa dialyse contre l'eau.

La CMC a été déterminée pour chaque solution micellaire obtenue à partir des copolymères glucosylé, mannosylé et enfin modifié uniquement par l'éthanolamine (Figure 3.5).

Les valeurs de CMC sont d'environ 100 mg.L<sup>-1</sup>, plus élevées que celles des micelles du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) initial correspondant (environ 20 mg.L<sup>-1</sup>). Ce résultat était attendu : en effet le caractère hydrophile se trouve accentué à la suite de la substitution des fonctions ester de NS par des sucres (et/ou uniquement par l'éthanolamine), ce qui contribue à une augmentation de la CMC. Ces valeurs confortent donc bien la présence des sucres sur la couronne hydrophile des micelles. Les CMC des copolymères ici obtenues sont plus élevées que la gamme de valeurs retrouvées typiquement pour des CMC de micelles de copolymères amphiphiles, décrites précédemment. Elles demeurent tout de même endeçà des copolymères classiquement employés tels les Pluronics (dont la CMC est d'environ 300 mg.L<sup>-1</sup>). Dans notre cas, le copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) d'origine présente un bloc de PLA ( $M_n = 19\ 000$ g.mol<sup>-1</sup>) d'une taille supérieure à celui de P(NAS-*co*-NVP) ( $M_n = 13\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ ). Il serait intéressant d'élaborer de nouveaux copolymères dotés d'un bloc de PLA de taille bien plus importante, par exemple deux à trois fois supérieure à celle de P(NAS-*co*-NVP), afin de pouvoir diminuer, à terme, la CMC de copolymères mannosylés et glucosylés.



FIGURE 3.5 – Graphiques (a) de l'intensité de fluorescence émise par le Nile Red et (b) de la longueur d'onde d'émission maximale  $(\lambda_{\acute{em},max})$  en fonction de la concentration en copolymère pour Copo2-gluc  $(\blacksquare)$ , Copo2-man  $(\bigcirc)$  et Copo2-eth  $(\blacktriangle)$ 

#### 3.2.3 Étude de l'encapsulation de l'imiquimod dans les micelles

Les micelles préalablement préparées ont été utilisées pour encapsuler de l'imiquimod, un ligand des TLR7 au caractère fortement hydrophobe. Dans un premier temps, l'étude a porté sur l'utilisation de micelles de copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP).

Une méthode simple pour encapsuler un composé non hydrosoluble est de l'incuber en présence de micelles. En effet, ces dernières, lorsque leur cœur n'est pas réticulé chimiquement, sont des systèmes non-figés en équilibre avec la forme libre du copolymère. Ainsi, tout comme le Nile Red utilisé pour déterminer les CMC, l'imiquimod devrait se nicher dans un environnement qui lui est plus favorable, et donc hydrophobe, i.e. au cœur des micelles.

L'imiquimod a donc été incubé pendant 24h dans la solution micellaire de PLA-b-P(NAS-co-NVP) (Mic-Copo4) à 6.4 mg.mL<sup>-1</sup>. À titre de contrôle, l'imiquimod a été également incubé dans de l'eau pure, i.e. sans micelles, afin d'évaluer la fraction solubilisée dans ce solvant (supposée très faible). Les spectres de fluorescence de l'imiquimod dans des solutions micellaires (ou dans l'eau comme contrôle) ont été réalisés après l'élimination des grains d'imiquimod non solubilisés par centrifugation. Les spectres représentent ainsi l'imiquimod qui est solubilisé dans les micelles ou dans l'eau. De manière qualitative, l'intensité de fluorescence de l'imiquimod est considérable pour la solubilisation micellaire par rapport à celle obtenue dans l'eau, indiquant que ce ligand s'est logé massivement dans le cœur des micelles (Figure 3.6). Signalons ici qu'il a été vérifié que le spectre de fluorescence des micelles de PLA-b-P(NAS-co-NVP) n'interfère pas avec le spectre de fluorescence de l'imiquimod (Figure 3.6).



FIGURE 3.6 – Spectres de fluorescence des milieux de micelles seules (—), de l'eau-imiquimod (—) et des micelles-imiquimod (—), obtenus après 24h d'incubation sur roue à température ambiante.  $\lambda_{ex}=325 \text{ nm}, \text{[imiquimod]} =1.28 \text{ mg.mL}^{-1}, \text{[micelles]} = 6.4 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

L'expérience a été reconduite sur quatre lots de micelles (4 mg.mL<sup>-1</sup>) pour quatre copolymères différents (Copo1 à Copo4).

De manière à pouvoir quantifier l'imiquimod encapsulé dans les micelles de copolymères, la fluorescence de l'imiquimod a été mesurée après destruction des micelles par solubilisation du copolymère dans le DMSO (dilution de la solution micellaire au vingtième dans le DMSO) (Figure 3.7 (a)). Grâce à une courbe de calibration  $I_{fluo,imi}=f([imiquimod])$  établie dans les mêmes conditions (Figure 3.7 (b)), la concentration en imiquimod et donc la quantité encapsulée d'imiquimod dans les micelles ont pu être déterminées.



FIGURE 3.7 – (a) Spectres de fluorescence de micelles Mic-Copo1 (—), Mic-Copo2 (—), Mic-Copo-3 (—) et Mic-Copo4 (—). Micelles à 4 mg.mL<sup>-1</sup>, incubées avec 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> d'imiquimod pendant 24h. Centrifugation à 1 377 g, dilution 20 fois dans le DMSO,  $\lambda_{ex}$ =325 nm,  $\lambda_{em}$ =350 nm. (b) Droite de calibration de l'imiquimod solubilisée dans une solution 19 : 1 de DMSO : eau

Le taux d'encapsulation (TE), qui représente le pourcentage massique d'imiquimod par rapport au copolymère, est de l'ordre de 4% par cette méthode (Tableau 3.3). On peut noter que le taux d'encapsulation semble augmenter lorsque la taille du bloc de PLA diminue (19 000 versus 11 400) et que la taille

Code	$M_n$	$M_n$	Taille	IP	[copolymère]	[imi] <sub>0</sub>	$[imi]_{enc}$	TE
	PLA	P(NAS-co-NVP)						
	$(g.mol^{-1})$	$(g.mol^{-1})$	(nm)		$(mg.mL^{-1})$	$(mg.mL^{-1})$	$(mg.mL^{-1})$	(%)
Mic2-Copo1	19 000	22 000	59	0.021	4	0.4	0.152	3.8
Mic2-Copo2	19000	13 000	53	0.042	4	0.4	0.133	3.3
Mic2-Copo3	11 400	30 000	75	0.021	4	0.4	0.180	4.5
Mic2-Copo4	11 400	16 000	66	0.040	4	0.4	0.171	4.3

des micelles augmente en conséquence.

Tableau 3.3 – Encapsulation de l'imiquimod dans quatre solutions de micelles élaborées à partir de quatre copolymères PLA-b-P(NAS-co-NVP) différents avec  $[imi]_{enc}$  la concentration en imiquimod encapsulé

Des encapsulations d'imiquimod ont été menées dans des micelles de copolymères glucosylé (Copo2gluc), mannosylé (Copo2-man) ou encore simplement obtenu après réaction avec l'éthanolamine (Copo2eth). Cette fois-ci les micelles sont utilisées à 1 mg.mL<sup>-1</sup>, parce que les taux de solide sont plus faibles que ceux obtenus pour les micelles de copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP), en raison de la dialyse. Les micelles de copolymères modifiés par des sucres permettent une encapsulation accrue de l'imiquimod par rapport aux micelles de PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP). La nature du composé hydrophile de la couronne semble avoir une influence significative sur la diffusion de l'imiquimod dans le cœur des micelles.

Code	Taille	IP	[copolymère]	[imi] <sub>0</sub>	$[imi]_{enc}$	TE
	(nm)		$(mg.mL^{-1})$	$(mg.mL^{-1})$	$(mg.mL^{-1})$	(%)
Mic-Copo2-gluc	$51 \pm 0.06$	$0.145 {\pm} 0.014$	1	0.40	0.141	14.1
Mic-Copo2-man	$39{\pm}0.27$	$0.120{\pm}0.023$	1	0.37	0.067	6.7
Mic-Copo2-eth	$41 \pm 0.22$	$0.134{\pm}0.068$	1	0.44	0.057	5.7

Tableau 3.4 – Encapsulation d'imiquimod dans les micelles de copolymères glucosylé (Copo2-gluc), mannosylé (Copo2-man) ou obtenu après réaction avec l'éthanolamine (Copo2-eth)

# 3.3 Conclusion

Lors de ce chapitre, le caractère amphiphile du copolymère PLA-b-P(NAS-co-NVP) a été démontré, grâce à sa capacité d'auto-assemblage sous forme de micelles, à partir d'une certaine concentration (CMC d'environ 20 mg.L<sup>-1</sup>). Les micelles obtenues par précipitation-évaporation de solvant sont caractérisées par des tailles comprises entre 50 et 70 nm avec des IP faibles (<0.1).

En outre, le copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) a pu être modifié par réaction de la D-glucosamine ou de la D-mannosamine sur les fonctions ester de NS. Ces couplages menés en solution organique, associés à une étape de purification par dialyse, permettent d'aboutir facilement à des solutions de micelles de copolymères modifiés par des sucres. La présence de sucres à la surface des micelles est confirmée par l'augmentation de la CMC de ces systèmes (100 mg.L<sup>-1</sup>) par rapport à celle du copolymère initial (20 mg.L<sup>-1</sup>).

Qu'il s'agisse de solutions de micelles de copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) ou de copolymère modifié par des sucres, l'encapsulation de l'imiquimod s'est révélée très efficace, avec respectivement des taux d'encapsulation typiques de 3-4% et de 6-14%.

Nous avons ainsi pu développer des systèmes hautement fonctionnels, avec la présence d'une importante quantité de D-mannose en leur surface et d'imiquimod en leur cœur.

# Chapitre 4

# Élaboration de NP de PLA multifonctionnelles

### Sommaire

4.1	Rap	pels sur les techniques d'élaboration de NP $\ldots$
	4.1.1	Émulsification-évaporation de solvant
	4.1.2	Double émulsion W/O/W
	4.1.3	Émulsion-changement de solubilité (ou salting-out)
	4.1.4	Émulsification-diffusion de solvant
	4.1.5	Nanoprécipitation (ou déplacement de solvant)
	4.1.6	Diafiltration (ou dialyse)
	4.1.7	Stratégie utilisée
4.2	Prép	paration et caractérisation de NP de PLA-copolymère
	4.2.1	Diafiltration
	4.2.2	Nanoprécipitation
	4.2.3	Conclusion et comparaison des méthodes diafiltration versus nanoprécipitation 121
4.3	Qua	ntification des fonctions ester de NS disponibles et de leur hydrolyse 122
	4.3.1	Quantification des fonctions ester de NS disponibles 122
	4.3.2	Évolution du taux d'hydrolyse des fonctions ester de NS au cours du temps $\ . \ . \ 124$
	4.3.3	Conclusion
4.4	Prép	paration de NP de PLA fonctionnelles
	4.4.1	Couplage de la séquence active de l'IL-1 $\beta$ à la surface des NP de PLA-copolymère 127
	4.4.2	Encapsulation de l'imiquimod dans les NP

C E chapitre a pour objectif de décrire la fonctionnalisation de surface de NP de PLA par le peptide de l'IL- $\beta$ , grâce à l'utilisation du copolymère amphiphile PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP), et l'encapsulation

de l'imiquimod au sein des NP de PLA. Quelques rappels bibliographiques sur les procédés de préparation de NP sont décrits. Puis, l'élaboration de NP de PLA en présence du copolymère PLA-b-P(NAS-co-NVP) est détaillée. Le couplage du peptide d'intérêt de l'IL- $\beta$  à la surface de NP de PLA-copolymère est ensuite étudié. L'étude de l'encapsulation de l'imiquimod dans les NP de PLA terminera ce chapitre.

Les travaux décrits sur les NP de PLA-copolymère (non couplées au peptide) dans ce chapitre ont fait l'objet d'une partie de la publication : Handké, N.; Trimaille, T.; Luciani, E.; Rollet, M.; Delair, T., Verrier, B.; Bertin, D. and Gigmes, D., J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem. 2011, 49 :1341-1350.

## 4.1 Rappels sur les techniques d'élaboration de NP

Dans cette section, sont détaillées les principales techniques d'élaboration de NP à base de polymères préformés de PLA/PLGA pour la délivrance de principes actifs.

#### 4.1.1 Émulsification-évaporation de solvant

Cette technique a été appliquée pour la première fois à des nanosphères de PLA en 1981.<sup>293</sup> Le polymère est solubilisé dans un solvant organique volatil non miscible à l'eau (dichlorométhane ou chloroforme). La phase organique est ensuite émulsifiée dans une phase aqueuse contenant un stabilisant (gélatine, poly(alcool vinylique), poloxamer) afin d'obtenir l'émulsion O/W. Le solvant présent dans les gouttes de l'émulsion diffuse vers la phase aqueuse jusqu'à saturation et s'évapore en atteignant la surface. L'élimination du solvant provoque alors la précipitation du polymère, puisqu'il se retrouve dans un non-solvant (l'eau), sous forme de NP. Pour obtenir des tailles inférieures au micron avec une distribution étroite, il est nécessaire de produire une émulsion fine et homogène, ce qui requiert l'utilisation de grandes quantités d'émulsifiants et une forte énergie déployée pour l'émulsification.<sup>294</sup> Cette technique permet l'encapsulation de principes actifs hydrophobes par leur incorporation dans la phase organique avant émulsification.<sup>293</sup>

#### 4.1.2 Double émulsion W/O/W

Il s'agit d'une technique similaire à celle décrite précédemment mais adaptée à l'encapsulation de principes actifs hydrophiles (certaines protéines, acides nucléiques).<sup>295, 296</sup> La première étape consiste à émulsifier la phase aqueuse contenant le principe actif dans la phase organique solubilisant le polymère. Cette émulsion W/O, dite primaire, est ensuite émulsifiée lors d'une seconde étape dans une phase

aqueuse. L'élimination du solvant entraîne, tout comme pour la stratégie de simple émulsion, la formation des particules. C'est la technique la plus répandue pour l'encapsulation de protéines antigéniques pour la vaccination.<sup>115,116</sup>

#### 4.1.3 Émulsion-changement de solubilité (ou salting-out)

Cette méthode a été développée par Ibrahim *et coll.*<sup>297</sup> Le solvant organique solubilisant le polymère doit être miscible à l'eau, typiquement de l'acétone. Une émulsion est produite sous forte agitation par le mélange de la phase organique et de la phase aqueuse, qui contient un stabilisant et surtout un électrolyte (sels ou sucrose) à forte concentration (plusieurs mol.L<sup>-1</sup>), qui empêche la miscibilité du solvant organique avec l'eau. De l'eau pure est ensuite ajoutée pour permettre au solvant organique de diffuser complètement dans l'eau, ce qui provoquera la précipitation du polymère sous forme de NP. Cette technique permet de contrôler aisément la taille des nanosphères en modulant plusieurs paramètres, tels que la concentration en tensioactif, la vitesse d'agitation ou la concentration en polymère dans la phase organique.

#### 4.1.4 Émulsification-diffusion de solvant

Pour remplacer les solvants chlorés couramment employés dans le procédé d'émulsification-évaporation, des solvants partiellement miscibles à l'eau, tels que l'acétate d'éthyle, le carbonate de propylène ou encore l'alcool benzylique, peuvent être utilisés. L'émulsion O/W est préparée à l'aide d'eau saturée avec le solvant organique et avec une phase de solvant organique saturée en eau. L'émulsion O/W est ensuite diluée dans un large volume d'eau pure. La dilution importante permet la miscibilité complète et donc la diffusion intégrale du solvant organique des gouttelettes dans la phase aqueuse et par conséquent la précipitation du polymère en nanoparticules.<sup>296,298</sup> La saturation mutuelle des solvants est réalisée de manière à se placer à l'équilibre thermodynamique et à prévenir les phénomènes de diffusion lors de l'ajout de la phase organique dans la phase aqueuse durant la phase d'émulsification. Les tailles peuvent être modulées de la même manière que pour le *salting-out*.

#### 4.1.5 Nanoprécipitation (ou déplacement de solvant)

La nanoprécipitation a été développée par Fessi *et coll.*<sup>299</sup> Cette méthode permet d'accéder à des nanosphères de taille typique d'environ 100 à 300 nm, avec de nombreux avantages, tels que la simplicité et la rapidité de réalisation, une excellente reproductibilité et l'absence de tensioactif.

Les composés de base sont le polymère, le solvant et le non-solvant du polymère. Le solvant du polymère doit être miscible à l'eau et volatil. L'acétone est ainsi souvent choisi, mais un mélange de

solvants (acétone/éthanol, acétone/eau) peut être également préconisé.<sup>296</sup>

Les NP se forment instantanément dès lors que la solution organique de polymère est ajoutée à la phase aqueuse, grâce à la diffusion rapide du solvant dans le non-solvant. La formation quasi-instantanée des NP est gouvernée par l'effet Marangoni, causé par les turbulences à l'interface entre le solvant et le non-solvant, qui dépendent de plusieurs paramètres, tels que le débit, la diffusion et la tension de surface.<sup>300</sup>

Le solvant organique est ensuite éliminé. Les conditions idéales sont obtenues quand le polymère est dissous dans un solvant thêta et quand la concentration en polymère se situe entre le régime dilué et semi-dilué.<sup>296</sup>

L'ajout de tensioactifs, bien que non nécessaire au procédé, aide à préserver les suspensions de NP, à prévenir de leur agrégation pendant un long stockage,<sup>296</sup> mais également à favoriser leur redispersion après centrifugation. Le principe actif peut être encapsulé dans les nanosphères en l'ajoutant dans la solution organique de polymère. Plus la vitesse de diffusion du solvant dans l'eau est élevée, plus les particules seront petites. Les constantes diélectriques des solvants semblent jouer un rôle important dans la nanoprécipitation, puisqu'il semblerait que l'échec de cette technique se présente fréquemment lorsque les constantes diélectriques du solvant et du non-solvant sont trop différentes.<sup>300</sup> Une concentration trop importante en polymère peut être à l'origine d'une mauvaise nanoprécipitation. Ceci est probablement la conséquence d'une trop grande viscosité, qui empêche alors une diffusion appropriée du solvant organique dans l'eau.<sup>300</sup>

#### 4.1.6 Diafiltration (ou dialyse)

Dans cette méthode, le polymère d'intérêt est dissous dans un solvant organique miscible à l'eau. Cette solution est placée dans un sac de dialyse pour être dialysée contre de l'eau pure. Le principe est un échange du solvant contre de l'eau provoquant la précipitation lente du polymère sous forme de particules à mesure de l'enrichissement en non-solvant dans le sac de dialyse.<sup>119,301</sup> Cette technique ne requiert pas l'utilisation de tensioactifs. La taille des NP obtenues par ce procédé peut être modulée en modifiant le solvant du polymère par exemple.<sup>302</sup>

En plus de l'élaboration des particules, la dialyse permet d'éliminer les impuretés résiduelles des NP telles que les principes actifs ou les tensioactifs en excès, lorsque ces derniers sont utilisés. Cependant il ne faut pas négliger plusieurs points : risque de contamination microbienne avec une utilisation longue durée d'eau, risque de libération prématurée du principe actif et inefficacité de la dialyse pour l'élimination de certaines molécules à haut poids moléculaire telles que le stabilisant poly(alcool vinylique).<sup>303</sup>

#### 4.1.7 Stratégie utilisée

L'équipe de "Nanovecteurs Biodégradables et Ingénierie Tissulaire" de l'IBCP possède une forte expertise dans la préparation de NP de PLA par les procédés de nanoprécipitation<sup>103</sup> et de diafiltration.<sup>119</sup> Comme nous l'avons vu précédemment, ce sont des techniques de choix pour l'élaboration de NP de PLA sans tensioactif.

Cette équipe a également développé plusieurs systèmes de NP de PLA - protéine et/ou glycoprotéine de choix pour le développement d'un vaccin anti-VIH. La protéine p24 et la glycoprotéine gp120 du VIH-1 ont par exemple été co-adsorbées sur des NP de PLA obtenues par nanoprécipitation pour aboutir à des adjuvants potentiels qui induisent des titres élevés d'anticorps anti-p24 et anti-gp120. De même, des NP de PLA élaborées par diafiltration ont été recouvertes par la p24 du VIH-1 et ont permis d'obtenir de fortes réponses humorale et cellulaire vis-à-vis de cette protéine chez différents modèles animaux.<sup>119</sup>

Dans l'optique d'augmenter la qualité et l'amplitude de la réponse immunitaire, nous souhaitons associer des molécules immunostimulantes, qui agissent comme des signaux dangers, à la surface et au cœur des particules. Pour aboutir à une couronne de biomolécules, nous désirons nano-déposer le copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) à la surface de NP de PLA, grâce à l'ancrage du bloc hydrophobe de PLA dans la matrice PLA des NP; le bloc hydrophile, quant à lui, sera déployé à la surface des NP de PLA pour permettre le couplage d'une quantité importante de ligands. La fonctionnalisation de cœur est effectuée par une encapsulation classique du ligand par nanoprécipitation. Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons donc à la préparation de NP de PLA en présence du tensioactif macromoléculaire PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) par diafiltration et nanoprécipitation. Ces nouvelles NP de PLA-copolymère obtenues pourront être comparées avec leurs homologues PLA nues, i.e. sans copolymère et préparées dans les mêmes conditions.

# 4.2 Préparation et caractérisation de NP de PLA-copolymère

Deux techniques de préparation de NP de PLA (diafiltration et nanoprécipitation) vont être ici adaptées à l'élaboration de NP de PLA en présence de PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP).

#### 4.2.1 Diafiltration

La technique développée au sein de l'équipe "Nanovecteurs Biodégradables et Ingénierie Tissulaire" pour la préparation de NP de PLA nues par diafiltration emploie typiquement une solution de PLA  $(M_n = 30\ 000\ \text{g.mol}^{-1},\ I_p = 1.7)$  dans le DMSO (20 mg.mL<sup>-1</sup>) pour la dialyser contre l'eau.<sup>119</sup> Notre stratégie de préparation de NP de PLA-copolymère requiert la solubilisation de ce dernier dans la phase organique. Le copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) étant parfaitement soluble dans le DMSO, le PLA (400 mg) et le copolymère (typiquement 20, 40 ou 80 mg) sont dissous ensemble dans ce solvant (20mL), la phase organique est ensuite dialysée contre l'eau.

Avec l'ajout de 10% massique (40 mg) de copolymère par rapport au PLA (400 mg), des tailles variant de 435 et à 518 nm sont obtenues pour quatre copolymères différents (Dia3 à Dia6 du Tableau 4.1). Ces tailles sont assez proches de celles des NP de PLA nues (470 nm : Dia1 et Dia2). Toutefois, nous pouvons remarquer qu'à taille de bloc de PLA identique, une augmentation de la taille du bloc hydrophile P(NAS-*co*-NVP) provoque une légère augmentation de la taille des NP, comme en témoigne les expériences Dia3 *versus* Dia4 et Dia5 *versus* Dia6. Les IP varient sur une plage de valeurs de 0.078 à 0.323. L'utilisation d'une quantité croissante de copolymère provoque une nette augmentation du diamètre moyen des particules préparées (Dia7, Dia8 et Dia9).

Code	$M_n$	$M_n$	% massique de	Taille	IP	Potentiel zêta
	PLA	P(NAS-co-NVP)	copolymère			
	$(g.mol^{-1})$	$(g.mol^{-1})$	ajouté	(nm)		(mV)
Dia1	-	-	Ø	$477 \pm 23.4$	$0.161{\pm}0.157$	$-74.2 \pm 1.2$
Dia2	-	-	Ø	$461 {\pm} 10.0$	$0.098 {\pm} 0.058$	$-73.6 \pm 1.4$
Dia3	19 000	18 000	10	$452 \pm 39.5$	$0.088 {\pm} 0.082$	$-40.3 \pm 0.8$
Dia4	19000	13000	10	$435 {\pm} 9.8$	$0.195 {\pm} 0.050$	$-55.4 \pm 0.9$
Dia5	$11 \ 400$	20000	10	$518 {\pm} 19.9$	$0.323{\pm}0.365$	$-28.8 \pm 0.6$
Dia6	$11 \ 400$	13000	10	$451 \pm 3.9$	$0.086{\pm}0.039$	$-35.0 {\pm} 0.2$
Dia7	8 500	25000	5	$367{\pm}10.6$	$0.136{\pm}0.047$	$-46.2 \pm 0.2$
Dia8	8 500	25000	10	$485 {\pm} 10.0$	$0.078 {\pm} 0.045$	$-58.2 \pm 1.4$
Dia9	8 500	25000	20	$635{\pm}18.3$	$0.237 {\pm} 0.026$	$-42.2 \pm 0.6$

Tableau 4.1 – Caractéristiques des NP de PLA et NP de PLA-copolymère élaborées par diafiltration

Les particules de PLA nues présentent un potentiel zêta extrêmement négatif de -74mV (moyenne de Dia1 et Dia2), en raison de l'exposition de bouts de chaînes acide carboxylique de PLA en surface. La présence du copolymère à la surface des NP de PLA est clairement mise en évidence par une augmentation des valeurs de potentiel zêta, passant de -74 mV en moyenne pour des PLA nues à un minimum de -58.2 mV (Dia8) jusqu'à -28.8 mV (Dia5). Nous pouvons noter une sensible diminution du potentiel zêta lorsque la taille du bloc hydrophile P(NAS-*co*-NVP) décroît à taille de bloc de PLA constante (Dia3 *versus* Dia4 et Dia5 *versus* Dia6). Ceci pourrait s'expliquer par le recouvrement plus faible des charges négatives des fonctions acide carboxylique du PLA. En revanche, l'influence de la quantité de copolymère dans les NP sur le potentiel zêta n'est pas notable.

Malgré des quantités importantes de copolymère incorporées aux NP, le potentiel zêta reste toujours négatif. Ceci peut être attribué à l'hydrolyse partielle des fonctions ester de *N*-succinimidyle (NS); ce phénomène sera discuté en détail plus loin. La présence du copolymère à la surface des NP est également démontrée lorsque la stabilité colloïdale est étudiée. En effet, pour des NP de PLA nues, la stabilité colloïdale est régie par des répulsions électrostatiques grâce à la présence de carboxylates à la surface des NP. Par conséquent, lorsque ces NP sont diluées dans une solution saline, l'écrantage des charges provoque la floculation des NP à de faibles concentrations comme c'est notre cas avec des NP de PLA nues (Figure 4.1). En présence de notre copolymère, la stabilité colloïdale est clairement augmentée, comme en témoigne la Figure 4.1, grâce à la contribution stérique du bloc hydrophile P(NAS-*co*-NVP) présent à la surface des NP.



FIGURE 4.1 – Stabilité colloïdale des NP de PLA nues (●) versus NP de PLA-copolymère (■) obtenues par diafiltration

## 4.2.2 Nanoprécipitation

#### 4.2.2.1 Base de travail

La technique mise au point au sein de l'équipe "Nanovecteurs Biodégradables et Ingénierie Tissulaire" emploie une phase organique de PLA dans l'acétone (20 mg.mL<sup>-1</sup>).<sup>103</sup> Le copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) n'étant pas soluble dans l'acétone, il a fallu trouver un solvant du copolymère volatil et miscible à l'eau, qui nous permette d'ajouter cette phase organique à la phase organique de PLA-acétone sans provoquer la précipitation du copolymère. La meilleure solubilité a été rencontrée avec l'acétonitrile (ACN).

Il a été fixé que la part de co-solvant, donc de l'ACN, ne devrait pas excéder 10% volumique d'ajout par rapport au volume d'acétone, afin de minimiser les perturbations du procédé.

Au sein de l'équipe, la phase aqueuse traditionnellement utilisée est constituée d'un mélange d'eau et d'éthanol. Dans notre cas, la phase aqueuse est uniquement constituée d'eau afin d'éviter la multiplication des solvants.

#### 4.2.2.2 Élaboration de NP de 100 nm de diamètre moyen

Afin de limiter la consommation du copolymère, l'échelle de production des NP a été divisée par 10 par rapport à la procédure classiquement suivie au sein de l'équipe, ce qui correspond à 5.5 mL de phase organique et 3.5 mL de phase aqueuse. La concentration du PLA dans l'acétone est identique et égale à 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Le premier système de coulée, utilisé pour l'addition de la phase organique dans la phase aqueuse, a été un système seringue-aiguille. Par cette technique, nous avons pu préparer des NP de PLA-copolymère d'un diamètre moyen de l'ordre de 100 nm avec des  $I_p$  variant de 0.055 à 0.158 (Tableau 4.2). L'influence de la composition du copolymère, celle de sa présence/absence et des quantités introduites sur les tailles sont limitées.

Code	$M_n$	$M_n$	% massique de	Taille	IP	Potentiel
	PLA	P(NAS-co-NVP)	copolymère			zêta
	$(g.mol^{-1})$	$(g.mol^{-1})$	ajouté	(nm)		(mV)
NP1	-	-	Ø	$103 \pm 2.1$	$0.150{\pm}0.008$	$-59 \pm 0.6$
NP2	-	-	Ø	$126{\pm}1.1$	$0.099 {\pm} 0.024$	$-69 \pm 0.7$
NP3			5	$94{\pm}2.2$	$0.138 {\pm} 0.017$	$-45 \pm 0.9$
NP4	19000	18 000	10	$114{\pm}1.5$	$0.055{\pm}0.008$	$-20\pm0.4$
NP5			15	$111 \pm 3.0$	$0.108 {\pm} 0.014$	$-35 \pm 1.2$
NP6			5	$102{\pm}0.5$	$0.151 {\pm} 0.005$	nd
NP7	19000	13000	10	$98{\pm}1.1$	$0.155{\pm}0.013$	$-45 \pm 1.2$
NP8			15	$103 {\pm} 0.4$	$0.158{\pm}0.008$	nd
NP9	11 400	13 000	10	$98{\pm}2.9$	$0.100{\pm}0.011$	$-33 \pm 0.8$
NP10	11 400	15 000	10	$103{\pm}0.6$	$0.116 {\pm} 0.003$	$-40 \pm 0.6$

Tableau 4.2 – Caractéristiques des NP de PLA nues et des NP de PLA-copolymère, obtenues par nanoprécipitation à l'aide d'un système de coulée seringue-aiguille (nd : non déterminé)

Dans la suite de cette étude, la quantité de copolymère ajoutée par rapport à la quantité de PLA introduite sera de 10% massique. Il a été estimé en effet qu'avec cette quantité les systèmes élaborés présenteraient suffisamment de fonctions ester de NS à la surface pour le futur couplage de ligands.

De manière similaire à la diafiltration, la présence du bloc hydrophile du copolymère P(NAS-co-NVP) à la surface des NP est encore une fois mise en évidence par l'augmentation du potentiel zêta en passant des NP de PLA nues (obtenues dans les mêmes conditions sans copolymère) aux NP de PLA-copolymère. Comme en diafiltration, le potentiel zêta est fortement négatif pour les NP de PLA nues (valeur moyenne -64 mV). Lorsque le copolymère est ajouté, le potentiel zêta varie de -45 mV (NP3) jusqu'à -20 mV (NP4). Cependant, de façon semblable à la diafiltration, la quantité de copolymère ajoutée n'a pas d'influence réelle sur le potentiel zêta. Comme remarqué précédemment, le potentiel zêta reste toujours négatif, ceci étant probablement dû, ici encore, à l'hydrolyse partielle des fonctions ester de NS, phénomène qui sera davantage étudié par la suite.

#### 4.2.2.3 Élaboration de NP de 150-200 nm de diamètre moyen

Afin d'augmenter les tailles des NP, nous avons souhaité exploiter le système de coulée typiquement utilisé au sein de l'équipe pour la nanoprécipitation, à savoir une ampoule de coulée, permettant d'accéder à des NP d'une taille de l'ordre de 150-200 nm. L'objectif d'augmenter les tailles est double : (i) s'affranchir des difficultés de centrifugation (étape qui sera probablement nécessaire lors des couplages pour laver les NP de l'excès de biomolécules) et (ii) pouvoir comparer l'efficacité, à taille équivalente (150-200 nm), des nouvelles NP de PLA-copolymère avec celles classiquement préparées au sein de l'équipe, lesquelles ont fait l'objet de nombreux travaux en tant que plateforme d'adjuvant.

Comme reporté dans le Tableau 4.3, l'usage de l'ampoule de coulée a en effet permis d'augmenter la taille des NP d'une moyenne de 100 nm à une gamme de 140-180 nm, avec des IP variant de 0.064 à 0.162. Cette augmentation de taille entre les deux systèmes de coulée peut s'expliquer par une différence de section du débit. En effet, l'ampoule de coulée présente une section de débit plus importante que celle d'une aiguille, ce qui provoque une concentration locale plus élevée en polymère à son arrivée dans le non-solvant, engendrant une augmentation de la taille des NP.

Référence	$M_n$	$M_n$	% massique de	Taille	IP	Potentiel
	PLA	P(NAS-co-NVP)	copolymère			zêta
	$(g.mol^{-1})$	$(g.mol^{-1})$	ajouté	(nm)		(mV)
NP11			10	$159{\pm}0.6$	$0.128{\pm}0.017$	nd
NP12	19 000	18000	10	$159 {\pm} 2.8$	$0.106 {\pm} 0.011$	nd
$NP12^*$			10	$156{\pm}0.9$	$0.123{\pm}0.028$	$-53 \pm 0.8$
NP13	10,000	13,000	10	$180{\pm}2.7$	$0.162{\pm}0.027$	$-38{\pm}1.1$
NP13**	19 000	15 000	10	$137{\pm}~0.1$	$0.089 {\pm} 0.020$	nd

Tableau 4.3 – Caractéristiques des NP de PLA-copolymère obtenues par nanoprécipitation à l'aide d'une ampoule de coulée (nd : non déterminé). \* : lot préparé dans les conditions mises au point par l'équipe : i.e. une multiplication par dix du volume des phases (organique et aqueuse) par rapport à nos conditions et \*\* lot préparé en divisant par deux l'échelle de production utilisée par l'équipe : i.e. une multiplication par 5

Le potentiel zêta, qui n'a été déterminé dans cette série que pour deux lots, se trouve une nouvelle fois augmenté, par rapport à celui typiquement obtenu pour les NP de PLA nues, en raison de la présence du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) à la surface des NP de PLA-copolymère.

L'augmentation de l'échelle de préparation n'induit pas de différence de taille, ni de déstabilisation du système, (dispersions NP12 (échelle x1) versus NP12\* (x10) et dispersions NP13 (échelle x1) versus NP13\*\* (x5)). La présence du segment hydrophile P(NAS-*co*-NVP) à la surface des NP est vérifiée, une fois encore, avec l'étude des stabilités colloïdales des NP de PLA obtenues en présence/absence du copolymère. Elles ont été évaluées de la même manière que pour les NP préparées par diafiltration, i.e. par mesure de taille dans des solutions de NaCl à différentes concentrations. L'ajout du copolymère dans le procédé permet d'augmenter nettement la stabilité des particules (de 250 mM pour des NP de PLA nues à 750 mM pour des NP de PLA-copolymère) (Figure 4.2).



FIGURE 4.2 – Stabilité colloïdale des NP de PLA nues (●) versus NP de PLA-copolymère (■) obtenues par nanoprécipitation

En Figure 4.3 sont exposés des clichés obtenus par microscopie électronique à balayage (MEB) pour deux dispersions de NP élaborées par nanoprécipitation sans copolymère (Figures 4.3 (a) et (b)) et avec copolymère (Figures 4.3 (c) et (d)). Les NP de PLA nues tendent à filmifier beaucoup plus facilement que les particules de PLA-copolymère sous la chaleur du faisceau d'électrons du microscope. Cette filmification est le résultat de la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) basse du PLA (45-55 °C). L'absence de filmification des dispersions élaborées en présence du copolymère démontre une fois encore la présence du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) en surface des NP (Figure 4.3).

Les clichés révèlent en outre une population homogène en taille sans présence d'objets de très petite taille, qui pourraient être synonymes de la présence de copolymère sous forme micellaire et donc dissocié des NP. En effet, il est important de noter ici que l'élaboration de micelles a été possible avec le copolymère amphiphile PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) dans nos conditions usuelles de nanoprécipitation en omettant le PLA. Les micelles obtenues présentent une population unimodale (d'une taille comprise typiquement entre 50 et 70 nm), caractérisées par des IP qui tendent vers 0. Etant donné l'absence de cette population pour les NP de PLA-copolymère par diafiltration ou nanoprécipitation, il est raisonnable de conclure qu'il n'y a pas de copolymère sous forme de micelles en coexistence avec les NP, ce qui est fortement corroboré par les clichés MEB.


FIGURE 4.3 – Clichés de MEB de NP de PLA obtenues par nanoprécipitation, sans copolymère ((a) et (b)) avec copolymère ((c) et (d)), grossissement 60 000 pour (a) et (c) et 120 000 pour (b) et (d)

# 4.2.3 Conclusion et comparaison des méthodes diafiltration versus nanoprécipitation

L'augmentation significative du potentiel zêta des NP de PLA-copolymère par rapport à celui des NP de PLA nues (formées dans les mêmes conditions) indique la contribution du copolymère neutre hydrophile fonctionnel P(NAS-*co*-NVP) à la surface des particules. L'obtention de valeurs de potentiel zêta toujours négatives peut être attribuée à l'hydrolyse partielle des fonctions ester activées dans l'eau, détaillée dans la section suivante.

Les stabilités colloïdales ont été évaluées pour des NP obtenues en présence/absence de copolymère par nanoprécipitation et par diafiltration. Leur augmentation dans chacun des deux procédés avec l'ajout du copolymère indique la présence du bloc hydrophile fonctionnel à la surface des NP, en assurant la stabilité des particules par une contribution stérique et non plus uniquement électrostatique, comme c'est le cas pour les NP de PLA nues. Pour conclure, deux méthodes d'élaboration de NP de PLA-copolymère ont été utilisées avec succès pour aboutir à une large gamme de tailles de NP (de 100 à 600 nm) et sont comparées dans le Tableau 4.4.

	NANOPRÉCIPITATION	DIAFILTRATION	
Diamètre	100 - 200 nm	300 - 600 nm	
IP	Généralement inférieur à $0.1$	Généralement supérieur à 0.1	
Reproductibilité	Bonne	Bonne	
Temps de préparation	2 h	24 h	
Quantité de solvant organique	Sim	ilaire	
Quantité d'eau	Faible	Très élevée	
Qualité obtenue	Stérile	Déminéralisée	
Taux de solide	Environ 50 mg.mL <sup>-1</sup>	Quelques mg.mL <sup>-1</sup>	
Transposition d'échelle	Facile (en cours chez Phusis)	Difficilement envisageable	

Tableau 4.4 – Récapitulatif de la comparaison nanoprécipitation versus diafiltration

La technique sera principalement choisie en fonction de la taille désirée de particules, même si des ajustements du procédé de nanoprécipitation peuvent être effectués pour obtenir des particules plus grosses.

La reproductibilité, le temps de préparation, la quantité, la qualité d'eau utilisée, les taux de solide élevés accessibles et enfin la transposition d'échelle plus aisée donnent l'avantage au procédé de nanoprécipitation.

# 4.3 Quantification des fonctions ester de NS disponibles et de leur hydrolyse

En vue du couplage de ligands d'intérêt sur les NP de PLA-copolymère, il est important d'une part de connaître la part de fonctions ester de N-succinimidyle (NS) accessibles pour le couplage de biomolécules et d'autre part de déterminer la proportion de fonctions ester hydrolysées après le processus d'élaboration des NP.

# 4.3.1 Quantification des fonctions ester de NS disponibles

Pour mettre en évidence la présence et la disponibilité des fonctions ester activées à la surface des NP, l'éthanolamine a été utilisée en tant qu'amine modèle réactive, en excès par rapport aux fonctions ester estimées sur des NP de PLA-copolymère, obtenues par nanoprécipitation. Les NP de PLA nues ont été utilisées comme référence. Après l'addition de cette amine modèle sur les dispersions de NP de PLA nues, le diamètre reste constant, alors que le potentiel zêta diminue en raison de la déprotonation complète des fonctions acide carboxylique présentes à la surface des NP, due à la présence d'éthanolamine qui augmente le pH de la dispersion (Tableau 4.5).

En revanche, le diamètre de NP de PLA-copolymère augmente de 20 nm et le potentiel zêta augmente de 20 mV par rapport aux NP avant réaction. Cette augmentation de taille témoigne de la réaction des fonctions ester de NS avec l'éthanolamine, rendant la couronne des NP plus hydrophile et donc plus déployée en milieu aqueux. La formation de cette nouvelle couronne neutre, à base de NVP et de fonctions hydroxyéthyle pendantes, explique donc l'augmentation du potentiel zêta des NP.

Cependant, le potentiel zêta reste toujours négatif. Ceci peut être expliqué par l'hydrolyse partielle des fonctions ester par l'eau avant la réaction avec l'éthanolamine mais aussi par une compétition entre l'hydrolyse des fonctions ester par l'eau et l'aminolyse par l'éthanolamine, en raison d'une augmentation drastique du pH de la phase continue de la dispersion.

	Avant ajout d'éthanolamine			Après ajout d'éthanolamine			
	Taille	IP	Potentiel zêta	Taille	IP	Potentiel zêta	
	(nm)		(mV)	(nm)		(mv)	
NP de PLA nues	126	0.099	-69	127	0.105	-80	
NP de PLA-copolymère	156	0.095	-60	176	0.080	-40	

Tableau 4.5 – Effet de l'addition de l'éthanolamine sur la taille et le potentiel zêta de la dispersion de NP (Copolymère  $M_n(\text{PLA})=19\ 000\text{g.mol}^{-1}$  et  $M_n(\text{P}(\text{NAS-}co\text{-NVP}))=18\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ )

De manière quantitative, il a pu être déterminé sur plusieurs lots la fraction des fonctions ester disponibles pour le couplage à la surface des NP. Pour obtenir cette valeur, l'absorbance (DO pour densité optique) à 260 nm des anions NHS libérés suite à la réaction de l'éthanolamine (en excès) sur les fonctions ester est reliée à sa concentration, via l'utilisation d'une courbe de calibration  $DO_{260}=f([NHS])$  établie dans les mêmes conditions. Cette concentration est alors comparée à la concentration théorique des ester de NS dans le copolymère (calculée à partir de la composition du copolymère et de sa quantité (10%) par rapport à l'homopolymère PLA) pour obtenir le taux de fonctions ester de NS disponibles pour le couplage de biomolécules. Un taux moyen de fonctions ester de NS disponibles de 84% est retrouvé pour sept lots de NP obtenues par nanoprécipitation. En utilisant la surface spécifique des NP, il a été déduit une quantité importante d'ester de NS de 2.4 fonctions.nm<sup>-2</sup> disponibles à la surface des NP de PLAcopolymère obtenues par nanoprécipitation. Cependant, ce taux est une valeur théorique. Il faudra en effet tenir compte de l'hydrolyse des fonctions ester après l'élaboration de NP.

# 4.3.2 Évolution du taux d'hydrolyse des fonctions ester de NS au cours du temps

Pour mettre en évidence le taux d'hydrolyse des fonctions ester de NS, nous avons exploité deux techniques : la première est la mesure de l'absorbance à 260 nm des anions NHS par spectrométrie UV, la seconde est le dosage de la NHS par HPLC.

La détermination du taux d'hydrolyse  $(T_H)$  nécessite deux données : la quantité totale de NHS libérable, correspondant à une hydrolyse totale des fonctions ester (100%) et la quantité de NHS libérée à un instant t.

(i) La quantité maximale de NHS libérable est obtenue en faisant réagir un large excès d'éthanolamine sur une dispersion diluée de NP pendant 30 minutes (comme précédemment pour le taux de disponibilité). La dispersion après réaction est centrifugée pour en extraire le surnageant, dont la DO à 260 nm (notée  $DO_{max}$ ) correspond à la quantité maximale de groupements NHS libérable.

(ii) La quantité de NHS libérée à un instant t est obtenue par la mesure de la DO à 260 nm du surnageant de la dispersion de particules (préalablement diluée comme précédemment), auquel a été ajoutée la même quantité d'éthanolamine (pour rester dans les mêmes conditions de pH), la valeur obtenue étant notée  $DO_{H,t}$ .

Ainsi, la fraction d'ester hydrolysée à un instant  $t(T_H)$  par rapport au total disponible a été déterminée par le rapport  $DO_{H,t}/DO_{max}$ .



FIGURE 4.4 – Évolution du taux d'hydrolyse des fonctions ester de NS disponibles à la surface des NP (températures du bain utilisées pour l'évaporation du solvant lors de la préparation des NP : 20°C (■) et 30°C (●)) et pour la préparation de micelles de copolymère : 30°C (▲) en fonction du temps

Un taux d'hydrolyse d'environ 30% est observé dès lors que le procédé de nanoprécipitation (après évaporation des solvants) est terminé (Figure 4.4). La température du bain d'évaporation lors de l'élaboration des nanoparticules a été diminuée de 30°C ( $\bullet$  de la Figure 4.4) à 20°C ( $\blacksquare$  de la Figure 4.4), afin de minimiser ce taux d'hydrolyse relativement conséquent mais sans effet positif. De même, l'étude

de l'hydrolyse des fonctions ester a été réalisée sur des micelles de copolymère obtenues dans les mêmes conditions de nanoprécipitation, mais sans PLA ( $\blacktriangle$  de la Figure 4.4). L'hydrolyse semble conséquente, puisqu'elle entraîne, là encore, la désactivation de 30% des fonctions ester. La grande majorité des fonctions ester est hydrolysée en 50 jours (plus de 80%), comme en témoigne la Figure 4.4. Le taux d'hydrolyse après formation des NP a été répété sur de nombreux lots, tous concourent à un taux d'hydrolyse d'environ 30%, qui a été confirmé par des analyses de chromatographie liquide haute performance (HPLC).

De manière similaire aux analyses effectuées par spectrométrie UV, le taux d'hydrolyse est déterminé par HPLC en comparant l'intégrale du pic relatif à la NHS libérée à un instant t (pic (a) de la Figure 4.5) à celle correspondant à la quantité maximale de NHS (par ajout d'éthanolamine : pic (c) de la Figure 4.5). Le pic (b) du chromatogramme représente la quantité de NHS libérée par hydrolyse 15h après la fin de la nanoprécipitation.



FIGURE 4.5 – Chromatogrammes, de bas en haut, de la NHS libérée, après formation des NP ((a) t=0 et (b) t=15h) en comparaison avec (c) l'hydrolyse totale

Dans la littérature, le phénomène d'hydrolyse des fonctions ester de NS a déjà été reporté. Les travaux de McCormick *et coll.*<sup>304</sup> mettent en évidence un taux d'hydrolyse des esters de NS de 0.3% après 7h et de

37% après 12 jours, avec l'utilisation d'un copolymère tribloc POE-b-P(DMA-s-NAS)-b-PNIPAM (DMA : N,N-diméthylacrylamide et NIPAM : N-isopropylacrylamide) utilisé pour l'élaboration de micelles. Dans d'autres travaux de Wooley *et coll.*,<sup>263</sup> l'hydrolyse du monomère NAS est de 4% après être resté 4h dans un mélange de THF et d'eau deutérés (v/v).

Les taux d'hydrolyse d'environ 30% après élaboration des nanoparticules (soit un temps de mise en contact avec l'eau d'environ 80 minutes avant analyse) semblent donc élevés en comparaison avec la littérature. Cependant, il est à noter que concernant les travaux de McCormick *et coll.*,<sup>304</sup> le bloc P(DMA-s-NAS), du copolymère tribloc POE-*b*-P(DMA-s-NAS)-*b*-PNIPAM, se situe entre le bloc de P(NIPAM) qui constitue le cœur des micelles et le bloc de POE qui constitue leur couronne. Les fonctions ester de NS sont dès lors moins accessibles et donc, par conséquent, très probablement moins sujettes à l'hydrolyse que dans notre cas, où les fonctions ester sont à la surface des particules et donc pleinement en contact avec la phase aqueuse.

# 4.3.3 Conclusion

Le procédé de nanoprécipitation permet d'obtenir des NP dotées en moyenne de 84% de fonctions ester de NS disponibles en leur surface. Il y a donc en moyenne 16% de fonctions ester enterrées dans la matrice de PLA. Toutefois, malgré cette perte inhérente au procédé d'élaboration des NP, une densité importante de fonctions ester (2.4 fonctions.nm<sup>-2</sup>) est retrouvée à la surface des NP.

L'hydrolyse des fonctions ester, reportée dans la littérature, a été confirmée par deux techniques, spectrométrie UV et HPLC, ce qui nous a permis de conclure sur un taux d'hydrolyse d'environ 30% des fonctions ester de NS disponibles, suite au procédé de fabrication des NP de PLA-copolymère. Cependant, malgré une hydrolyse prononcée, nous pouvons envisager à présent de manière rationnelle le couplage de biomolécules d'intérêt à la surface des NP, compte-tenu de la densité de fonctions ester de NS présentes à la surface des NP de PLA-copolymère.

# 4.4 Préparation de NP de PLA fonctionnelles

Afin d'aboutir à des systèmes de particules multifonctionnelles, le couplage du peptide de l'IL-1 $\beta$  à la surface des NP de PLA-copolymère est étudié dans un premier temps, suivi par l'étude de l'encapsulation de l'iniquimod dans les NP de PLA et de PLA-copolymère.

# 4.4.1 Couplage de la séquence active de l'IL-1 $\beta$ à la surface des NP de PLAcopolymère

#### 4.4.1.1 Quelques notions sur le couplage de peptides

L'étude du couplage de la séquence active extraite de l'interleukine  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) sur les NP a porté sur deux peptides : le premier est la stricte séquence active **VQGEESNDK** de l'IL- $1\beta$  retrouvée en position 163-171 de cette protéine, le second est son homologue KKK**VQGEESNDK** présentant une séquence supplémentaire de trois lysines au niveau de son extrémité N-terminale, appelée séquence "tag". Ce peptide dit taggé est envisagé en raison de la présence d'une lysine en C-terminal, qui pourrait défavoriser le couplage souhaité avec l' $\alpha$ -amine N-terminale. De plus, le nonapeptide **VQGEESNDK** possède trois acides aminés (deux E et un D) présentant des fonctions carboxylate, qui sont susceptibles de défavoriser l'approche du peptide vers la surface négativement chargée des NP.

L'augmentation du taux de couplage d'un peptide taggé lysine par rapport à son analogue non-taggé sur un support polymère de (poly(anhydride maléique-*alt*-méthyléther de vinyle)) a été démontrée par Ladavière *et coll.*<sup>305</sup> En effet, pour un temps identique de réaction, cette stratégie permet d'augmenter le rendement de couplage de 17 % pour le peptide non-taggé à 89% pour un peptide taggé lysine.<sup>305</sup> L'amine terminale du peptide réagit donc plus efficacement avec les fonctions activées en présence de ce tag, ce que les auteurs ont expliqué : par (i) des interactions électrostatiques favorables à la réaction et par (ii) une diminution de la gêne stérique en présence du tag.<sup>305</sup>

#### 4.4.1.2 Étude du couplage de peptides à la surface des NP

#### A- Étude préliminaire d'optimisation du temps de couplage et de l'influence du tag

Dans un premier temps, le couplage des peptides sur les fonctions ester de NS des NP de PLAcopolymère (Copo2,  $T_H$ =49%, 186 nm, IP=0.146) a été effectué à température ambiante, en tampon phosphate pH 8 (10 mM) à un taux de solide de 0.5% en NP, avec une quantité de peptide taggé introduite sensiblement identique (respectivement 11.3 et 13 mg pour les peptides taggé et non-taggé par gramme de NP, correspondant à des masses identiques de peptide-TFA (16 mg.g<sup>-1</sup> de NP)). L'analyse du couplage est effectuée par HPLC à 215 nm par le dosage du peptide non couplé dans le surnageant des NP obtenu après centrifugation.

Pour optimiser le couplage des deux peptides à la surface des NP de PLA-copolymère, différents temps de réaction ont été testés. Les résultats des taux de couplage obtenus pour les peptides non-taggé et taggé sont présentés dans le Tableau 4.6.

Peptide	Quantité de	Temps	Taux de	Quantité de
	peptide introduite		couplage	peptide couplée
	$(mg.g^{-1} de NP)$	(h)	(%)	$(mg.g^{-1} de NP)$
II 1 <i>Q</i>	19	2	1	0.13
IL-1 $p$	10	24	2	0.26
	11.2	2	56	6.4
<b>KIXIX-11</b> -1 <i>p</i>	11.0	24	92	10.4

Tableau 4.6 – Influence du temps de réaction sur les taux de couplage des deux peptides sur les NP de PLA-copolymère

Il est clairement remarqué que l'ajout du tag lysine en N-terminal du peptide améliore considérablement le rendement de couplage passant de 2% pour le peptide brut à 92% pour le peptide taggé en 24h (Tableau 4.6).

À 11.3 mg de peptide taggé introduit par gramme de NP, un temps de réaction de 24h permet de finaliser le couplage de manière quasi-quantitative avec les fonctions ester de NS. Le taux de couplage passe en effet de 56% en 2h à 92% en 24h.

De manière intéressante, l'hydrolyse compétitive des fonctions ester de NS au cours du temps peut être renseignée par l'aire du pic de NHS obtenue par HPLC des surnageants de couplage (Figure 4.6). Le couplage du peptide non-taggé étant quasi-nul, l'évolution de l'aire du pic de NHS pour ce couplage peut être assimilée essentiellement au processus d'hydrolyse des fonctions ester. Le surplus d'aire de pic observé pour le couplage du peptide taggé correspond à la NHS libérée suite à la fixation du peptide. Ainsi, on observe que l'hydrolyse des fonctions ester est bien en compétition avec le couplage peptidique. Néanmoins, cela ne nous a pas empêché de coupler la quasi-intégralité du peptide taggé.



FIGURE 4.6 – Évolution du taux de couplage (-■- pour le peptide taggé et -●- pour le peptide non-taggé) et de l'aire du pic de NHS obtenu par HPLC sur les surnageants (-□- pour le peptide taggé et -○- pour le peptide non-taggé) au cours du temps. 11.3 mg de peptide taggé et 13 mg de peptide non-taggé par g de NP

À titre d'expérience contrôle, un couplage du peptide taggé (introduit à 11.3 mg.g<sup>-1</sup> de NP) a été effectué sur des NP dont les fonctions ester étaient hydrolysées à plus de 90%. Le taux de couplage obtenu est de 5% en 2h, contre 56% en 2h pour le couplage du peptide taggé sur des NP de taux d'hydrolyse de 49%, confirmant clairement que les fonctions ester sont impliquées dans le couplage. Cette expérience indique également qu'il n'y a pas réellement d'adsorption non covalente, qui serait gouvernée par des interactions électrostatiques entre le peptide taggé et la particule.

#### B- Influence de la quantité de peptide introduite

Le couplage a ensuite été étudié pour différentes quantités de peptide sur 24h, en tampon phosphate pH 8 10 mM, avec des NP de PLA-copolymère d'une taille de 169 nm et présentant un  $T_H$  de 31 %. Les résultats de couplage sont présentés dans le Tableau 4.8. La quantité de peptide taggé immobilisée sur les NP augmente avec les quantités introduites. En revanche, pour le peptide non-taggé, la quantité immobilisée n'évolue plus et stagne à une faible valeur d'environ 1.83 mg par gramme de NP.

Peptide	Quantité de peptide introduite (mg.g <sup>-1</sup> de NP)	Taux de couplage (%)	Quantité de peptide couplée (mg.g <sup>-1</sup> de NP)	Nombre de moles de peptide couplé $(\mu \text{mol.g}^{-1} \text{ de NP})$
IL-1 $\beta$	$\begin{array}{c} 13\\ 26\\ 39 \end{array}$	$12.5 \\ 5.8 \\ 4.7$	1.63 1.51 1.84	1.62 1.51 1.83
KKK-IL-1 $\beta$	$     11.3 \\     22.7 \\     34.0 $	97 89 76	11.0 20.2 25.9	$7.92 \\ 14.53 \\ 18.62$

Tableau 4.7 – Influence de la quantité de peptide introduite sur les taux de couplage des deux peptides sur les NP de PLA-copolymère (24h de réaction)

Nous pouvons ici noter l'influence du taux d'hydrolyse des NP sur le couplage. En effet, dans l'étude préliminaire précédente, le rendement de couplage du peptide non-taggé (introduit à 13 mg.g<sup>-1</sup> de NP) sur les NP présentant un  $T_H$  de 49% était de 2% en 24h, alors qu'ici avec des NP caractérisées par un  $T_H$  de 31% il passe à environ 12%. La même observation peut être faite pour le peptide taggé (introduit à 11.3 mg.g<sup>-1</sup> de NP), où le rendement de couplage passe de 92% à 97%.

Les isothermes de couplage, correspondant à la quantité de peptide immobilisée en fonction de la quantité résiduelle de peptide dans le surnageant, sont présentées dans la Figure 4.7. L'isotherme relative au peptide taggé nous indique, que pour 34 mg de peptide introduit, soit 25.9 mg de peptide immobilisé, le couplage commence à atteindre un palier et représente donc une quantité très proche de la quantité maximale que nous pouvons espérer coupler.



FIGURE 4.7 – Isothermes de couplage obtenues pour le peptide taggé ( $\blacksquare$ ) et le peptide non-taggé ( $\bigcirc$ )

Il a ainsi pu être couplé de manière covalente 25.9 mg soit 18.6  $\mu$ mol de peptide par gramme de NP. Or d'après le calcul théorique, les NP de PLA-copolymère présentent au maximum 142  $\mu$ mol de fonctions ester de NS par gramme de NP, auxquelles doivent se déduire 16% de fonctions de ester de NS enterrées (cf section précédente), soit 119  $\mu$ mol de fonctions ester disponibles par gramme de NP. Déduction faite de l'hydrolyse des fonctions ester disponibles (31%), les NP de PLA-copolymère présentent 82  $\mu$ mol.g<sup>-1</sup> de NP de fonctions ester activées et disponibles. Ainsi, nous avons pu coupler de manière covalente 22.6% des fonctions ester activées disponibles avec le peptide taggé. Le reste des fonctions est semble-t-il hydrolysé durant le couplage.

Enfin, il est à noter ici qu'un couplage de peptide taggé a été effectué sur les NP de PLA nues, par activation classique des fonctions acide carboxylique de surface avec l'EDC ou l'EDC/NHS. La quantité maximale immobilisée est de 6 mg.g<sup>-1</sup> dans les deux cas (contre 25.9 mg.g<sup>-1</sup> pour les NP de PLAcopolymère), montrant l'intérêt du bloc P(NAS-*co*-NVP) à la surface des NP pour un couplage massif du peptide.

### 4.4.1.3 Densité de peptides à la surface des NP

Il a été calculé la densité maximale de peptides immobilisée à la surface des particules, exprimée en nombre de molécules de peptides par  $\mu$ m<sup>2</sup> et par NP, (Tableau 4.8), en utilisant les expériences menées précédemment.

Peptide	Quantité de peptides immobilisée (mg.g <sup>-1</sup> de NP)	Nombre de peptides immobilisé (par $\mu$ m <sup>2</sup> )	Nombre de peptides immobilisé par NP	
IL-1 $\beta$	1.84	38 806	3 482	
KKK- IL-1 $\beta$	25.9	395  053	35 447	

Tableau 4.8 – Densités de molécules de peptides immobilisées sur les NP (diamètre moyen : 169 nm) et nombre moyen de peptides par  $\mu$ m<sup>2</sup> et par NP

Le nombre de molécules de peptides taggés par NP est considérable, en comparaison avec les travaux décrits dans la littérature. Dans les travaux de Valencia *et coll.*,<sup>306</sup> les auteurs utilisent la stratégie de fonctionnalisation de bouts de chaînes d'un copolymère à blocs PLA-*b*-PEG par un peptide RGD, qui est utilisé par la suite pour la préparation de micelles. Suivant cette stratégie, ils obtiennent un maximum de 224 760 peptides RGD par  $\mu$ m<sup>2</sup>. Grâce à notre stratégie, nous doublons presque la densité de peptides immobilisée à la surface de nos NP, en n'utilisant que 10% massique du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) par rapport au PLA. Les travaux de Brandhonneur *et coll.*,<sup>128</sup> quant à eux, décrivent l'immobilisation du peptide **RGD** (séquence **GRGD**SPK) par sa réaction avec les fonctions acide carboxylique de bouts de chaînes de PLGA, préalablement activées par l'EDC présentes à la surface des NP. Ils obtiennent ainsi pour le couplage du peptide RGD l'équivalent de 34 490 molécules par  $\mu$ m<sup>2</sup>. Nous multiplions ainsi par dix cette quantité.

# 4.4.1.4 Taille et potentiel zêta des NP fonctionnalisées par le peptide

Les tailles et potentiels zêta des particules fonctionnalisées par différentes quantités de peptides, après lavage par centrifugation/redispersion dans l'eau, sont présentés dans le Tableau 4.9.

Une nette augmentation de la taille est à constater en passant des NP de PLA-copolymère obtenues après nanoprécipitation (169 nm, IP 0.187) aux NP de PLA-copolymère après couplage de peptides (environ 220 nm) (Tableau 4.9). En fait, cette différence est surtout attribuée au gonflement de la couronne suite à l'hydrolyse compétitive des esters, puisque les NP de PLA-copolymère<sup>\*</sup> placées en tampon phosphate pH8 (en absence de peptide) présentent une taille moyenne de 237 nm. La fraction importante de peptides taggés (évaluée à 24% des fonctions ester disponibles) ne contribue pas à une augmentation significative de la taille des NP en comparaison avec les NP de PLA de peptides non-taggés. Il est important de noter que la stabilité colloïdale des NP de PLA-couplées aux peptides est maintenue.

	Quantité de peptides	Taille	IP	Potentiel zêta
	immobilisée (mg.g <sup>-1</sup> de NP)	(nm)		(mV)
NP de PLA-copolymère	Ø	169	0.187	-
NP de PLA-copolymère <sup>*</sup>	Ø	237	0.094	-46
	1.63	226	0.135	-44.8
NP de PLA-copolymère-IL-1 $\beta$	1.51	222	0.161	-44.1
	1.84	228	0.122	-44.5
	11.0	215	0.165	-43.4
NP de PLA-copolymère-KKK-IL-1 $\beta$	20.2	213	0.164	-42.2
	25.9	218	0.177	-40.4

Tableau 4.9 – Influence du couplage covalent du peptide sur les tailles et potentiels zêta des NP obtenues. Potentiel zêta réalisé en milieu tampon phosphate pH6. NP de PLA-copolymère<sup>\*</sup> : dispersion de NP laissée en tampon phosphate pH 8 10 mM pendant 24h sans peptide

En ce qui concerne le potentiel zêta, une relative augmentation peut être observée avec une quantité croissante de peptide taggé immobilisée, semblant indiquer l'influence des tags lysines cationiques. Néanmoins, le peptide possède tout de même trois fonctions carboxylate, ce qui explique que les valeurs de potentiels zêta ne subissent pas de grandes variations.

## 4.4.1.5 Conclusion

Dans cette étude, la stratégie du tag lysine est apparue décisive pour le succès du couplage de peptides immunostimulants sur les NP de PLA-copolymère. Elle permet en effet de favoriser l'approche du peptide sur les NP de PLA-copolymère négativement chargées, par le jeu d'interactions électrostatiques, pour son couplage. Elle s'avère donc puissante pour permettre le couplage de peptides très défavorables à leur fixation sur des NP négativement chargées, comme c'est le cas pour le peptide VQGEESNDK.

D'autre part, la capacité du bloc P(NAS-co-NVP) présent à la surface des NP pour permettre un couplage massif du peptide a été démontrée.

# 4.4.2 Encapsulation de l'imiquimod dans les NP

Dans l'optique de protéger l'imiquimod et de pouvoir le délivrer au sein des cellules immunitaires, les NP de PLA ont été mises à profit pour encapsuler l'imiquimod. L'encapsulation de cette molécule devrait être facilitée par son fort caractère hydrophobe.

## 4.4.2.1 Mise au point du procédé de nanoprécipitation

L'encapsulation de l'imiquimod suivant le procédé de nanoprécipitation précédemment étudié nécessite sa solubilisation avec le PLA dans un solvant organique miscible à l'eau et volatil. Cependant, le principal inconvénient de cette molécule est sa faible solubilité dans les solvants organiques classiquement utilisés pour la nanoprécipitation, tels que l'ACN et l'acétone.<sup>3</sup>

Sa meilleure solubilité étant acquise dans le DMSO, la nanoprécipitation a été menée avec ce solvant comme phase organique. Concrètement, le DMSO (27.5 mL) permet de solubiliser le PLA (550 mg) et l'imiquimod (27.5 mg, maximum solubilisable soit 5% massique d'imiquimod par rapport au PLA) à 37°C. Après son retour à température ambiante, la solution de PLA-imiquimod-DMSO est nanoprécipitée dans une phase aqueuse (17.5 mL), à l'aide d'une ampoule de coulée. La phase opalescente obtenue, témoin de la nanoprécipitation, est dialysée contre l'eau, pour éliminer le DMSO employé. Pour la mise au point de ce procédé, les nanoprécipitations ont été conduites en l'absence du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP). Lors de la dialyse, le premier constat, qui s'est imposé, est d'ordre visuel avec l'apparition de grains de solides en suspension dans le sac de dialyse avant même le premier renouvellement d'eau. Il peut donc être suspecté : soit l'agrégation des particules, soit la précipitation de l'imiquimod. Or, après la sédimentation de ces grains, les tailles obtenues sont de l'ordre de 100 nm avec des IP faibles, généralement inférieurs à 0.1 (Tableau 4.10) et les taux de solide sont proches de ceux espérés. Par conséquent, la floculation du PLA lors de ce procédé peut être exclue et la précipitation de l'imiquimod confirmée.

Il est à remarquer une différence de taille entre les NP de PLA élaborées à partir d'une phase organique d'acétone (typiquement 150-200 nm lors du procédé de nanoprécipitation précédemment étudié) et celles préparées ici à partir de DMSO (100 nm). Cette diminution de diamètre moyen est le résultat de la vitesse de diffusion du DMSO dans l'eau, plus rapide que celle de l'acétone dans l'eau.

De manière générale, les interactions entre le solvant et le non-solvant et entre le polymère et le solvant influencent la taille des NP. Les paramètres d'interaction ( $\chi$ ), dont le calcul est exposé dans la partie expérimentale, permettent de quantifier ces interactions.

Plus l'interaction solvant/non-solvant est forte (i.e. plus  $\chi$  est faible), plus les particules sont petites,<sup>300</sup> ce qui est confirmé dans notre cas, avec les paramètres d'interaction pour les couples acétone/eau (5.82) et DMSO/eau (3.39).

En outre, plus l'interaction polymère/solvant est faible (i.e. plus  $\chi$  est élevé), plus les particules sont petites.<sup>300</sup> La diminution de taille en passant de l'acétone au DMSO est une fois encore confirmée avec les valeurs des paramètres d'interaction pour les couples PLA/acétone (0.04) et PLA/DMSO (0.867).

Code des NP	$  TE_{th} $	Taille (nm)	IP	TE imi NF	TE imi F	[imi] dan le SN $(\mu q m L^{-1})$	EE (%)
	(70)			(70)	(70)	(µg.mL)	(70)
NP-PLA-imi-1	5	92	0.089	4.6	0.19	30.0	3.8
NP-PLA-imi-2	2.5	82	0.166	1.1	0.11	21.9	4.4
NP-PLA-imi-3	1	95	0.057	0.05	0.04	22.0	5

Tableau 4.10 – Caractéristiques des NP obtenues lors de l'encapsulation de l'imiquimod par nanoprécipitation d'une solution de PLA-imiquimod-DMSO (20 mg.mL<sup>-1</sup>) dans l'eau puis dialyse, avec TE : taux d'encapsulation,  $TE_{th}$  : TE théorique, imi : imiquimod, NF : non filtré, F : filtré, SN : surnageant et EE : efficacité d'encapsulation

#### 4.4.2.2 Efficacité d'encapsulation

Pour l'étude de l'encapsulation de l'imiquimod, trois pourcentages massiques d'imiquimod par rapport au PLA ont été testés (1, 2.5 et 5%). Le taux d'encapsulation (TE) est déterminé par l'étude de la fluorescence de l'imiquimod contenu dans le culot lyophilisé et dissous dans le DMSO. La concentration d'imiquimod résiduelle dans le surnageant a été déterminée par HPLC. Concernant les taux d'encapsulation d'imiquimod (TE), il a été mis volontairement en évidence le TE pour des NP non filtrées (TE imi NF) et le TE pour des NP filtrées (TE imi F) dans le Tableau 4.10. En effet, lorsque le taux d'encapsulation est déterminé sur le culot de NP obtenu par simple centrifugation des NP non filtrées au préalable, un TE de 4.6 % est déterminé lorsque 5% massique d'imiquimod sont introduits. Or nous savions pertinemment que l'imiquimod avait précipité dans le sac de dialyse, ceci en quantité non négligeable compte tenu de l'aspect visuel de la dispersion des NP après dialyse. De fait, la simple centrifugation des NP entraîne la présence d'imiquimod précipité dans le culot des NP.

Ainsi, grâce à leur taille de 100 nm, les dispersions de NP ont été filtrées sur membrane nylon 0.22  $\mu$ m, ce qui permet de s'affranchir de la fraction d'imiquimod précipité et donc de déterminer le TE réel d'imiquimod encapsulé au sein des NP (et en même temps permet de stériliser les NP). Une chute drastique de ce TE est à déplorer, les TE variant de 0.19 à 0.04 % pour un pourcentage massique introduit de 5 à 1%, confirmant une fois encore la nature imiquimod des grains de solide en suspension dans le sac de dialyse. L'efficacité d'encapsulation (EE) pour cette technique de nanoprécipitation (i.e. le rapport du TE expérimental sur le TE théorique) est de l'ordre de 4%.

Augmenter la quantité d'imiquimod introduite initialement semble augmenter le taux d'encapsulation mais ce dernier demeure limité (0.19% pour 5% introduits). Or, il n'est pas concevable d'essayer d'améliorer un système de formation de nanosphères où le principe actif est perdu à plus de 95%; la quantité d'imiquimod ne sera par conséquent pas augmentée.

L'efficacité d'encapsulation aussi faible peut apparaître surprenante au regard des précédents résultats obtenus avec les micelles de copolymère, pour lesquelles l'imiquimod se logeait massivement dans le cœur de PLA (par incubation avec les micelles). La raison de cette faible encapsulation semble plutôt liée au processus d'élaboration des NP. Dans le cas présent, pour qu'une encapsulation efficace ait lieu, l'imiquimod doit, au moment de la diffusion rapide du DMSO dans l'eau, rester dans la "gouttelette" de PLA gonflée de solvant. Toutefois, il semble qu'une grande partie de l'imiquimod ait plutôt tendance à diffuser avec le DMSO dans l'eau.

Avec l'objectif d'avoir des NP multifonctionnelles cœur/couronne, il a été vérifié que l'ajout du copolymère PLA-b-P(NAS-co-NVP) (10% massique par rapport au PLA) lors du procédé d'encapsulation est sans incidence sur les taux d'encapsulation obtenus (il est retrouvé 0.2% d'encapsulation sur les 5% massique introduit).

Concernant la concentration d'imiquimod résiduelle, nous retrouvons ici des valeurs proches de la solubilité de l'imiquimod pour un pH typique de 6-7, déterminées par Chollet  $et \ coll.$ <sup>3</sup> soit une gamme

de concentrations comprise entre 20 et 30  $\mu g.mL^{-1}$ .

Malgré une dialyse efficace pour l'élimination du DMSO, il est à déplorer la présence persistante d'imiquimod précipité dans la dispersion de particules, les grains d'imiquimod apparaissant entre 0 et 1h de dialyse, temps pour lequel le transfert de masse de DMSO contre l'eau est le plus important.

### 4.4.2.3 Conclusion

La technique de nanoprécipitation classiquement utilisée pour l'élaboration de NP dans ce manuscrit a dû être adaptée pour l'encapsulation de l'imiquimod, qui est une molécule très peu soluble dans les solvants organiques volatils et miscibles à l'eau traditionnellement utilisés. De même, sa solubilité dans des solvants organiques moins volatils est relativement faible.

Par conséquent, le DMSO a dû être utilisé pour solubiliser à la fois le PLA et l'imiquimod. Des NP de PLA imiquimod d'une taille d'environ 100 nm avec des IP faibles (<0.1) ont pu être obtenues.

En revanche, à l'inverse des micelles, les NP de PLA pour encapsuler l'imiquimod se sont révélées décevantes avec des TE avoisinant 0.2% dans le meilleur des cas. Des techniques d'élaboration de nanocapsules (dotées d'un cœur huileux) par nanoprécipitation pourraient constituer une excellente alternative pour l'encapsulation de l'imiquimod, qui présente une affinité certaine pour les acides gras biocompatibles, tels que l'acide isostéraique, l'acide linoléique ou encore l'acide oléique.<sup>307</sup> L'utilisation d'acides gras, par définition insolubles dans l'eau, devrait permettre de retenir l'imiquimod dans la matrice de PLA.

# Chapitre 5

# Évaluations préliminaires du potentiel vaccinal

Uelques études préliminaires ont été menées sur deux lignées de cellules dendritiques (DC) : SRDC (lignée immortalisée de souris) et cellules dendritiques humaines, extraites à partir d'une poche de sang de donneur. Différentes formulations à base de micelles et de NP de PLA-peptide ont été testées.

# 5.1 Apport des ligands

L'évaluation du potentiel vaccinal a été menée par l'étude de deux lignées cellulaires par cytométrie en flux par FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Il est étudié l'évolution (augmentation ou non) des molécules/marqueurs de surface caractéristiques de la maturation des cellules dendritiques. La cytométrie en flux permet de caractériser les éléments d'une suspension de cellules entraînées par un flux liquide. Dans notre cas, les molécules de surface présentes à la surface des cellules sont révélées grâce à l'ajout d'anticorps (couplés à un fluorochrome) dirigés contre les molécules de surface étudiées. Les cellules sont ensuite injectées et diluées dans le flux liquide afin de les faire défiler une par une devant un faisceau laser. La fluorescence émise par chaque cellule est mesurée. Plus l'intensité de fluorescence est importante, plus le nombre de molécules de surface présentes à la surface des cellules est élevé.

# 5.1.1 Études menées sur une lignée de DC immortalisées de souris

Dans un premier temps, les stimulations de DC ont été conduites sur une lignée de DC immortalisées de la rate de souris : SRDC. Cette lignée cellulaire a été développée par Ruiz *et coll.*<sup>308</sup> avec la motivation de pallier la difficulté d'obtention de DC naïves d'origine humaine ou animale, les contraintes qu'impose la culture de cellules dérivant de la moelle osseuse et les faibles nombres de cellules obtenues par cette voie.

Lorsque les SRDC sont stimulées et deviennent matures, elles expriment plusieurs molécules d'intérêt, telles que les molécules du CMH I et du CHM II, les molécules co-stimulantes CD80, CD86 et CD40, la molécule CD95 (appartenant à la famille de récepteur du TNF) et le récepteur au mannose CD205. Lorsque ces cellules dendritiques sont stimulées avec du LPS ou un antigène de la *Toxoplasma gondii* responsable de la toxoplasmose, les molécules CHM I, CMH II, CD40, CD80, CD86, CD95 et CD205 sont surexprimées, comme en témoigne la Figure 5.1.<sup>308</sup>



FIGURE 5.1 – Évolution typique de l'expression des marqueurs CD40, CD11c, CD80, CD86, CD95, CD205, CMH I et CMH II après stimulation des SRDC par du LPS. Image extraite de Ruiz et coll.<sup>308</sup> représentant le nombre d'événements en fonction de l'intensité de fluorescence

Les stimulations ont été conduites sur 24h sur deux millions de cellules pour chaque condition. Il a été testé :

- le LPS  $(2 \mu g)$ ,
- le D-mannose et le D-glucose (respectivement 320  $\mu$ g et 180  $\mu$ g),
- l'imiquimod (100 ng),
- des NP de PLA nues,
- de NP de PLA nues encapsulant de l'imiquimod,

- des micelles de copolymère modifié par des sucres avec ou sans imiquimod (mannosylé (100 ng d'imiquimod)) et glucosylé (200 ng d'imiquimod))

- des micelles neutres de copolymère modifié par l'éthanolamine avec ou sans imiquimod.

Tous les systèmes particulaires sont ajoutés de sorte à avoir 8 150 NP par cellule.

Les résultats sont exposés sous forme de graphique représentant l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) par dispersion évaluée (Figure 5.2). L'IMF donne une représentation de la quantité moyenne de molécules de surface ayant été fixées par un anticorps couplé à un fluorochrome. Pour chaque molécule de surface étudiée (CMH II, CD40, CD80 et CD83), l'IMF minimum de référence correspond à celle des cellules non stimulées (ici notées NS) et l'IMF à atteindre, voire dépasser, correspond à celle des SRDC stimulées par le LPS.

Il peut être remarqué que les stimulations des SRDC par le LPS et par nos formulations provoquent une augmentation généralement modérée de l'expression des molécules de surface étudiées (Figure 5.2).



Aucun effet n'est à constater avec l'utilisation de D-mannose et de D-glucose en solution, ni avec les NP de PLA avec/sans imiquimod.

FIGURE 5.2 – Influence des différentes formulations sur l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) par cellule de différents marqueurs. Pour tous les graphiques de gauche à droite : NS (non-stimulée), LPS, micelles glucosylées, micelles glucosylées/imiquimod, micelles mannosylées, micelles mannosylées/imiquimod, micelles neutres, micelles neutres/imiquimod et référence imiquimod

Toutefois, une augmentation modérée de l'expression du CMH II à la surface des SRDC est à constater pour la formulation à base de micelles de copolymère glucosylé encapsulant de l'imiquimod (Figure 5.2 (a)). Un doublement de la fluorescence du marqueur CD40 est constaté pour les cellules stimulées par le LPS (Figure 5.2 (b)). Une nette hausse est observée pour les formulations de micelles de copolymère glucosylé encapsulant ou non de l'imiquimod. Le LPS et la formulation à base de micelles de copolymère glucosylé encapsulant de l'imiquimod permettent d'induire une légère surexpression de la molécule CD80 (Figure 5.2 (c)). Aucune influence du LPS et des systèmes évalués est à constater sur l'expression du marqueur CD83 (Figure 5.2 (d)).

Il est toutefois important de noter ici que la quantité d'imiquimod introduite via les micelles de copolymère glucosylé est deux fois supérieure à celle introduite via les micelles de copolymère mannosylé et la solution de référence d'imiquimod. L'imiquimod encapsulé dans les micelles glucosylées (introduite à 200 ng pour deux millions de cellules) semble toutefois présenter un léger pouvoir immunostimulant sur les SRDC. Nous ne pouvons malheureusement pas conclure sur l'apport des micelles et le type de micelles (glucosylées *versus* mannosylées), en comparaison avec la forme libre de l'imiquimod.

Les cytokines Il-12 et IFN- $\alpha$  ont été dosées dans le surnageant du milieu de stimulation des cellules. Ces analyses n'ont révélées aucune présence de ces cytokines. Dans les travaux de Ruiz, les cellules semblent sécréter davantage de cytokines, suite à l'utilisation d'antigène, et finalement peu, voire pas du tout, suite à des stimulations menées en présence de LPS ou d'IFN- $\gamma$ . Il n'est donc pas surprenant de n'avoir obtenu aucune cytokine dans les surnageants après stimulation.

Cependant, les variations d'IMF en passant de SRDC non stimulées à des cellules stimulées par le LPS sont très modérées, voire absentes. Nous avons donc estimé que cette lignée cellulaire ne constituait pas un modèle adéquat pour l'étude de la stimulation de DC, contrairement à ce qu'affirme les auteurs à l'origine de cette lignée. Ainsi, nous avons souhaité reproduire les stimulations sur des cellules dendritiques humaines.

# 5.1.2 Études menées sur des DC humaines

Les cellules dendritiques dérivent de monocytes. Ainsi, à partir d'une poche de sang humain, les monocytes ont été séparés des autres cellules présentes dans le sang (globules rouges, cellules B, T et NK), puis mis en culture en présence d'IL-4 et de GM-CSF pour induire leur différenciation en DC.

Les stimulations ont été conduites sur 24h et 48h, sur un million de cellules par condition. Les formulations testées sont :

- les NP de PLA-copolymère couplé au peptide (11.6 mg de KKK-IL-1 $\beta$  par gramme de NP) en comparaison avec les NP de PLA nues (8 150 NP par cellules),

 les micelles glucosylées, mannosylées et neutres encapsulant ou non de l'imiquimod (100 ng d'imiquimod par million de cellules).

Un temps de 24h de stimulation ne semble pas suffire pour obtenir des résultats satisfaisants de stimulation des DC. Les expériences présentées ont été menées sur 48h.

Concernant la morphologie des cellules, dont quelques clichés de microscopie sont exposés dans la Figure 5.3, il peut être remarqué que les cellules non stimulées ne présentent pas de dendrites, tout comme celles stimulées par les micelles neutres sans imiquimod. En revanche, pour toutes les autres formulations, un allongement prononcé des DC avec la formation de quelques dendrites peut être observé.





FIGURE 5.3 – Clichés de microscopie de DC humaines après 48h de stimulation avec différentes formulations (Microscope Nikon, logiciel d'acquisition Metaview)

Lors de cette étude, les marqueurs CMH II, CD80, CD83 et CD86 ont été étudiés.

Cette fois-ci, le LPS joue pleinement son rôle de contrôle de positif, comme en témoigne la Figures (b), (c) et (d) de la Figure 5.4. Une incontestable augmentation de l'expression des marqueurs CD80, CD83 et CD86 est observée.



FIGURE 5.4 – Influence des différentes formulations sur l'IFM de différents marqueurs. Pour tous les graphiques de gauche à droite : NS (non-stimulée), LPS, micelles glucosylées, micelles glucosylées/imiquimod, micelles mannosylées, micelles mannosylées/imiquimod, micelles neutres, micelles neutres/imiquimod, référence imiquimod, NP de PLA-copolymère couplé avec le peptide KKK-IL-1 $\beta$  et NP de PLA nues

Concernant nos formulations, en revanche peu de pouvoir immunostimulant est à constater. Toutefois, il peut être noté pour la solution d'imiquimod dans le DMSO un doublement de l'IFM pour les marqueurs de surface CD80 et CD86 par rapport à l'IFM de cellules non-stimulées. Le faible pouvoir immunostimulant de l'imiquimod peut être attribué à la faible quantité d'imiquimod introduite (100 ng par million de cellules).

Cette étude nous a donc seulement permis de conclure sur la viabilité de l'utilisation de lignées

humaines réelles pour l'évaluation du potentiel vaccinal de nouvelles formulations.

# 5.2 Cytotoxicité des NP

La viabilité cellulaire est déterminée à l'aide d'iodure de propidium, qui entre dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire pour intercaler leurs acides nucléiques (ADN ou ARN).

La viabilité des formulations précédemment étudiées pour la stimulation de DC humaines a donc été déterminée. Comme en témoigne la Figure 5.5, la viabilité de nos systèmes, en comparaison avec celle des cellules non stimulées est très satisfaisante, nous permettant d'envisager sereinement l'augmentation de la quantité d'imiquimod introduite.



FIGURE 5.5 – Influence du LPS et de nos formulations sur la viabilité cellulaire de DC humaines (48h de mise en contact). De gauche à droite : NS (non-stimulée), LPS, micelles glucosylées, micelles glucosylées/imiquimod, micelles mannosylées, micelles mannosylées/imiquimod, micelles neutres, micelles neutres/imiquimod, référence imiquimod et NP de PLA de copolymère couplé avec le peptide KKK-IL-1 $\beta$ 

# 5.3 Conclusion

Ces deux courtes études préliminaires nous ont permis de choisir les cellules dendritiques humaines, comme excellent moyen d'évaluation du potentiel vaccinal, les SRDC représentant un modèle cellulaire limité pour ce type d'étude.

Dans les conditions utilisées pour l'étude, les micelles sucrées encapsulant ou non de l'imiquimod et les NP de PLA-copolymère couplé avec le peptide KKK-IL-1 $\beta$  n'ont pas provoqué d'importantes différences de l'expression des marqueurs de surface étudiés, comparativement aux marqueurs présents à la surface de cellules non stimulées. Il est important de noter que les formulations étudiées n'induisent pas de mort

cellulaire supérieure à celles de DC non stimulées.

Un effet dose de quantité d'imiquimod est en cours de réalisation pour déterminer la quantité maximale d'imiquimod, que l'on peut administrer à ces cellules sans toutefois provoquer une mort cellulaire supérieure à celle de cellules non stimulées. En effet, concernant la quantité d'imiquimod introduite, elle est de 100 ng par million de cellules, ce qui semble relativement faible en comparaison avec les études menées dans la littérature (quantité typique de  $5\mu$ g). Des études comparant l'imiquimod libre et l'imiquimod encapsulé dans des micelles sucrées ou non seront effectuées à la quantité maximale d'imiquimod, préalablement déterminée par effet dose.

De même, la quantité maximale du peptide dérivant de l'IL-1 $\beta$  pouvant être administrée est en cours d'étude, afin de pouvoir comparer l'apport du couplage de ce ligand au peptide libre sur la stimulation de DC humaines.

# **Conclusions et Perspectives**

C E travail de thèse avait pour objectif l'élaboration de nouveaux systèmes adjuvants pour la vaccination, à base de NP et de micelles de PLA, capables d'améliorer la qualité et l'amplitude des réponses immunitaires humorales et cellulaires, afin de développer une alternative aux adjuvants non biodégradables actuellement utilisés.

Pour atteindre cet objectif, notre stratégie a consisté à fonctionnaliser la couronne et le cœur de micelles et de NP de PLA par des biomolécules d'intérêt, capables d'activer les cellules dendritiques, qui sont de réels pivots de l'immunité. Pour acquérir une fonctionnalisation de surface avec une importante densité de ligands, nous avons développé un copolymère à blocs amphiphile PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP), comprenant des unités NAS, dotées de fonctions ester activées de NS facilitant la réaction de ligands aminés et nous l'avons exploité pour l'élaboration de micelles et de NP de PLA fonctionnelles.

Avant de s'intéresser à la synthèse de ce copolymère amphiphile d'intérêt, l'homopolymérisation du NAS a été étudiée par NMP amorcée par la MAMA-SG1. La mise au point de cette polymérisation nous a permis d'élaborer des homopolymères PNAS bien définis. L'étude du taux de chaînes vivantes du PNAS nécessite toutefois quelques études supplémentaires, pour élargir l'utilisation de cet homopolymère, notamment en tant que précurseur de copolymères à blocs.

La synthèse du segment hydrophile P(NAS-*co*-NVP) a, elle aussi, été étudiée par NMP amorcée par l'alcoxyamine modèle MAMA-SG1, afin d'ajuster les conditions de copolymérisation. La NMP du NAS et de la NVP amorcée par la MAMA-SG1 nous a permis d'obtenir des copolymères présentant une structure fortement alternée, comprenant une importante fraction molaire de 54% d'unité fonctionnalisable NAS.

Enfin, les techniques de ROP du D,L-lactide et de NMP du NAS et de la NVP ont été associées avec succès pour l'élaboration de copolymères diblocs PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP). Cette combinaison a été possible grâce à l'utilisation de la stratégie du macro-amorçage avec une macro-alcoxyamine PLA-SG1, obtenue en deux étapes : ROP du D,L-lactide (amorcée par le HEA et catalysée par le Sn(Oct)<sub>2</sub>), puis addition radicalaire intermoléculaire de type 1-2 de la MAMA-SG1 sur la liaison vinylique du bout de chaînes du PLA  $\alpha$ -acrylate. Le PLA-SG1 a été utilisé pour amorcer la NMP du NAS et de la NVP, conduisant aux copolymères diblocs d'intérêt bien définis aux masses molaires modulables.

Le caractère amphiphile du copolymère dibloc PLA-b-P(NAS-co-NVP) a été attesté par la formation de micelles, d'un diamètre moyen compris entre 50 et 70 nm, présentant une distribution des tailles étroite (IP<0.1). La CMC moyenne de ce type de copolymère a été déterminée à 20 mg.L<sup>-1</sup>.

Ce copolymère a été ensuite exploité en tant que précurseur pour la formation de micelles fonctionnalisées par des sucres. Ces dernières sont élaborées aisément par simple couplage en milieu organique de la D-glucosamine et de la D-mannosamine sur le copolymère, puis purification du milieu réactionnel par dialyse, nous permettant directement d'accéder à des micelles d'une taille moyenne comprise entre 80 et 90 nm.

Une réactivité plus faible de la D-mannosamine (comparée à la D-glucosamine) a été observée pour le couplage sur le copolymère. La CMC des copolymères modifiés par des sucres (100 mg.L<sup>-1</sup>) augmente en comparaison avec la CMC du copolymère initial. L'augmentation du rapport entre la taille du bloc PLA et celle du bloc P(NAS-*co*-NVP) est une voie à explorer pour diminuer la CMC de copolymères finaux fonctionnalisés par des ligands hydrophiles.

Les micelles ainsi obtenues à partir du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) et à partir de copolymères modifiés par des sucres ont permis l'encapsulation très efficace de l'imiquimod en leur cœur, avec des taux d'encapsulation respectivement compris entre 3 et 4% et entre 6 et 14%. Il sera intéressant à l'avenir d'étudier la libération de l'imiquimod encapsulé dans différents tampons (pH 2, pH 5 et pH 7) à 37°C et à 4°C.

Le copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) a ensuite été utilisé en tant que tensioactif lors de la préparation de NP de PLA par diafiltration et par nanoprécipitation. Les NP de PLA-copolymère ainsi obtenues sont caractérisées par des stabilités colloïdales et des potentiels zêta plus élevés que pour les NP de PLA nues.

Le procédé de nanoprécipitation nous a permis d'accéder à des NP de PLA-copolymère dotées de 84% en moyenne de fonctions ester disponibles (par rapport au total théorique introduit dans la formulation) en surface pour le couplage, soit 2.4 fonctions par nm<sup>2</sup>. Toutefois, un taux d'hydrolyse des fonctions ester de NS de 30% est tout de même à déplorer suite au procédé de nanoprécipitation.

Malgré un taux d'hydrolyse relativement conséquent, l'association de la stratégie de l'ajout du copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) lors de la fabrication des NP de PLA et de la stratégie du tag lysine pour le peptide **VQGEESNDK** nous a permis d'élaborer des NP de PLA hautement fonctionnelles, dotées d'environ 400 000 molécules de peptides par  $\mu$ m<sup>2</sup> de NP, là où les stratégies de fonctionnalisation en bouts de chaînes de copolymère de type PLA-*b*-PEG permettent le couplage d'environ 200 000 peptides par  $\mu$ m<sup>2</sup>. Il sera intéressant d'étudier à présent le couplage de la D-glucosamine et de la D-mannosamine à la surface des NP.

Dans l'optique d'aboutir à des systèmes de particules multifonctionnelles, l'encapsulation de l'imiquimod au sein des NP de PLA a été étudiée. Elle s'est malheureusement révélée peu efficace avec l'utilisation de la nanoprécipitation comme technique d'élaboration de NP. Il serait donc intéressant d'envisager le développement de nanocapsules de PLA par nanoprécipitation, en espérant que l'augmentation de l'affinité de l'imiquimod pour le cœur huileux de la NP permette d'augmenter la quantité d'imiquimod encapsulée.

Les NP de PLA-copolymère fonctionnalisées en couronne par le peptide **VQGEESNDK** et les micelles mannosylées, encapsulant ou non de l'imiquimod en leur cœur ont fait l'objet de quelques études préliminaires de stimulation de cellules dendritiques. Sur les deux lignées utilisées : SRDC et cellules dendritiques humaines dérivant de monocytes extraits du sang, ces systèmes se sont révélés non cytotoxiques.

Les systèmes à base de NP de PLA-copolymère fonctionnalisées par le peptide et de micelles mannosylées, avec ou sans imiquimod dans leur cœur, se sont révélés non cytotoxiques pour une lignée immortalisée de cellules dendritiques de souris (SRDC) et pour des cellules dendritiques humaines, lors d'expériences préliminaires du potentiel de stimulation. Les résultats de stimulation de ces deux lignées présentent quelques prémices intéressantes du potentiel de ces systèmes. Cependant, plusieurs mises au point doivent être effectuées : notamment un effet dose sur les quantités d'imiquimod et de peptides pouvant être administrées sans toxicité. Une augmentation nette de la quantité de ces ligands devrait nous permettre d'augmenter la maturation des cellules dendritiques. Il serait également très intéressant de procéder à une évaluation *in vivo* de ces formulations chez la souris.

# Partie expérimentale

# Sommaire

6.1	Réa	ctifs et solvants utilisés
6.2	Ana	lyses de molécules et macromolécules organiques 150
	6.2.1	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) $\hfill \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 150$
	6.2.2	Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)
	6.2.3	Analyse élémentaire
	6.2.4	Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES)
	6.2.5	Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) $\ldots \ldots \ldots 154$
	6.2.6	UV et fluorescence $\dots \dots \dots$
6.3	Synt	thèse d'homo- et copolymères à base de NAS
	6.3.1	Synthèse du NAS
	6.3.2	NMP du NAS à partir de la MAMA-SG1 156
	6.3.3	NMP du NAS et de la NVP à partir de la MAMA-SG1 157
	6.3.4	Synthèse du copolymère à blocs PLA- $b$ -P(NAS- $co$ -NVP) 158
6.4	Prép	paration de micelles fonctionnalisées
	6.4.1	Élaboration de micelles de PLA- $b$ -P(NAS- $co$ -NVP)
	6.4.2	Élaboration de micelles à partir de copolymères modifiés par des sucres $\ . \ . \ . \ 160$
	6.4.3	Détermination de la concentration micellaire critique (CMC) $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 161$
	6.4.4	Encapsulation de l'imiquimod dans les micelles
	6.4.5	Dosage de l'imiquimod encapsulé dans les micelles par fluorescence $\dots \dots \dots \dots \dots 162$
6.5	Prép	paration de NP fonctionnalisées 162
	6.5.1	Diafiltration
	6.5.2	Nanoprécipitation
	6.5.3	Couplage covalent de peptides dérivés de l'interleukine-1 $\beta$
	6.5.4	Encapsulation de l'imiquimod dans les NP
	6.5.5	Caractérisation des NP 165
6.6	$\mathbf{\acute{E}val}$	luation biologique des NP et micelles 168

6.6.1	Études sur les SRDC	168
6.6.2	Études sur des cellules dendritiques humaines	171
6.6.3	Cytotoxicité des NP	173

# 6.1 Réactifs et solvants utilisés

Les solvants sont reçus et utilisés sans purification, sauf mention contraire. Les solvants couramment rencontrés sont le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le *n*-hexane, le méthanol, l'éther diéthylique, le DMF, le THF et l'acétone. Les réactifs, dont la liste est exposée dans le Tableau 6.1 sont aussi utilisés tels quels.

	Masse molaire	Pureté	Fournisseur
	$(g.mol^{-1})$		
<i>N</i> -Hydroxysuccinimide	115.09	98%	Sigma-Aldrich
Chlorure d'acryloyle	90.50	96%	Sigma-Aldrich
Triéthylamine	101.19	99%	Sigma-Aldrich
MAMA-SG1 (BlocBuilder <sup>®</sup> )	381.44	99%	Arkema
SG1	294.35	82 %	Arkema
1,3-Trioxane	90.08	> 99%	Sigma-Aldrich
NVP	111.14	> 99%	Sigma-Aldrich
D,L-lactide	144.13	99%	Purac Biochem
Octanoate d'étain	405.12	95%	Sigma-Aldrich
HEA	116.12	96%	Sigma-Aldrich
Éthanolamine	61.08	99%	Sigma-Aldrich
LiBr	86.85	99%	Sigma-Aldrich
TFA	114.02	> 99%	Sigma-Aldrich
D-glucosamine	215.63	> 99%	Sigma-Aldrich
D-mannosamine	215.63	> 99%	Sigma-Aldrich
D-glucose	180.16	> 99%	Sigma-Aldrich
D-mannose	180.16	> 99%	Sigma-Aldrich
Imiquimod	240.30	$>\!\!98\%$	TCI
IL-1 $\beta$ (163-171)	1005.01	> 99%	
$ ext{IL-1}eta  ext{ (163-171)} + 2  ext{ TFA}$	1233.05	> 99%	CROPS
KKK-IL-1 $\beta$ (163-171)	1389.53	> 99%	
$\text{KKK-IL-1}\beta \text{ (163-171)} + 5 \text{ TFA}$	1959.63	> 99%	CROPS

Tableau6.1– Listes des réactifs utilisés

# 6.2 Analyses de molécules et macromolécules organiques

# 6.2.1 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Toutes les analyses spectroscopiques ont été réalisées en solution dans des solvants deutérés, fournis par Eurisotop : chloroforme deutéré (CDCl<sub>3</sub>)+ 0.03% tétraméthylsilane (TMS), diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d6) et oxyde de deuterium. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont donnés en ppm. La multiplicité des signaux est indiquée par s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), t (triplet) et m (multiplet). Les analyses RMN <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P ont été conduites sur les spectromètres BRUKER Avance DPX-300 (fréquence d'enregistrement 300 MHz) ou Avance III 400 (fréquence d'enregistrement 400 MHz). Les déplacements chimiques sont donnés en fonction du pic de TMS à 0.00 ppm dans le cas de l'utilisation de CDCl<sub>3</sub> et du pic de DMSO à 2.51 ppm.

Les analyses RMN <sup>13</sup>C du solide par polarisation croisée à l'angle de rotation magique (CPMAS) ont été réalisées par Fabio Ziarelli du Spectropole (Université d'Aix-Marseille). Elles ont été conduites sur le spectromètre Bruker Avance III 400 MHz à une fréquence de résonance de 100.7 MHz par utilisation de la double sonde commerciale Bruker. 50 mg de l'échantillon sont placés dans un rotor en dioxyde de zirconium de 4 mm de diamètre et mis en rotation à la vitesse de l'angle magique de 10 kHz.

# 6.2.2 Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)

Les analyses RPE des molécules paramagnétiques ont été réalisées sur un spectromètre BRUKER ESP 300. La macro-alcoxyamine PNAS-SG1 ou PLA-SG1 à analyser est solubilisée dans le DMF pour le PNAS-SG1 ou dans le *tert*-butylbenzène pour le PLA-SG, puis diluée afin d'obtenir une concentration de 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>. La solution de PNAS-SG1 dans le DMF est introduite dans un capillaire. 500  $\mu$ L de la solution de PLA-SG1 dans le *tert*-butylbenzène sont introduits dans un tube en verre de 5 mm de diamètre interne. Le spectre de l'échantillon (blanc) est effectué, le tube est ensuite chauffé à 120°C pendant 2 heures. La solution est refroidie jusqu'à température ambiante, une spectre RPE est à nouveau effectué.

À cette température, la liaison NO-C de la macro-alcoxyamine subit une rupture homolytique, libérant un macro-radical PNAS<sup>•</sup>/PLA<sup>•</sup> et le nitroxyde SG1. L'oxygène dissous dans le *tert*-butylbenzène pour le PLA<sup>•</sup> ou dans le DMF pour le PNAS<sup>•</sup> agit comme piège à radicaux en se recombinant avec les radicaux PNAS<sup>•</sup>/PLA<sup>•</sup>. Ces radicaux étant incapables de recombiner avec le SG1, ce dernier reste libre dans la solution.

Le spectre de la solution de polymères, revenue à température ambiante, est de nouveau enregistré (spectre après chauffage) et comparé avec celui d'une solution de SG1 libre également à 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> (spectre standard externe). Par conséquent, le taux de chaînes vivantes du polymère est déterminé par l'équation 6.1 :

## 6.2.3 Analyse élémentaire

Les analyses ont été réalisées par Grégory Excoffier du Spectropole (Université d'Aix-Marseille) sur un analyseur Thermo Finnigan EA 1112, équipé d'un passeur automatique de 32 échantillons. Le système est géré par le logiciel Eager 300. Les éléments dosés sont C,H, et N. La combustion des échantillons est réalisée sous courant d'oxygène et les composés formés (N0<sub>2</sub>, C0<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, S0<sub>2</sub>) sont ensuite analysés par chromatographie. Les appareils utilisés ne permettent pas l'analyse de composés comportant des atomes de fluor. Les résultats sont fournis avec une précision absolue de  $\pm$  0,2 %.

# 6.2.4 Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES)

Les polymères et copolymères à base de NAS (PNAS, P(NAS-co-NVP) et PLA-b-P(NAS-co-NVP)) sont analysés par CES dont l'éluant est le DMF LiBr, en raison de leur insolubilité dans le THF. Les polymères PLA  $\alpha$ -acrylate et la macro-alcoxyamine PLA-SG1 sont analysés à la fois par CES dans le THF et par CES dans le DMF LiBr.

#### CES dans le DMF

Le système de CES DMF est composé d'une pompe Waters 600 délivrant un débit de 0.7 mL.min<sup>-1</sup>, d'un injecteur automatique Waters 717 plus prélevant 20  $\mu$ L d'échantillon, d'un détecteur réfractométrique différentiel (RI) 2414. Le système de colonnes est composé de deux colonnes Polymer Laboratories RésiPore (600 x 7.5 mm) en série, précédées d'une pré-colonne (PL Resipore Guard Column), thermostatées à 70 °C par un four. Le LiBr est ajouté au DMF afin d'obtenir une concentration de 0.01M; l'éluant est filtré sur des membranes en nylon de porosité 0.22  $\mu$ m (Millipore Millex GN). L'ajout de LiBr a été envisagé lorsque sont apparus de petits pics parasites aux hautes masses. Aucun changement dans les temps d'élution n'est à constater. Il permettrait d'éviter la formation d'agrégats. Le logiciel d'acquisition des chromatogrammes est Millenium version 3.20 (Waters). Les chromatogrammes sont analysés et traités par le logiciel PSS WinGPC Unity (PSS Laboratories).

L'échantillon à analyser est solubilisé dans le DMF LiBr à une concentration de 0.5 % wt. La solution est ensuite filtrée sur un filtre seringue en nylon de porosité 0.22  $\mu$ m (Millipore Millex GN). Les échantillons obtenus lors de synthèses effectuées dans le PC sont d'abord précipités dans l'éther diéthylique, le surnageant est prélevé puis l'échantillon est mis à sécher sous hôte une nuit pour être solubilisé dans le DMF LiBR.

#### Étalonnage du système CES DMF LiBr

En l'absence de connaissance des coefficients de Mark-Houwink pour le PNAS et le P(NAS-co-NVP), plusieurs courbes d'étalonnage ont été testées pour la détermination des masses molaires relatives de polymères analysées par CES DMF LiBr. Les standards les plus appropriés et les plus communément utilisés en CES DMF sont des standards de PMMA, PS et PEG. Les polymères isomoléculaires fournis par Polymer Laboratories sont exposés dans le Tableau 6.2.

Std PEC	$M_p$	22450	11840	6 450	4020	1900	1080	620	400	194	106
$I_p$	1.03	1.04	1.02	1.02	1.03	1.04	1.05	1.05	1	1	
Std PS	$M_p$	377400	96000	19720	4490	1180	188700	46500	9920	2360	580
	$I_p$	1.03	1.03	1.03	1.04	1.06	1.02	1.03	1.02	1.02	1.04
Std PMMA	$M_p$	51800	35100	20050	10290	7100	3790	2810	1850		
Stu I MIMA	$I_p$	1.02	1.02	1.03	1.03	1.08	1.08	1.08	1.08		

Tableau 6.2 – Masses au pic  $(M_p \text{ en g.mol}^{-1})$  et  $I_p$  des standards polymères utilisés en CES DMF LiBr

#### CES dans le THF

Le système est composé d'une pompe Water 515 HPLC délivrant un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>, d'un injecteur automatique Waters 517 plus, prélevant 20  $\mu$ L d'échantillon, d'un détecteur réfractométrique différentiel (RI) Waters 2414. Le système de colonnes utilisé est composé des colonnes (Macherey Nagel Nucleogel) 104-5 (300 x 7.7 mm) et 103-5 (300 x 7.7 mm) en série, précédées d'une pré-colonne Macherey Nagel Nucleogel 5P (50 x 7.7 mm), thermostatées à 30°C par un four. Le logiciel d'acquisition des chromatogrammes est Millenium version 3.20 (Waters). Les chromatogrammes sont analysés et traités par le logiciel PSS WinGPC Unity (PSS Laboratories).

L'échantillon à analyser est solubilisé dans le THF à une concentration de 0.5 % wt. La solution est ensuite filtrée sur un filtre seringue Alltech en PTFE de porosité 0.2  $\mu$ m.

#### Étalonnage du système CES THF

Une calibration est effectuée à partir de standards PS anioniques isomoléculaires de différentes masses. Les standards contenus dans le kit kit EasyCal (Polymer Laboratories) sont dissous pendant 30 min dans le THF. Les masses molaires de ces standards sont reportées dans le Tableau 6.3.

Les  $M_n$  absolues des échantillons PLA, PLA  $\alpha$ -acrylate et de la macro-alcoxyamine PLA-SG1 sont déterminées en utilisant une calibration universelle *via* les coefficients de Mark-Houwink du Tableau 6.4.

Std DS A	$M_p$	377400	96000	19720	4490	1180
Stu PS A	$I_p$	1.03	1.03	1.03	1.04	1.06
Std DS B	$M_p$	188700	46500	9920	2360	580
SIGPSD	$I_p$	1.02	1.03	1.02	1.02	1.04

Tableau 6.3 –  $M_p$  et  $I_p$  des standards polymères utilisés en CES THF

Polymère	K (mL.g $^{-1}$ )	$\alpha$
PS	$1.14 \ge 10^{-2}$	0.716
PLA	$5.51 \ge 10^{-2}$	0.639

Tableau 6.4 – Paramètres de Mark-Houwink du PS et du PLA dans le THF à 30 $^\circ\mathrm{C}$ 

Les  $M_n$  déterminées à l'aide d'une calibration universelle peuvent être comparées à celles obtenues à partir d'une calibration relative en équivalent PS corrigée par un coefficient correcteur proposé par Save *et coll.*<sup>309</sup> suivant l'équation :

$$\overline{M_n}_{Exp} = 0.58 \pm 0.05 \cdot \overline{M_n}_{Calibration PS}$$
(6.2)

## 6.2.5 Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC)

L'étude de l'hydrolyse des fonctions ester de NS et du couplage des peptides a été effectuée par HPLC sur 20  $\mu$ L d'échantillon. L'appareil HPLC fourni par Agilent (modèle 1 100) comprend une colonne Jupiler (Phenomenex, C18, 5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm). L'analyse a été effectuée en faisant un gradient linéaire (éluant A : 0.1% de TFA dans l'eau (v/v), éluant B : 70% ACN et 30% d'eau à 0.09% de TFA, de 0 à 40% de B en 15 min, puis retour à 0% de B en 2 min). Le débit utilisé est de 0.8 mL.min<sup>-1</sup>. La NHS est détectée à 6.4 min, le peptide non-taggé à 12.69 min et le peptide taggé à 13.56 à une longueur d'onde de 215 nm.

Le dosage de l'imiquimod contenu dans le surnageant des dispersions de NP de PLA-imiquimod a été effectué par HPLC sur  $20\mu$ L d'échantillon. L'appareil HPLC fourni par Agilent (modèle 1 100) comprend une colonne Merck (LiChroCART, rpC18, 5  $\mu$ m, 125 x 4 mm). L'analyse a été effectuée dans un éluant composé de 62.95% d'eau et 37.05% d'ACN en présence de 0.09% de TFA. Le débit utilisé est de 0.8 mL.min<sup>-1</sup>. L'imiquimod est détectée à 244 nm à un temps de rétention de 2.8 min. Une courbe de calibration reliant la concentration en imiquimod à l'air du pic d'imiquimod contenu à 2.8 min et à 244 nm est établie à partir de solutions d'imiquimod solubilisé dans un mélange eau/ACN (4/6 (v/v) en présence de 0.1% de TFA.

## 6.2.6 UV et fluorescence

Les analyses d'UV et de fluorescence sont effectuées sur le lecteur de microplaque Infinite M1000 (Tecan), qui permet d'obtenir des spectres d'absorbance, d'excitation et d'émission de fluorescence. Les plaques utilisées pour les spectres d'absorbance UV sont des microplaques 96 puits transparentes aux UV, UV star (Greiner) et celles utilisées en fluorimétrie sont des microplaques noires 96 puits (Nunc). Le volume de travail est de 200  $\mu$ L. Le logiciel d'acquisition des données est Tecan i-control (version 1.5.14.0.). L'utilisation de ce spectromètre concerne le dosage des anions NHS, de l'imiquimod et du Nile Red.

Le lecteur de plaque pour les dosages ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) de cytokines est le modèle 680 microplate reader (Biorad).

# 6.3 Synthèse d'homo- et copolymères à base de NAS

# 6.3.1 Synthèse du NAS



FIGURE 6.6 – Schéma de synthèse du N-acryloxysuccinimide

Le NAS est synthétisé selon la méthode de Pollak *et coll.*,<sup>137</sup> reprise par Fukukawa *et coll.*<sup>266</sup> suivant le schéma réactionnel 6.6.

En résumé, dans un tricol, surmonté d'un réfrigérant et d'une ampoule à brome, le N-hydroxysuccinimide (11.1 g, 96 mmol, 1 éq), la triéthyle amine (15 mL, 0.106 mol, 1.1 éq) et le chloroforme (150 mL) sont introduits. Le tricol est placé dans un bain salé et glacé maintenu à 0°C sous atmosphère inerte d'argon. Un mélange de chloroforme (20 mL) et de chlorure d'acryloyle (9 mL, 106 mmol, 1.1 éq) est placé dans l'ampoule à brome. Cette solution est ajoutée goutte à goutte pendant 30 min. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique à 0°C pendant 3h. Le milieu réactionnel est extrait avec 3 x 50 mL d'eau froide saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis filtrée sur papier filtre. Le milieu est concentré sous vide dans un bain à 35°C jusqu'à obtenir un volume résiduel de 30 mL. Un mélange de 40 mL de *n*-hexane et 6 mL d'acétate d'éthyle est additionné goutte à goutte à la phase organique contenant le NAS sous forte agitation à 0°C. Un précipité blanc apparaît alors. La solution est placée au congélateur (-18°C) pendant une nuit. Le précipité est filtré sur fritté, lavé avec 100 mL d'un mélange de *n*-hexane et d'acétate d'éthyle (4 :1), puis avec 100 mL de *n*-hexane et d'acétate d'éthyle (9 :1) et enfin avec 200 mL de *n*-hexane, les mélanges de solvants étant placés au préalable à -18°C. Le solide obtenu est alors séché sous vide à température ambiante. Le rendement est de 74%, avec une pureté supérieure à 99%.

 $\begin{aligned} &\text{RMN }^{1}\text{H, CDCl}_{3}: 6.74\text{-}6.68 \text{ (dd, 1H, } J \ gem, 1-2=1.03 \text{ Hz}, \ J_{trans, 2-3}=17.2 \text{ Hz}, \text{ H}_{2}), \ 6.38\text{-}6.29 \text{ (dd, } 1\text{H, } J_{cis, 1-2}=10.67 \text{ Hz}, \ J_{trans, 2-3}=17.2 \text{ Hz}, \text{ H}_{3}), \ 6.20\text{-}6.16 \text{ (dd, 1H, } J \ gem, 1-2=1.03 \text{ Hz}, \ J_{trans, 2-3}=17.2 \text{ Hz}, \text{ H}_{2}), \ 6.38\text{-}6.29 \text{ (dd, } 1\text{H, } J_{cis, 1-2}=1.03 \text{ Hz}, \ J_{trans, 2-3}=17.2 \text{ Hz}, \text{ H}_{3}), \ 6.20\text{-}6.16 \text{ (dd, 1H, } J \ gem, 1-2=1.03 \text{ Hz}, \ J_{trans, 2-3}=17.2 \text{ Hz}, \text{ H}_{1}), \ 2.87 \text{ (s, 4H, H}_{4}). \end{aligned}$ 

Analyse élémentaire - *Expérimentale* : C : 49.79; H : 4.23; N : 8.30 - *Théorique* : C : 49.71, H : 4.17, N : 8.28.

# 6.3.2 NMP du NAS à partir de la MAMA-SG1



FIGURE 6.7 – NMP du NAS et de la NVP à partir de la MAMA-SG1

La masse molaire théorique visée est de 10 000 g.mol<sup>-1</sup>, soit un DP de 60. Dans un tricol surmonté d'un réfrigérant, sont introduits le monomère NAS (1g, 5.9 mmol, 60 éq), la MAMA-SG1 (37.9 mg, 0.099 mmol, 1 éq), le trioxane (30mg) et le DMF (25% massique de NAS dans le DMF, 3 g) et 100  $\mu$ L d'une solution de SG1 dans le DMF dont la concentration varie selon le ratio molaire en SG1 libre souhaité (0, 2.5, 5 et 7.5 %). Le trioxane est utilisé en tant que référence interne pour suivre la conversion en monomères. Le milieu réactionnel est dégazé par barbotage à l'argon pendant 20 min, puis une rampe de température est effectuée jusqu'à atteindre des températures de 100°C, 110°C ou 120°C, selon la température de polymérisation désirée, dans le bain d'huile. Le temps  $t_0$  marquant le début de la polymérisation est choisi lorsque le bain d'huile atteint la température de 35°C (température de clivage de l'alcoxyamine MAMA-SG1).

Au cours de la polymérisation, 300  $\mu$ L de milieu réactionnel sont prélevés à différents temps, refroidis et stockés à 4°C, afin de suivre par RMN <sup>1</sup>H (60 $\mu$ L dans 500  $\mu$ L de DMSO-*d6*) la conversion en monomère (déterminée en prenant pour référence le trioxane) au cours du temps ainsi que l'évolution des masses molaires au cours de la conversion par CES dans le DMF LiBr. En fin de réaction, le milieu réactionnel est
placé dans un bain d'eau glacé afin de stopper la polymérisation. Le polymère est précipité dans l'éther diéthylique et séché sous vide poussé.

#### 6.3.3 NMP du NAS et de la NVP à partir de la MAMA-SG1



FIGURE 6.8 – NMP du NAS et de la NVP à partir de la MAMA-SG1

Différentes masses molaires ont été visées : 10 000, 20 000 et 40 000 g.mol<sup>-1</sup> pour une même fraction molaire initiale de NAS de 60%.

À titre d'exemple, pour une masse molaire visée de 20 000 g.mol<sup>-1</sup> avec un ratio molaire initial de 60% mol de NAS et de 40% mol de NVP, le NAS (1.02 g, 6.01 mmol, 81 éq), la NVP (448 mg, 3.99 mmol, 54 éq), la MAMA-SG1 (28.5 mg, 74  $\mu$ mol, 1 éq) et la trioxane (30 mg) sont placés dans un tricol, surmonté d'un réfrigérant. 10 mL de DMF sont ajoutés afin d'obtenir une concentration totale en monomères de 1M. Le SG1 (1.33 mg, 3.71  $\mu$ mol, 0.05 éq) préalablement dissous dans du DMF est ajouté. Le milieu réactionnel est dégazé à l'argon pendant 20 min, puis une rampe de température est effectuée jusqu'à atteindre des températures de 100°C dans le bain d'huile. Le temps  $t_0$  marquant le début de la polymérisation est choisi quand le bain d'huile atteint la température de 35°C (température de clivage de l'alcoxyamine MAMA-SG1).

Au cours de la polymérisation, 300  $\mu$ L de milieu réactionnel sont prélevés afin de suivre par RMN <sup>1</sup>H (60 $\mu$ L dans 500  $\mu$ L de DMSO-d6) la conversion en monomères au cours du temps ainsi que l'évolution des masses molaires au cours de la conversion par CES dans le DMF LiBr. En fin de réaction, le milieu réactionnel est placé dans un bain d'eau glacé afin de stopper la polymérisation. Le polymère est précipité dans l'éther diéthylique et séché sous vide poussé.

Pour l'étude des rapports de réactivité, plusieurs copolymérisations ont été effectuées en partant de différents ratios molaires initiaux en NAS et NVP afin de déterminer les rapports de réactivité, en maintenant un DP total constant de 300, soit une concentration totale en monomères de 1M et une concentration initiale en amorceur de 3.35 mmol.L<sup>-1</sup>.

# 6.3.4 Synthèse du copolymère à blocs PLA-b-P(NAS-co-NVP)

#### 6.3.4.1 Synthèse du PLA α-acrylate : ROP du D,L-lactide



FIGURE 6.9 – ROP du D,L-lactide, amorcée par le HEA et catalysée par le  $Sn(Oct)_2$ 

La polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide a été effectuée en présence d'octanoate d'étain  $(Sn(Oct)_2)$  en tant que catalyseur et de l'acrylate de 2-hydroxyethyle (HEA) en tant qu'amorceur. Les polymérisations ont été conduites en masse. La masse molaire théorique visée est calculée à partir du rapport  $DP_n = n_{Lactide}/n_{HEA}$ .

Expérimentalement pour une masse molaire visée de 15 000 g.mol<sup>-1</sup>, le D,L-lactide (20 g, 137 mmol, 98 éq) est ajouté dans un schlenk parfaitement propre et séché. Le D,L-lactide est alors séché sous vide poussé pendant 4h à 40°C. Un mélange de  $Sn(Oct)_2$  (29.5 mg, 0.0692 mmol, 0.05 éq) et de HEA (168.5 mg, 1.41 mmol, 1 éq) est préparé dans un tube à hémolyse, sur lequel trois cycles argon-vide sont effectués. Dans ce mélange, 1 mL de toluène distillé est ajouté avec une seringue purgée à l'argon. Le D,L-lactide est alors mis sous flux d'argon et plongé dans un bain thermostaté préalablement chauffé à 135°C. Une fois le lactide en fusion, la solution d'amorceur et de catalyseur est ajoutée. La réaction est laissée réagir jusqu'à ce que le milieu commence à peine à se figer. Un prélèvement du milieu réactionnel est effectué en fin de polymérisation pour être solubilisé dans du CDCl<sub>3</sub> afin de déterminer la conversion de polymérisation suivant l'équation 6.3. Après avoir normé à 1 la valeur de l'intégrale du signal des protons -CH- du monomère compris entre 5.07 et 5.12 ppm, la valeur de l'intégrale du signal des protons -CH- du polymère compris entre 5.12 et 5.24 pm est déterminée. Le milieu de polymérisation est dissous dans du THF une nuit, puis précipité trois fois dans du méthanol froid. Le polymère obtenu est alors filtré et rincé au méthanol froid, puis séché sous vide poussé à température ambiante.

$$Conversion = \frac{\int Polym \grave{e}re}{\int Polym \grave{e}re + \int Monom \grave{e}re}$$
(6.3)

# 6.3.4.2 Synthèse du PLA-SG1 : Addition intermoléculaire radicalaire de type 1-2 de la MAMA-SG1 sur le PLA $\alpha$ -acrylate



FIGURE 6.10 – Addition intermoléculaire radicalaire de type 1-2 de la MAMA-SG1 sur la liaison vinylique en bout de chaîne du PLA  $\alpha$ -acrylate

La synthèse de la macro-alcoxyamine PLA-SG1 s'appuie sur l'addition radicalaire intermoléculaire de type 1,2 de l'alcoxyamine MAMA-SG1 sur l'extrémité acrylate du PLA, présentée dans la Figure 6.10.

Dans un schlenk muni d'un rotaflo, une solution de PLA  $\alpha$ -acrylate (10 g, 0.8 mmol, 1 éq) et de MAMA-SG1 (3.09 g, 8 mmol, 10 éq) dans le THF (0.2 M de MAMA-SG1) est introduite. Le milieu réactionnel est homogénéisé par agitation magnétique jusqu'à dissolution complète de tous les réactifs, puis dégazé par barbotage d'argon pendant 15 min. Le schlenk est introduit dans un bain thermostaté préalablement chauffé à 100°C. La réaction est conduite pendant 1h sous pression d'argon. Après refroidissement de la solution, une huile jaune et visqueuse est obtenue. Cette huile est reprise dans le THF puis précipitée trois fois dans du méthanol froid. Le précipité obtenu est alors filtré et rincé au méthanol froid, puis séché sous vide poussé à température ambiante pour obtenir une poudre blanche (une coloration jaunâtre persistante est signe de présence de SG1 résiduel). Le rendement molaire de la réaction est proche de 90 %. Le rendement de fonctionnalisation des fonctions acrylates en SG1 est déterminé par RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>31</sup>P et RPE.

#### 6.3.4.3 NMP du NAS et de la NVP à partir du PLA-SG1



FIGURE 6.11 – NMP du NAS et de la NVP à partir de la macro-alcoxyamine PLA-SG1

Concrètement, pour une masse molaire visée de 10 000 g.mol<sup>-1</sup> avec une fraction molaire initiale de 54% mol de NAS et de 46% mol de NVP, le NAS (1.02 g, 6.01 mmol, 41 éq), la NVP (575 mg, 5.13 mmol, 33 éq) et le PLA-SG1 (3 g, 159  $\mu$ mol, 1 éq) sont ajoutés dans un tricol surmonté d'un réfrigérant. 12 mL de DMF sont ajoutés afin d'obtenir une concentration totale en monomères égale à 1M. Le SG1 (2.75 mg,

7.94  $\mu$ mol, 0.05 éq) préalablement dissous dans du DMF est ajouté. Le milieu réactionnel est dégazé à l'argon pendant 20 min, puis une rampe de température est effectuée jusqu'à atteindre une température de 120°C, température de dissociation du PLA-SG1, dans le bain d'huile.

Au cours de la polymérisation, 300  $\mu$ L de milieu réactionnel sont prélevés afin de suivre par RMN <sup>1</sup>H la conversion des monomères au cours du temps ainsi que l'évolution des masses molaires au cours de la conversion par CES dans le DMF LiBr. En fin de réaction, le milieu réactionnel est placé dans un bain d'eau glacé afin de stopper la polymérisation. Le polymère est précipité trois fois dans un mélange 1 :1 v :v de méthanol et d'éther diéthylique et séché sous vide poussé.

Pour déterminer la masse molaire du bloc P(NAS-*co*-NVP), l'intégrale relative aux signaux des protons -CH- du PLA situés entre 5.0 et 5.3 ppm est fixée à deux fois la valeur du DP du bloc de PLA, préalablement déterminée par CES THF à l'aide d'une calibration universelle. L'intégrale du pic correspondant aux signaux des protons -CH<sub>2</sub>- (4H) du résidu NS du NAS,  $I_{2.8}$  est déterminée à 2.8 ppm. Les fractions molaires de NAS (x) et de NVP (y) incorporées dans le copolymère sont ajustées à l'aide de leurs conversions déterminées par RMN <sup>1</sup>H. La masse molaire du bloc P(NAS-*co*-NVP) est déterminée suivant l'équation (6.4) :

$$M_n = \frac{I_{2.8}}{4} \left( 169 + \frac{y}{x} 111 \right) \tag{6.4}$$

# 6.4 Préparation de micelles fonctionnalisées

# 6.4.1 Élaboration de micelles de PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP)

Le copolymère à blocs PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) est solubilisé dans l'ACN (5 mL) à 10 mg.mL<sup>-1</sup>. La phase organique copolymère/ACN est précipitée dans 10 mL d'eau stérile. L'ACN est éliminé sous pression réduite.

#### 6.4.2 Élaboration de micelles à partir de copolymères modifiés par des sucres

#### 6.4.2.1 Couplage de sucre sur le PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP)

Une solution de TEA (114  $\mu$ L, 10 éq) dans le DMSO est préparée et sera utilisée comme solvant de réaction. Le copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) préalablement synthétisé (Copo2, 50 mg, 1 éq de fonctions ester de NS) et le sucre, D-mannosamine ou D-glucosamine (88.8 mg, 5 éq), sont mis à solubiliser séparément dans 2.5 mL de TEA-DMSO sous agitation magnétique. Lorsque les deux phases organiques sont homogènes, la phase de polymère TEA-DMSO est alors prélevée et ajoutée à celle du sucre TEA-DMSO. Les phases sont préparées séparément afin de s'assurer de la bonne solubilisation des deux réactifs, sachant que le sucre est moins facilement solubilisé dans le DMSO que dans l'eau par exemple. La concentration finale en copolymère dans le TEA-DMSO est de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique pour réaction pendant 4 jours à température ambiante.

#### 6.4.2.2 Élaboration de micelles fonctionnalisées par un sucre

Le milieu réactionnel est préalablement précipité dans deux volumes d'eau soit 10 mL d'eau, puis mis à dialyser contre l'eau (c.o. membrane de dialyse : 3 500 MW, SpectraPor). L'eau est renouvelée toutes les heures pendant 6 heures, puis est laissée une nuit, pour être à nouveau renouvelée pendant une heure.

Les micelles obtenues sont analysées en taille. Une partie de la solution de micelles est lyophilisée pour effectuer une RMN <sup>1</sup>H du copolymère modifié par un sucre dans le DMSO-*d6*. Lorsque les fonctions ester de NS sont aminolysées par l'éthanolamine, 851  $\mu$ L d'une solution d'éthanolamine (5.9 mg.mL<sup>-1</sup>) dans le DMSO est ajoutée dans le milieu réactionnel, le milieu est laissé une nuit pour réaction, puis précipité et dialysé comme précédemment.

Le taux de couplage est déterminé en fixant l'intégrale du pic relatif aux signaux -CH- du PLA, compris entre 5.0 et 5.3 ppm puis en comparant l'intégrale des pics relatifs aux quatre fonctions hydroxyle (4H) des sucres, compris entre 6.2 et 7.9 ppm ( $I_{6.2-7.9}$ ) avec l'intégrale du pic du signal relatif aux -CH<sub>2</sub>-(4H) du résidu NS du NAS avant couplage ( $I_{2.8,t=0}$ ). Pour une fonction ester substituée par un sucre, il doit y avoir la disparition de 4H à 2.8 ppm pour l'apparition de 4H de sucres entre 6.2 et 7.9 ppm. Ainsi, le taux de couplage est obtenu par le rapport  $I_{6.2-7.9}/I_{2.8,t=0}$ .

# 6.4.3 Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)

Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec l'utilisation de Nile Red pour déterminer la CMC. Différentes dilutions sont effectuées à partir de la solution mère de micelles, entre 1 et 0.0001 mg.mL<sup>-1</sup>. Une solution de Nile Red dans l'acétone est préparée à 0.97 mg.mL<sup>-1</sup>. 2  $\mu$ L de cette solution sont ajoutés à 200  $\mu$ L de solution micellaire disposée dans une plaque noire 96 puits (Nunc). L'acétone est mis à évaporer. Le spectre d'émission est enregistré entre 560 et 750 nm en utilisant une  $\lambda_{ex}$ =550nm. La CMC est alors déterminée au point d'inflexion de la courbe représentant l'intensité de fluorescence (I<sub>fluo</sub>) en fonction de la concentration et plus précisément au point d'inflexion de la courbe relative à la longueur d'onde obtenue au maximum d'intensité de fluorescence  $(\lambda_{\acute{em},max})$  en fonction de la concentration en polymère.

# 6.4.4 Encapsulation de l'imiquimod dans les micelles

Les micelles sont diluées à 4 mg.mL<sup>-1</sup> pour les micelles de copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) et à 1 mg.mL<sup>-1</sup> pour les micelles de copolymère modifié par un sucre. La solution de micelles est mise en présence de 10% massique d'imiquimod par rapport au copolymère dans un Eppendorf sur roue pendant 24h.

#### 6.4.5 Dosage de l'iniquimod encapsulé dans les micelles par fluorescence

Pour le dosage de l'iniquimod encapsulé dans les micelles, les micelles sont centrifugées à 1 377 g, pendant 10 min. 10  $\mu$ L du surnageant de la solution micellaire sont ajoutés à 190  $\mu$ L de DMSO.

Pour quantifier l'imiquimod contenu dans les micelles, une courbe de calibration est effectuée dans les mêmes conditions. Une solution mère en imiquimod est préparée dans un mélange de DMSO/eau (19/1, v/v) (500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), différentes dilutions sont alors effectuées dans un mélange de DMSO/eau (19/1, v/v) pour tracer la droite de calibration reliant la concentration en imiquimod à l'intensité de fluorescence émise à 350 nm pour une excitation effectuée à 325 nm.

Toutes les analyses sont conduites à l'aide de 200  $\mu$ L d'échantillon déposé dans une plaque 96 puits noire (Nunc). L'échantillon est excité à 325 nm et l'intensité de fluorescence est récupérée à 350 nm.

# 6.5 Préparation de NP fonctionnalisées

Pour toutes les NP de PLA et de PLA-copolymère élaborées, le poly(acide lactique) ( $M_n = 50\ 000$ g.mol<sup>-1</sup>,  $M_n/M_w = 1.7$ ) doté d'un acide carboxylique en bouts de chaînes est fourni par Phusis.

#### 6.5.1 Diafiltration

Des particules submicroniques de PLA ont été préparées par méthode de dialyse, précédemment décrite par Jeon *et coll.*,<sup>302</sup> reprise par Ataman-Önal *et coll.*<sup>119</sup>

Concrètement 400 mg de PLA ou 400 mg de PLA avec x mg (20, 40 ou 80 mg) de copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) sont dissous dans 20 mL de DMSO. La solution obtenue est introduite dans une membrane de dialyse ayant un c.o. entre 6 000 et 8 000 g.mol<sup>-1</sup>. La solution est dialysée contre 5 L d'eau distillée pendant 6h à température ambiante. Le bain de dialyse est changée toutes les deux heures pendant les six premières heures puis la dialyse est laissée une nuit. L'eau de dialyse est renouvelée une nouvelle fois le jour suivant. Après une heure de dialyse, les particules sont collectées de la membrane de dialyse dans des vials de 60mL. Une partie des particules obtenues est mise à l'étuve une nuit à 100°C pour obtenir un taux de solide (TS). Une partie des particules est centrifugée à 10 000 rpm (Eppendorf, 5408R) pour que la NHS contenue dans le surnageant puisse être dosée, comme expliqué plus loin. Les particules sont stockées à 4°C.

## 6.5.2 Nanoprécipitation

Des nanoparticules de PLA ont été préparées par la méthode de déplacement de solvant appelée nanoprécipitation décrite par Fessi *et coll.*,<sup>299</sup> reprise par Lamalle-Bernard *et coll.*<sup>103</sup>

Brièvement, 1.1 g de PLA sont dissous dans 55 mL d'acétone. Dans le cas de nanoprécipitation en présence du copolymère amphiphile PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP), 1.1 g de PLA sont dissous dans 55 mL d'acétone et 110 mg de PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) sont dissous dans de l'ACN (5.5 mL) (concentration de 20 g.mL<sup>-1</sup> chacun), pour avoir 10% massique de copolymère ajouté par rapport au PLA. Les solutions d'acétone-PLA et d'ACN-copolymère sont mélangées et homogénéisées quelques instants. La solution organique de polymères est introduite dans une ampoule de coulée puis est additionnée avec un flux continu à 35 mL d'eau stérile Versol sous agitation modérée (250 rpm). Une fois la suspension de particules obtenue, l'acétone est éliminée du milieu par évaporation sous pression réduite dans un bain de 30°C jusqu'à obtenir un volume résiduel d'environ 35 mL. Une partie des NP est centrifugée à 16 873 g pour en étudier le taux d'hydrolyse.

La diminution d'échelle de production des NP est effectuée en divisant tous les volumes par dix et la vitesse d'agitation est augmentée à 400 rpm. La solution de polymère à couler est introduite dans une seringue de 5 mL ou dans une ampoule de coulée. Elle peut être effectuée en divisant par deux tous les volumes (27.5 mL de PLA-acétone, 17.5 mL d'eau), l'agitation est maintenue à 250 rpm.

Les particules sont stockées à 4°C.

#### 6.5.3 Couplage covalent de peptides dérivés de l'interleukine- $1\beta$

#### 6.5.3.1 Couplage de peptides sur des NP de PLA-copolymère

La dispersion de NP est diluée dans de l'eau stérile pour avoir un TS de 1%. Une solution de peptide en tampon phosphate pH8 20 mM est préparée à la concentration souhaitée. Un volume (200  $\mu$ L) de dispersion de particules à 1% est ajouté à un volume (200  $\mu$ L) de la solution de peptide dans un Eppendorf de 2mL. L'Eppendorf est mis sur roue pour homogénéisation et réaction. À l'instant t, la dispersion est centrifugée à 16 873 g pendant 10 min. Le surnageant est prélevé et conservé à 4°C pour le dosage du peptide non couplé par HPLC.

#### 6.5.3.2 Couplage de peptides sur des NP de PLA nues

Pour le couplage covalent de l'IL-1 $\beta$  sur des NP de PLA nues, le même mode opératoire est typiquement suivi, excepté que 7  $\mu$ L d'une solution d'EDC diluée 100 fois dans de l'eau et 4.7  $\mu$ L d'une solution de NHS à 7.9 mg.mL<sup>-1</sup> dans l'eau sont préalablement ajoutés à la dispersion de NP pour activer les fonctions carboxyliques. Le couplage est réalisé à pH 8 et également à pH 6.

#### 6.5.4 Encapsulation de l'imiquimod dans les NP

#### 6.5.4.1 Nanoprécipitation en présence d'imiquimod

Le PLA est dissous dans le DMSO à une concentration de 20 mg.mL<sup>-1</sup>, sous agitation magnétique (500 rpm) pendant 30 min. Une masse précise d'imiquimod est pesée pour correspondre à 5, 2.5 et 1% de la masse de PLA, soit 27.5, 13.9 et 6.0 mg. 27.5 mL de PLA sont ajoutés à l'imiquimod pesé. Le tout est mis à solubiliser à 37°C pendant 30 min. La solution obtenue est ramenée à température ambiante puis précipitée dans 17.5 mL d'eau. Un milieu opalescent et une réaction exothermique sont à constater. La phase obtenue est dialysée contre l'eau suivant le protocole de renouvellement d'eau de la diafiltration. Les NP obtenues sont filtrées sur filtre Nylon (0.22  $\mu$ m, Millipore) pour enlever l'imiquimod non encapsulé et non solubilisé dans la phase aqueuse. Un certain volume de NP est centrifugé à 16 873 g, le surnageant est prélevé pour analyse de l'imiquimod dans le surnageant par HPLC et le culot de NP est lyophilisé pour l'analyse de l'imiquimod encapsulée dans les NP par mesure de fluorescence.

#### 6.5.4.2 Dosage de l'imiquimod dans le surnageant des NP par HPLC

Le surnageant prélevé après filtration et centrifugation des particules est directement injecté en HPLC (20  $\mu$ L), comme décrit précédemment.

#### 6.5.4.3 Dosage par fluorescence de l'imiquimod encapsulé dans les NP

Pour le dosage de l'imiquimod encapsulé dans les NP, une solution mère d'imiquimod dans le DMSO  $(500 \ \mu \text{g.mL}^{-1})$  est préparée à partir de laquelle sont élaborée différentes solutions dont la concentration varie entre 0 et 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> dans une plaque 96 puits noire (Nunc). Le spectre de fluorescence est mesurée entre 280 et 500 nm pour une excitation à 325 nm (Figure 6.12(a)). L'intensité de fluorescence à 350 nm est reliée à la concentration en imiquimod pour aboutir à ce type de calibration (Figure 6.12(b)). Les NP lyophilisées (1mg) sont solubilisées dans le DMSO (1mL), 200  $\mu$ L de cette solution sont mis dans une plaque 96 puits noire (Nunc), le spectre de fluorescence est mesuré comme précédemment. La quantité



d'imiquimod contenue dans les particules est obtenue avec la droite de calibration  $I_{fluo} = f([imiquimod])$ .

FIGURE 6.12 – (a) Spectres de fluorescence typiquement obtenus de l'imiquimod dans le DMSO et (b) droite de calibration pour le dosage de l'imiquimod dans le DMSO (y=26.5x+10.5,  $R^2=0.99$ )

#### 6.5.5 Caractérisation des NP

#### 6.5.5.1 Diffusion quasi-élastique de la lumière

La taille des NP, correspondant au volume hydrodynamique des NP (dispersions très diluées dans de l'eau NaCl 1mM), est mesurée par DDL à l'aide d'un d'un zêta sizer 3000 HS (détecteur à 173°, Malvern) à 25°C. Les diamètres sont le résultats de la moyenne de quatre mesures.

#### 6.5.5.2 Mobilité électrophorétique

Le potentiel zêta est déterminé par anémométrie laser Doppler avec le zêta sizer 3000HS (Malvern, GB). Les mesures de mobilité électrophorétique sont effectuées à 25°C, sur une dispersion de NP très diluée dans une solution d'eau NaCl 1mM.

#### 6.5.5.3 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La dispersion de NP est diluée à 0.1% de taux de solide. Quelques gouttes sont disposées sur une lamelle Thermanox et sont laissées sécher une nuit. Les échantillons sont observés après ajout de palladium-or par un microscope FEI quanta 250 FEG ESEM.

#### 6.5.5.4 Stabilité colloïdale des NP

La stabilité colloïdale est étudiée par la mesure de la taille des particules par DDL, comme décrit précédemment. Les NP sont diluées à 0.01% dans des solutions de NaCl aux concentrations croissantes

(0, 0.001, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5 M de NaCl).

#### 6.5.5.5 Quantification des fonctions ester de NS disponibles à la surface des NP

Lors du procédé de préparation de NP, la quantité de copolymère PLA-*b*-P(NAS-*co*-NVP) et celle du PLA sont connues (typiquement pour 100 mg de PLA, 10 mg de copolymère sont ajoutés, soit une fraction massique réelle 9.09% de copolymère introduit). La fraction massique ou molaire du NAS eu sein du copolymère est connue par RMN <sup>1</sup>H. Ainsi, la fraction molaire théorique maximale de fonctions ester retrouvée à la surface des NP est connue.

Pour accéder à la fraction molaire réelle de fonctions ester disponibles à la surface des NP, les fonctions réactives sont aminolysées par l'éthanolamine. Ainsi, la quantité totale de NHS libérée suite à cette réaction (ajoutée à celle libérée par l'hydrolyse partielle d'une certaine fraction des ester de NS après élaboration des NP) témoigne de la quantité maximale de fonctions ester pouvant être modifiée chimiquement. Concrètement, 26  $\mu$ L d'une solution aqueuse d'éthanolamine (6.1 mg.mL<sup>-1</sup>) sont ajoutés à la dispersion de NP préalablement diluée ( $20\mu$ L de NP dans 1 mL d'eau). Une courbe de calibration DO<sub>260</sub> =f([NHS]) est réalisée dans les mêmes conditions pour permettre de relier la valeur de DO à 260 nm correspondant à la quantité de NHS contenue dans le surnageant à sa concentration, correspondant à la quantité de fonctions ester de NS disponibles en surface. Cette concentration est comparée à celle contenue dans les formulations de NP (obtenue par le calcul expliqué ci-dessus). Le rapport de ces deux concentrations donnent accès à la proportion de fonctions ester disponibles en surface des NP.

#### 6.5.5.6 Étude de l'hydrolyse des fonctions ester de NS

Cette étude a été réalisée soit par spectrométrie UV, soir par HPLC.

Pour l'analyse par spectrométrie UV, 20  $\mu$ L de nanoparticules sont dilués dans 2 mL d'eau puis centrifugés pendant 20 min à 16 873 g. 200  $\mu$ L de surnageant sont prélevés, 2.6  $\mu$ L d'une solution d'éthanolamine à 6.1 mg.mL<sup>-1</sup> sont ajoutés. Un spectre de l'absorbance est effectué entre 230 et 450 nm. La valeur de la densité optique à 260 nm, DO<sub>H,t</sub>, est alors comparée à la DO<sub>max</sub> correspondant à la DO du surnageant obtenue après la réaction de 26  $\mu$ L de solution d'éthanolamine à 6.1 mg.mL<sup>-1</sup> sur une dispersion de NP obtenue en ajoutant 20  $\mu$ L de NP dans 2 mL d'eau, afin d'obtenir TH<sub>max</sub>, taux d'hydrolyse maximal. Le rapport des deux valeurs permet d'accéder au pourcentage d'hydrolyse à l'instant t suivant la formule 6.5.

$$TH_t = \frac{DO_{H,t}}{DO_{max}} \times 100 \tag{6.5}$$

Pour l'analyse HPLC, les NP de PLA-copolymère sont diluées pour obtenir un taux de solide de

0.5%, puis sont centrifugées à 16 873 g pendant 10 min, 20  $\mu$ L de surnageant sont injectés en HPLC, pour obtenir l'aire du pic relatif à la NHS libérée à un instant t (A<sub>t</sub>). Pour accéder à l'hydrolyse totale, les NP de PLA-copolymère sont diluées à 0.5%, 1 $\mu$ L d'éthanolamine est ajouté à la dispersion de NP. La dispersion est mise sous agitation pendant 30 min, puis centrifugée à 16 873 g pendant 10 min. 20  $\mu$ L de surnageant sont injectés en HPLC, pour obtenir l'aire du pic relatif à la totalité des NHS disponibles à la surface des NP (A<sub>max</sub>). Le rapport de ces deux valeurs A<sub>t</sub>/A<sub>max</sub> donne accès à la fraction de fonctions ester hydrolysées.

#### 6.5.5.7 Calcul des paramètres d'interaction

Les paramètres d'interaction, entre le solvant (S) et le non-solvant (NS) et entre le polymère et le solvant, utilisés pour la nanoprécipitation, ont une influence sur la taille finale des NP obtenues.

Les différents paramètres d'interaction nécessaires pour comparer la nanoprécipitation d'une solution organique de PLA-acétone et d'une solution de PLA-DMSO ont donc été calculés.

Le paramètre d'interaction  $\chi_{S/NS}$  décrivant l'affinité du solvant S pour le non-solvant NS est défini par l'équation 6.6, où  $V_{NS}$  est le volume molaire du non-solvant (mL.mol<sup>-1</sup>), et  $\delta_S$  et  $\delta_{NS}$  (SI) sont les paramètres de solubilité de Scatchard-Hildebrand du solvant et du non-solvant, respectivement<sup>300</sup> :

$$\chi_{S/NS} = \frac{V_{NS}}{RT} (\delta_S - \delta_{NS})^2 \tag{6.6}$$

Ainsi à 25°C, pour un mélange binaire eau/DMSO, le paramètre d'interaction entre l'eau et le DMSO a pour valeur 3.39 et entre l'eau et l'acétone la valeur de 5.82 (Tableau 6.5).

$$\begin{array}{c|c|c} \delta_{eau} = 48 & \delta_{ac\acute{e}tone} = 19.7 & \chi_{eau/ac\acute{e}tone} = 5.82 \\ \hline \delta_{eau} = 48 & \delta_{DMSO} = 26.4 & \chi_{eau/DMSO} = 3.39 \end{array}$$

Tableau 6.5 – Valeurs des différents paramètres d'interaction, avec un volume molaire V<sub>eau</sub>=18 mL.mol<sup>-1</sup>, V<sub>acétone</sub>=74.2 mL.mol<sup>-1</sup> et V<sub>DMSO</sub>=71.0 mL.mol<sup>-1</sup>

De plus, cette même équation permet de décrire l'interaction entre le polymère et le solvant organique, suivant la formule 6.7 :

$$\chi_{polym \grave{e}re/S} = \frac{V_S}{RT} (\delta_S - \delta_{polym \grave{e}re})^2 \tag{6.7}$$

Å 25°C les paramètres d'interaction polymère/solvant, sont les suivants :  $\chi_{PLA/acétone} = 0.04$  et  $\chi_{PLA/DMSO} = 0.867$  (Tableau 6.6).

$\delta_{PLA}{=}20.9^{310}$	$\delta_{ac\acute{e}tone}{=}19.7$	$\chi_{PLA/ac\acute{e}tone} = 0.04$
$\delta_{PLA}=20.9$	$\delta_{DMSO}=26.4$	$\chi_{PLA/DMSO} = 0.867$

Tableau 6.6 – Valeurs des différents paramètres d'interaction, avec un volume molaire  $V_{acétone}=74.2$  mL.mol<sup>-1</sup> et  $V_{DMSO}=71.0$  mL.mol<sup>-1</sup>

# 6.6 Évaluation biologique des NP et micelles

Les milieux de culture (IMDM pour les SRDC et RPMI 1640 pour les cellules extraites de sang humain), le mélange de pénicilline/streptomycine, le 2-mercaptoéthanol, le D-PBS, la gentamicine, l'HEPES et le SVF sont fournis par Gibco Invitrogen. Le Ficoll et le Percoll sont fournis respectivement par GE Healthcare et Sigma-Aldrich. L'EDTA est fourni par USB. Le PBS 10X est fourni par Euromedex et dilué si nécessaire dans de l'eau Versol fournie par Aguettant. L'IL-4 et le GM-CSF sont fournis respectivement par RD Systems et Collaborative Biomedical Product-Biosciences. Tous les anticorps ont été fournis par BD Biosciences pour le marquage des SRDC et par BD Pharmingen pour le marquage des DC humaines.

# 6.6.1 Études sur les SRDC

#### 6.6.1.1 Culture cellulaire

Les cellules SRDC dérivent de cellules dendritiques primaires de la rate de souris et ont été fournies par le laboratoire UMR0483 Université François Rabelais Tours - INRA d'Immunologie Parasitaire et Vaccinologie, Biothérapies anti-infectieuses. Le milieu de culture est composé de milieu IMDM, contenant de la L-glutamine et 25 mM d'HEPES, supplémenté de 5% v/v de sérum de veau fétal (SVF), 1% v/v d'un mélange de pénicilline (5 000 U.mL<sup>-1</sup>) - streptomycine (5 000  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), afin d'obtenir 100 U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline et 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de streptomycine, et du 2-mercaptoéthanol (500  $\mu$ L, 50 mM dans du D-PBS). Une ampoule contenant un million de cellules est décongelée, reprise dans 9 mL de milieu de culture et centrifugée à 200 g pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est prélevé, les cellules sont reprises dans 15 mL de milieu. Le passage est effectué au tiers tous les deux jours.

#### 6.6.1.2 Stimulation des SRDC

Les anticorps utilisés sont listés dans le Tableau 6.7.

Une plaque 6 puits est ensemencée avec 2 mL par puits (1 million de cellules par mL) à  $J_1$ . 24h plus tard soit  $J_2$ , le milieu de culture est changé avec 2 mL de milieu, contenant les formulations à tester. A  $J_3$ , le marquage des SRDC est effectué. Pour ce faire, les cellules sont lavées avec du PBS 1X, puis récoltées en PBS dans des Falcons de 15 mL. Les cellules sont centrifugées à 200 g (Thermoscientific, Multifuge 3L-5) pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant est prélevé, le culot est repris dans 1 mL

Marqueur	Fluorochrome	Concentration	Fournisseur
		$(mg.mL^{-1})$	
CMH I	FITC	0.5	BD Biosciences
CMH II	PE	0.2	BD Biosciences
CD40 (rat)	APC	0.2	BD Biosciences
CD80 (Hamster)	APC	0.2	BD Biosciences
CD83 (rat)	PE	0.2	BD Biosciences
CD86 (rat)	APC	0.2	BD Biosciences
IgG2a souris - Isotype contrôle	PE	0.2	BD Biosciences

Tableau 6.7 – Anticorps utilisés pour le marquage des SRDC. FITC :  $\lambda_{ex}$ =488 nm,  $\lambda_{\acute{e}m}$ =518 nm, PE :  $\lambda_{ex}$ =488 nm,  $\lambda_{\acute{e}m}$ =575 nm et APC :  $\lambda_{ex}$ =650 nm,  $\lambda_{\acute{e}m}$ =661 nm

de PBS-1% SVF, contenant du Fc block anti-souris (dilué 500 fois), pour bloquer les sites aspécifiques de liaison de la partie Fc des anticorps. Le tout est incubé pendant 10 min à 4°C. 1 mL de PBS-1% de SVF est ajouté pour que les cellules soient centrifugées à 200 g pendant 10 min à 4°C. Les cellules sont reprises dans 1 mL de PBS-1% SVF. Dès lors que les anticorps sont manipulés, tout est effectué à l'obscurité afin de préserver les fluorochromes. Les anticorps (Tableau 6.7) sont dilués à 2  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> dans du PBS-1% SVF. Dans une plaque 96 puits à fond V, 50  $\mu$ L d'anticorps dilués à 2  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> sont mis dans les puits correspondants, auxquels sont ajoutés 50  $\mu$ L de suspension cellulaire préalablement obtenue. Les cellules et les anticorps incubés pendant 20 min à 4°C. 100  $\mu$ L de PBS-1% SVF sont ajoutés à chaque puits. Les cellules sont alors centrifugées pendant 2 min à 2 000 rpm (Eppendorf, R5408) à 4°C. Le surnageant est éliminé, le culot repris dans 100  $\mu$ L de PBS 1x, puis transféré dans des tubes de FACS. 200  $\mu$ L de PBS 1x sont ajoutés pour que la suspension cellulaire soit analysée par FACS (Modèle Canto, BD).

#### 6.6.1.3 Dosage de l'IL-12 sécrétée par les SRDC

L'étude de l'IL-12 permet de déterminer le potentiel de l'orientation de la réponse Th1. Son dosage est effectué sur le surnageant des cellules dendritiques après stimulation, à l'aide d'un kit eBioscience, Mouse IL-12 p70 ELISA Ready-SET-Go!<sup>®</sup>. Il s'agit d'un dosage ELISA en sandwich, qui permet de détecter l'IL-12 de souris à des concentrations comprises entre 15 pg.mL<sup>-1</sup> et 2 000 pg.mL<sup>-1</sup>.

Les puits (plaque Corning Costar 918 ELISA) sont recouverts de 100  $\mu$ L d'une solution d'anticorps de capture (diluée 250 fois) dans un tampon adéquat ("coating buffer", dilué par 10). La plaque est incubée pendant une nuit à 4°C. Cet anticorps permettra de capturer spécifiquement l'IL-12.

Les puits sont aspirés et lavés 5 fois avec 250  $\mu$ L par puits de tampon adéquat ("wash buffer", PBS 1x avec 0.05% Tween). Entre chaque lavage, la plaque est laissée au repos pendant 1 min. Le liquide résiduel après le dernier lavage est éliminé.

Les puits sont ainsi saturés avec 200  $\mu$ L de diluant ("assay diluent" diluée par 10) et la plaque est incubée pendant 1h à température ambiante. Un nouveau cycle de lavages est effectué, comme précédem-

Partie expérimentale

 $\mathrm{ment}.$ 

Les solutions étalons d'anticorps sont préparées par dilution en cascade de 2 000 pg.mL<sup>-1</sup> à 15.6 pg.mL<sup>-1</sup> dans le diluant. Les solutions étalons et les échantillons non dilués (100  $\mu$ L) sont déposés dans la plaque. La plaque est incubée soit pendant 2h à température ambiante, soit une nuit à 4°C. Il s'agit donc du dépôt et de la capture par l'anticorps de l'IL-12. Un nouveau cycle de lavages est effectué comme précédemment afin d'éliminer tout antigène spécifique n'ayant pas été capturé.

L'anticorps de détection, ou encore anticorps secondaire, est dilué 250 fois dans le diluant pour déposer 100  $\mu$ L de cette solution dans chaque puits. La plaque est incubée pendant 1 heure à température ambiante. L'anticorps de détection est un anticorps qui se lie lui aussi spécifiquement à l'IL-12 et qui est couplé à une biotine. Un nouveau cycle de lavages est effectué comme précédemment pour retirer l'excédent.

Le révélateur (Avidin-HRP) est dilué 250 fois dans le diluant pour déposer 100  $\mu$ L de cette solution dans chaque puits. La plaque est incubée pendant 30 min à température ambiante. L'enzyme HRP est couplé à une avidine pour permettre son interaction forte avec la biotine couplée à l'anticorps secondaire. Un nouveau cycle de 7 lavages avec un temps de repos entre chaque lavage de 1 à 2 min est effectué pour retirer l'excès de révélateur.

Le substrat de l'enzyme HRP (100  $\mu$ L de TMB) est ajouté dans chaque puits. La plaque est incubé 15 min à température ambiante. L'enzyme HRP convertit ainsi le TMB en molécule chromogène. 50  $\mu$ L de solution d'arrêt de la réaction enzymatique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2N) sont ajoutés à chaque puits. La plaque est lue à 450 nm.

#### 6.6.1.4 Dosage de l'IFN- $\alpha$ sécrétée par les SRDC

L'étude de l'IFN- $\alpha$  permet quant à elle de déterminer le potentiel antiviral de nos formulations. Son dosage est effectué sur le surnageant des cellules dendritiques après stimulation, à l'aide d'un kit VeriKine<sup>TM</sup>Mouse Interferon Alpha ELISA kit. Il s'agit d'un dosage ELISA en sandwich, qui permet de détecter l'IFN- $\alpha$  de souris à des concentrations comprises entre 12.5 et 400 pg.mL<sup>-1</sup>. Une plaque prérecouverte de l'anticorps primaire est fournie avec le kit.

Les solutions étalons d'anticorps sont préparées par dilution en cascade de 400 à 12.5 pg.mL<sup>-1</sup> dans un tampon adéquat ("sample buffer" dilué 5 fois). Les solutions étalons et les échantillons non dilués (100  $\mu$ L) sont déposés dans leur puits, ainsi que l'anticorps secondaire 50  $\mu$ L (dilué 100 fois). La plaque est incubée sous agitation (450 rpm) pendant 1 heure à température ambiante. La plaque est incubée sans agitation pendant 20-24h à 4°C. Les puits sont aspirés et lavés 4 fois avec 250  $\mu$ L par puits de tampon adéquat ("wash solution concentrate" diluée 20 fois).

Le révélateur (HRP conjugué) est dilué 400 fois dans le diluant pour déposer 100  $\mu$ L de cette solution

dans chaque puits. La plaque est incubée sous agitation (450 rpm) 2 heures à température ambiante. Un nouveau cycle de lavages est effectué comme précédemment.

Le substrat de l'enzyme HRP (100  $\mu$ L de TMB) est ajouté dans chaque puits. La plaque est incubée sans agitation 15 min à température ambiante. 100  $\mu$ L de solution d'arrêt ("stop solution" fournie) de la réaction enzymatique sont ajoutés à chaque puits. La plaque est lue après 5 min à 450 nm.

#### 6.6.2 Études sur des cellules dendritiques humaines

#### 6.6.2.1 Extraction, culture de monocytes humains et leur différenciation en DC

Une poche de sang (450 mL) est versée dans une bouteille stérile (1L), après découpage du cordon préalablement nettoyé méticuleusement à l'alcool. Le sang est dilué deux fois dans un mélange contenant 45 mL de PBS 10X, 400  $\mu$ L de gentamicine, 1 mL d'EDTA 0.5M et 450 mL de PBS 1X.

La première étape consiste en la séparation des globules blancs (monocytes, lymphocytes T et B, NK et polynucléaires), des globules rouges et des neutrophiles. Il est important de noter que le Ficoll est toxique pour les cellules, il faut donc minimiser son contact avec les cellules. Le Ficoll (15 mL) est versé dans un nombre approprié de tubes Falcon de 50 mL (typiquement 28-32 tubes), puis 30 mL de sang sont versés délicatement sur le Ficoll. Le milieu est mis à centrifuger pendant 20 min à 700 g (Thermoscientific, Multifuge 3L-5) à température ambiante (sans frein, en pente douce). L'anneau de cellules sanguines périphériques mononucléaires, situé au-dessus des globules rouges et du Ficoll et en-dessous du sérum, est récupéré, pour être introduit dans un Falcon de 50 mL. Seulement 30 mL sont introduits dans un Falcon, complétés jusqu'à 50 mL avec du PBS 1X - 5% de SVF. Le culot de globules rouges peut être jeté. Les cellules sont centrifugées pendant 10 min à 485 g à 4°C (décélération avec frein). Le surnageant est retiré. Les culots sont regroupés dans quatre tubes Falcon de 50 mL puis complétés avec du milieu complet, composé de milieu RPMI 1640, agrémenté de 10% de SVF, de 1% d'HEPES, de 500  $\mu L$  de gentamicine (50 U.mL<sup>-1</sup>) et de 1% de pénicilline-streptomycine. Les cellules sont à nouveau centrifugées à 485 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est repris avec 36 mL de milieu RPMI complet puis distribué dans 12 tubes Falcon de 15 mL à hauteur de 3 mL dans chaque tube.

La deuxième étape consiste en la séparation des monocytes des cellules B, T, NK. Dans un tube Falcon de 15 mL, 6 mL de Percoll (Sigma-Aldrich) dilué comme suivant : 45 mL de Percoll 100% avec 5 mL de PBS 10X et 46 mL de PBS 1X, sont versés, puis lentement 3 mL de cellules sont versées délicatement. Les cellules sont mises à centrifuger pendant 20 min à 863 g à température ambiante, sans frein. Les anneaux de monocytes sont récoltés dans deux tubes Falcon de 50 mL, lesquels sont complétés par du milieu RPMI complet. Les cellules sont à nouveau centrifugées pendant 10 min à 485 g. Les culots sont regroupés dans un tube Falcon de 50 mL avec du milieu RPMI complet. Le tout est à nouveau centrifugé pendant 10 min à 485 g. Le culot est repris dans 10 mL de RPMI 1640 - 10% de SVF.

La troisième étape est celle de la saturation des récepteurs Fc par du sérum humain. Les cellules

sont comptées, puis centrifugées à 4°C pendant 10 min à 485 g. Le surnageant est retiré, puis du milieu RPMI complet doté de 3% de sérum humain (préalablement décomplémenté et filtré) est ajouté de sorte à obtenir une concentration cellulaire de 10 millions de cellules par mL de milieu, pour être incubé à température ambiante pendant 10 min.

Afin de retirer les cellules B, T, NK et globules rouges résiduels, 500  $\mu$ L de milieu RPMI complet sont filtrés dans un tube Falcon de 15 mL. Les anticorps correspondant aux marqueurs de surface des cellules B, T, NK et globules rouges (respectivement anticorps anti-CD19, anti-CD3, anti-CD56 et antiglycophorine A, fournis par Beckman Coulter) sont préparées pour avoir une concentration finale de 2  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> pour chacun des anticorps dans le milieu puis filtrés. Le filtre stérile (0.22  $\mu$ m) est rincé avec 500  $\mu$ L de milieu RPMI complet. Les cellules sont incubées sous agitation pendant 30 min à 4°C. Les cellules sont diluées deux fois dans du milieu, puis centrifugées à 485 g, puis reprises et centrifugées à nouveau dans 10 mL de milieu. Les billes DYNAbeads Goat anti-mouse (Invitrogen) sont ajoutées, de sorte à avoir 5 billes par cellules à dépléter, en considérant qu'il y a en moyenne 50% de cellules à dépléter. 3mL de milieu sont ajoutés. Les cellules et les billes sont incubées pendant 12 min à 4°C. Le tube est mis sur un portoir magnétique pendant 7 min à 4°C. Le surnageant est récupéré pour être transvasé dans un autre tube Falcon de 15 mL. Ce tube est passé à son tour sur le portoir magnétique 7 min à 4°C. Le surnageant est récupéré. Une numération cellulaire est effectuée.

La dernière étape consiste en la mise en culture des monocytes obtenus et leur différenciation en DC. Dans une grande flasque, 50 mL de milieu RPMI 1640-10% de SVF à une concentration cellulaire de 0.5 millions de cellules par mL sont versés avec de l'IL-4 (2.5 ng.mL<sup>-1</sup>) et du GM-CSF (40 ng.mL<sup>-1</sup>).

#### 6.6.2.2 Stimulation de DC humaines

Les anticorps de souris anti-humain (BD Pharmingen) utilisés pour fixer les différents marqueurs de surface sont répertoriés dans le Tableau suivant :

Marqueur - fluorochrome	Volume introduit	Remarque
IgG-FITC, IgG-PE, IgG-PE-Cy5	$1\mu L$ de chaque	Isotype contrôle
CD1a-FITC	$3\mu L$	Simple positif
CD1a-PE	$3\mu L$	Simple positif
CD1a-Pe-Cy5	$3\mu L$	Simple positif
CD1a-FITC, CD86-PE, CMH II-PE-Cy5	$1\mu L$ de chaque	Triple positif
CD14-FITC, CD3-PE, CD56-PE-Cy5	$1\mu L$ de chaque	Pureté
CD80-PE, CD83-FITC, CD25-PE-Cy5	$1\mu L$ de chaque	Maturation

Tableau 6.8 – Anticorps utilisés pour le marquage des DC humaines. FITC :  $\lambda_{ex}$ =488 nm, $\lambda_{\acute{em}}$ =518 nm, PE :  $\lambda_{ex}$ =488 nm, $\lambda_{\acute{em}}$ =575 nm et pour le PE-Cy5 :  $\lambda_{ex}$ =496 nm, $\lambda_{\acute{em}}$ =667 nm

Les cellules (1 mL contenant 1 million de cellules) et les formulations à tester sont déposées dans une plaque 24 puits. À 24h et 48h, les cellules sont prélevées, 10 mL de PBS 1X sont ajoutés pour que les cellules soient centrifugées pendant 10 min à 350 g à 4°C. Le culot est repris dans 650  $\mu$ L de PBS - 5% de SVF pendant 10 min pour bloquer les récepteurs non spécifiques. 50  $\mu$ L de suspension cellulaire sont déposés dans une plaque 96 puits à fond V, préalablement recouverte d'anticorps, suivant les anticorps et mélanges d'anticorps listés dans le Tableau 6.8. Les cellules et les anticorps sont incubés pendant 30 min à 4°C dans l'obscurité. 50  $\mu$ L de PBS - 5% de SVF sont ajoutés, pour que la plaque soit centrifugée pendant 2 min à 700 g. Trois lavages avec 100  $\mu$ L de PBS 1X sont effectués. Le culot est repris avec 100  $\mu$ L de PBS 1X pour que la suspension cellulaire soit analysée par FACS (Modèle Canto, BD).

# 6.6.3 Cytotoxicité des NP

Pour analyser la cytotoxicité de nos formulations (micelles et NP),  $100\mu$ L de dispersion cellulaire sont préservés sans incubation en présence d'anticorps. De l'iodure de propidium (2 µg.mL<sup>-1</sup>, 2 µL) est ajouté dans la suspension cellulaire. Les cellules sont ensuite analysées par FACS (Modèle Canto, BD).

- [1] B. D. Walker and D. R. Burton. Toward an aids vaccine. Science, 320(5877):760-764, 2008.
- [2] D. T. O'Hagan and R. Rappuoli. Novel approaches to vaccine delivery. *Pharm. Res.*, 21(9) :1519–1530, [2004].
- [3] G. Ramon. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. Bull. Soc. Centr. Med. Vet., 101 :227–234, [1925].
- [4] D. T. O'Hagan, M. Singh, and R. K. Gupta. Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. Adv. Drug Delivery Rev., 32(3) :225–246, |1998|.
- [5] J. Kazzaz, J. Neidleman, M. Singh, G. Ott, and D. T. O'Hagan. Novel anionic microparticles are a potent adjuvant for the induction of cytotoxic t lymphocytes against recombinant p55 gag from hiv-1. J. Controlled Release, 67(2-3):347–356, 7 [2000].
- [6] R. Halwani, M. Doroudchi, B. Yassine-Diab, L. Janbazian, Y. Shi, E. A. Said, E. K. Haddad, and R.-P. Sékaly. Generation and maintenance of human memory cells during viral infection. *Springer* Semin. Immunopathol., 28(3) :197–208, [2006].
- [7] C. Basset, J. Holton, R. O'Mahony, and I. Roitt. Innate immunity and pathogen-host interaction. Vaccine, 21(Supplement 2) :S12–S23, |2003|.
- [8] T. H. Mogensen. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clin. Microbiol. Rev., 22(2) :240-273, |2009|.
- K. Nasu and H. Narahara. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. *Mediators Inflammation*, 10:1–12, [2010].
- [10] S. Akira. Toll-like receptors and innate immunity. Advances in Immunology, Volume 78:1-56, 2001.
- [11] R. Veazey and A. Lackner. The mucosal immune system and hiv-1 infection. AIDS Rev., 5:245–252, |2003|.
- [12] C. Primard. Transport de nanoparticules biodegradables de poly(acide lactique) à travers la muqueuse intestinale, et induction d'une réponse immunitaire muqueuse anti-VIH-1. PhD thesis, Université Jean Monnet, |2009|.

- [13] S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 124(4):783–801, |2006|.
- [14] S.-I. Saitoh and K. Miyake. Regulatory molecules required for nucleotide-sensing toll-like receptors. *Immunol. Rev.*, 227(1):32–43, |2009|.
- [15] S. M. Bal, Z. Ding, E. van Riet, W. Jiskoot, and J. A. Bouwstra. Advances in transcutaneous vaccine delivery : Do all ways lead to rome? J. Controlled Release, 148(3) :266–282, |2010|.
- [16] S. Higgins and K. Mills. Thr, nhr agonists, and other immune modulators as infectious disease vaccine adjuvants. *Current Infectious Disease Reports*, 12(1):4–12, [2010].
- [17] E. P. McGreal, J. L. Miller, and S. Gordon. Ligand recognition by antigen-presenting cell c-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 17(1):18–24, [2005].
- [18] K. Geddes, J. G. Magalhaes, and S. E. Girardin. Unleashing the therapeutic potential of nod-like receptors. Nat. Rev. Drug Discov., 8(6) :465–479, [2009].
- [19] T.-D. Kanneganti. Central roles of nlrs and inflammasomes in viral infection. Nat. Rev. Immunol., 10(10) :688–698, |2010|.
- [20] J. G. Magalhaes, M. T. Sorbara, S. E. Girardin, and D. J. Philpott. What is new with nods? Curr. Opin. Biotechnol., 23(1) :29–34, [2011].
- [21] J. Rey-Ladino, A. G. Ross, A. W. Cripps, D. P. McManus, and R. Quinn. Natural products and the search for novel vaccine adjuvants. *Vaccine*, 29(38) :6464–6471, 9 [2011].
- [22] P. J. Shaw, M. Lamkanfi, and T.-D. Kanneganti. Nod-like receptor (nlr) signaling beyond the inflammasome. *Eur. J. Immunol.*, 40 :624–627, [2010].
- [23] Y. van Kooyk, A. Engering, A. N. Lekkerkerker, I. S. Ludwig, and T. B. H. Geijtenbeek. Pathogens use carbohydrates to escape immunity induced by dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 16(4):488– 493, [2004].
- [24] S. I. Gringhuis, J. den Dunnen, M. Litjens, M. van der Vlist, and T. B. H. Geijtenbeek. Carbohydrate-specific signaling through the dc-sign signalosome tailors immunity to mycobacterium tuberculosis, hiv-1 and helicobacter pylori. *Nat. Immunol.*, 10 :1081–1088, [2009].
- [25] W. K. Eddie Ip, Kazue Takahashi, R. Alan Ezekowitz, and Lynda M. Stuart. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol. Rev.*, 230 :9–21, [2009].
- [26] P. Gasque. Complement : a unique innate immune sensor for danger signals. Mol. Immunol., 41(11) :1089–1098, |2004|.
- [27] Philip D. Stahl and R. Alan B. Ezekowitz. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.*, 10(1):50–55, [1998].
- [28] U. Gazi and L. Martinez-Pomares. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*, 214(7):554–561, [2009].

- [29] P. Guermonprez, J. Valladeau, L. Zitvogel, Cl. Thery, and S. Amigorena. Antigen presentation and t cell stimulation by dendritic cells. Annu. Rev. Immunol., 20(1) :621, [2002].
- [30] J. Banchereau and R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, 392(6673) :245, |1998|.
- [31] S.-Y. Liu, D. J. Sanchez, and G. Cheng. New developments in the induction and antiviral effectors of type i interferon. *Curr. Opin. Immunol.*, 23(1):57–64, [2010].
- [32] J. Sprent and C. D. Surh. T cell memory. Annu. Rev. Immunol., 20(1):551, 2002.
- [33] R. W. Dutton, L. M. Bradley, and S. L. Swain. T cell memory. Annu. Rev. Immunol., 16(1) :201, |1998|.
- [34] I. Bellinghausen, U. Brand, A. H. Enk, J. Knop, and J. Saloga. Signals involved in the early th1 /th2 polarization of an immune response depending on the type of antigen. J. Allergy Clin. Immunol., 103(2) :298–306, [1999].
- [35] K. Onoé, Y. Yanagawa, K. Minami, N. Iijima, and K. Iwabuchi. Th1 or th2 balance regulated by interaction between dendritic cells and nkt cells. *Immunol. Res.*, 38(1):319–332, |2007|.
- [36] S. K. Mallapragada and B. Narasimhan. Immunomodulatory biomaterials. Int. J. Pharm., 364(2):265–271, |2008|.
- [37] R. M. Welsh, L.K. Selin, and E. Szomolanyi-Tsuda. Immunological memory to viral infections. Annu. Rev. Immunol., 22 :711–743, |2004|.
- [38] J. Aimanianda, V.and Haensler, S. Lacroix-Desmazes, S. V. Kaveri, and J. Bayry. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol. Sci.*, 30(6) :287–295, [2009].
- [39] G. Leroux-Roels. Unmet needs in modern vaccinology : Adjuvants to improve the immune response. Vaccine, 28(Supplement 3) :C25–C36, |2010|.
- [40] D. Sesardic and R. Dobbelaer. European union regulatory developments for new vaccine adjuvants and delivery systems. *Vaccine*, 22(19) :2452–2456, [2004].
- [41] S. H. E. Kaufmann, P.-H. Lambert, C. R. Alving, and G. R. Matyas. Design and selection of vaccine adjuvants : principles and practice. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases, |2005|.
- [42] J. H. Wilson-Welder, M. P. Torres, M. J. Kipper, S. K. Mallapragada, M. J. Wannemuehler, and B. Narasimhan. Vaccine adjuvants : Current challenges and future approaches. J. Pharm. Sci., 98(4) :1278–1316, [2009].
- [43] N. W. Baylor, W. Egan, and P. Richman. Aluminum salts in vaccines-us perspective. Vaccine, 20(Supplement 3) :S18–S23, |2002|.

- [44] L. J. Peek, C. R. Middaugh, and C. Berkland. Nanotechnology in vaccine delivery. Adv. Drug Delivery Rev., 60(8) :915–928, [2008].
- [45] J.-W. Yoo, D. J. Irvine, D.E. Discher, and S. Mitragotri. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10(7) :521–535, 07 [2011].
- [46] R.K. Gupta. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. Adv. Drug Delivery Rev., 32(3):155–172, |1998|.
- [47] A. L. Clausi, A. Morin, J. F. Carpenter, and T. W. Randolph. Influence of protein conformation and adjuvant aggregation on the effectiveness of aluminum hydroxide adjuvant in a model alkaline phosphatase vaccine. J. Pharm. Sci., 98(1) :114–121, [2009].
- [48] A. Clausi, J. Cummiskey, S. Merkley, J. F. Carpenter, L.T. J. Braun, and T. W. Randolph. Influence of particle size and antigen binding on effectiveness of aluminum salt adjuvants in a model lysozyme vaccine. J. Pharm. Sci., 97(12) :5252–5262, |2008|.
- [49] A. T. Glenny, G. A. H. Buttle, and Muriel F. Stevens. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea - pigs : Toxoid precipitated with alum. *The Journal of Pathology* and Bacteriology, 34(2) :267–275, [1931].
- [50] L.B. Holt. Developments in diphtheria prophylaxis. J. Am. Med. Assoc., 144(16):1415, [1950].
- [51] R. Edelman. The development and use of vaccine adjuvants. Mol. Biotechnol., 21(2) :129–148, [2002].
- [52] J. C. Cox and A. R. Coulter. Adjuvants-a classification and review of their modes of action. Vaccine, 15(3) :248–256, [1997].
- [53] B. Pulendran and R. Ahmed. Immunological mechanisms of vaccination. Nat. Immunol., 12(6):509– 517, [2011].
- [54] F. R. Vogel. The role of adjuvants in retroviral vaccines. Int. J. Immunopharmacol., 17(2):85–90, [1995].
- [55] R.K. Gupta and G. R. Siber. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 13(14) :1263–1276, [1995].
- [56] P. J. Tacken and C. G. Figdor. Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo : Steps towards cost effective vaccines. *Semin. Immunol.*, 23(1) :12 – 20, |2011|.
- [57] S. D. Xiang, A. Scholzen, G. Minigo, C. David, V. Apostolopoulos, P. L. Mottram, and M. Plebanski. Pathogen recognition and development of particulate vaccines : does size matter? *Methods*, 40(1):1–9, |2006|.
- [58] G. Ott, R. Radhakrishnan, F. Jia-Hwa, and H. Maninder. The adjuvant mf59 : A 10-year perspective. Methods Mol. Med., 42, April [2000].

- [59] W. Jiang, R. K. Gupta, M. C. Deshpande, and S. P. Schwendeman. Biodegradable poly(lactic-coglycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. Adv. Drug Delivery Rev., 57(3):391–410, [2005].
- [60] G. Gregoriadis and P.D Leathwood. Enzyme entrapment in liposomes. FEBS Letters, 14(2):95–100, |1971|.
- [61] G. Gregoriadis. Drug entrapment in liposomes. FEBS Letters, 36(3):292–296, [1973].
- [62] M.-L. De Temmerman, J. Rejman, J. Demeester, D. J. Irvine, B. Gander, and S. C. De Smedt. Particulate vaccines : on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discovery Today*, 16(13-14) :569–582, 7 [2011].
- [63] T. Uchida. Development of a cytotoxic t-lymphocyte-based, broadly protective influenza vaccine. Microbiol. Immunol., 55(1):19–27, [2011].
- [64] C. Ludwig and R. Wagner. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. Curr. Opin. Biotechnol., 18(6) :537–545, [2007].
- [65] R. L. Garcea and L. Gissmann. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15(6):513–517, 12 [2004].
- [66] P. Couvreur and C. Vauthier. Nanotechnology : intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.*, 23(7) :1417–1450, |2006|.
- [67] I. Yildiz, S. Shukla, and N. F. Steinmetz. Applications of viral nanoparticles in medicine. Curr. Opin. Biotechnol., 22(6) :901–908, |2011|.
- [68] J. K. Pokorski and N. F. Steinmetz. The art of engineering viral nanoparticles. Mol. Pharmaceutics, 8(1):29–43, 11 |2010|.
- [69] M. A. Liu. Immunologic basis of vaccine vectors. Immunity, 33(4):504-515, 10 |2010|.
- [70] S. P Buchbinder, D. V Mehrotra, A. Duerr, D. W Fitzgerald, R. Mogg, D. Li, P. B. Gilbert, J. R. Lama, M. Marmor, C. del Rio, M. J. McElrath, D. R. Casimiro, K. M. Gottesdiener, J. A. Chodakewitz, L. Corey, and M. N. Robertson. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity hiv-1 vaccine (the step study) : a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *The Lancet*, 372(9653) :1881–1893, 2008/12/5/ |2008|.
- [71] S. Rerks-Ngarm, P. Pitisuttithum, S.i Nitayaphan, J. Kaewkungwal, J. Chiu, R. Paris, N. Premsri,
  C. Namwat, M. de Souza, E. Adams, M. Benenson, S. Gurunathan, J. Tartaglia, J. G. McNeil,
  D. P. Francis, D. Stablein, D. L. Birx, S. Chunsuttiwat, C. Khamboonruang, P. Thongcharoen,
  M. L. Robb, N. L. Michael, P. Kunasol, and J. H. Kim. Vaccination with alvac and aidsvax to
  prevent hiv-1 infection in thailand. N. Engl. J. Med., 361(23) :2209–2220, |2009|.
- [72] H.-X. Sun, Y. Xie, and Y.-P. Ye. Iscoms and iscomatrix(tm). Vaccine, 27(33):4388–4401, 7 [2009].

- [73] A. Zuber Kjerrström, A. Bråve, G. Engström, B. Zuber, K. Ljungberg, M. Fredriksson, R. Benthin, M. G. Isaguliants, E. Sandström, and B. Hinkula, J.and Wahren. Topical delivery of imiquimod to a mouse model as a novel adjuvant for human immunodeficiency virus (hiv) dna. Vaccine, 22(13-14) :1791–1798, 4 |2004|.
- [74] C. J. Harrison, R. L. Miller, and D. I. Bernstein. Reduction of recurrent hsv disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine. *Vaccine*, 19(13-14) :1820–1826, 2 [2001].
- [75] D. J. Marciani. Vaccine adjuvants : role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. Drug Discovery Today, 8(20) :934–943, 10 [2003].
- [76] W. Beckers, L Villa, S Gonfloni, L Castagnoli, SM Newton, G Cesareni, and P Ghiara. Increasing the immunogenicity of protein antigens through the genetic insertion of vqgeesndk sequence of human il-1 beta into their sequence. *The Journal of Immunology*, 151(4):1757–1764, 08 [1993].
- [77] S. Rovero, K. Boggio, E. Di Carlo, A. Amici, E. Quaglino, P. Porcedda, P. Musiani, and G. Forni. Insertion of the dna for the 163-171 peptide of illbeta enables a dna vaccine encoding p185(neu) to inhibit mammary carcinogenesis in her-2/neu transgenic balb/c mice. *Gene Ther.*, 8(6) :447–452, 03 |2001|.
- [78] R. Rappuoli and A. Aderem. A 2020 vision for vaccines against hiv, tuberculosis and malaria. *Nature*, 473(7348) :463–469, 05 |2011|.
- [79] J. Panyam and V. Labhasetwar. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Adv. Drug Delivery Rev., 55(3):329–347, [2003].
- [80] I.F. Uchegbu and A.G. Schätzlein. Polymers in drug delivery Chapter 8 Couvreur, P. and Hillaireau, H. Pharmacology and toxicology. CRC Taylor and Francis, [2006].
- [81] M. Huang, E. Khor, and L. Y. Lim. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles : effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm. Res.*, 21(2) :344–353, [2004].
- [82] A. Vila, A. Sanchez, M. Tobio, P. Calvo, and M. J. Alonso. Design of biodegradable particles for protein delivery. J. Controlled Release, 78(1-3):15-24, [2002].
- [83] S. A. Moschos, V. W. Bramwell, S. Somavarapu, and H. O. Alpar. Adjuvant synergy : The effects of nasal coadministration of adjuvants. *Immunol. Cell Biol.*, 82(6) :628–637, [2004].
- [84] A. Gamvrellis, D. Leong, J. C. Hanley, S. D. Xiang, P. Mottram, and M. Plebanski. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.*, 82(5):506–516, [2004].
- [85] G. Quan and T. Wang. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf.*, B, 59(1):24–34, 9 [2007].
- [86] T. Delair. Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile nanocarriers of bioactive molecules. Eur. J. Pharm. Biopharm., 78(1):10–18, 5 [2011].

- [87] E. M. Bachelder, T. T. Beaudette, K. E. Broaders, J. Dashe, and J. M. J. Fréchet. Acetal-derivatized dextran : An acid-responsive biodegradable material for therapeutic applications. J. Am. Chem. Soc., 130(32) :10494–10495, 07 |2008|.
- [88] E. M. Bachelder, T. T. Beaudette, K. E. Broaders, J. M. J. Fréchet, M. T. Albrecht, A. J. Mateczun, K. M. Ainslie, J. T. Pesce, and A. M. Keane-Myers. In vitro analysis of acetalated dextran microparticles as a potent delivery platform for vaccine adjuvants. *Mol. Pharmaceutics*, 7(3) :826–835, [2010].
- [89] L. Cui, J.A. Cohen, K. E. Broaders, T. T. Beaudette, and J. M. J. Fréchet. Mannosylated dextran nanoparticles : A ph-sensitive system engineered for immunomodulation through mannose targeting. *Bioconjugate Chem.*, 22(5) :949–957, [2011].
- [90] H. Huang, G. R. Ostroff, C. K. Lee, C. A. Specht, and S. M. Levitz. Robust stimulation of humoral and cellular immune responses following vaccination with antigen-loaded beta-glucan particles. *Mbio*, 1(3), 07 |2010|.
- [91] M. Sauter, S. Freimund, H. Dutler, O. Kappeli, A. Al-Ghazawi, E. Schwarz, L. Thomas, and H. Schoberl. Isolation of glucan particles and uses thereof. US Patent, US 2006/0134759 A1, |2005|.
- [92] G. R. Castro, B. Panilaitis, E. Bora, and D. L. Kaplan. Controlled release biopolymers for enhancing the immune response. *Mol. Pharmaceutics*, 4(1) :33–46, |2007|.
- [93] S. Espuelas, C. Thumann, B. Heurtault, F. Schuber, and B. Frisch. Influence of ligand valency on the targeting of immature human dendritic cells by mannosylated liposomes. *Bioconjugate Chem.*, 19(12) :2385–2393, |2008|.
- [94] L. de Witte, A. Nabatov, M. Pion, D.a Fluitsma, M. A. W. P. de Jong, T. de Gruijl, V. Piguet, Y. van Kooyk, and T. B. H. Geijtenbeek. Langerin is a natural barrier to hiv-1 transmission by langerhans cells. *Nat. Med.*, 13(3) :367–371, [2007].
- [95] R. J. Shattock and J. P. Moore. Inhibiting sexual transmission of hiv-1 infection. Nat. Rev. Micro., 1(1):25–34, [2003].
- [96] S. Hamdy, A. Haddadi, A. Shayeganpour, J. Samuel, and A. Lavasanifar. Activation of antigenspecific t cell-responses by mannan-decorated plga nanoparticles. *Pharm. Res.*, pages 2288–2301, |2011|.
- [97] W. Yu, C. Liu, Y. Liu, N. Zhang, and W. Xu. Mannan-modified solid lipid nanoparticles for targeted gene delivery to alveolar macrophages. *Pharm. Res.*, 27(8) :1584–1596–1596, [2010].
- [98] C. K. Tang, K.-C. Sheng, D. Pouniotis, S. Esparon, H.-Y. Son, C.-W. Kim, G. A. Pietersz, and V. Apostolopoulos. Oxidized and reduced mannan mediated muc1 dna immunization induce effective anti-tumor responses. *Vaccine*, 26(31):3827–3834, 7 [2008].

- [99] M. L. Gou, M. Dai, X. Y. Li, L. Yang, M. Huang, Y. S. Wang, B. Kan, Y. Lu, Y. Q. Wei, and Z. Y. Qian. Preparation of mannan modified anionic pcl-peg-pcl nanoparticles at one-step for bfgf antigen delivery to improve humoral immunity. *Colloids Surf.*, B, 64(1) :135–139, 6 [2008].
- [100] M. P. Torres, J. H. Wilson-Welder, S. K. Lopac, Y. Phanse, B. Carrillo-Conde, A. E. Ramer-Tait, B. H. Bellaire, M. J. Wannemuehler, and B. Narasimhan. Polyanhydride microparticles enhance dendritic cell antigen presentation and activation. *Acta Biomater.*, 7(7) :2857–2864, 7 [2011].
- [101] T. Akagi, X. Wang, T. Uto, M. Baba, and M. Akashi. Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives. *Biomaterials*, 28(23):3427–3436, |2007|.
- [102] R. K. Gupta, J. Alroy, M.a J. Alonso, R. Langer, and G. R. Siber. Chronic local tissue reactions, long term immunogenicity and immunologic priming of mice and guinea pigs to tetanus toxoid encapsulated in biodegradable polymer microspheres composed of poly lactide-co-glycolide polymers. *Vaccine*, 15(16) :1716–1723, 11 [1997].
- [103] D. Lamalle-Bernard, S. Munier, C. Compagnon, M. H. Charles, V. S. Kalyanaraman, T. Delair, B. Verrier, and Y. Ataman-Onal. Coadsorption of hiv-1 p24 and gp120 proteins to surfactantfree anionic pla nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. J. Controlled Release, 115(1):57–67, [2006].
- [104] L. Brannon-Peppas. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. Int. J. Pharm., 116(1):1–9, [1995].
- [105] M. Singh and D. T. O'Hagan. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm. Res.*, 19(6):715–728– 728, [2002].
- [106] G. Spenlehauer, M. Vert, J. P. Benoit, and A. Boddaert. In vitro and in vivo degradation of poly(d,l lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method. *Biomaterials*, 10(8):557–563, 10 [1989].
- [107] I. Grizzi, H. Garreau, S. Li, and M. Vert. Hydrolytic degradation of devices based on poly(-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials*, 16(4) :305–311, 3 [1995].
- [108] J. M. Anderson and M. S. Shive. Biodegradation and biocompatibility of pla and plga microspheres. Adv. Drug Delivery Rev., 28(1):5–24, [1997].
- [109] M. L. T. Zweers, G. H. M. Engbers, D. W. Grijpma, and J. Feijen. In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on d,l-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide). J. Controlled Release, 100(3):347–356, 12 |2004|.
- [110] M. Vajdy, I. Srivastava, J. Polo, J. Donnelly, D. T. O'Hagan, and M. Singh. Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, dna- and rna-based vaccines. *Immunol. Cell Biol.*, 82(6) :617–627, |2004|.

- [111] M. Diwan, P. Elamanchili, H. Lane, A. Gainer, and J. Samuel. Biodegradable nanoparticle mediated antigen delivery to human cord blood derived dendritic cells for induction of primary t cell responses. J. Drug Targeting, 11:495–507, [2003].
- [112] V. Kanchan and A. K. Panda. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials*, 28(35):5344–5357, |2007|.
- [113] I. Gutierro, R. M. Hernández, M. Igartua, A. R. Gascón, and J. L. Pedraz. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of bsa loaded nanospheres. *Vaccine*, 21(1-2):67–77, 11 |2002|.
- [114] P. Johansen, Y. Men, H. P. Merkle, and B. Gander. Revisiting pla/plga microspheres : an analysis of their potential in parenteral vaccination. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50(1) :129–146, |2000|.
- [115] J. Panyam, M. M. Dali, S. K. Sahoo, W. Ma, S. S. Chakravarthi, G. L. Amidon, R. J. Levy, and V. Labhasetwar. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(d,l-lactideco-glycolide) nano- and microparticles. J. Controlled Release, 92(1-2) :173–187, [2003].
- [116] U. Bilati, E. Allémann, and E. Doelker. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59(3):375– 388, 4 [2005].
- [117] H. Tamber, P. Johansen, H. P. Merkle, and B. Gander. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. Adv. Drug Delivery Rev., 57(3):357–376, [2005].
- [118] N. Venkataprasad, A. G. A. Coombes, M. Singh, M. Rohde, K. Wilkinson, F. Hudecz, S. S. Davis, and H. M. Vordermeier. Induction of cellular immunity to a mycobacterial antigen adsorbed on lamellar particles of lactide polymers. *Vaccine*, 17(15-16) :1814–1819, 4 [1999].
- [119] Y. Ataman-Onal, S. Munier, A. Ganee, C. Terrat, P. Y. Durand, N. Battail, F. Martinon, R. Le Grand, M. H. Charles, T. Delair, and B. Verrier. Surfactant-free anionic pla nanoparticles coated with hiv-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. J. Controlled Release, 112(2) :175–185, |2006|.
- [120] F. Aline, D. Brand, J. Pierre, P. Roingeard, M. SÈverine, B. Verrier, and I. Dimier-Poisson. Dendritic cells loaded with hiv-1 p24 proteins adsorbed on surfactant-free anionic pla nanoparticles induce enhanced cellular immune responses against hiv-1 after vaccination. Vaccine, 27(38) :5284–5291, |2009|.
- [121] C. Guillon, K. Mayol, C. Terrat, C. Compagnon, C. Primard, M. H. Charles, T. Delair, S. Munier, and B. Verrier. Formulation of hiv-1 tat and p24 antigens by pla nanoparticles or mf59 impacts the breadth, but not the magnitude, of serum and faecal antibody responses in rabbits. *Vaccine*, 25(43):7491–7501, |2007|.

- [122] C. Primard, N. Rochereau, E. Luciani, C. Genin, T. Delair, S. Paul, and B. Verrier. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials*, 31(23):6060–6068, [2010].
- [123] T. Trimaille, C. Pichot, and T. Delair. Surface functionalization of poly(d,l-lactic acid) nanoparticles with poly(ethylenimine) and plasmid dna by the layer-by-layer approach. *Colloids Surf.*, A, 221(1-3):39–48, |2003|.
- [124] S. Munier, I. Messai, T. Delair, B. Verrier, and Y. Ataman-Önal. Cationic pla nanoparticles for dna delivery : Comparison of three surface polycations for dna binding, protection and transfection properties. *Colloids Surf.*, B, 43(3-4) :163–173, [2005].
- [125] M. Singh, M. Briones, G. Ott, and D. O'Hagan. Cationic microparticles : A potent delivery system for dna vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(2) :811–816, 01 |2000|.
- [126] P. Elamanchili, M. Diwan, M. Cao, and J. Samuel. Characterization of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine*, 22(19) :2406–2412, |2004|.
- [127] L. Bondioli, L. Costantino, A. Ballestrazzi, D. Lucchesi, D. Boraschi, Pellati, S. Benvenuti, G. Tosi, and M. A. Vandelli. Plga nanoparticles surface decorated with the sialic acid, n-acetylneuraminic acid. *Biomaterials*, 31(12):3395–3403, 4 [2010].
- [128] N. Brandhonneur, F. Chevanne, V. Vié, B. Frisch, R. Primault, M.-F. Le Potier, and P. Le Corre. Specific and non-specific phagocytosis of ligand-grafted plga microspheres by macrophages. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 36(4-5) :474–485, 3 [2009].
- [129] F. Rieger, J.and Stoffelbach, D. Cui, A. Imberty, E. Lameignere, R. Putaux, J.-L.and Jérôme, C.e Jérôme, and R. Auzély-Velty. Mannosylated poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) diblock copolymers : Synthesis, characterization, and interaction with a bacterial lectin. *Biomacro-molecules*, 8(9) :2717–2725, 08 2007.
- [130] J. Rieger, H. Freichels, A. Imberty, J.-L. Putaux, T. Delair, C. Jerôme, and R. Auzély-Velty. Polyester nanoparticles presenting mannose residues : Toward the development of new vaccine delivery systems combining biodegradability and targeting properties. *Biomacromolecules*, 10(3):651–657, |2009|.
- [131] V. Fievez, L. Plapied, A. des Rieux, V. Pourcelle, H. Freichels, V. Wascotte, M.-L. Vanderhaeghen, C. Jerôme, A. Vanderplasschen, J. Marchand-Brynaert, Y.-J. Schneider, and V. Préat. Targeting nanoparticles to m cells with non-peptidic ligands for oral vaccination. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 73(1):16–24, 9 |2009|.
- [132] R. Gref, P. Couvreur, G. Barratt, and Mysiakine. Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. *Biomaterials*, 24(24):4529–4537, 11 [2003].

- [133] C. Foged, C. Arigita, A. Sundblad, G. Jiskoot, W.and Storm, and S. Frokjaer. Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes : effect of bilayer composition. *Vaccine*, 22(15-16) :1903–1913, 5 |2004|.
- [134] S. T. Reddy, M. A. Swartz, and J. A. Hubbell. Targeting dendritic cells with biomaterials : developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.*, 27(12) :573–579, [2006].
- [135] D. Boraschi, L. Nencioni, L. Villa, S. Censini, P. Bossù, P. Ghiara, R. Presentini, F. Perin, D. Frasca, and G. Doria. In vivo stimulation and restoration of the immune response by the noninflammatory fragment 163-171 of human interleukin 1 beta. *The Journal of Experimental Medicine*, 168(2):675– 686, 08 [1988].
- [136] R. L. Miller, J. F. Gerster, M. L. Owens, H. B. Slade, and M. Tomai. Review article imiquimod applied topically : a novel immune response modifier and new class of drug. *Int. J. Immunopharmacol.*, 21(1) :1–14, 1 [1999].
- [137] A. Pollak, H. Blumenfeld, M. Wax, R. L. Baughn, and G. M. Whitesides. Enzyme immonbilization by condensation copolymerization intro cross-linked polyacrylamide gels. J. Am. Chem. Soc., 102(20) :6324–6336, [1980].
- [138] Y. Luo, A. Wang, J. Yuan, and Q. Gao. Preparation, characterization and drug release behavior of polyion complex micelles. Int. J. Pharm., 374(1-2) :139–144, [2009].
- [139] G. Gaucher, K. Asahina, J. Wang, and J.-C. Leroux. Effect of poly(n-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(d,l-lactide) as coating agent on the opsonization, phagocytosis, and pharmacokinetics of bio-degradable nanoparticles. *Biomacromolecules*, 10(2):408–416, [2009].
- [140] M. Szwarc. Living polymers. Nature, 178(4543) :1168-1169, 11 [1956].
- [141] M. Szwarc, M. Levy, and R. Milkovich. Polymerization initiated by electron transfer to monomer. a new method of formation of block polymers. J. Am. Chem. Soc., 78(11) :2656–2657, 06 1956.
- [142] T. Otsu and M. Yoshida. Role of initiator-transfer agent-terminator (iniferter) in radical polymerizations : Polymer design by organic disulfides as iniferters. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications*, 3(2) :127–132, |1982|.
- [143] T. Otsu, M. Yoshida, and T. Tazaki. A model for living radical polymerization. Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications, 3(2):133–140, |1982|.
- [144] H. Fischer. Unusual selectivities of radical reactions by internal suppression of fast modes. J. Am. Chem. Soc., 108(14) :3925–3927, 07 [1986].
- [145] H. Fischer. The persistent radical effect in controlled radical polymerizations. J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem., 37(13) :1885–1901, [1999].
- [146] T.P. Le, G. Moad, E. Rizzardo, and S. Thang. Pct wo98/01478. [1998].

- [147] J. Chiefari, Y. K. (Bill) Chong, J. Ercole, F.and Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, and S. H. Thang. Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer : The raft process. *Macromolecules*, 31(16) :5559–5562, 07 |1998|.
- [148] M. Destarac, W. Bzducha, D. Taton, I. Gauthier-Gillaizeau, and S. Z. Zard. Xanthates as chaintransfer agents in controlled radical polymerization (madix) : Structural effect of the o-alkyl group. *Macromol. Rapid Commun.*, 23(17) :1049–1054, [2002].
- [149] P. Copart, D. Charmot, T. Bidatti, T. Zard, and D. Michelet. Pct wo 98/58974. [1998].
- [150] J. Chiefari and E. Rizzardo. Handbook of radical polymerization. John Wiley and sons, Inc. : New-Yotk, 2002.
- [151] S. Perrier and P. Takolpuckdee. Macromolecular design via reversible addition-fragmentation chain transfer (raft)/xanthates (madix) polymerization. J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem., 43(22) :5347–5393, |2005|.
- [152] A. Favier and M.-T. Charreyre. Experimental requirements for an efficient control of free-radical polymerizations via the reversible addition-fragmentation chain transfer (raft) process. *Macromol. Rapid Commun.*, 27(9) :653–692, |2006|.
- [153] M. Destarac, D. Charmot, X. Franck, and S. Z. Zard. Dithiocarbamates as universal reversible addition-fragmentation chain transfer agents. *Macromol. Rapid Commun.*, 21(15) :1035–1039, |2000|.
- [154] M. S. Kharasch, E.V. Jensen, and Urry W.H. Addition of carbon tetrachloride and chloroform to olefins. *Science*, 102 :128–129, [1945].
- [155] M. S. Kharasch, M. C. McNab, and Frank R. Mayo. The peroxide effect in the addition of reagents to unsaturated compounds. ii. the addition of hydrogen bromide to vinyl bromide. J. Am. Chem. Soc., 55(6) :2521–2530, 06 [1933].
- [156] D. P. Curran. The design and application of free radical chain reactions in organic synthesis. part 2. Synthesis, |1988|.
- [157] K. Matyjaszewski and J. Xia. Atom transfer radical polymerization. Chem. Rev., 101(9):2921–2990, 09 [2001].
- [158] M. Kamigaito, T. Ando, and M. Sawamoto. Metal-catalyzed living radical polymerization. Chem. Rev., 101(12) :3689–3746, 12 |2001|.
- [159] N.V. Tsarevsky, W. Tang, S.J. Brooks, and K. Matyjaszewski. Controlled/living radical polymerization : from the synthesis to materials. A.C.S. Symposium Series 944, [2006].

- [160] F. Chauvin, P.-E. Dufils, D. Gigmes, Y. Guillaneuf, S. R. A. Marque, P. Tordo, and D. Bertin. Nitroxide-mediated polymerization : The pivotal role of the kd value of the initiating alkoxyamine and the importance of the experimental conditions. *Macromolecules*, 39(16) :5238–5250, |2006|.
- [161] T. Fukuda, T. Terauchi, A. Goto, K. Ohno, Y. Tsujii, T. Miyamoto, S. Kobatake, and B. Yamada. Mechanisms and kinetics of nitroxide-controlled free radical polymerization. *Macromolecules*, 29(20) :6393–6398, 01 |1996|.
- [162] H. Fischer. The persistent radical effect : A principle for selective radical reactions and living radical polymerizations. *Chem. Rev.*, 101(12) :3581–3610, 11 [2001].
- [163] G. Moad, E. Rizzardo, and D. H. Solomon. Selectivity of the reaction of free radicals with styrene. *Macromolecules*, 15(3) :909–914, 05 |1982|.
- [164] D. H. Solomon, E. Rizzardo, and P. Cacioli. Free radical polymerization and the produced polymers
   ep135280. Eur. Pat. Appl., 135 :280, |1985|.
- [165] C. J. Hawker. Molecular weight control by a living free radical polymerization process. J. Am. Chem. Soc., 116 :11185–11186, [1994].
- [166] D. Greszta and K. Matyjaszewski. Mechanism of controlled/living radical polymerization of styrene in the presence of nitroxyl radicals. kinetics and simulations. *Macromolecules*, 29:7661–7670, [1996].
- [167] S. Grimaldi, F. Le Moigne, J.-P. Finet, P. Tordo, P. Nicol, and M. Plechot. Wo 96 / 24620, [1996].
- [168] P. Lacroix-Desmazes, J.-F. Lutz, F. Chauvin, R. Severac, and B. Boutevin. Living radical polymerization : Use of an excess of nitroxide as a rate moderator. *Macromolecules*, 34(26) :8866–8871, |2001|.
- [169] D. Benoit, V. Chaplinski, R. Braslau, and C. J. Hawker. Development of a universal alkoxyamine for "living" free radical polymerizations. J. Am. Chem. Soc., 121(16) :3904–3920, [1999].
- [170] S. Grimaldi, J.-P. Finet, F. Le Moigne, A. Zeghdaoui, P. Tordo, D. Benoit, M. Fontanille, and Y. Gnanou. Acyclic beta-phosphonylated nitroxides : a new series of counter-radicals for living/controlled free radical polymerization. *Macromolecules*, 33 :1141–1147, |2000|.
- [171] D. Benoit, S. Grimaldi, S. Robin, J.-P. Finet, P. Tordo, and Y. Gnanou. Kinetics and mechanism of controlled free-radical polymerization of styrene and n-butyl acrylate in the presence of an acyclic beta-phosphonylated nitroxide. J. Am. Chem. Soc., 122 :5929–5939, [2000].
- [172] C. Le Mercier, S. Acerbis, D. Bertin, F. Chauvin, D. Gigmes, O. Guerret, S. Marque, H. Fischer, and P. Tordo. Design and use of beta-phosphorous nitroxides and alkoxyamines in controlled/living free radical polymerizations. *Macromol. Symp.*, 182 :225–247, |2002|.
- [173] E. Harth, D. Benoit, and C. Helms. Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.), 41:42, [2000].

- [174] L. Couvreur, C. Lefay, J. Belleney, B. Charleux, O. Guerret, and S. Magnet. First nitroxidemediated controlled free-radical polymerization of acrylic acid. *Macromolecules*, 36(22):8260–8267, [2003].
- [175] Y. Guillaneuf, D. Gigmes, S. R. A. Marque, P. Astolfi, L. Greci, P. Tordo, and D. Bertin. First effective nitroxide-mediated polymerization of methyl methacrylate. *Macromolecules*, 40(9) :3108– 3114, [2007].
- [176] S. Butz, H. Baethge, and G. Schmidt-Naake. Narrow-polydispersity poly(styrene-co-butyl methacrylate) block copolymers by an n-oxyl mediated free radical polymerization process. *Macromol. Rapid Commun.*, 18 :1049–1055, [1997].
- [177] Y. Miura, N. Nakamura, A. Taniguchi, and A. Ichikawa. Radical polymerization of butyl acrylate and random copolymerization of styrene and butyl acrylate and styrene and methyl methacrylate mediated by monospiro- and dispiropiperidinyl-n-oxyl radicals. *Polymer*, 44 :3461–3467, |2003|.
- [178] M. K. Georges, R. P. N. Veregin, P. M. Kazmaier, and G. K. Hamer. Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process. *Macromolecules*, 26 :2987–2988, [1993].
- [179] Y. Guillaneuf. Polymérisation radicalaire contrôlée en présence de nitroxydes. Aspects expérimentaux et théoriques. PhD thesis, Université de Provence, |2006|.
- [180] F. Chauvin. PhD thesis, |2002|.
- [181] C. Barner-Kowollik and S. Perrier. The future of reversible addition fragmentation chain transfer polymerization. J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem., 46(17):5715–5723, [2008].
- [182] Y. Shen, H. Tang, and S. Ding. Catalyst separation in atom transfer radical polymerization. Prog. Polym. Sci., 29(10) :1053–1078, 10 |2004|.
- [183] R. Poli. Relationship between one-electron transition-metal reactivity and radical polymerization processes. Angew. Chem. Int. Ed., 45(31) :5058–5070, [2006].
- [184] C.J. Hawker, A. W. Bosman, and E. Harth. New polymer synthesis by nitroxide mediated living radical polymerizations. *Chem. Rev.*, 101(12) :3661–3688, [2001].
- [185] V. Sciannamea, R. Jérôme, and C. Detrembleur. In-situ nitroxide-mediated radical polymerization (nmp) processes : Their understanding and optimization. *Chem. Rev.*, 108(3) :1104–1126, 02 |2008|.
- [186] K. Matyjaszewski, S. Coca, S. G. Gaynor, M. Wei, and B. E. Woodworth. Zerovalent metals in controlled/"living"radical polymerization. *Macromolecules*, 30(23):7348–7350, 2012/01/09 1997.
- [187] K. Matyjaszewski and T. P. Davis. Handbook of radical polymerization. John Wiley and sons, Inc. : New-Yotk, 2002.
- [188] T. Pintauer and K. Matyjaszewski. Atom transfer radical addition and polymerization reactions catalyzed by ppm amounts of copper complexes. *Chem. Soc. Rev.*, 37 :1087–1097, 2008.

- [189] S. Faucher, P. Okrutny, and S. Zhu. Facile and effective purification of polymers produced by atom transfer radical polymerization via simple catalyst precipitation and microfiltration. *Macromolecules*, 39(1) :3–5, 2012/01/09 2005.
- [190] N.V. Tsarevsky and K. Matyjaszewski. "green" atom transfer radical polymerization : From process design to preparation of well-defined environmentally friendly polymeric materials. *Chem. Rev.*, 107(6) :2270–2299, 2012/01/09 2007.
- [191] K. Matyjaszewski, W. Jakubowski, K. Min, W. Tang, J. Huang, W. A. Braunecker, and N. V. Tsarevsky. Diminishing catalyst concentration in atom transfer radical polymerization with reducing agents. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 103(42) :15309–15314, 10 2006.
- [192] M. Chenal, S. Mura, C. Marchal, D. Gigmes, B. Charleux, E. Fattal, P. Couvreur, and J. Nicolas. Facile synthesis of innocuous comb-shaped polymethacrylates with peg side chains by nitroxidemediated radical polymerization in hydroalcoholic solutions. *Macromolecules*, 43(22) :9291–9303, 10 [2010].
- [193] B. Clément, T. Trimaille, Ol. Alluin, D. Gigmes, K. Mabrouk, F. Féron, P. Decherchi, T. Marqueste, and D. Bertin. Convenient access to biocompatible block copolymers from sg1-based aliphatic polyester macro-alkoxyamines. *Biomacromolecules*, 10(6) :1436–1445, [2009].
- [194] T. Yokozawa and A. Yokohama. Chain-growth polycondensation : the living polymerization process in polycondensation. *Prog. Polym. Sci.*, 32 :147–172, [2007].
- [195] A.-C. Albertsson and I. Varma. Aliphatic polyesters : Synthesis, properties and applications. Adv. Polym. Sci., 157 :1–40, [2002].
- [196] A.-C Albertsson and I. K. Varma. Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications. *Biomacromolecules*, 4 :1466–1486, [2003].
- [197] A.-C Albertsson and R. K. Srivastava. Recent developments in enzyme-catalysed ring-opening polymerization. Adv. Drug. Deliv. Rev., 60 :1077–1093, [2008].
- [198] S. Penczek, M. Cypryk, A. Duda, P. Kubisa, and S. Slomkowski. Living ring-opening polymerizations of heterocyclic monomers. *Prog. Polym. Sci.*, 32 :247–282, [2007].
- [199] C. Jérôme and P. Lecomte. Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization. Adv. Drug. Deliv. Rev., 60 :1056–1076, [2008].
- [200] C. E. Lowe, [1954].
- [201] H. Uyama and S. Kobayashi. Enzymatic ring-opening polymerization of lactones catalysed by lipase. *Chem. Lett.*, pages 1149–1150, 1993.
- [202] I. K. Varma, A.-C. Albertsson, R. Rajkhowa, and R. K. Srivastava. Enzyme catalysed synthesis of polyesters. Prog. Polym. Sci., 30 :949–981, [2005].

- [203] R. A. Gross, A. Kumar, and B. Kalra. Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Chem. Rev.*, 101, |2001|.
- [204] N. E. Kamber, J. Wonhee, R. M. Waymouth, R. C. Pratt, B. G. G. Lohmeijer, and J. L. Hedrick. Organocatalytic ring-opening polymerization. *Chem. Rev.*, 107 :5813–5840, [2007].
- [205] T. Biela, A. Duda, and S. Penczek. Control of mn, mw/mn, end-groups, and kinetics in living polymerization of cyclic esters. *Macromol. Symp.*, 183 :1–10, [2002].
- [206] O. Coulembier, P. Degée, J. L. Hedrick, and P. Dubois. From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester : especially poly(beta-malic acid) derivatives. *Prog. Polym. Sci.*, 31 :723–747, |2006|.
- [207] A. Hofman, S. Slomkowski, and S. Penczek. Polymerization of e-caprolactone with kinetic suppession of macrocycles. *Makromol. Chem.*, *Rapid Commun.*, 8 :387–391, [1987].
- [208] H. R. Kricheldorf and I. Kreiser-Saunders. Polylactones, 19. anionic polymerization of l-lactide in solution. *Makromol. Chem.*, 191 :1057–1066, [1990].
- [209] A. Kowalski, A. Duda, and S. Penczek. Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with tin(ii) octoate. 3. polymerization of l,l-dilactide. *Macromolecules*, 33 :7359–7370, |2000|.
- [210] B. Dechy-Cabaret, O.and Martin-Vaca and D. Bourissou. Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide. *Chem. Rev.*, 104(12) :6147–6176, 10 [2004].
- [211] H. R. Kricheldorf and R. Dunsing. Polylactones, 8. mechanism of the cationic polymerization of l,l-dilactide. *Makromol. Chem.*, 187 :1611–1625, |1986|.
- [212] T. Ouhadi, C. Stevens, and P. Teyssié. Mechanism of e-caprolactone polymerization by aluminum alkoxides. *Makromol. Chem.*, 1 :191–201, [1975].
- [213] A. J. Nijenhuis, D. W. Grijpma, and A. J. Pennings. Lewis acid catalysed polymerization of l-lactide. kinetics and mechanism of the bulk polymerization. *Macromolecules*, 25:6419–6424, [1992].
- [214] A. Stjerndahl, A. F. Wistrand, and A.-C Albertsson. Industrial utilization of tin-initiated resorbable polymers : synthesis on a large scale with a low amount of initiator residue. *Biomacromolecules*, 8 :937–940, [2007].
- [215] A. Kowalski, A. Duda, and S. Penczek. Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with tin(ii) octoate. 1. polymerization of e-caprolactone. *Macromol. Rapid Commun.*, 19:567–572, [1998].
- [216] H. R. Kricheldorf, I. Kreiser-Saunders, and A. Stricker. Polylactones 48. snoct2 initiated polymerizations of lactide : a mechanistic study. *Macromolecules*, 33 :702–709, [2000].
- [217] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless. Click chemistry : diverse chemical function from a few good reactions. Angew. Chem. Int. Ed., 40 :2004–2021, [2001].

- [218] R. Huisgen. Centenary lecture 1,3-dipolar cycloadditions. Proc. Chem. Soc., pages 357–396, [1961].
- [219] J. A. Opsteen and J. C. M. van Hest. Modular synthesis of block copolymers via cycloaddition of terminal azide and alkyne functionalized polymers. *Chem. Comm.*, pages 57–59, [2005].
- [220] N. Akeroyd and B. Klumperman. The combination of living radical polymerization and click chemistry for the synthesis of advanced macromolecular architectures. *Eur. Polym. J.*, 47(6) :1207– 1231, 6 [2011].
- [221] M. A. Tasdelen. Diels-alder "click" reactions : recent applications in polymer and material science. Polym. Chem., pages -, [2011].
- [222] M. Nasser-Eddine, C. Delaite, G. Hurtrez, and P. Dumas. Controlled one-step synthesis of a diblock copolymer. *Eur. Polym. J.*, 41(2) :313–318, 2 [2005].
- [223] T.-L. Yu, B.-H. Huang, W.-C. Hung, C.-C. Lin, T.-C. Wang, and R.-M. Ho. Preparation and characterization of poly(e-caprolactone)-b-polyacrylonitrile (pcl-b-pan) and poly(l-lactide)-bpolyacrylonitrile (plla-b-pan) copolymers by aluminum and lithium alkoxides containing doubleheaded initiators. *Polymer*, 48(15) :4401–4411, 7 [2007].
- [224] Q. Zhang, E. E. Remsen, and K. L. Wooley. Shell cross-linked nanoparticles containing hydrolytically degradable, crystalline core domains. J. Am. Chem. Soc., 122(15) :3642–3651, 03 |2000|.
- [225] M. Hales, C. Barner-Kowollik, T. P. Davis, and M. H. Stenzel. Shell-cross-linked vesicles synthesized from block copolymers of poly(d,l-lactide) and poly(n-isopropyl acrylamide) as thermoresponsive nanocontainers. *Langmuir*, 20(25) :10809–10817, 11 [2004].
- [226] K. J. Thurecht, A. M. Gregory, S. Villarroya, J. Zhou, A. Heise, and S. M. Howdle. Simultaneous enzymatic ring opening polymerisation and raft-mediated polymerisation in supercritical co2. *Chem. Comm.*, (42) :4383–4385, |2006|.
- [227] Y. You, C. Hong, W. Wang, W. Lu, and C. Pan. Preparation and characterization of thermally responsive and biodegradable block copolymer comprised of pnipaam and pla by combination of rop and raft methods. *Macromolecules*, 37(26) :9761–9767, 12 [2004].
- [228] J. Dao, D. Benoit, and C. J. Hawker. A versatile and efficient synthesis of alkoxyamine lfr initiators via manganese based asymmetric epoxidation catalysts. J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem., 36 :2161–2167, [1998].
- [229] R. D. Puts and D. Y. Sogah. Universal multifunctional initiator containing orthogonal reactive sites. synthesis of macromonomers and comb polymers using consecutive controlled free radical and cationic ring-opening polymerizations. *Macromolecules*, 30(23):7050–7055, 11 [1997].
- [230] M. W. Weimer, O. A. Scherman, and D. Y. Sogah. Multifunctional initiators containing orthogonal sites. one-pot, one-step block copolymerization by simultaneous free radical and either cationic ringopening or anionic ring-opening polymerization. *Macromolecules*, 31(23):8425–8428, 10 [1998].

- [231] J. Di and D. Y. Sogah. Exfoliated block copolymer/silicate nanocomposites by one-pot, onestep in-situ living polymerization from silicate-anchored multifunctional initiator. *Macromolecules*, 39(15):5052–5057, 06 |2006|.
- [232] C. J. Hawker, J. L. Hedrick, E. E. Malmström, M. Trollsås, D. Mecerreyes, G. Moineau, Ph. Dubois, and R. Jérôme. Dual living free radical and ring opening polymerizations from a double-headed initiator. *Macromolecules*, 31(2) :213–219, 01 [1998].
- [233] D. Mecerreyes, G. Moineau, P. Dubois, R. Jérôme, J. L. Hedrick, C. J. Hawker, E. E. Malmstrom, and M. Trollsas. Simultaneous dual living polymerizations : a novel one-step approach to block and graft copolymers. Angew. Chem. Int. Ed., 37 :1274–1276, [1998].
- [234] J. Vinas, N. Chagneux, D. Gigmes, T. Trimaille, A. Favier, and D. Bertin. Sg1-based alkoxyamine bearing a n-succinimidyl ester : A versatile tool for advanced polymer synthesis. *Polymer*, 49(17):3639–3647, [2008].
- [235] N. Chagneux, T. Trimaille, M. Rollet, E. Beaudoin, P. Gérard, D. Bertin, and D. Gigmes. Synthesis of poly(n-butyl acrylate)-b-poly(e-caprolactone) through combination of sg1 nitroxide-mediated polymerization and sn(oct)2-catalyzed ring-opening polymerization : study of sequential and onestep approaches from a dual initiator. *Macromolecules*, 42 :9435–9442, [2009].
- [236] Y. Yagci and M. A. Tasdelen. Mechanistic transformations involving living and controlled/living polymerization methods. Prog. Polym. Sci., 31 :1133–1170, [2006].
- [237] J. M. Messman, A. D. Scheuer, and R. F. Storey. Synthesis and characterization of a-b-a triblock copolymers derived from chloro-telechelic poly(l-lactide) : combining ring-opening polymerization (rop) and atom transfer radical polymerization (atrp). *Polymer*, 46(11) :3628–3638, 5 |2005|.
- [238] I. Ydens, P. Degée, P. Dubois, J. Libiszowski, A. Duda, and S. Penczek. Combining atrp of methacrylates and rop of l,l-dilactide and epsilon-caprolactone. *Macromol. Chem. Phys.*, 204(1):171–179, |2003|.
- [239] C. Lefay, D. Glé, M. Rollet, J. Mazzolini, D. Bertin, S. Viel, C. Schmid, C. Boisson, F. D'Agosto, D. Gigmes, and C. Barner-Kowollik. Block copolymers via macromercaptan initiated ring opening polymerization. J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem., 49(3) :803–813, [2011].
- [240] R. C. Pratt, B. G. G. Lohmeijer, D. A. Long, P. N. P. Lundberg, A. P. Dove, H. Li, C. G. Wade, R.t M. Waymouth, and J. L. Hedrick. Exploration, optimization, and application of supramolecular thiourea-amine catalysts for the synthesis of lactide (co)polymers. *Macromolecules*, 39(23):7863– 7871, 2011/10/01 [2006].
- [241] X. Yu, X. Tang, and C. Pan. Synthesis, characterization and self-assembly behavior of six-armed star block copolymers with triphenylene core. *Polymer*, 46(24) :11149–11156, 11 [2005].
- [242] L. Luo, M. Ranger, D. G. Lessard, D. Le Garrec, S. Gori, J.-C. Leroux, S. Rimmer, and D. Smith. Novel amphiphilic diblock copolymer of low molecular weight poly(n-vinylpyrrolidone)-blockpoly(d,l-lactide) : Synthesis, characterization, and micellization. *Macromolecules*, 37(11) :4008– 4013, 05 |2004|.
- [243] D. Le Garrec, S. Gori, L. Luo, D. Lessard, D. C. Smith, M. A. Yessine, M. Ranger, and J. C. Leroux. Poly(n-vinylpyrrolidone)-block-poly(d,l-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydro-phobic anticancer drugs : in vitro and in vivo evaluation. J. Controlled Release, 99(1) :83–101, 9 [2004].
- [244] T.W. Chung, K.Y. Cho, H.-C. Lee, J.W. Nah, J.H. Yeo, T. Akaike, and C.S. Cho. Novel micelleforming block copolymer composed of poly (e-caprolactone) and poly(vinyl pyrrolidone). *Polymer*, 45(5):1591–1597, [2004].
- [245] I. Bartolozzi, R. Solaro, E. Schacht, and E. Chiellini. Hydroxyl end-capped macromers of n-vinyl-2-pyrrolidinone as precursors of amphiphilic block copolymers. *Eur. Polym. J.*, 43(11) :4628–4638, |2007|.
- [246] A. K. Mishra, V. K. Patel, N. K. Vishwakarma, C. S. Biswas, M. Raula, A. Misra, T. K. Mandal, and B. Ray. Synthesis of well-defined amphiphilic poly(e-caprolactone)-b-poly(n-vinylpyrrolidone) block copolymers via the combination of rop and xanthate-mediated raft polymerization. *Macromolecules*, 44(8) :2465–2473, 03 |2011|.
- [247] X. Li, Z. Yang, K. Yang, Y. Zhou, X. Chen, Y. Zhang, Y. Wang, F.and Liu, and L. Ren. Selfassembled polymeric micellar nanoparticles as nanocarriers for poorly soluble anticancer drug ethaselen. *Nanoscale Res. Lett.*, 4(12) :1502–1511, [2009].
- [248] M.-H. Gaucher, G.and Dufresne, V. P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, and J.-C. Leroux. Block copolymer micelles : preparation, characterization and application in drug delivery. J. Controlled Release, 109(1-3) :169–188, 12 |2005|.
- [249] L. Yang, A. El Ghzaoui, and S. Li. In vitro degradation behavior of poly(lactide)-poly(ethylene glycol) block copolymer micelles in aqueous solution. Int. J. Pharm., 400(1-2) :96–103, [2010].
- [250] P. Ma, S. Liu, Y. Huang, L. Chen, X.and Zhang, and X. Jing. Lactose mediated liver-targeting effect observed by ex vivo imaging technology. *Biomaterials*, 31(9) :2646–2654, 3 [2010].
- [251] F. R. Mayo and F. M. Lewis. Copolymerization. i. a basis for comparing the behavior of monomers in copolymerization; the copolymerization of styrene and methyl methacrylate. J. Am. Chem. Soc., 66 :1594–1601, |1944|.
- [252] M. Fineman and S.D. Ross. Linear method for determining monomer reactivity ratios in copolymerization. J. Polym. Sci., 5(2) :259–265, [1950].

- [253] T. Kelen and F. Tüdos. Analysis of the linear methods for determining copolymerization reactivity ratios. i. a new improved linear graphic method. J. Macromol. Sci., Chem., A9(1):1–27, [1975].
- [254] M.-G. Baek and R. Roy. Relative lectin binding properties of t-antigen-containing glycopolymers : Copolymerization of n-acryloylated t-antigen monomer vs. graft conjugation of aminated t-antigen ligands onto poly(n-acryloxysuccinimide). *Macromol. Biosci.*, 1(7) :305–311, |2001|.
- [255] Y. L. Hu, Z.and Chunyan and H. C. Pan. Synthesis of well-defined glycoconjugate polyacrylamides via preactivated polymers prepared by atrp. J. Appl. Polym. Sci., 98(1) :189–194, [2005].
- [256] K.V. Gujraty, M.J. Yanjarappa, A. Saraph, A. Joshi, J. Mogridge, and R.S. Kane. Synthesis of homopolymers and copolymers containing an active ester of acrylic acid by raft : Scaffolds for controlling polyvalent ligand display. J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem., 46(21) :7249–7257, |2008|.
- [257] J. Zhang, X. Jiang, Y. Zhang, Y. Li, and S. Liu. Facile fabrication of reversible core cross-linked micelles possessing thermosensitive swellability. *Macromolecules*, 40(25) :9125–9132, |2007|.
- [258] H. Kakwere and S. Perrier. Orthogonal "relay" reactions for designing functionalized soft nanoparticles. J. Am. Chem. Soc., 131(5) :1889–1895, [2009].
- [259] P. Relogio, M.-T. Charreyre, J.P.S. Farinha, J.M.G. Martinho, and C. Pichot. Well-defined polymer precursors synthesized by raft polymerization of n,n-dimethylacrylamide/n-acryloxysuccinimide : random and block copolymers. *Polymer*, 45(26) :8639–8649, [2004].
- [260] M.D. Rowe, D.H. Thamm, S.L. Kraft, and S.G. Boyes. Polymer-modified gadolinium metal-organic framework nanoparticles used as multifunctional nanomedicines for the targeted imaging and treatment of cancer. *Biomacromolecules*, 10(4) :983–993, [2009].
- [261] T. Delair, M.-H. Charles, P. Cros, A. Laayoun, B. Mandrand, and C. Pichot. Synthesis and characterization of nucleic acid-(co)polymer conjugates : application to diagnostics. *Polym. Adv. Technol.*, 9(6) :349–361, |1998|.
- [262] A. Favier, F. D'Agosto, M.-T. Charreyre, and C. Pichot. Synthesis of n-acryloxysuccinimide copolymers by raft polymerization, as reactive building blocks with full control of composition and molecular weights. *Polymer*, 45(23):7821–7830, [2004].
- [263] Y. Li, I. Akiba, S. Harrisson, and K. L. Wooley. Facile formation of uniform shell-crosslinked nanoparticles with built-in functionalities from n-hydroxysuccinimide-activated amphiphilic block copolymers. Adv. Funct. Mater., 18:551–559, [2008].
- [264] B. De Lambert, C. Chaix, M.-T. Charreyre, T. Martin, A. Aigoui, A. Perrin-Rubens, C. Pichot, and B. Mandrand. Block copolymer-oligonucleotide conjugates for genotyping on microarrays. Anal. Biochem., 373(2) :229–238, |2008|.

- [265] M.-N. Erout, A. Elaissari, C. Pichot, and M.-F. Llauro. Radical-initiated copolymers of n-vinyl pyrrolidone and n-acryloxy succinimide : kinetic and microstructure studies. *Polymer*, 37(7) :1157– 1165, [1996].
- [266] K. Fukukawa, R. Rossin, A. Hagooly, E.D. Pressly, J.N. Hunt, B.W. Messmore, K.L. Wooley, M.J. Welch, and C.J. Hawker. Synthesis and characterization of core-shell star copolymers for in vivo pet imaging applications. *Biomacromolecules*, 9(4) :1329–1339, |2008|.
- [267] Y. Guillaneuf and P. Castignolles. Using apparent molecular weight from sec in controlled/living polymerization and kinetics of polymerization. J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem., 46(3):897– 911, [2008].
- [268] J. E. Mark. Polymer Data Handbook. Oxford University Press, [1999].
- [269] Y. Shimura. Solution properties of the methyl methacrylate-acrylonitrile copolymer. Bull. Chem. Soc. Jpn., [1967].
- [270] X.-H. Liu, Y.-G. Li, Y. Lin, and Y.-S. Li. 2-cyanoprop-2-yl dithiobenzoate mediated reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of acrylonitrile targeting a polymer with a higher molecular weight. J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem., 45(7) :1272–1281, |2007|.
- [271] P. Bilalis, M. Pitsikalis, and N. Hadjichristidis. Controlled nitroxide-mediated and reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of n-vinylpyrrolidone : Synthesis of block copolymers with styrene and 2-vinylpyridine. J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem., 44(1):659–665, [2005].
- [272] O. V. Nazarova, M. V. Solovskij, E. F. Panarin, V. M. Denisov, A. S. Khachaturov, A. I. Koltsov, and A. V. Purkina. Copolymerizations of n-vinylpyrrolidone and activated esters of unsaturated acids. *Eur. Polym. J.*, 28(1) :97–100, 1 [1992].
- [273] B. Clément. Synthèse de copolymères à blocs amphiphiles comme précurseurs de guides tubulaires pour la réparation nerveuse périphérique. PhD thesis, Université de Provence, |2010|.
- [274] M. Save and A. Soum. Controlled ring-opening polymerization of lactones and lactide initiated by lanthanum isopropoxide, 2. mechanistic studies. *Macromol. Chem. Phys.*, 203 :2591–2603, [2002].
- [275] S. R. A. Marque, C. Le Mercier, P. Tordo, and H. Fischer. Factors influencing the c-o-bond homolysis of trialkylhydroxylamines. *Macromolecules*, 33(12) :4403–4410, [2000].
- [276] P.-E. Dufils. Synthèse de polymèrs à architecture complexe. PhD thesis, Université de Provence, |2005|.
- [277] G. S. Kwon and T. Okano. Polymeric micelles as new drug carriers. Advanced Drug Delivery Reviews, 21(2) :107–116, 9 [1996].
- [278] M.-C. Jones and J.-C. Leroux. Polymeric micelles a new generation of colloidal drug carriers. Eur. J. Pharm. Biopharm., 48(2) :101–111, 9 [1999].

- [279] U. Kedar, P. Phutane, S. Shidhaye, and V. Kadam. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(6) :714–729, 12 [2010].
- [280] M. Yokoyama. Clinical applications of polymeric micelle carrier systems in chemotherapy and image diagnosis of solid tumors. J. Exp. Clin. Med., 3(4):151–158, [2011].
- [281] Y. Yang, Y. Kuang, Y. Liu, W. Li, Z. Jiang, L. Xiao, and M. Li. Immunogenicity of multipleepitope antigen gene of hcv carried by novel biodegradable polymers. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(1):65–72, 1 [2011].
- [282] A. Boudier, A. Aubert-Pouëssel, N. Mebarek, A. Chavanieu, J. Quentin, D. Martire, H. Boukhaddaoui, C. Gérardin, C. Jorgensen, J.-M. Devoisselle, P. Louis-Plence, and S. Bégu. Development of tripartite polyion micelles for efficient peptide delivery into dendritic cells without altering their plasticity. J. Controlled Release, 154(2):156–163, 9 [2011].
- [283] K. Y. Dane, C. Nembrini, A. A. Tomei, J. K. Eby, C. P. O'Neil, D. Velluto, M. A. Swartz, L. Inverardi, and J.y A. Hubbell. Nano-sized drug-loaded micelles deliver payload to lymph node immune cells and prolong allograft survival. J. Controlled Release, [2011].
- [284] V. Manolova, A. Flace, M. Bauer, K. Schwarz, P. Saudan, and M. Bachmann. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.*, 38 :1404–1413, [2008].
- [285] E. D. Goddard, N. J. Turro, P. L. Kuo, and K. P. Ananthapadmanabhan. Fluorescence probes for critical micelle concentration determination. *Langmuir*, 1(3) :352–355, 05 |1985|.
- [286] J.-R. Daban, M. Samsó, and S. Bartolomé. Use of nile red as a fluorescent probe for the study of the hydrophobic properties of protein-sodium dodecyl sulfate complexes in solution. Anal. Biochem., 199(2) :162–168, 12 [1991].
- [287] Z. L. Tyrrell, Y. Shen, and M. Radosz. Fabrication of micellar nanoparticles for drug delivery through the self-assembly of block copolymers. *Prog. Polym. Sci.*, 35(9) :1128–1143, 9 [2010].
- [288] H. Wang, S. Han, J. Sun, T. Fan, C. Tian, and Y. Wu. Preparation of dextran-poly(lactide)-1,2dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine copolymer and its micellar characteristics. *Carbohydr. Polym.*, 83(3) :1408–1413, [2011].
- [289] P. J. G. Coutinho. Photophysics and Biophysical Applications of Benzo[a]phenoxazine Type Fluorophores, volume 2007, pages 335–362. Springer New York, [2009].
- [290] P. J. G. Coutinho, E. M. S. Castanheira, M. Céu Rei, and M. E. C. D. Real Oliveira. Nile red and dcm fluorescence anisotropy studies in c12e7/dppc mixed systems. J. Phys. Chem B, 106(49) :12841–12846, 11 |2002|.

- [291] W.-C. Lee, Y.-C. Li, and I-M. Chu. Amphiphilic poly(d,l-lactic acid)/poly(ethylene glycol)/poly(d,llactic acid) nanogels for controlled release of hydrophobic drugs. *Macromol. Biosci.*, 6(10) :846–854, |2006|.
- [292] T. Trimaille, K. Mondon, R. Gurny, and M. Möller. Novel polymeric micelles for hydrophobic drug delivery based on biodegradable poly(hexyl-substituted lactides). Int. J. Pharm., 319(1-2):147–154, 8 [2006].
- [293] R. Gurny, N.A. Peppas, Harrington D.D., and G.S. Banker. Development of biodegradable and injectable lattices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 7(1), [1981].
- [294] P. Couvreur, G. Couarraze, and J. P. Devissaguet. Nanoparticles : Preparation and characterization. Drugs Pharm. Sci., 73 :183–211, [1996].
- [295] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. J. Controlled Release, 70(1-2) :1–20, [2001].
- [296] C. Vauthier and K. Bouchemal. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm. Res.*, 26(5):1025–1058, [2009].
- [297] H. Ibrahim, C. Bindschaedler, E. Doelker, P. Buri, and R. Gurny. Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. Int. J. Pharm., 87(1-3) :239–246, [1992].
- [298] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, E. Doelker, and H. Fessi. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm. Res.*, 15(7) :1056–1062, [1998].
- [299] H. Fessi, F. Puisieux, J. Ph Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int. J. Pharm., 55(1):R1–R4, [1989].
- [300] U. Bilati, E. Allémann, and E. Doelker. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 24(1):67–75, [2005].
- [301] C. S. Cho, Y. I. Jeong, T. Ishihara, R. Takei, J. U. Park, K. H. Park, A. Maruyama, and T. Akaike. Simple preparation of nanoparticles coated with carbohydrate-carrying polymers. *Biomaterials*, 18(4):323–326, [1997].
- [302] H.-J. Jeon, Y.-I. Jeong, M.-K. Jang, Y.-H. Park, and J.-W. Nah. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *Int. J. Pharm.*, 207(1-2) :99–108, [2000].
- [303] G. Dalwadi, H. Benson, and Y. Chen. Comparison of diafiltration and tangential flow filtration for purification of nanoparticle suspensions. *Pharm. Res.*, 22(12) :2152–2162, |2005|.
- [304] Y. Li, B. S. Lokitz, and Ch. L. McCormick. Raft synthesis of a thermally responsive abc triblock copolymer incorporating n-acryloxysuccinimide for facile in situ formation of shell cross-linked micelles in aqueous media. *Macromolecules*, 39(1):81–89, [2006].

- [305] C. Ladavière, C. Lorenzo, A. Elaissari, B. Mandrand, and T. Delair. Electrostatically driven immobilization of peptides onto (maleic anhydride-alt-methyl vinyl ether) copolymers in aqueous media. *Bioconjugate Chem.*, 11(2) :146–152, |2000|.
- [306] P. M. Valencia, M.I H. Hanewich-Hollatz, W.i Gao, F. Karim, R. Langer, R. Karnik, and O. C. Farokhzad. Effects of ligands with different water solubilities on self-assembly and properties of targeted nanoparticles. *Biomaterials*, 32(26) :6226–6233, 9 [2011].
- [307] J. L. Chollet, M. J. Jozwiakowski, K. R. Phares, M. J. Reiter, P. J. Roddy, H. J. Schultz, Q.V. Ta, and M. A. Tomai. Development of a topically active imiquimod formulation. *Pharm. Dev. Technol.*, 4(1):35–43, [1999].
- [308] S. Ruiz, C. Beauvillain, M.-N. Mévélec, P. Roingeard, P. Breton, D. Bout, and I. Dimier-Poisson. A novel cd4–cd8alpha+cd205+cd11b–murine spleen dendritic cell line : establishment, characterization and functional analysis in a model of vaccination to toxoplasmosis. *Cell. Microbiol.*, 7(11) :1659– 1671, [2005].
- [309] C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, and M.J. Shchlomchick. Immunobiology The immune system Health and Disease. Garland Science Publishing, [2005].
- [310] S. Schenderlein, M. Lück, and B. W. Müller. Partial solubility parameters of poly(d,l-lactide-coglycolide). Int. J. Pharm., 286(1-2) :19-26, 11 |2004|.

## Liste des figures

1.1	Structures chimiques de l'imiquimod (a), du resiquimod (b), et des bases azotées (c) gua-	
	nine, (d) uracile et (e) adénine respectivement des nucléosides guanosine, uridine et adénosine $% \mathcal{A}$	8
1.2	Structures chimiques de la $N$ -acétyl-D-glucosamine, du D-mannose et du D-fucose	10
1.3	Mécanisme simplifié de l'activation et de la modulation de la réponse immunitaire adapta-	
	tive par capture, digestion et présentation de l'antigène par les DC. Les principales étapes	
	de l'activation de l'immunité sont indiquées en bleu et les cytokines sécrétées sont indiquées	
	en vert (DC : cellule dendritique, Ag : antigène, IL : interleukine, RII : réponse immunitaire	
	innée, RIA : réponse immunitaire adaptative, CMH : complexe majeur d'histocompatibi-	
	lité, Th : cellule T auxiliaire, IFN : interféron)	13
1.4	Du virus aux vecteurs viraux, VLP et virosomes. (a) Le gène viral est remplacé par des	
	gènes d'intérêt. (b) La capside dérivée de virus est assemblée en VLP. (c) Des lipides et	
	protéines viraux sont reconstitués pour former des virosomes. En dessous, des images de	
	microscopie correspondant à chacun des systèmes. Source directe Mitragotri $et\ coll.^{45}$	25
1.5	Évolution de la répartition du temps d'élaboration d'un vaccin entre sa découverte et son	
	développement depuis 30 ans, source Rappuoli $et\ coll.^{78}$	32
1.6	Structure chimique du chitosane	33
1.7	Structures chimiques de polyesters aliphatiques et de polyanhydrides	35
1.8	Biomimétisme de structures entre le VIH, donné en exemple, et les systèmes génériques de	
	particules en développement pour mimer les structures de pathogènes, où des biomolécules	
	naturelles ou synthétiques se retrouvent au cœur $({ ullet})$ et à la surface $({ { \bf \land }})$ des particules	40
1.9	Systèmes génériques obtenus par fonctionnalisation de surface (a) à partir des fonctions	
	acide carboxylique activées et (b) à l'aide d'un copolymère amphiphile $\ldots \ldots \ldots \ldots$	41
1.10	(a) Schéma du système final souhaité pour ce projet de thèse avec une fonctionnalisation	
	au cœur ( $\bullet$ imiquimod) et à la surface ( $\blacktriangle$ peptide ou D-mannose). (b) Structure chimique	
	du copolymère amphiphile sélectionné PLA- $b$ -P(NAS- $co$ -NVP)	43
2.1	Mécanisme de polymérisation radicalaire conventionnelle	47

2.2	Illustration de l'affinement de la distribution des masses molaires par l'utilisation de la	
	polymérisation contrôlée (—) par rapport à la polymérisation classique (—)	49
2.3	Représentation schématique des caractères vivant et contrôlé d'une polymérisation	50
2.4	Mécanisme de transfert dégénératif, sur le quel repose le procédé RAFT $\ \ldots \ldots \ldots \ldots$	51
2.5	Mécanisme de terminaison réversible, sur le quel reposent les procédés ATRP et NMP	52
2.6	Évolution (a) de l'expression logarithmique de la conversion en fonction du temps et (b) de	
	la masse molaire et de l'indice de polymolécularité en fonction de la conversion en monomère.	53
2.7	Structures des agents de transfert	54
2.8	Mécanisme de transfert réversible régissant la polymérisation radicalaire par transfert	
	d'atome	55
2.9	Mécanisme régissant la NMP	56
2.10	Mécanisme régissant l'effet radical persistant	56
2.11	Structures chimiques de quelques nitroxy des utilisés en NMP $\hfill \hfill \h$	57
2.12	Structures chimique de quelques al coxyamines utilisées en NMP	58
2.13	Dissociation thermique de la MAMA-SG1 en un radical alkyle instable et un radical ni-	
	troxyle SG1 persistant	58
2.14	Les voies de synthèse du PLA	61
2.15	Mécanismes de réactions de transestérifications (a) intermoléculaire et (b) intramoléculaire	63
2.16	Mécanismes d'amorçage de la ROP anionique des lactones	63
2.17	Mécanismes d'amorçage de la ROP cationique du LA où $\mathbf{R}=\mathbf{H}$ pour l'acide trifluoromé-	
	than esulfonique et $R=CH_3$ pour le trifluorométhane sulfonate $\hfill \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	64
2.18	Mécanisme général de la ${\rm ROP}_{c/i}$ du lactide. (1) Coordination du métal sur le carbonyle	
	de l'ester cyclique et (2) insertion de l'alcoxy de dans la liaison oxygène-acyle $\ \ldots \ldots \ldots$	65
2.19	Structure chimique de l'octanoate d'étain	66
2.20	Mécanisme de la ROP du D,L-lactide, catalysée par l'octanoate d'étain	66
2.21	Stratégie de synthèse d'un copolymère dibloc par couplage macromoléculaire de deux ho-	
	mopolymères fonctionnels en bout de chaînes $\ldots \ldots \ldots$	67
2.22	Réaction de cycload dition d'Huisgen où $\mathbf{R}_1$ et $\mathbf{R}_2$ peuvent ainsi représenter deux homopo-	
	lymères	68
2.23	Stratégies de synthèse de copolymères diblocs AB à partir d'un amorceur difonctionnel.	
	(1) Polymérisations séquencées et (2) polymérisations simultanées des monomères A et B.	68
2.24	Schéma réactionnel permettant d'aboutir à l'amorceur difonctionnel ROP/NMP basé sur	
	le SG1	69
2.25	Stratégie de synthèse de copolymères diblocs AB à partir d'un macroamorceur, obtenu par	
	modification de bouts de chaînes de l'homopolymère A	70

2.26	Influence des paramètres température et quantité initiale de SG1 libre sur la cinétique	
	de polymérisation du NAS par NMP dans le DMF, $M_n$ visée 10 000 g.mol^-1. Les figures	
	(a), (c) et (e) représentent l'évolution du $\ln([M]_0/[M])$ en fonction du temps et les figures	
	(b), (d) et (f) celle de la conversion en fonction du temps : à différentes températures :	
	respectivement à 100, 110 et 120°C, avec $\blacksquare:0\%, \bullet:2.5\%, \blacktriangle:5\%$ et $\blacktriangledown:7.5\%$ molaire de	
	SG1 libre par rapport à la MAMA-SG1	76
2.27	Influence du choix des standards dans la détermination des $M_n$ et $I_p$ apparents de PNAS	
	obtenus par NMP. (a) CES dans le DMF suivant l'évolution de la conversion, de droite	
	à gauche à 25, 30, 35, 40, 45 et 50 min de polymérisation. (b) Évolution des $M_n$ appa-	
	rents (symboles pleins) et $I_p$ (symboles creux) en fonction de la conversion pour différents	
	standards $(\blacksquare,\Box)$ : PS, $(\blacktriangle, \bigtriangleup)$ : PMMA et $(\bigcirc, \bigcirc)$ : PEG	77
2.28	Spectre RMN <sup>1</sup> H d'un PNAS obtenu après précipitation dans l'éther diéthylique (DMSO-	
	<i>d6</i> , 400 MHz)	79
2.29	Évolution des $M_n$ et $I_p$ en fonction de la conversion, avec les valeurs de $M_n$ (symboles	
	pleins) et ${\cal I}_p$ (symboles creux) obtenues pour deux polymérisations du NAS par NMP	
	(110°C, 5% molaire SG1 libre, $M_{n,vis\acute{e}}=50~000~{\rm g.mol^{-1}})$ dans le PC ( $\blacksquare,\Box$ ) et dans le DMF	
	$(\bullet, \bigcirc)$ . CES DMF avec une calibration relative en PMMA	79
2.30	Chromatogrammes obtenus par CES DMF du PNAS-SG1 (—) et du PNAS- $b$ -PS ()	
	obtenu par NMP du styrène à partir du PNAS-SG1 dans le DMF	81
2.31	RMN $^{13}\mathrm{C}$ solide par rotation à l'angle magique (NH-21 : PNAS-SG1 et NH-22 : PNAS- $b$ -	
	PS, 400 MHz)	81
2.32	Graphiques des fractions molaires du NAS $(f_{NAS})$ ( $\blacksquare$ expérimentales et — théoriques)	
	dans le milieu réactionnel en fonction de la conversion molaire globale (a) dans le DMF,	
	sans SG1 libre et (b) avec 5% molaire de SG1 libre et (c) en présence de 5% de SG1 libre	
	dans le PC	84
2.33	(a) Évolution de la conversion (symboles pleins) et du $\ln([M]_0/[M])$ (symboles vides) en	
	fonction du temps. (b) Évolution des $M_n$ (symboles pleins) et $I_p$ (symboles vides) en	
	fonction de la conversion pour différentes $M_n$ visées (10 000 g.mol <sup>-1</sup> : $\blacktriangle$ ) (20 000 g.mol <sup>-1</sup> :	
	●) et (40 000 g.mol <sup>-1</sup> : ■), respectivement. NMP du NAS et de la NVP à 100°C, 1M total	
	de monomères dans le DMF, [SG1]/[MAMA-SG1]=0.05	85
2.34	${\rm Spectre\ RMN\ ^1H\ d'un\ P(NAS-{\it co-NVP})\ après\ précipitation\ dans\ l'éther\ diéthylique\ (DMSO-{\it co-NVP})\ après\ précipitation\ dans\ l'éther\ dans\ d$	
	<i>d</i> 6, 300MHz)	86
2.35	Schéma de synthèse du copolymère à blocs PLA- $b$ -P(NAS- $co$ -NVP) par couplage ROP/NMP	87
2.36	Spectre RMN <sup>1</sup> H d'un PLA $\alpha$ -acrylate après précipitation dans le méthanol (CDCl <sub>3</sub> , 400	
	MHz)	88

2.37	Mécanisme de l'addition radicalaire intermoléculaire de type 1,2 de l'alcoxyamine MAMA-	
	SG1 sur des oléfines $\alpha\text{-substituées}$ pour l'obtention d'al coxyamines secondaires comme	
	adduit 1-2	89
2.38	Profil réactionnel de la dissociation des alcoxyamines initiales et finales lors d'une réaction	
	d'addition radicalaire intermoléculaire de type 1-2. Source E. Dufils $^{276}$	90
2.39	Spectres <sup>1</sup> H (a) du PLA $\alpha$ -acrylate et (b) de la macro-alcoxyamine PLA-SG1 après préci-	
	pitation dans le méthanol (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz)	91
2.40	Fraction molaire du NAS $(f_{NAS})$ dans le milieu réactionnel en fonction de la conversion	
	molaire globale. NMP du NAS et de la NVP amorcée par le PLA-SG1 (8 500 g.mol^-1)	
	120°C, 5% de SG1 libre avec 1M totale de monomères dans le DMF (DP visé 300) $\ \ldots$ .	92
2.41	(a) Chromatogrammes obtenus par CES DMF du PLA-SG1 (—), du PLA- <i>b</i> -P(NAS- <i>co</i> -	
	NVP) pour une $M_n$ visée de 10 000 g.mol <sup>-1</sup> () et une $M_n$ visée de 20 000 g.mol <sup>-1</sup> (· · ·).	
	(b) Spectres RMN <sup>1</sup> H de bruts réactionnels à 15, 30, 45 et 60 min de haut en bas. Copo-	
	lymérisation du NAS et de la NVP à partir du PLA-SG1, 5% de SG1 libre, 1M totale de	
	monomères, $f_{NAS,0}=0.61$	93
2.42	Spectre <sup>1</sup> H d'un PLA- $b$ -P(NAS- $co$ -NVP) purifié par précipitation dans un mélange métha-	
	nol/éther diéthylique (v/v) (CDCl_3, 400MHz)	94
3.1	Détermination de la CMC par l'étude de l'évolution de la tension superficielle en fonction	
	de la concentration en tensioactifs $\ldots \ldots \ldots$	99
3.2	Graphiques (a) de l'intensité de fluorescence émise par le Nile Red et (b) de la longueur	
	d'onde d'émission maximale $(\lambda_{\acute{em},max})$ en fonction de la concentration de copolymère pour	
	Copo1 ( $\blacksquare$ ), Copo2 ( $\bigcirc$ ) et Copo3( $\blacktriangle$ ) et Copo4 ( $\checkmark$ )	01
3.3	Spectres RMN <sup>1</sup> H, de bas en haut : (a) PLA- <i>b</i> -P(NAS- <i>co</i> -NVP), (b) copolymère glucosylé,	
	(c) D-glucosamine, (d) copolymère mannosylé et (e) D-mannosamine (2.7 équivalents de	
	sucre par rapport aux fonctions ester de NS, température ambiante) (DMSO- $d6$ , 400 MHz) 1	03
3.4	Conformation chaise de la D-mannosamine et de la D-glucosamine	04
3.5	Graphiques (a) de l'intensité de fluorescence émise par le Nile Red et (b) de la longueur	
	d'onde d'émission maximale $(\lambda_{\acute{em},max})$ en fonction de la concentration en copolymère pour	
	Copo2-gluc ( $\blacksquare$ ), Copo2-man ( $\bigcirc$ ) et Copo2-eth ( $\blacktriangle$ )	06
3.6	Spectres de fluorescence des milieux de micelles seules (), de l'eau-imiquimod ()	
	et des micelles-imiquimod (), obtenus après 24h d'incubation sur roue à température	
	ambiante. $\lambda_{ex}$ =325 nm, [imiquimod] =1.28 mg.mL <sup>-1</sup> , [micelles] = 6.4 mg.mL <sup>-1</sup>	07

3.7	(a) Spectres de fluorescence de micelles Mic-Copo1 (), Mic-Copo2 (), Mic-Copo-3	
	(—) et Mic-Copo4 (—). Micelles à 4 mg.mL <sup>-1</sup> , incubées avec 0.4 mg.mL <sup>-1</sup> d'imiquimod	
	pendant 24 h. Centrifugation à 1 377 g, dilution 20 fois dans le DMSO, $\lambda_{ex}{=}325$ nm,	
	$\lambda_{em}{=}350$ nm. (b) Droite de calibration de l'imiquimod solubilisée dans une solution 19 : 1	
	de DMSO : eau	107
4.1	Stabilité colloïdale des NP de PLA nues ( $\bigcirc$ ) versus NP de PLA-copolymère ( $\blacksquare$ ) obtenues	
	par diafiltration	117
4.2	Stabilité colloïdale des NP de PLA nues ( $\bigcirc$ ) versus NP de PLA-copolymère ( $\blacksquare$ ) obtenues	
	par nanoprécipitation	120
4.3	Clichés de MEB de NP de PLA obtenues par nanoprécipitation, sans copolymère ((a) et	
	(b)) avec copolymère ((c) et (d)), grossissement 60 000 pour (a) et (c) et 120 000 pour (b)	
	et (d)	121
4.4	Évolution du taux d'hydrolyse des fonctions ester de NS disponibles à la surface des NP	
	(températures du bain utilisées pour l'évaporation du solvant lors de la préparation des	
	NP : 20°C (■) et 30°C (●)) et pour la préparation de micelles de copolymère : 30°C (▲)	
	en fonction du temps	124
4.5	Chromatogrammes, de bas en haut, de la NHS libérée, après formation des NP ((a) $t=0$	
	et (b) $t=15h$ ) en comparaison avec (c) l'hydrolyse totale	125
4.6	Évolution du taux de couplage (- <b>-</b> - pour le peptide taggé et pour le peptide non-taggé)	
	et de l'aire du pic de NHS obtenu par HPLC sur les surnageants (- $\Box$ - pour le peptide taggé	
	et - O- pour le peptide non-taggé) au cours du temps. 11.3 mg de peptide taggé et 13 mg	
	de peptide non-taggé par g de NP	128
4.7	Isothermes de couplage obtenues pour le peptide taggé $(\blacksquare)$ et le peptide non-taggé $(\bigcirc)$ .	130
5.1	Évolution typique de l'expression des marqueurs CD40, CD11c, CD80, CD86, CD95,	
	CD205, CMH I et CMH II après stimulation des SRDC par du LPS. Image extraite de	
	Ruiz $et \ coll.^{308}$ représentant le nombre d'événements en fonction de l'intensité de fluorescence	e138
5.2	Influence des différentes formulations sur l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) par	
	cellule de différents marqueurs. Pour tous les graphiques de gauche à droite : NS (non-	
	stimulée), LPS, micelles glucosylées, micelles glucosylées/imiquimod, micelles mannosylées,	
	$micelles\ mannosylées/imiquimod,\ micelles\ neutres,\ micelles\ neutres/imiquimod\ et\ référence$	
	imiquimod	139
5.3	Clichés de microscopie de DC humaines après 48h de stimulation avec différentes formula-	
	tions (Microscope Nikon, logiciel d'acquisition Metaview)	141

5.4	Influence des différentes formulations sur l'IFM de différents marqueurs. Pour tous les	
	graphiques de gauche à droite : NS (non-stimulée), LPS, micelles glucosylées, micelles	
	glucosylées/imiquimod, micelles mannosylées, micelles mannosylées/imiquimod, micelles	
	neutres, micelles neutres/imiquimod, référence imiquimod, NP de PLA-copolymère couplé	
	avec le peptide KKK-IL-1 $\beta$ et NP de PLA nues	142
5.5	Influence du LPS et de nos formulations sur la viabilité cellulaire de DC humaines (48h de	
	mise en contact). De gauche à droite : NS (non-stimulée), LPS, micelles glucosylées, micelles	
	glucosylées/imiquimod, micelles mannosylées, micelles mannosylées/imiquimod, micelles	
	neutres, micelles neutres/imiquimod, référence imiquimod et NP de PLA de copolymère	
	couplé avec le peptide KKK-IL-1 $\beta$ $\ldots$	143
6.6	Schéma de synthèse du $N$ -acryloxy succinimide $\ldots \ldots \ldots$	155
6.7	NMP du NAS et de la NVP à partir de la MAMA-SG1 $\hdots$	156
6.8	NMP du NAS et de la NVP à partir de la MAMA-SG1 $\hdots$	157
6.9	ROP du ${\tt D,L}\mbox{-}{\tt lactide},$ amorcée par le HEA et catalysée par le ${\tt Sn}({\tt Oct})_2$ $\hdots$	158
6.10	Addition intermoléculaire radicalaire de type 1-2 de la MAMA-SG1 sur la liaison vinylique $% \mathcal{A}$	
	en bout de chaîne du PLA $\alpha\text{-acrylate}$	159
6.11	NMP du NAS et de la NVP à partir de la macro-alcoxyamine PLA-SG1 $\ldots$	159
6.12	(a) Spectres de fluorescence typiquement obtenus de l'imiquimod dans le DMSO et (b)	
	droite de calibration pour le dosage de l'imiquimod dans le DMSO (y= $26.5x+10.5$ , R <sup>2</sup> = $0.99$ )	165

## Liste des tableaux

1	Impact de le vaccination sur les maladies aux États-Unis, avec le pic de la maladie, un état	
	du nombre de cas reportés en 2001 et le pourcentage de réduction de la maladie, source	
	O'Hagan <i>et coll.</i> <sup>2</sup>	vii
1.1	Les différentes classes de pathogènes illustrées par quelques exemples de pathogènes connus	4
1.2	Les TLR et quelques ligands de reconnaissance associés, sources principales Nasu $et\ coll.^9$	
	et Akira <i>et coll.</i> <sup>13</sup>	7
1.3	Les récepteurs NLR et leurs ligands ou signaux dangers associés, source Geddes $et\ coll.^{18}$	
	et Shaw <i>et coll.</i> <sup>22</sup>	9
1.4	Adjuvants alternatifs en cours de développement, source O'Hagan^2 $\hdots$	22
2.1	Caractéristiques de deux alcoxyamines basées sur le nitroxyde SG1	59
2.2	Influence des conditions expérimentales sur les valeurs des rapports de réactivité $r_{NAS}$ et	
	$r_{NVP}$ déterminées suivant l'équation intégrée de copolymérisation par corrélation des don-	
	nées expérimentales et théoriques par la méthode des moindres carrés. Résultats obtenus	
	avec une erreur maximale de 5%	84
2.3	Récapitulatif des masses molaires obtenues pour plusieurs PLA suivant différentes mé-	
	tho des en comparaison avec les valeurs théoriques attendues. (a) ${\cal M}_n$ déterminées par	
	calibration universelle par CES THF et (b) ${\cal M}_n$ obtenues suivant la méthode de Save	88
2.4	Liste de quelques copolymères $\mathrm{PLA}\xspace{-}b\xspace{-}\mathrm{P}(\mathrm{NAS}\xspace{-}co\xspace{-}\mathrm{NVP})$ utilisés dans la suite de l'étude	
	pour l'élaboration de nanoparticules et/ou micelles, avec les valeurs de $M_n$ des différents	
	blocs, $M_n$ obtenues (a) par RMN <sup>1</sup> H et (b) par CES dans le DMF $\ldots \ldots \ldots \ldots$	94
3.1	Caractéristiques des micelles de PLA- <i>b</i> -P(NAS- <i>co</i> -NVP)	.01
3.2	Influence du nombre d'équivalents de sucre et de la température sur l'aminolyse des fonc-	
	tions ester de NS du Copo2 par la D-glucosamine (D-gluc) et la D-mannosamine (D-man).	
	TA : température ambiante $(25^{\circ}C)$	.04

3.3	Encapsulation de l'imiquimod dans quatre solutions de micelles élaborées à partir de quatre	
	copolymères PLA- $b\mbox{-}P(\mbox{NAS-}\mbox{\it co-NVP})$ différents avec $[\mbox{imi}]_{enc}$ la concentration en imiquimod	
	encapsulé	108
3.4	Encapsulation d'imiquimod dans les micelles de copolymères glucosylé (Copo2-gluc), man-	
	nosylé (Copo2-man) ou obtenu après réaction avec l'éthanolamine (Copo2-eth) $\ \ldots \ \ldots$	108
4.1	Caractéristiques des NP de PLA et NP de PLA-copolymère élaborées par diafiltration	116
4.2	Caractéristiques des NP de PLA nues et des NP de PLA-copolymère, obtenues par nano-	
	précipitation à l'aide d'un système de coulée seringue-aiguille (nd : non déterminé)	118
4.3	Caractéristiques des NP de PLA-copolymère obtenues par nanoprécipitation à l'aide d'une	
	ampoule de coulée (nd : non déterminé). $\ast$ : lot préparé dans les conditions mises au point	
	par l'équipe : i.e. une multiplication par dix du volume des phases (organique et aqueuse)	
	par rapport à nos conditions et ** lot préparé en divisant par deux l'échelle de production	
	utilisée par l'équipe : i.e. une multiplication par 5	119
4.4	Récapitulatif de la comparaison nanoprécipitation versus diafiltration	122
4.5	Effet de l'addition de l'éthanolamine sur la taille et le potentiel zêta de la dispersion de	
	NP (Copolymère $M_n(PLA)=19~000$ g.mol <sup>-1</sup> et $M_n(P(NAS-co-NVP))=18~000$ g.mol <sup>-1</sup> )	123
4.6	Influence du temps de réaction sur les taux de couplage des deux peptides sur les NP de	
	PLA-copolymère	128
4.7	Influence de la quantité de peptide introduite sur les taux de couplage des deux peptides	
	sur les NP de PLA-copolymère (24h de réaction)	129
4.8	Densités de molécules de peptides immobilisées sur les NP (diamètre moyen : 169 nm) et	
	nombre moyen de peptides par $\mu m^2$ et par NP $\hfill \hfill \h$	130
4.9	Influence du couplage covalent du peptide sur les tailles et potentiels zêta des NP obte-	
	nues. Potentiel zêta réalisé en milieu tampon pho sphate pH6. NP de PLA-copolymère $\!\!\!*$ :	
	dispersion de NP laissée en tampon phosphate p H 8 10 mM pendant 24 h sans peptide $\ .$ .	131
4.10	Caractéristiques des NP obtenues lors de l'encapsulation de l'imiquimod par nanopréci-	
	pitation d'une solution de PLA-imiquimod-DMSO (20 mg.mL-1) dans l'eau puis dialyse,	
	avec TE : taux d'encapsulation, $\mathrm{TE}_{th}$ : TE théorique, imi : imiquimod, NF : non filtré, F :	
	filtré, SN : surnageant et EE : efficacité d'encapsulation	133
6.1	Listes des réactifs utilisés	150
6.2	Masses au pic $(M_p$ en g.mol^-1) et $I_p$ des standards polymères utilisés en CES DMF LiBr $% \mathcal{A}_p$ .	153
6.3	$M_p$ et $I_p$ des standards polymères utilisés en CES THF $\ \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	154
6.4	Paramètres de Mark-Houwink du PS et du PLA dans le THF à 30°C	154

6.5	Valeurs des différents paramètres d'interaction, avec un volume molaire V $_{eau}{=}18~{\rm mL.mol^{-1}},$	
	$V_{ac\acute{e}tone} = 74.2 \text{ mL.mol}^{-1} \text{ et } V_{DMSO} = 71.0 \text{ mL.mol}^{-1} \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots$	167

- 6.8 Anticorps utilisés pour le marquage des DC humaines. FITC :  $\lambda_{ex}$ =488 nm, $\lambda_{\acute{em}}$ =518 nm, PE :  $\lambda_{ex}$ =488 nm, $\lambda_{\acute{em}}$ =575 nm et pour le PE-Cy5 :  $\lambda_{ex}$ =496 nm, $\lambda_{\acute{em}}$ =667 nm . . . . . 172

## Élaboration de nanoparticules de poly(acide lactique) multifonctionnelles comme adjuvants potentiels de vaccination

Résumé : La vaccination est l'un des moyens les plus efficaces de la médecine moderne dans le combat contre les maladies infectieuses. L'amélioration de l'efficacité des vaccins requiert la mise au point d'adjuvants permettant d'accroître la qualité de la réponse immunitaire. À titre d'exemple, les nanoparticules (NP) de poly(acide lactique) (PLA) constituent un système efficace pour la délivrance d'antigènes. Afin de renforcer leur potentiel vaccinal, ce travail de recherche a eu pour objectif d'élaborer des NP de PLA décorées en surface par des molécules immunostimulantes, le D-mannose ou un peptide dérivé de l'interleukine-1 $\beta$ , et au cœur, par l'iniquimod. Notre stratégie repose sur l'utilisation d'un tensioactif macromoléculaire composé d'un bloc de PLA et d'un bloc de poly (N-acryloxy succinimideco-N-vinylpyrrolidone) (P(NAS-co-NVP)), dont les fonctions ester de N-succinimidyle (NS) permettent le couplage de biomolécules. Ce copolymère a été synthétisé par combinaison de la polymérisation par ouverture de cycle et de la polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (NMP). Après l'étude de la copolymérisation du NAS et de la NVP par NMP à partir d'une alcoxyamine modèle (MAMA-SG1), leur copolymérisation a été réalisée à partir de la macro-alcoxyamine PLA-SG1, conduisant au copolymère PLA-b-P(NAS-co-NVP) désiré. Des NP de PLA ont alors été préparées par nanoprécipitation et diafiltration en présence du copolymère, conduisant à des tailles respectives de 150 et 500 nm. Des études de potentiel zêta et de spectrométrie UV ont démontré la présence des esters de NS à la surface des NP (2.4 fonctions.nm<sup>-2</sup>), disponibles pour le couplage des biomolécules. Des micelles de copolymère ont été également préparées, après substitution des esters de NS par des sucres, et permettent une encapsulation efficace de l'imiquimod, contrairement aux NP de PLA. Ces systèmes constituent une plateforme flexible d'adjuvants potentiels comme alternative aux adjuvants non biodégradables actuellement utilisés.

**Mots-clés :** Adjuvant, nanoparticules/micelles fonctionnelles, poly(acide lactique), copolymère amphiphile, polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes, polymérisation par ouverture de cycle, D-mannose, peptide, imiquimod, encapsulation

## Elaboration of poly(lactide) multifunctionalized nanoparticles as potential adjuvants for vaccination

Abstract : Vaccination represents one of the most powerful tools of medicine for the fight against infectious diseases. The improvement of vaccine efficiency needs the development of adjuvants able to increase the quality of the immune response. Poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles (NPs) represent an efficient system for antigen delivery. In order to improve their vaccine potential, the goal of this research work was to elaborate PLA NPs decorated at the surface with immunostimulatory molecules, D-mannose or peptide derived from interleukine- $1\beta$ , and into the core with imiquimod. Our strategy relies on the use of a macromolecular surfactant composed of a PLA block and a poly (N-acryloxy succinimideco-N-vinylpyrrolidone) (P(NAS-co-NVP)) block, whose N-succinimidyl (NS) activated esters allow the coupling of biomolecules. This diblock copolymer was synthesized by the combination of ring opening polymerization and nitroxide mediated polymerization (NMP). After the study of the copolymerization of NAS and NVP by NMP from the MAMA-SG1 model alkoxyamine, their copolymerization was performed from the macro-alkoxyamine PLA-SG1, leading to the desired copolymer PLA-b-P(NAS-co-NVP). PLA NPs were then prepared by nanoprecipitation and diafiltration, in the presence of the copolymer, leading to 150 nm and 500 nm sized particles, respectively. Studies of zeta potential and UV spectrometry demonstrated the presence of NS-activated ester at the NP surface (2.4 functions.nm<sup>-2</sup>), available for the coupling of biomolecules. Micelles from copolymer were also prepared, after substitution of ester with carbohydrates, to allow an efficient encapsulation of imiquimod, contrary to PLA NPs. These systems represent a flexible platform of potential adjuvants as an alternative to non-biodegradable adjuvants currently used.

 $\label{eq:keywords:Adjuvant, functionalized nanoparticles/micelles, poly(lactic acid), amphiphilic copolymer, nitroxide mediated polymerization, ring opening polymerization, D-mannose, peptide, imiquimod, encapsulation$