



HAL
open science

Evaluation de nanobagues comme vecteurs de délivrance de médicaments

Julien Ogier

► **To cite this version:**

Julien Ogier. Evaluation de nanobagues comme vecteurs de délivrance de médicaments. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT: . tel-00364262

HAL Id: tel-00364262

<https://theses.hal.science/tel-00364262>

Submitted on 25 Feb 2009

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

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

ORSAY

N° D'ORDRE :

**Université de Paris Sud
U.F.R. Scientifique d'Orsay**

THESE de DOCTORAT

Présentée par :

Julien Ogier

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

Discipline : Chimie

*Evaluation de Nanobagues comme Vecteurs de Délivrance de
Médicaments*

Travaux réalisés sous la direction de :
Charles Mioskowski

Soutenue le 29 Avril 2008 devant la commission d'examen :

<i>MM.</i>	<i>Pr Jean-Pierre Benoit</i>	<i>Rapporteur</i>
	<i>Dr Alberto Bianco</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Mme</i>	<i>Dr Annick Loiseau</i>	<i>Examinateur</i>
<i>MM.</i>	<i>Pr Cyrille Kouklovsky</i>	<i>Président du jury</i>
	<i>Dr Thomas Arnauld</i>	<i>Examinateur</i>
	<i>Dr Eric Doris</i>	<i>Directeur de thèse</i>

ORSAY

N° D'ORDRE :

<p style="text-align: center;">Université de Paris Sud U.F.R. Scientifique d'Orsay</p>
--

THESE de DOCTORAT

Présentée par :

Julien Ogier

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

Discipline : Chimie

*Evaluation de Nanobagues comme Vecteurs de Délivrance de
Médicaments*

Travaux réalisés sous la direction de :
Charles Mioskowski

Soutenue le 29 Avril 2008 devant la commission d'examen :

<i>MM.</i>	<i>Pr Jean-Pierre Benoit</i>	<i>Rapporteur</i>
	<i>Dr Alberto Bianco</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Mme</i>	<i>Dr Annick Loiseau</i>	<i>Examinateur</i>
<i>MM.</i>	<i>Pr Cyrille Kouklovsky</i>	<i>Président du jury</i>
	<i>Dr Thomas Arnauld</i>	<i>Examinateur</i>
	<i>Dr Eric Doris</i>	<i>Directeur de thèse</i>

REMERCIEMENTS

A Charles Mioskowski, à qui je veux rendre hommage dans ce mémoire et dont la disparition m'a beaucoup touché. Je tiens à souligner que la collaboration entre le CEA et les laboratoires Servier a été initiée par Miko sur des bases solides de travail et de confiance, qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions tout au long de ma thèse. Plus particulièrement, je retiendrai de Miko son accessibilité et l'homme de science qui a su nous transmettre lors de nos différentes discussions de travail son enthousiasme et son désir de connaissance.

J'adresse ma profonde reconnaissance à François Lefoulon pour m'avoir accueilli dans son équipe de synthèse des laboratoires Servier à Orléans et pour m'avoir permis de mener à bien ces travaux de thèse. Grâce à lui, j'ai pu découvrir et apprécier le monde de l'industrie pharmaceutique au cours de mes différents séjours à Orléans.

Je tiens à remercier Eric Doris de m'avoir encadré et de m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse dans le laboratoire du CEA à Saclay. Sa succession à Charles Mioskowski, comme directeur de thèse, m'a permis de continuer ma thèse dans le même état d'esprit et a largement contribué au succès de ces travaux.

Je voudrais dire un immense merci à Thomas Arnault, du service de synthèse des laboratoires Servier à Orléans, pour m'avoir encadré et donné l'occasion de collaborer avec de nombreuses personnes sur le centre d'Orléans au cours de cette thèse. Son accueil chaleureux m'a permis de m'adapter et de m'intégrer rapidement au laboratoire. Au-delà de ses compétences, je retiendrai particulièrement son enthousiasme, sa disponibilité et sa patience, en particulier lors nos nombreuses discussions.

Je tiens à faire part de ma gratitude à Annick Loiseau, Jean-Pierre Benoit, Alberto Bianco et Cyrille Kouklovsky pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je ne voudrais pas oublier tous ceux qui ont participé à ce travail au cours de ma thèse :

- *Au CEA, je remercie Géraldine Carrot, du laboratoire Léon Brillouin, de m'avoir initié à la diffusion des neutrons aux petits angles et de m'avoir permis d'utiliser et de connaître cette technique au cours de mes travaux. Je tiens aussi à remercier Jean-Philippe Renault et Serge Pin, du laboratoire de radiolyse, pour leurs*

implications dans la polymérisation d'acrylate par radiolyse. Je remercie également Olivier Loreau, du service de chimie bioorganique et de marquage pour son aide dans la synthèse marquée de surfactant.

- *A technologie Servier, je tiens à remercier Jean-Manuel Péan, Christophe Hermelin et Stéphanie Marsas, de l'institut d'innovation galénique, pour m'avoir aidé au cours de ma thèse et m'avoir permis de découvrir le monde de la galénique. Je remercie également Claire Boursier, Jean-Marie Delbos et Antoine Lhumeau, du Département de Pré-Développement Biopharmaceutique ADME, pour leurs disponibilités et leurs enthousiasmes qui m'ont permis d'effectuer des études d'accumulation et de distribution. Je veux aussi remercier le service d'analyse structurale et plus particulièrement Alain Petit et Nathalie Lancelot pour leurs aides et leurs disponibilités en RMN, Tristan Renauld et Fabien Rioult pour leurs efficacités en spectroscopie de masse. Enfin, Je remercie Mickael Lynch pour son aide en analyse thermique.*

Je tiens à remercier très chaleureusement tout le service de synthèse des laboratoires Servier à Orléans : Luc et Sandrine pour leurs disponibilités, François pour ses histoires passées, Sophie pour sa bonne humeur, Nadine pour tous les tracas que j'ai pu lui causer avec mes déplacements à Orléans, Jean-Yves pour son humour et toute l'aide qu'il m'a apporté au cours de ma thèse, et Hubert, pour m'avoir permis de prendre mes marques dès ma première venue, pour son humour fin et nos nombreuses discussions.

Je tiens également à remercier du fond du cœur tout le service de chimie bioorganique et de marquage avec qui j'ai passé trois ans très agréable. Je tiens particulièrement à remercier Bernard Rousseau pour son accueil, sa bonne humeur, son rire et sa disponibilité. Je remercie également Chantal Faux pour sa gentillesse et son assistance précieuse lors de mes nombreux oublis administratifs.

Je voudrais enfin remercier très particulièrement le laboratoire tritium. Je tiens à remercier Jean-Christophe pour son humour, pour m'avoir permis d'effectuer mes recherches sereinement sur SciFinder et pour son sens de l'observation affuté. Je remercie également Florence pour sa gentillesse et ses cakes délicieux, et Christelle pour sa bonne humeur et mes hématomes. Je voudrais remercier Guillaume pour son talent inné de chef d'orchestre ; Emerson pour l'effet de ses jeux de mots sur les enfants de son chef ; Alexander pour son aide dans l'amélioration de mon anglais littéraire ; Aude pour avoir apporté un morceau de Bretagne avec toi ; Fabien pour nous avoir initié à la culture belge ; Nathalie, Julia et Emilie pour nous avoir apporté vos sourires et votre bonne humeur ; Chloé, Christine, Kathalyn et Sébastien pour avoir créé le seul fan club du laboratoire ; Stéphane pour son amour des voitures et des belles carrosseries ; Marie-Laure pour avoir apporté l'autre moitié de la Bretagne.

Je tiens à dire un grand merci à Aurélie pour nos longues discussions sincères et enrichissantes, avec qui j'ai été heureux de partager ma paillasse pendant deux ans. A Sophie, je te remercie d'avoir apporté de la bonne humeur par tes fous rires dans le bureau et au labo, et d'avoir adopté le port du casque au ski pour éviter que je te défigure. Après Montpellier et Paris, qui sait où nous nous retrouverons !!!

A Nicolas, j'ai trouvé en toi un collègue de travail étonnant mais aussi, et surtout, nos séjours au ski, nos escapades au golf et nos sorties m'ont permis de bien te connaître et de trouver en toi un très bon ami. Ton amitié et ton soutien m'ont permis de rédiger cette thèse avec sérénité, et ton aide m'a permis de la corriger rapidement. Evidemment, il nous reste un chapitre à écrire ensemble avec une partie expérimentale conséquente.

Enfin, je voudrais remercier toute ma famille et mes proches, et en particulier mes parents, ma sœur et mon frère pour tout le soutien et l'aide qu'ils m'ont apporté. A Tatiana, je tiens à te remercier du fond du cœur pour ta présence, ton aide et ton soutien précieux tout au long de ces trois ans.

A2	Second coefficient du Viriel
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATG	Analyse thermogravimétrique
ATR-IR	<i>Attenuated Total Reflectance - Infrared</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyle
CMC	Concentration Micellaire Critique
CNT	<i>Carbon nanotube</i>
CPP	<i>Critical packing parameter</i>
CTAC	Chlorure d'héxadécyltriméthyle ammonium
CVD	<i>Chemical vapor deposition</i>
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DES	Système d'électroéluion directe
DIEA	Diisopropyléthylamine
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNPA	Diffusion des neutrons aux petits angles
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
DWNT	<i>Double-Walled Nanotube</i>
EDCI	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide hydrochloride
Gy	Gray
HIPCO	<i>High Pressure Carbon Monoxide</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
I(q)	Intensité diffusée
IV	Intra-Veineux
LINAC	Accélérateur Linéaire d'Electrons
Mapp	Masse Molaire apparente
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MWNT	<i>Multi-Walled Nanotube</i>
Na	Nombre d'Avogadro
NHS	<i>N</i> -Hydrosuccinimide
Ns	<i>Surfactant parameter</i>
NTA	Nitrilotriacétique
q	Vecteur d'onde
Rg	Rayon de giration
RGD	Arginine-Glycine-Acide Aspartique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i>

SiARNA	<i>Silencing Ribonucleic Acid</i>
SWNT	<i>Single-Walled Nanotube</i>
TMC	Température Micellaire Critique
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	Ultraviolet
ϵ	Coefficient d'extinction molaire

Sommaire

AVANT-PROPOS	19
CHAPITRE I NANOTECHNOLOGIES ET NANOMEDECINE	23
I-1- Introduction	25
I-2- Vectorisation par les nanoparticules de polymères	29
I-2-1- Nanosphères et nanocapsules de polymères	29
I-2-2- Inclusion de principes actifs dans les nanoparticules	31
I-2-3- Nanoparticules de première génération	32
I-2-4- Nanoparticules de deuxième génération	33
I-2-5- Nanoparticules de troisième génération	35
I-3- Vectorisation par les microsphères	38
I-3-1- Préparation des microsphères et inclusion de principes actifs	39
I-3-2- Dégradation des microsphères et relargage des principes actifs	41
I-3-3- Applications des microsphères	43
I-4- Vectorisation par les micelles de polymères	44
I-4-1- Les micelles de polymères	45
I-4-2- Inclusion de principes actifs dans les micelles de polymères	48
I-4-3- Ciblage et relargage contrôlé de principes actifs	49
I-5- Vectorisation par les liposomes et les vésicules	51
I-5-1- Liposomes et vésicules	52
I-5-2- Préparations des liposomes et des vésicules de polymères	54
I-5-3- Inclusion de principes actifs	56
I-5-4- Ciblage et relargage de principes actifs	57
I-6- Vectorisation par des dendrimères	59
I-6-1- Les dendrimères : structures et synthèses	59
I-6-2- Encapsulation de principes actifs par les dendrimères	62
I-7- Vectorisation par les nanotubes de carbone	64
I-7-1- Approche par fonctionnalisation covalente	65
I-7-2- Approche par fonctionnalisation non covalente	67
I-8- Conclusion	72
CHAPITRE II DU NANOTUBE DE CARBONE AUX NANOBAGUES	80
II-1- Les nanotubes de carbone	82
II-1-1- Les différentes formes allotropiques du carbone	82
II-1-2- Structure des nanotubes de carbone	85

II-1-3- Généralités sur la synthèse des nanotubes de carbone	86
II-1-3-1- Technique par décharge d'un arc électrique	86
II-1-3-2- Technique par ablation laser	87
II-1-3-3- Technique par décomposition catalytique	88
II-1-4- Purification des nanotubes de carbone	89
II-1-5- Synthèse de nanotubes de carbone multi parois à l'EPFL	89
II-1-5-1- Synthèse des nanotubes de carbone par arc électrique dans le laboratoire du Dr Forró	90
II-1-5-2- Purification des nanotubes de carbone par sédimentation	91
II-1-5-3- Nanotubes de carbone n-Tec (Norvège)	94
II-2- Autoorganisation des amphiphiles en solution et aux interfaces	95
II-2-1- Autoassemblages supramoléculaires d'amphiphiles en solution	95
II-2-2- Autoassemblages supramoléculaires d'amphiphiles aux interfaces	99
II-2-3- Autoassemblages d'amphiphiles à la surface de nanotubes de carbone	101
II-3- Objectif du projet « Nanobagues »	105
II-4- Nanobagues de première génération	106
II-4-1- Synthèse de la molécule amphiphile	106
II-4-1-1- Synthèse de la tête hydrophile « NTA »	106
II-4-1-2- Couplage de la tête hydrophile NTA avec l'acide 10,12-pentacosadiynoïque	107
II-4-2- Autoassemblage du surfactant II-4 autour de nanotubes de carbone	107
II-4-2-1- Détermination de la CMC de la molécule II-4	107
II-4-2-2- Autoassemblage de la molécule II-4 autour des nanotubes de carbone	112
II-4-3- Optimisation du ratio nanotubes de carbone / surfactants	116
II-4-4- Polymérisation des motifs diacétyléniques par irradiation $h\nu$	119
II-4-4-1- Mécanisme et structure de la polymérisation	119
II-4-4-2- Polymérisation des anneaux à la surface des nanotubes de carbone	122
II-4-5- Séparation des anneaux polymérisés des nanotubes de carbone	123
II-5- Synthèse de nanobagues doublement polymérisées	128
II-5-1- Synthèse et étude d'un amphiphile acrylate	128
II-5-1-1- Synthèse d'un amphiphile constitué d'un motif polymérisable acrylate	129
II-5-1-2- Autoassemblage de l'amphiphile II-11 à la surface de nanotubes de carbone	130
II-5-1-3- Méthode de polymérisation des motifs acrylates	131
II-5-1-4- Polymérisation des assemblages de II-11 sur MWNT au LINAC	133
II-5-2- Synthèse et étude d'un amphiphile doublement polymérisable	135
II-5-2-1- Synthèse de l'amphiphile polymérisable via les motifs diacétyléniques et acrylates	136
II-5-2-2- Autoassemblage et polymérisation de la molécule II-23 autour des nanotubes	138
II-6- Mise au point d'une nouvelle méthode d'extraction des anneaux	141
II-6-1- Système d'extraction par électroélution directe (DES)	141
II-6-2- Extraction des anneaux d'amphiphiles par électroélution directe	143

II-6-2-1- Extraction des anneaux formés à partir de l'amphiphile II-23	143
II-6-2-2- Extraction des anneaux formés à partir de l'amphiphile II-4	145
II-6-3- Caractérisations des anneaux formés à partir de la molécule II-4	147
II-6-3-1- Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	148
II-6-3-2- Diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA)	150
II-6-3-3- Calorimétrie différentielle à balayage (« DSC » : differential scanning calorimetry)	156
II-6-3-4- Conclusion	159
II-7- Conclusion	160
CHAPITRE III NANOBAGUES ET APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES	165
III-1- Introduction	167
III-2- Vectorisation de principes actifs hydrophobes dans les nanobagues	168
III-2-1- Structure et propriétés des nanobagues	168
III-2-2- Etude préliminaire d'inclusion	169
III-2-3- Molécule modèle : S39625	171
III-2-4- Etude de l'inclusion du S39625 dans les nanobagues	172
III-2-4-1- Etalonnage du S39625 en solution organique	172
III-2-4-2- Etude de la méthode d'inclusion du S39625 dans les nanobagues	173
III-2-4-3- Etude de l'effet d'un co-solvant sur le taux d'incorporation du S39625	176
III-2-4-4- Effet de la concentration des nanobagues sur l'inclusion de S39625	178
III-2-4-5- Détermination du taux d'inclusion du S39625 par HPLC	180
III-2-4-6- Comparaison des taux d'inclusion du S39625 avec différentes formulations	182
III-2-5- Etude toxicologique des nanobagues	183
III-2-6- Conclusion	184
III-3- Nouveau système de vectorisation du S39625	184
III-3-1- Autoassemblage supramoléculaire de l'amphiphile II-4 en solution	184
III-3-1-1- Structuration des amphiphiles en solution	184
III-3-1-2- Structurations de l'amphiphile II-4	186
III-3-2- Préparation et caractérisation des micelles de surfactants II-4	188
III-3-2-1- Etude de la polymérisation des micelles	189
III-3-2-2- Caractérisation des micelles par diffusion de la lumière	190
III-3-2-3- Caractérisation des micelles polymérisées par diffusion des neutrons aux petits angles	192
III-3-3- Etude de l'inclusion de principes actifs dans les micelles	196
III-3-3-1- Etude de l'inclusion du S39625	196
III-3-3-2- Etude de l'inclusion de principes actifs hydrophobes	201
III-3-3-3- Conclusion	205
III-3-4- Etude d'accumulation/élimination <i>in vivo</i> des micelles polymérisées	206
III-3-4-1- Synthèse de l'amphiphile III-6 et des micelles polymérisées radiomarquées au ¹⁴ C	206
III-3-4-2- Etude de l'accumulation/élimination des micelles polymérisées chez le rat	208

III-3-5- Conclusion	210
III-4- Fonctionnalisation des nanobaguettes et des micelles polymérisées	211
III-4-1- Fonctionnalisation par le 4-amino-3-hydroxy-1-sulfonatenaphtalène	212
III-4-2- Fonctionnalisation par de l'acide folique	213
III-4-3- Conclusion	215
III-5- Conclusion	216
CONCLUSION GENERALE	218
PARTIE EXPERIMENTALE	222
I- Généralités	224
II- Synthèse organique	228
II-1- Résultats expérimentaux du Chapitre II	228
II-2- Résultats expérimentaux du Chapitre III	249
III- Synthèse des nanobaguettes et encapsulation de principe actif	255
III-1- Procédure générale d'assemblage d'amphiphile à la surface de MWNTs	255
III-2- Procédure d'extraction par électrophorèse et électroélution	255
III-2-1- Extraction par électrophorèse sur gel d'agarose	255
III-2-2- Extraction par électroélution des nanobaguettes	256
III-2-3- Purification des nanobaguettes	256
III-3- Procédure d'extraction par électroélution directe	256
III-3-1- Extraction par le système d'électroélution directe	256
III-3-2- Purification des nanobaguettes	256
III-4- Procédure d'encapsulation de principe actif	257
III-5- Caractérisations complémentaires des nanobaguettes	257
III-5-1- Spectroscopie de masse MALDI TOF	257
III-5-2- Spectroscopie infra-rouge de réflexion totale atténuée (ATR-IR)	258
IV- Synthèse de micelles polymérisées et encapsulation de principes actifs	259
IV-1- Synthèse de micelles polymérisées	259
IV-2- Procédure d'encapsulation	259
IV-3- Etude RMN de l'inclusion de principes actifs (<i>chapitre III-3-3-2</i>)	260

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été financée par les laboratoires SERVIER. Elle s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le Service de Chimie Bioorganique et de Marquage (SCBM) du Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) à Saclay et le laboratoire de synthèse de Technologie SERVIER à Orléans.

Nous nous sommes proposés, au cours de ce travail de synthétiser, caractériser et évaluer des anneaux de tensio-actifs comme agents de vectorisation de médicaments.

Dans un premier chapitre, nous détaillerons quelques exemples de systèmes de vectorisation de médicaments décrits dans la littérature. Nous nous intéresserons plus particulièrement à leur structure, à leur mode de synthèse et aux voies d'inclusion des principes actifs. Enfin, les cibles thérapeutiques privilégiées de ces transporteurs seront présentées.

Dans le deuxième chapitre, nous discuterons de la structure et du mode de synthèse d'amphiphiles auto-assemblés sur support de nanotube de carbone. Ces auto-assemblages conduisent, après polymérisation et extraction du support carboné, à la formation de « nanobagues » hydrosolubles possédant un domaine hydrophobe. Nous avons tenté d'élucider la structure de ces nanostructures auto-assemblées et polymérisées par différentes techniques dont la diffusion de neutrons.

Enfin, dans un dernier chapitre, nous exposerons les résultats obtenus lors de l'évaluation de ces nanobagues comme vecteurs de médicaments. Une étude d'incorporation de principes actifs et de toxicité a montré le fort potentiel des nanobagues et de structures dérivées pour des applications à l'interface avec le vivant.

CHAPITRE I

NANOTECHNOLOGIES ET
NANOMEDECINE

I-1- Introduction

« Il y a une impression grandissante dans la communauté scientifique et technique : nous sommes en train d'entrer dans un nouvel âge d'or (...). Nous sommes sur le point d'être capable de construire des choses qui fonctionnent sur la plus petite échelle possible, atome par atome (...). Le siècle dernier nous a permis d'étudier le fonctionnement de la nanomachine biologique à un niveau de détail incroyable, les prochaines décennies vont nous permettre d'apprendre à modifier et adapter cette machinerie pour prolonger la qualité et la durée de vie ». Richard E. Smalley, prix Nobel de chimie en 1996, témoigna ainsi devant le Congrès américain en 1999 de l'émergence d'une nouvelle discipline scientifique : les nanotechnologies.¹

Depuis, les recherches dans ce domaine se sont multipliées pour tenter de découvrir les applications potentielles des nanotechnologies. Les crédits alloués à la recherche et au développement n'ont cessé d'augmenter ces dernières années, ainsi que le nombre de publications consacrées aux nanosciences (1000 publications en 1990 et 25000 publications en 2000).

Depuis quelques années, la médecine et la santé constituent des domaines majeurs où l'introduction de la nanotechnologie semble très prometteuse, en particulier pour la vectorisation de principes actifs médicamenteux.^{2,3} Ainsi, la nanomédecine découle de l'intégration de la nanotechnologie dans la médecine. Elle englobe le développement de systèmes nanométriques pour la multi-présentation de principes actifs et la vectorisation de médicaments. En effet, la résistance aux médicaments de certaines maladies infectieuses et cancers a contraint les médecins à administrer de plus fortes doses à des fréquences plus importantes. Cette évolution de la posologie a engendré une augmentation de la toxicité et du coût du traitement, ainsi qu'une diminution de la tolérance du patient.⁴ De plus, certains de ces principes actifs requièrent une formulation spécifique associée à des problèmes de solubilité, d'instabilité en milieu biologique (barrières enzymatiques entraînant leur dégradation et leur métabolisation rapide), de faible biodisponibilité (passage des barrières biologiques par le médicament pour atteindre son site d'action), ainsi qu'à des effets secondaires potentiels liés à l'accumulation d'un médicament sur son site d'action.⁵

Pour tenter de résoudre ces problèmes de dose et de formulation, les nanosciences offrent de nouveaux outils et une technologie qui permet de travailler à différents niveaux (atomique, moléculaire et supramoléculaire). Les échelles variées rendent possible le développement de vecteurs de médicaments avec des propriétés et des fonctions fondamentalement différentes.

Le challenge de la vectorisation est de transporter suffisamment de principe actif à travers les différentes barrières physiologiques pour atteindre le site d'action, et de traiter la maladie de façon efficace et peu toxique.³ Pour y parvenir, les systèmes de nanovecteurs présentent de nombreux avantages :

- Accroissement de la stabilité et de la solubilité du médicament : son inclusion dans le vecteur augmente sa biodisponibilité pour un relargage contrôlé dans le temps et un ciblage précis, et réduit sa toxicité ;
- Ciblage spécifique de par la taille, la distribution et la surface (charge, greffage de ligands, etc...) des particules utilisées ;
- Possibilité de créer des systèmes dont les tailles sont comparables à celles de la nature (ADN et protéines : quelques dizaines de nanomètres ; Cellules : quelques micromètres ; Figure I-1),
- Possibilité de vectoriser plusieurs principes actifs dans une même formulation.

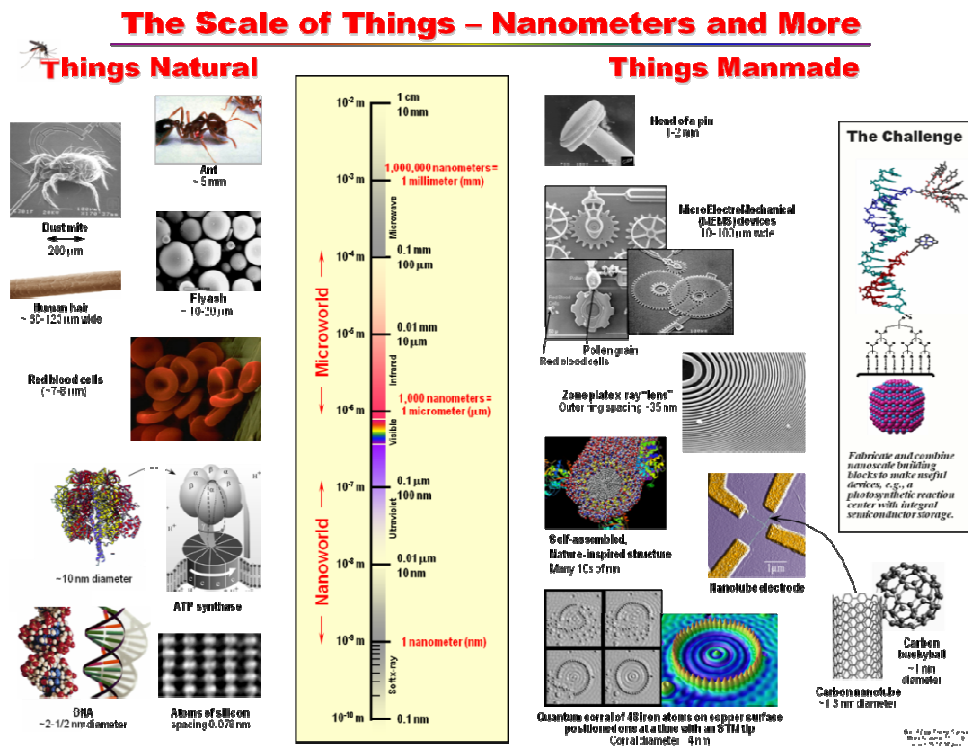


Figure I-1 – Echelle de taille des objets subcentimétriques naturels ou fabriqués par l’homme⁶

Deux grandes approches coexistent dans le domaine des nanotechnologies.⁷⁻¹² La première de type « top-down » (du haut vers le bas) consiste à miniaturiser des dispositifs existants. La seconde, dite « bottom-up » (du bas vers le haut), consiste à assembler (ou autoassembler) des atomes ou molécules, dans le but de constituer des architectures

nanométriques. Les domaines de la nanomédecine et des nanovecteurs découlent généralement de la deuxième approche, et reposent sur la synthèse de molécules ou polymères, mais également sur l'autoassemblage de ces petites molécules ou polymères sous différentes formes.¹³⁻¹⁸ Il connaît un essor important dans le traitement ciblé de maladies comme le cancer.

Deux types de vectorisation peuvent être employés pour amener les principes actifs vers leurs sites d'action : un ciblage passif ou actif.^{2,4,19-21}

La vectorisation passive repose sur les propriétés du nanovecteur et les caractéristiques particulières de l'environnement de son site d'action. Le but est alors d'accumuler le principe actif de façon sélective sur sa cible et d'éviter une distribution aléatoire. Cette technique se base sur la perméabilité des tissus tumoraux. Celle-ci provient de la vascularisation rapide des cellules cancéreuses, lors de leur croissance, qui engendre une architecture de la membrane avec des défauts et des espaces interstitiels. De ce fait, les nanovecteurs peuvent s'accumuler dans ces espaces (400 nm à 600 nm)²² par un phénomène appelé l'effet EPR (*enhanced permeability and retention*, perméabilité vasculaire accrue) et concentrer 10 à 100 fois plus de principe actif dans la cellule par cet effet que par l'administration du principe actif seul (Figure I-2).

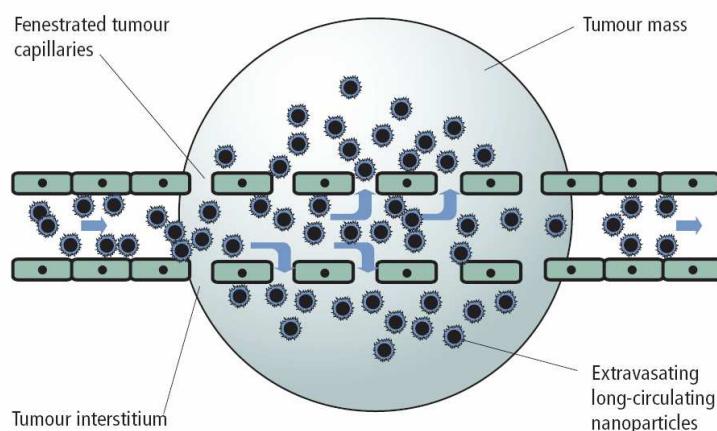


Figure I-2 – Effet de perméabilité vasculaire accrue⁴

De plus, la taille des nanovecteurs est un facteur déterminant pour leur évolution *in vivo*. Il a été montré que des nanovecteurs d'un diamètre inférieur à 200 nm présentent une diminution du taux d'élimination par les macrophages et un temps de circulation allongé en comparaison de vecteurs de plus grande taille. D'autre part, il a été observé que les vecteurs de diamètres inférieurs à 200 nm sont ceux qui se concentrent le plus dans les tumeurs cancéreuses.

Enfin, le recouvrement de la surface des nanovecteurs par des molécules hydrophiles (poly(éthylène glycol), polysaccharide, poloxamère, etc...) augmente le temps de circulation

(temps de demi-vie plasmatique) et réduit la capture hépatique (élimination *via* les macrophages). Les chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) créent ainsi une barrière hydrophile à la surface du nanovecteur et bloquent l'adhésion des opsonines (protéines plasmatiques reconnues par les récepteurs transmembranaires des macrophages, responsables de l'élimination des substances étrangères). Ces vecteurs « peggylés » sont donc « invisibles » vis-à-vis de l'organisme et peuvent être considérés comme des vecteurs « furtifs » ou « de deuxième génération ».

La vectorisation active, elle, repose sur le couplage d'un nanovecteur avec un ligand capable de reconnaître de façon spécifique des antigènes ou des récepteurs surexprimés à la surface de cellules cibles (cellules tumorales, endothéliales, ou sanguines). Ce type de vectorisation s'appuie sur les interactions lectine-hydrate de carbone, ligand-récepteur ou anticorps-antigène. De ce fait, l'accumulation d'un nanovecteur au niveau d'une cellule cible est possible par l'utilisation de méthodes d'adressage (Figure I-3 – A).

Par exemple, la prolifération des cellules tumorales étant rapide, celles-ci surexpriment certains récepteurs tels que les récepteurs folate ou d'intégrine ($\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_v\beta_5$). La séquence tripeptidique arginine/glycine/acide aspartique (RGD) est alors capable de reconnaître les récepteurs d'intégrine $\alpha_v\beta_3$, tandis que la modification de la surface du nanovecteur par l'acide folique permet également un ciblage spécifique.

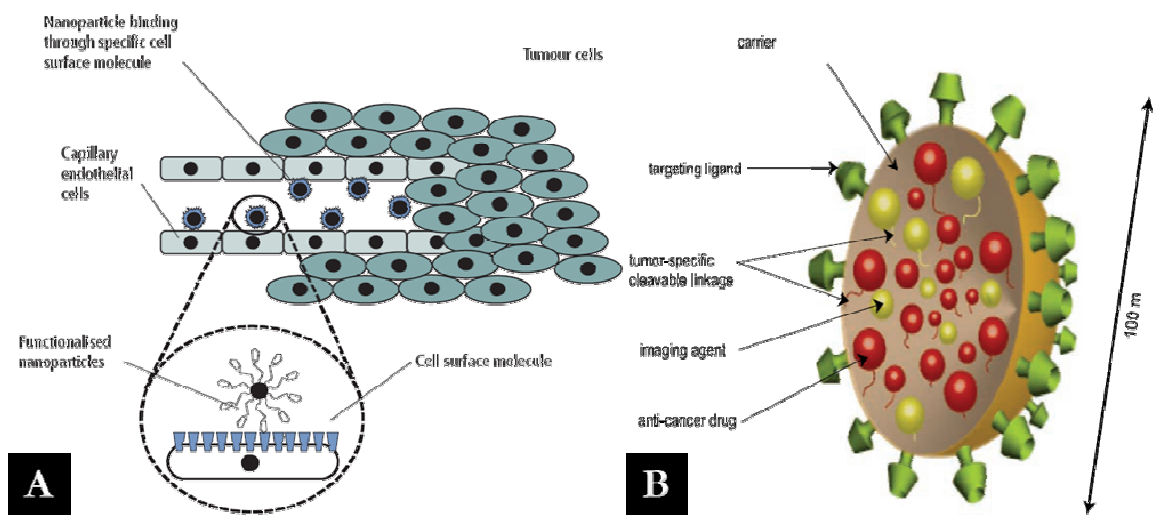


Figure I-3 – (A) Principe de la vectorisation active – (B) Vecteur de troisième génération

Enfin, la combinaison des caractéristiques des vecteurs passifs et actifs permet d'obtenir des nanovecteurs dits « de 3^{ème} génération » (Figure I-3 – B). Ces vecteurs allient donc les caractéristiques suivantes :

- Particules de taille inférieure à 200 nm ;

- Surface hydrophile (PEG, polysaccharides ou poloxamères par exemple) pour induire la « furtivité » ;
- Ligand à la surface du nanovecteur capable de reconnaître de façon spécifique des antigènes ou des récepteurs surexprimés à la surface de cellules cibles ;
- Ligands d'imagerie *in vivo* (quantum dots, nanoparticules de silice, nanoparticules magnétiques ou sonde SERS) pour suivre la distribution du vecteur.

Différents types de matériaux ont été utilisés pour élaborer des nanovecteurs pour le ciblage thérapeutique de certaines maladies. Seuls les vecteurs organiques seront développés dans ce premier chapitre, et plus particulièrement les nanoparticules de polymères, les microsphères, les micelles de polymères, les liposomes, les dendrimères et les nanotubes de carbone.

I-2- Vectorisation par les nanoparticules de polymères

Le développement de systèmes de vectorisation a permis d'améliorer les propriétés thérapeutiques et pharmacologiques des principes actifs, administrés seuls auparavant.²³ En effet, certains principes actifs ont des propriétés intrinsèques problématiques : faible solubilité (toxicité associée à la précipitation), dégradation rapide *in vivo* (perte d'activité), pharmacocinétique défavorable (élimination trop rapide impliquant l'administration de fortes doses), biodistribution faible (tissus sains touchés, dose limite associée aux effets secondaires comme la toxicité cardiaque), faible biodisponibilité (faible traversée des barrières biologiques). Tous ces problèmes peuvent être améliorés par l'utilisation de systèmes de vectorisation comme les nanoparticules qui ont la capacité de stabiliser les principes actifs *in vivo*, d'augmenter le temps de demi-vie plasmatique et d'améliorer le ciblage de tissus malades.

I-2-1- Nanosphères et nanocapsules de polymères

La chimie des polymères a permis de développer des espèces biocompatibles et biodégradables pour des applications de vectorisation, comme les nanoparticules de polymères (NP). Ces nanoparticules peuvent être définies comme des systèmes colloïdaux submicroniques permettant de conserver les propriétés du médicament et d'éviter les problèmes de toxicité systémique non spécifiques.²⁴ Suivant le type de polymères et le mode de préparation, les nanoparticules peuvent être séparées en deux catégories :^{20,25,26}

- Les **nanosphères** qui peuvent être définies comme des particules solides colloïdales de type matriciel dans lesquelles les principes actifs peuvent être encapsulés, dissous ou liés

chimiquement. Ces particules ont généralement des tailles supérieures à celles des micelles de polymères avec un diamètre compris entre 100 nm et 200 nm (Figure I-4 – A).

- Les **nanocapsules** qui peuvent être définies comme des systèmes colloïdaux et vésiculaires dans lesquelles le principe actif est confiné dans le cœur liquide de la particule. Ce cœur est entouré d'une membrane monocouche de polymère dont le diamètre est généralement compris entre 100 nm et 300 nm (Figure I-4 – B).

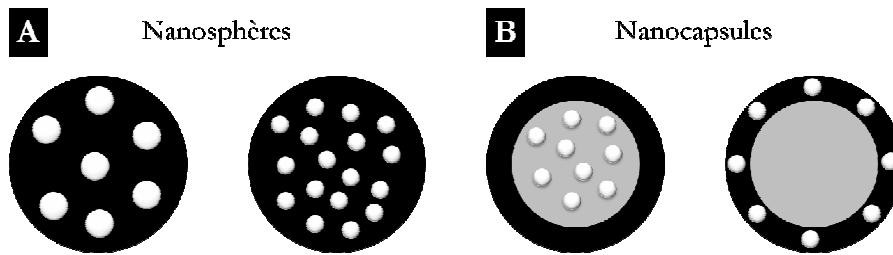


Figure I-4 – Structures des nanosphères (A) et des nanocapsules (B)

Les nanoparticules de polymères sont généralement constituées de polymères biodégradables⁵ tels que le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) (PGA), les polycyanoacrylate d'alkyle(PACA), ou de polymères naturels (utilisés pour diminuer la toxicité et d'améliorer la biodégradabilité des nanovecteurs) tels que le chitosane ou les alginates (Figure I-5).

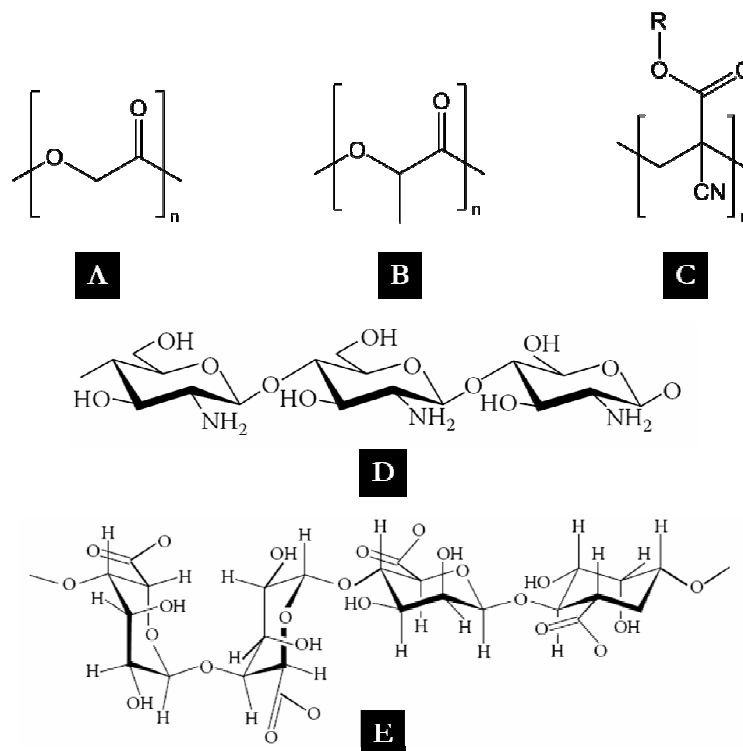


Figure I-5 - (A) poly(acide glycolique) (PGA) ; (B) poly(acide lactique) (PLA); (C) polycyanoacrylate d'alkyle (PACA) ; (D) chitosane ; (E) alginates

Suivant le type de nanoparticule désirée (nanosphère ou nanocapsule), différentes méthodes de synthèse sont utilisées :^{20,27}

- La méthode la plus couramment employée pour la synthèse de nanosphères est la méthode de « **nanoprécipitation** ».²⁸⁻³⁵ Elle consiste à solubiliser le polymère dans un solvant organique miscible à l'eau et à l'additionner à une solution aqueuse, en présence ou non de tensio-actif. Lors de l'addition dans la phase aqueuse, le solvant organique diffuse immédiatement et conduit à la précipitation du polymère et à la formation de la nanosphère.
- Les nanosphères peuvent être obtenues directement par **polymérisation du monomère en émulsion**³⁶⁻⁴⁰ (« *emulsion polymerization* ») dans l'eau, en présence ou non de surfactant, ou par polymérisation par ouverture de cycle du monomère en milieu organique⁴¹⁻⁴³ (« *ring opening polymerization* »), puis redispersion en phase aqueuse par sonication.
- Les nanocapsules sont obtenues par **émulsion dans l'eau d'une solution huileuse** de polymère, en présence ou non de tensio-actif, sous faible agitation. La nanocapsule est formée par l'aggrégation du polymère à la surface de la goutte d'huile.^{20,35}

I-2-2- Inclusion de principes actifs dans les nanoparticules

L'inclusion de principes actifs hydrophobes tels que le paclitaxel, la doxorubicine ou l'ampicilline dans les nanoparticules peut être conduite de différentes manières :

- Le principe actif peut être introduit **lors de la polymérisation** des monomères et encapsulé dans la matrice de polymère nouvellement formée.
- Il peut être encapsulé **par nanoprécipitation**. Le polymère et le principe actif sont solubilisés dans un solvant organique miscible à l'eau et additionnés rapidement à une solution aqueuse en présence ou non de tensio-actif sous très forte agitation, pour former des nanoparticules incluant le principe actif. Le solvant organique est ensuite évaporé pour conduire à une suspension aqueuse de nanoparticules.
- Il peut également être inclus **par dialyse**. Pour ce faire, le polymère et le principe actif sont solubilisés dans un solvant organique miscible à l'eau, puis dialysés contre de l'eau pure. Cette opération est effectuée dans le but d'éliminer l'excès de PA et le solvant, et aboutit à une suspension, dans l'eau, de nanoparticules de polymère ayant intégré le PA inclus.

Suivant l'état de surface des nanoparticules de polymères, ces vecteurs peuvent être classés dans deux principales catégories : les vecteurs passifs (1^{ère} et 2^{nde} générations) et les vecteurs actifs (3^{ème} génération).

I-2-3- Nanoparticules de première génération

Les nanoparticules de 1^{ère} génération sont des particules constituées d'un polymère hydrophobe, mis en suspension dans une phase aqueuse à l'aide d'un surfactant (Dextran, Pluronic, Tween, ...).

Pour des applications médicales, ces nanoparticules doivent être biocompatibles et biodégradables de préférence. Par exemple, le poly(acide lactique) (PLA) est dégradé par voie métabolique et éliminé sous forme de dioxyde de carbone et d'eau. Le poly(acide glycolique) (PGA), lui, est éliminé par voie métabolique en combinaison d'une excrétion directe par les reins.⁴⁴ Les polycyanoacrylates d'alkyle (PACA), eux, doivent être de faibles poids moléculaires pour pouvoir être excrétés. Comme les polymères précédents, les PACAs sont dégradés par voie métabolique (hydrolyse des fonctions ester par l'estérase) et éliminés sous forme d'alcool et de poly(acide cyanoacrylique) par voie rénale.²⁷

Ces nanoparticules, administrées par voie intraveineuse, sont généralement rapidement éliminées du flux sanguin.^{2,25,27} En effet, certaines protéines plasmatiques (opsonines) ont des interactions hydrophobes fortes avec la surface des nanoparticules, conduisant à un recouvrement de celles-ci. Les macrophages, responsables de l'élimination des corps étrangers, reconnaissent alors spécifiquement les opsonines collées à la surface des nanoparticules et internalisent celles-ci par endocytose pour les éliminer du flux sanguin. De ce fait, ces particules se concentrent principalement dans le foie, la rate et la moelle.

Les nanoparticules de 1^{ère} génération permettent donc de cibler le foie, la rate ou la moelle. Les nanoparticules de PACA ont ainsi été utilisées pour le traitement des métastases hépatiques par la doxorubicine (Schéma I-1 – A). Ces dernières ont présenté une activité sur le traitement des métastases du foie, et une réduction de la toxicité cardiaque de la doxorubicine.²⁵

Enfin, des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isohéxyle) (PIHCA) ont été employées pour incorporer un antibiotique : l'ampicilline (Schéma I-1 – C). Ces nanosphères n'ont montré ni cytotoxicité³⁸ ni mutagénicité³⁹ et ont permis d'incorporer l'ampicilline avec un taux d'inclusion de 20% (0,25 mg d'ampicilline pour 1 mg de nanoparticule). L'ampicilline incorporée dans les nanoparticules a conduit à une internalisation accrue du principe actif dans les macrophages, 10 à

20 fois supérieure comparée à celle de l'ampicilline seule.³⁶ Une augmentation de l'activité antibiotique de l'ampicilline a également été observée.³⁹ Cette efficacité proviendrait de l'internalisation accrue de l'ampicilline incorporée dans les nanoparticules, grâce à la dégradation du PIHCA par voie enzymatique (estérases) qui libère le principe actif dans la cellule.³⁶⁻³⁹ Cette étude montre l'efficacité des nanovecteurs de première génération dans le traitement des maladies du foie.

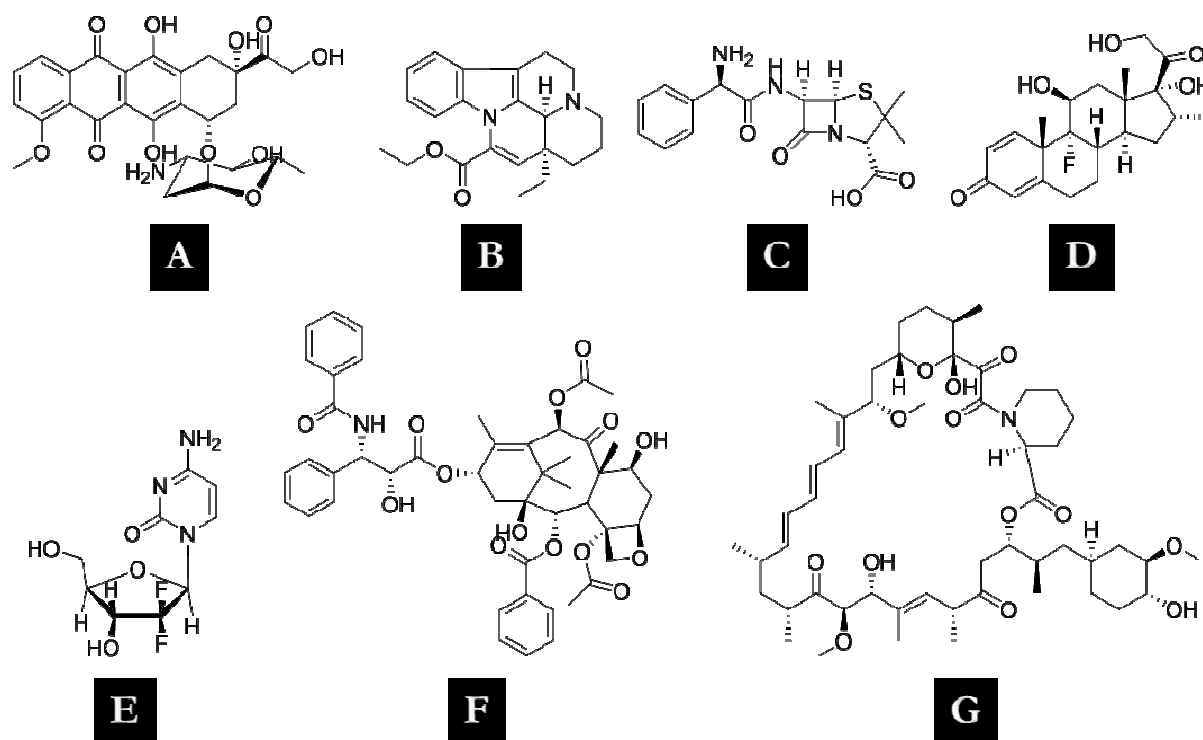


Schéma I-1 – (A) Doxorubicine (antibiotique antitumoral) ; (B) Vinpocétine (inhibiteur de phosphodiésterases) ; (C) Ampicilline (antibiotique) ; (D) Dexaméthasone (anti-inflammatoire – immunosuppresseur) ; (E) Gemcitabine (antitumoral) ; (F) Paclitaxel (alcaloïde antitumoral) ; (G) Rapamycine (immunosuppresseur)

I-2-4- Nanoparticules de deuxième génération

Afin de cibler des organes autres que le foie ou la rate, la surface des nanoparticules doit être modifiée pour réduire les interactions hydrophobes entre la surface des particules et les opsonines. Pour ce faire, les nanoparticules sont à l'aide de groupements hydrophiles comme des poly(éthylène glycol), des polysaccharides ou des poloxamères (polyéthylène-polypropylène glycol). Ces nanovecteurs de 2^{ème} génération deviennent alors furtifs vis-à-vis des macrophages.^{2,25}

Une étude par microscopie électronique à transmission (MET) menée sur les poly(cyanoacrylate d'héxyle) (PHCA) a souligné l'effet des motifs poly(éthylène glycol) sur les interactions entre les protéines plasmatiques (fibrogènes – diamètre 15 nm ; Figure I-6 – C) et la

surface hydrophobe de ces nanoparticules.³¹ Cette étude mit en évidence que les nanoparticules de PHCA non greffées par des PEGs avaient de fortes interactions avec les protéines plasmatiques qui viennent s'adsorber à la surface de la nanoparticule (Figure I-6 – A). Au contraire, les nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'héxyle) greffées de manière covalente par des PEGs ne montrent plus aucune interaction avec les protéines plasmatiques (Figure I-6 – B). Cette étude met ainsi en évidence que le greffage de la surface des nanoparticules par des groupements PEG diminue fortement l'adsorption des protéines plasmatiques.

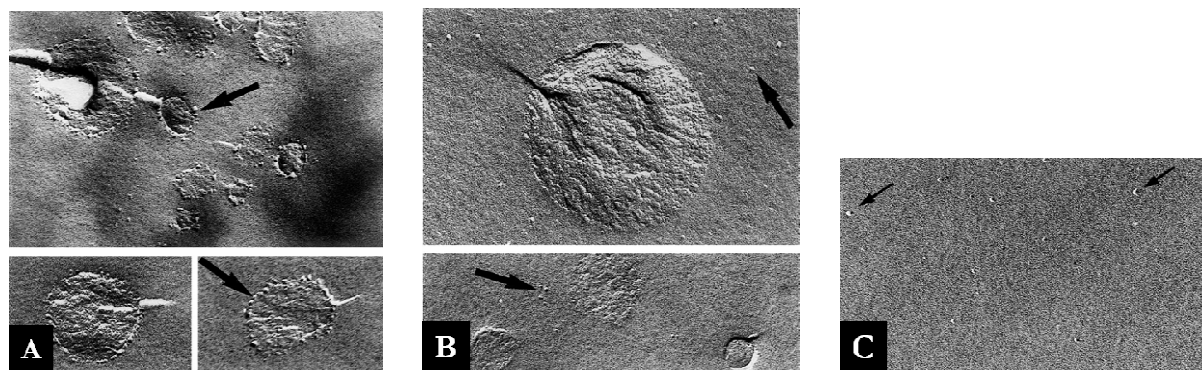


Figure I-6 – (A) Images MET (cryofracture) de nanoparticules de PHCA sans PEG ; (B) Images MET (cryofracture) de nanoparticules de PEGCA-PHCA ; (C) Image MET (cryofracture) d'une solution de fibrogènes³¹

La diminution de l'adsorption des protéines plasmatiques engendre un temps de demi-vie plasmatique prolongé puisque 30% des nanoparticules de PEGCA-co-PHCA sont encore présentes dans le flux sanguin après 6 heures. A l'opposé, les nanoparticules de PHCA sont éliminées du flux sanguin en quelques minutes.^{28,30} Les nanoparticules peggyliées ont montré une cytotoxicité plus faible que celle des nanoparticules sans PEG.^{30,32}

La présence du poly(éthylène glycol) induit une dégradation rapide des nanoparticules de PEGCA-co-PHCA (30% du polymère est dégradé en 3 heures quand aucune dégradation n'est observée dans le cas du PHCA dans cet intervalle de temps). Cette dégradation s'explique par la couche hydrophile formée par les PEGs qui facilite l'accès des estérases aux fonctions esters du polymère.^{28,32}

Enfin, les nanoparticules de PEGCA-co-PHCA ont montré qu'elles avaient la capacité de traverser les tissus cérébraux présentant une tumeur.^{28,34} Cette capacité à traverser la paroi hémato-encéphalique laisse entrevoir des applications prometteuses pour la vectorisation de principes actifs vers le cerveau.

Les nanovecteurs de seconde génération ont des applications importantes du fait d'un relargage contrôlé de principe actif sur de longues périodes. En effet, des nanoparticules de copolymères de poly(acide lactique) et de vitamine E - TPGS (VitE-TPGS-PLA ; Schéma I-2), ou de poly(acide lactique-co-acide glycolique) et de poly(éthylène glycol) (PEG-PLGA), ont permis d'atteindre des temps de relargage supérieurs à 15 jours.

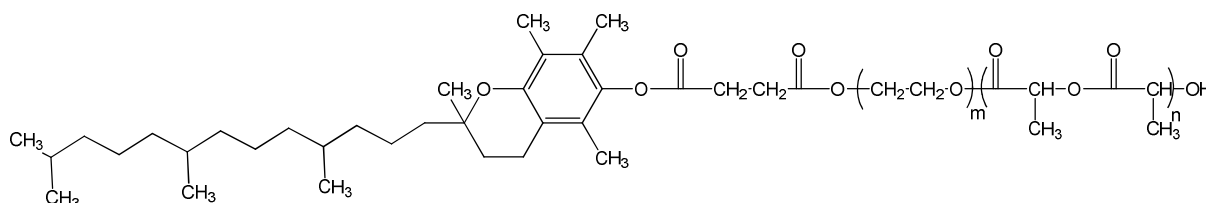


Schéma I-2 – Structure de la VitE-TPGS-PLA

Les nanoparticules de PEG-PLGA ont permis d'inclure de la dexaméthasone (taux d'inclusion : 29% en masse ; Schéma I-1 – D) et de la rapamycine (taux d'inclusion : 0,1 - 0,4% en masse ; Schéma I-1 – G).⁴⁵ Ces deux espèces sont relarguées complètement dans un tampon phosphate en 5 heures. Ce temps de relargage a pu être très largement augmenté par redispersion des nanoparticules dans des solutions de gélatine ou d'albumine, pour atteindre 17 jours pour les nanoparticules contenant la dexaméthasone et de 50 jours pour celles incluant la rapamycine. Il est donc possible de contrôler le temps de relargage des principes actifs. Enfin, les nanoparticules de TPGS-PLA ont permis de solubiliser dans l'eau et d'incorporer du paclitaxel avec un taux d'inclusion de 10% en masse.⁴² Ces nanoparticules contenant du paclitaxel ont autorisé un relargage de 55 à 65% du principe actif en 30 jours. L'internalisation dans les cellules et la cytotoxicité du paclitaxel sont meilleures avec les nanoparticules de TPGS-PLA qu'avec celles de PLGA.

I-2-5- Nanoparticules de troisième génération

Pour finir, les nanovecteurs de seconde génération peuvent être fonctionnalisés avec divers ligands (anticorps, peptides, aptamères ou petites molécules) pour conduire à un ciblage actif. Ils permettent alors la reconnaissance spécifique des récepteurs de cellules tumorales et sont désignés comme ***des nanovecteurs de 3^{ème} génération***.

Le récepteur de l'acide folique étant surexprimé à la surface de certaines cellules cancéreuses, l'acide folique a été très largement utilisé pour le ciblage spécifique de cellules cancéreuses du cerveau, du rein, du sein, des ovaires et des poumons.⁴⁶ Cette molécule étant de petite taille, son utilisation comme ligand n'induit pas d'encombrement stérique et ne masque pas l'effet des motifs poly(éthylène glycol) sur la furtivité des particules. De plus, le complexe

ligand/récepteur de l'acide folique étant internalisé dans les cellules par endocytose, l'utilisation de ces ligands laisse entrevoir des perspectives intéressantes pour la délivrance de principes actifs dans le cytoplasme.²

Le greffage du ligand acide folique peut s'effectuer de deux manières : soit par greffage sur le nanovecteur de 2nde génération par un couplage peptidique sur un PEG aminé (Figure I-7 – A), soit par greffage au cours de la synthèse du polymère (Figure I-7 – B).

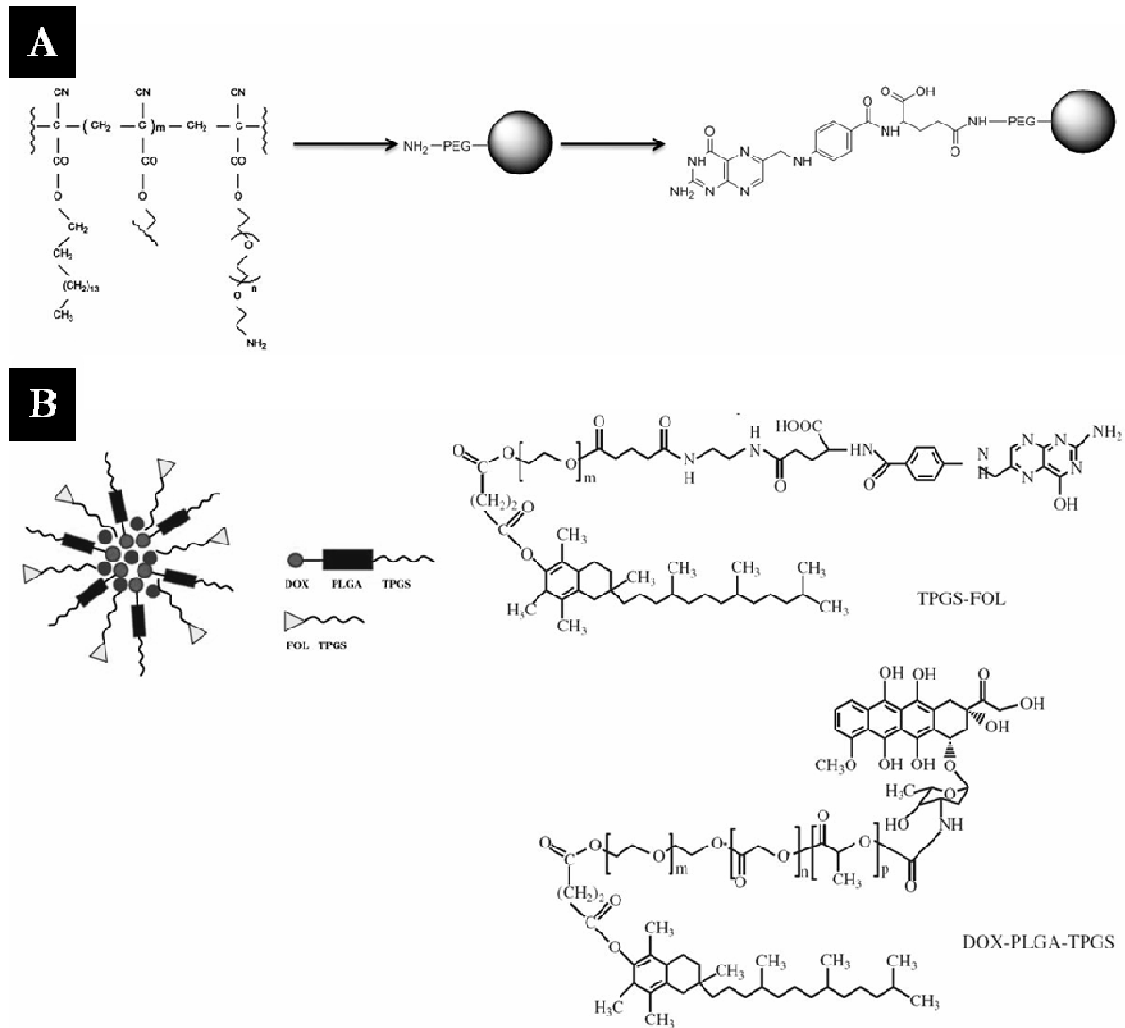


Figure I-7 – (A) greffage d'acide folique à la surface de nanoparticules de poly(H₂N-PEGCA-co-HDCA) par couplage peptidique ; (B) Structure des nanoparticules de poly(acide lactique-co-acide glycolique)-vitamine E-TPGS conjuguées avec le folate-vitamine E-TPGS

Dans le cas des nanoparticules de poly(H₂N-PEGCA-co-HDCA) (Figure I-7 – A), le greffage s'effectue par un couplage peptidique de la surface des particules entre les PEGs aminés et l'acide folique, avec un taux de greffage des PEGs aminés compris entre 14% et 16%.³³ L'étude *in vitro* des interactions entre les nanoparticules greffées et des récepteurs folate (appelés FBP : « *folate binding protein* ») a mis en évidence leurs interactions spécifiques avec ces récepteurs. De

plus, elles ont montré une affinité relative avec des récepteurs folate dix fois plus élevée que l'acide folique seul. Les nanoparticules non greffées quant à elle n'ont présenté aucune interaction avec les récepteurs folate.

Les nanoparticules de PEG-co-PCL^a conjuguées folate, formées à partir de polymères conjugués à l'acide folique et de paclitaxel par la méthode de dialyse,⁴⁷ ont été utilisées pour la vectorisation ciblée de ce principe actif (Schéma I-1 – F). Le taux d'inclusion atteint 31%. Une étude de la toxicité de ces nanosphères folate/paclitaxel a été menée sur des fibroblastes humains normaux. Elle a montré une augmentation de la survie des cellules dans le cas du paclitaxel inclus dans les nanoparticules (viabilité de 80% des cellules) comparé au cas du paclitaxel seul (viabilité de 65% des cellules). Cette étude illustre la capacité des nanoparticules à protéger les principes actifs du milieu environnant.

Une étude similaire a été conduite à partir de nanoparticules de poly(acide lactique-co-acide glycolique)-vitamine E-TPGS conjuguées avec 50% de folate-vitamine E TPGS (TPGS-FOL) (Figure I-7 – B).⁴³ Ces nanoparticules ont été utilisées pour inclure de la doxorubicine (Figure I-7 – A) attachée de façon covalente au polymère. Une étude *in vivo* a mis en évidence un relargage lent de 65% de la doxorubicine, après 30 jours, pour les nanoparticules conjuguées avec 50% de TPGS-FOL, contre 50%, après 30 jours, pour celles sans folate. L'influence de l'acide folique a été mise en évidence par une étude de cytotoxicité sur des cellules cancéreuses du cerveau (C6) et du sein (MCF-7). Le taux de mortalité des cellules cancéreuses augmente, de 49% pour 0% de TPGS-FOL à 92% pour 50% de TPGS-FOL. Cette étude met en évidence l'effet de ciblage des ligands folate vers les cellules cancéreuses surexprimant les récepteurs folate, l'augmentation de la cytotoxicité des nanoparticules conjuguées aux ligands folate, et une internalisation cellulaire accrue de la doxorubicine.

Enfin, de nombreuses études ont montré des résultats similaires (ciblage, cytotoxicité et internalisation accrues) avec différents ligands tels que les aptamères,^{48,49} les anticorps,⁵⁰ les sucres^{40,51} ou les ligands de transferrine.²⁴

Les nanoparticules de polymères sont des nanovecteurs idéaux pour le traitement ciblé de maladies telles que le cancer, du fait de leur biocompatibilité, de leur biodégradabilité, de leur élimination, de leur capacité d'inclusion et de protection de principes actifs. Ces nanovecteurs augmentent de façon significative l'activité des principes actifs, de par l'internalisation accrue de ces particules dans les cellules.

^a PCL :ε-caprolactone

I-3-Vectorisation par les microsphères

Le développement de nouveaux véhicules pour la délivrance de médicaments est devenu une priorité pour l'industrie pharmaceutique car les avancées dans ce domaine laissent entrevoir de nouvelles possibilités.

Le relargage contrôlé de principes actifs par des microsphères biodégradables a été très largement étudié ces dernières années. Cette technique de vectorisation est devenue très prisée, de par les propriétés intrinsèques de ces particules.^{44,52-56} Le principe actif est encapsulé dans la matrice de polymère de la microsphère, le protégeant de la dégradation par le milieu externe. Ces particules étant synthétisées à partir de polymères biodégradables, celles-ci peuvent être dégradées et éliminées du corps humain. Les polymères les plus couramment utilisés (Schéma I-3) sont les polycyanoacrylate d'alkyle,²⁷ les polyanhydride,⁵⁷ et les polyester (poly(β -aminoester),⁵⁸ poly(*ortho*-ester),⁵⁹ poly(acide lactique),⁶⁰ ou poly(acide lactique-co-acide glycolique)^{52,53,55,56}.

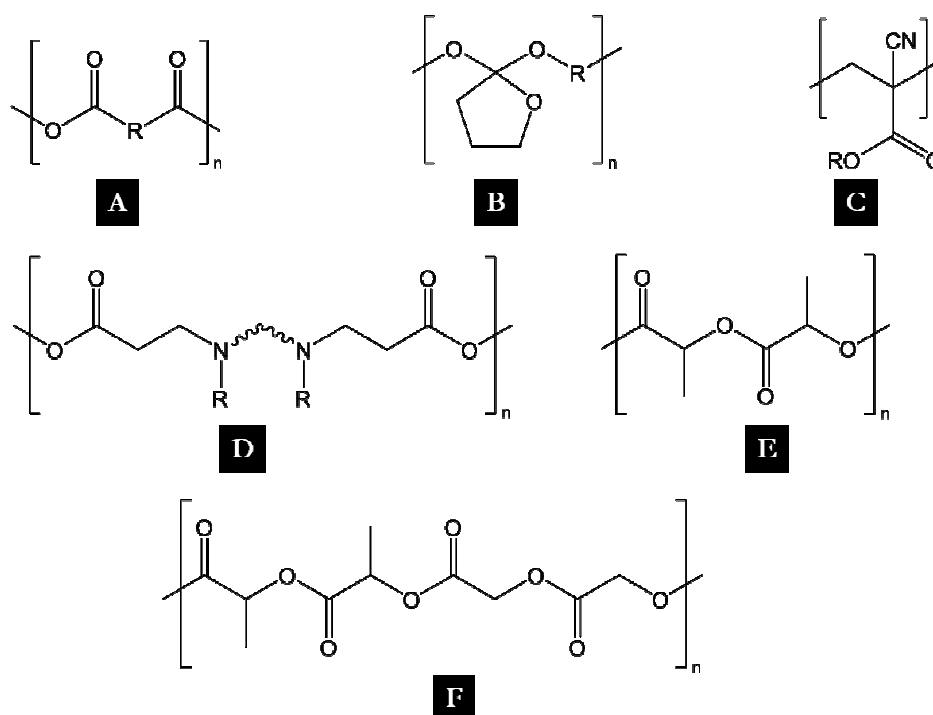


Schéma I-3 – (A) polyanhydride ; (B) poly(*ortho*-ester) ; (C) polycyanoacrylate d'alkyle ; (D) poly(β -aminoester) ; (E) poly(acide lactique) ; (F) poly(acide lactique-co-acide glycolique)

Le relargage de principes actifs *in vivo* peut être contrôlé par modification du polymère et des paramètres de préparation des microsphères. Des temps de relargage de quelques semaines à plusieurs mois peuvent ainsi être atteints. Le temps de relargage peut être contrôlé en modifiant la taille des microparticules ou le poids moléculaire du polymère, ainsi que le ratio de chacun des monomères dans le cas des copolymères. Ces microsphères ont donc des applications très

prometteuses dans le relargage de médicaments nécessitant des traitements de longue durée, mais dont le temps de demi-vie plasmatique est court et la biodisponibilité par voie orale, faible.

I-3-1- Préparation des microsphères et inclusion de principes actifs

Le mode de préparation est une étape importante dans la synthèse de microsphères car, dans le cas des protéines par exemple, la stabilisation de ces espèces par la particule est nécessaire pour maintenir leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques, en même temps que leur activité thérapeutique.

Suivant la voie d'administration envisagée, la taille des particules varie de 20 μm à 100 μm pour une administration intramusculaire, sous-cutanée ou sous forme d'implants, à quelques microns par inhalation, et à des tailles inférieures au micron par voie intraveineuse.

La fabrication de microsphères peut s'effectuer de différentes manières, qui dépendent de la nature du polymère utilisé et de la nature du principe actif.⁴⁴

La méthode la plus communément utilisée est la synthèse ***par émulsion et évaporation de solvant organique***.⁴⁴ Suivant la stabilité de la molécule ou de la macromolécule à encapsuler, deux approches ont été étudiées : dans le cas de molécules stables, une encapsulation directe dans la matrice polymère de la microparticule est effectuée, et dans le cas de molécules stables uniquement dans un environnement aqueux, une double encapsulation est accomplie.

Dans le cas de molécules stables ou hydrophobes, l'inclusion est réalisée par la méthode d'émulsion huile-dans-eau (*oil-in-water émulsion : O/W*)^{61,62} ou d'émulsion solide-dans-huile-dans-eau (*solid-in-oil-in-water émulsion : S/O/W*).^{55,63,64} La méthode *O/W* consiste à solubiliser le polymère et la molécule à inclure, dans un solvant organique, à l'émulsifier dans une solution aqueuse contenant un émulsifiant (poly(alcool vinylique) -PVA-), et à évaporer le solvant organique pour donner des microsphères de polymères durs, incluant la molécule incluse. La méthode *S/O/W* consiste à suspendre la molécule à inclure dans une solution organique du polymère. Cette suspension est ensuite additionnée à une solution aqueuse d'émulsifiant (PVA) sous agitation, et le solvant est évaporé pour donner les microparticules. Par cette méthode, des microsphères de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres (50 μm) (Figure I-8) peuvent être obtenues, avec des taux d'inclusions compris entre 1% et 15% en masse.

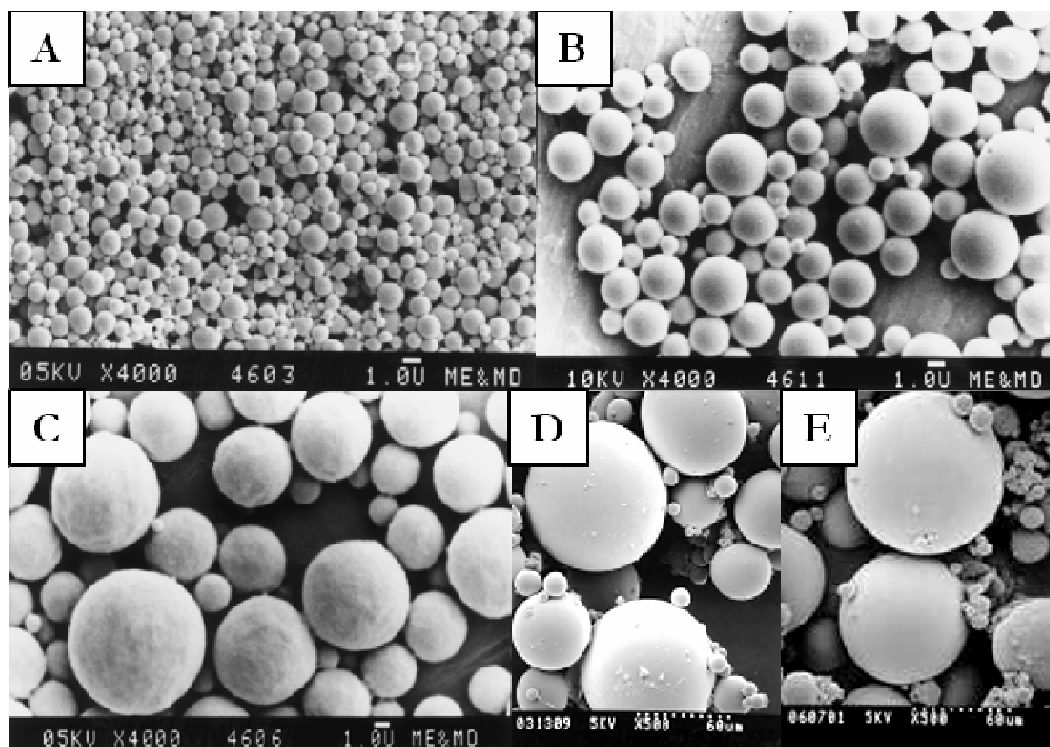


Figure I-8 – Images de microscopie électronique à balayage (MEB) de microsphères de PLGA préparées par les méthodes O/W et S/O/W

Dans le cas de molécules instables, les méthodes par *O/W* ou *S/O/W* ne sont pas applicables. Pour les stabiliser, une ***méthode de double émulsion*** doit être employée : double émulsion eau-dans-huile-dans-eau (*water-in-oil-in-water emulsion : W/O/W*).⁶⁵⁻⁷³ Cette technique permet d'encapsuler une protéine ou de l'ADN en phase aqueuse dans la matrice de polymère de la microsphère. La protéine ou l'ADN en solution aqueuse et le polymère en solution organique sont émulsifiés, en présence d'un émulsifiant, par ultrasonication (Figure I-9 – A). Cette première émulsion eau-dans-huile est ensuite additionnée à une solution aqueuse contenant un émulsifiant (PVA), puis émulsifiée à nouveau pour donner lieu à la double émulsion *W/O/W*. Le solvant organique est évaporé pour conduire à la formation de microsphères dures de polymère contenant les protéines ou l'ADN inclus en phase aqueuse.

Par cette méthode, des microsphères de polymères d'un diamètre compris entre 20 μm et 100 μm ont pu être obtenues avec des taux d'inclusion compris entre 0,2% et 3,5%. Les images de MEB (Figure I-9 – B) montrent des microsphères de polymères (PLGA) avec des microdomaines aqueux où se localisent les protéines ou l'ADN. La taille de ces domaines dépend de la concentration saline de la solution aqueuse externe, ainsi que de la composition moléculaire du polymère de PLGA et de la présence ou non d'émulsifiant lors de la préparation des particules.

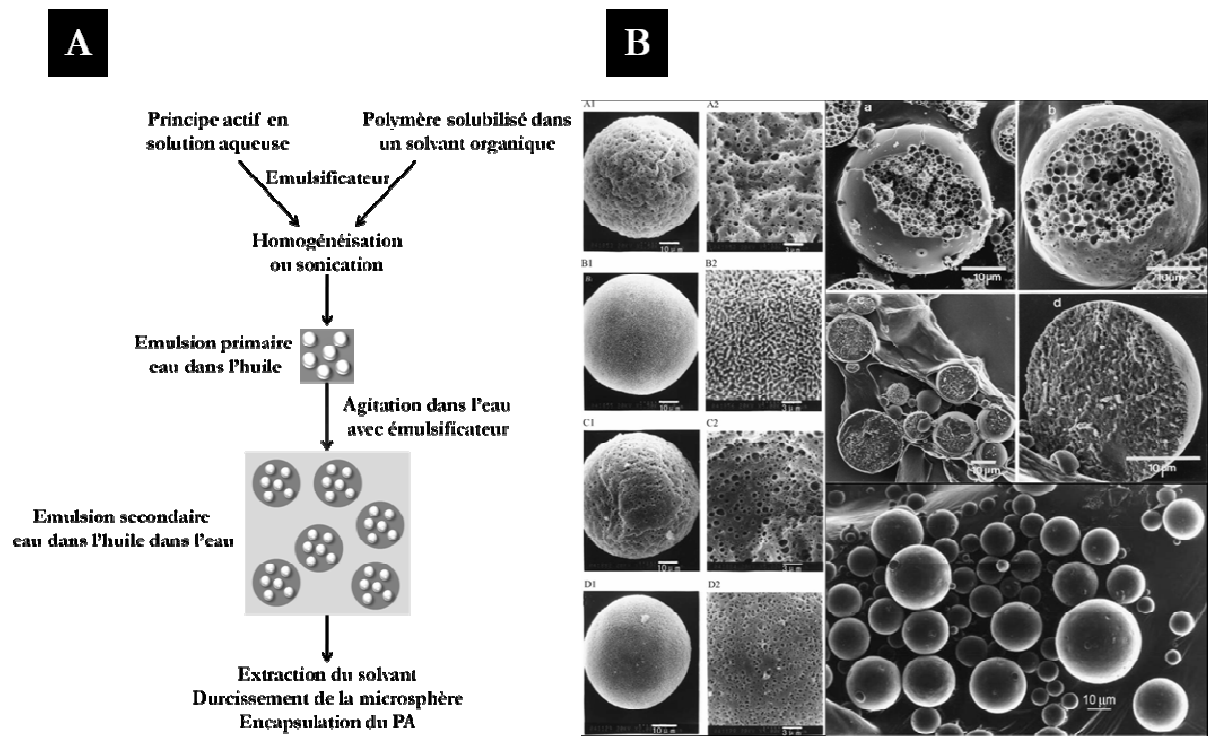


Figure I-9 – (A) Préparation de microsphères par la méthode W/O/W – (B) – Images de microscopie électronique à balayage (MEB) de microsphères de PLGA préparées par la méthode W/O/W

D'autres techniques ont été utilisées pour former des microsphères, telles que l'encapsulation par inversion de phase, le « *spray-drying* » ou la préparation dans du dioxyde de carbone supercritique.⁴⁴

I-3-2- Dégradation des microsphères et relargage des principes actifs

Le mode de préparation des microsphères diffère selon le type de molécule qui doit être encapsulé. De plus, le contrôle de la taille des particules formées et la structure des polymères utilisés sont des facteurs importants dans le processus de dégradation des microsphères et le contrôle du relargage de principes actifs.^{44,68,74,75} En effet, une augmentation du poids moléculaire du polymère implique une dégradation rapide et un relargage plus lent.

Le mode de dégradation des microsphères de PLGA est à présent connu et se produit selon deux mécanismes.⁷⁶ ***L'érosion de surface*** (« *surface erosion* ») par le milieu physiologique conduit à une diminution du diamètre de la particule à mesure que les chaînes de polymères en surface sont dégradées. Cette érosion s'effectue à une vitesse constante. ***L'érosion du cœur de la particule*** (« *bulk erosion* ») provient de la diffusion d'eau vers l'intérieur de la particule, qui conduit à la dégradation du cœur de la particule et au maintien prolongé du diamètre de la particule. Cette érosion s'effectue à une vitesse croissante.

L'érosion des particules s'effectue *via* la combinaison de l'érosion de surface et l'érosion du cœur, par hydrolyse des liaisons ester de la chaîne du polymère. La dégradation débute par l'absorption d'eau par la particule et la production de monomères et d'oligomères acides (Schéma I-4).

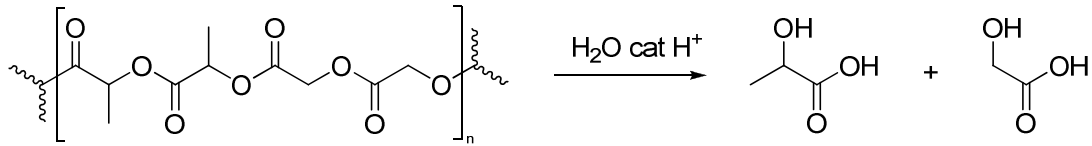


Schéma I-4 – Schéma synthétique d'hydrolyse du PLGA

Ces espèces ne diffusent pas vers l'extérieur de la particule et contribuent à une accélération de la dégradation du cœur de la microsphère par autocatalyse acide de l'hydrolyse des liaisons ester. L'érosion de surface étant plus lente que l'érosion du cœur de la particule (Figure I-10 – A),⁷⁶ les grosses particules se dégraderont plus rapidement que les petites.

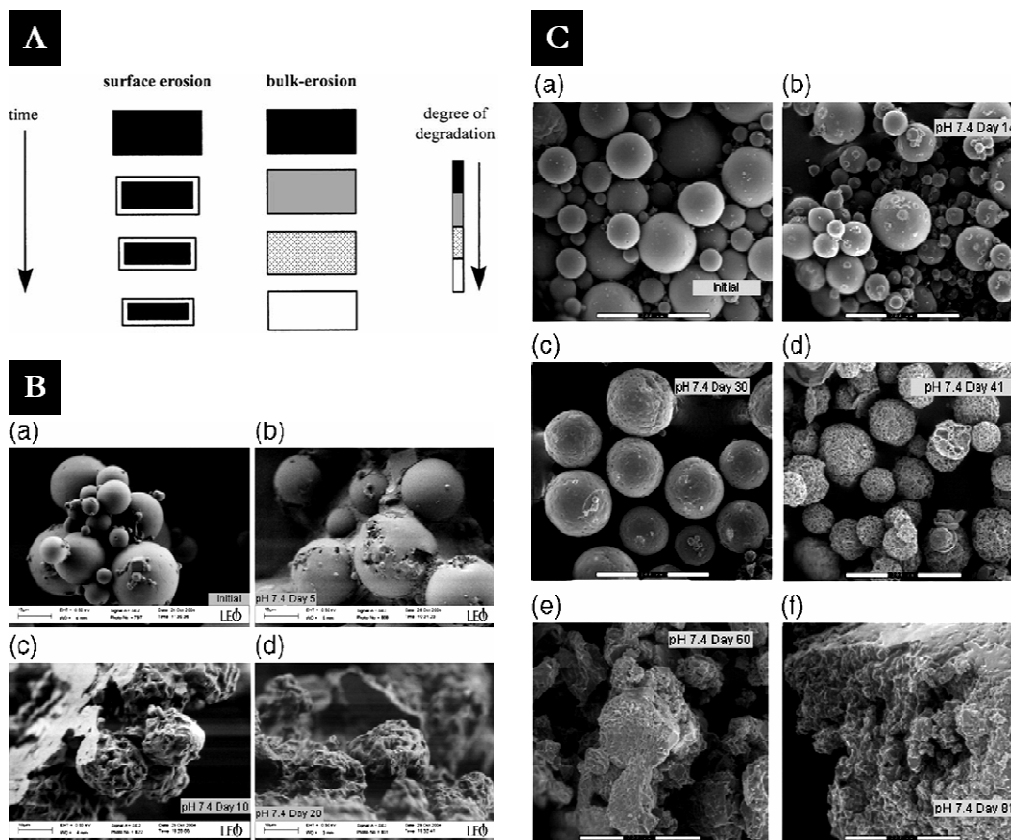


Figure I-10 – (A) Illustration du changement de la matrice de polymère par érosion de surface et érosion du cœur de la particule – Images MEB de dégradation en fonction du temps de PLGA 25 kDa (B) et de PLGA 70 kDa (C)

Néanmoins, le contrôle de la vitesse de dégradation se fait principalement par modification du poids moléculaire des chaînes de polymères. En effet, des microsphères

produites à partir de PLGA de 25 kDa se dégradent en 20 jours, alors que des microsphères produites à partir de PLGA de 70 kDa se dégradent en 80 jours (Figure I-10 – B & C).⁷⁵

Le relargage de molécules incluses est directement relié à la dégradation de la microsphère qui peut être contrôlée par la modification du polymère et de la taille de la particule. La cinétique de relargage des molécules est dépendante du poids moléculaire du polymère, avec un profil de relargage triphasique :

- Dans les premières 48 heures, un **relargage rapide** intervient avec la libération de principe actif (10% à 80% de la quantité totale incluse).⁵⁵ Ce phénomène est appelé « **initial burst** » et correspond à la perte de molécules en surface de la particule.
- Ensuite, une phase de relargage très lent apparaît, correspondant à la formation de pores lors de la dégradation de la particule, qui permettront le relargage des molécules vers l'extérieur. Ce laps de temps dépend à nouveau du poids moléculaires du polymère : 10 jours pour du PLGA 25 kDa et 40 jours pour du PLGA 70 kDa.⁷⁵
- Enfin, une dernière phase de relargage rapide intervient avec la libération de la totalité des molécules incluses au bout de 20 jours.

L'effet de relargage rapide peut être atténué par l'augmentation du poids moléculaire du polymère (50% de perte avec PLGA 25 kDa et 5 à 10% avec PLGA 70 kDa),⁷⁵ par l'utilisation d'émulsifiants à différentes concentrations,^{64,77} ou par l'addition d'un sel dans la phase de dispersion.⁷² Ces modifications permettent de diminuer de façon importante le relargage rapide et d'atteindre des relargages inférieurs à 10%.

I-3-3- Applications des microsphères

Les microsphères ont des applications dans le traitement de maladies nécessitant des doses répétées de principe actif. Des études *in vivo* ont mis en évidence l'intérêt de ces formulations pour le relargage contrôlé de principes actifs.

L'administration sous-cutanée de microsphères de polypeptides (*Salmon Calcitonin hormone*, contre l'ostéoporose) chez le rat a permis de montrer la capacité de ces formulations à libérer des molécules sur des temps relativement longs.⁶² En effet, cette voie de vectorisation a permis de maintenir un niveau d'hormone élevé pendant 10 jours.

Les microsphères ont aussi été utilisées pour le **traitement de tumeurs cancéreuses du cerveau** chez le rat, par injection dans la tumeur de microsphères d'anti cancéreux

(5-fluorouracile) associé à un traitement par radiothérapie. L'association de ces deux traitements conduit à des taux importants de survie (57%) et de rémission (47%), avec disparition de la tumeur dans certains cas.⁶³ Des traitements similaires ont été envisagés avec d'autres anti-cancéreux tels que le paclitaxel.⁷⁷

Enfin, le *traitement de maladies dégénératives du cerveau* par administration intracrânienne de microsphères représente une nouvelle alternative aux traitements existants. Cette formulation fait l'objet d'études pour le traitement de la maladie de Parkinson, par l'implantation de microsphères de protéine GDNF^{65,70} et pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, par l'implantation de microsphères de protéine NGF.^{71,72}

Les microsphères de polymères biodégradables présentent de nombreuses applications dans le relargage contrôlé de principes actifs, de protéines ou d'ADN pour le traitement de maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer), de tumeurs cancéreuses ou pour des traitements hormonaux. Cette technologie permet d'atteindre des temps de relargage de quelques mois, rendant les traitements thérapeutiques plus supportables pour les patients.

I-4- Vectorisation par les micelles de polymères

Les molécules thérapeutiques ne présentent généralement pas toutes les propriétés pharmacologiques requises : solubilité, stabilité, perméabilité aux parois membranaires, ou encore ciblage d'un tissu ou organe particulier.⁷⁸ En particulier, la faible solubilité dans l'eau semble être la propriété intrinsèque d'un grand nombre de molécules, et surtout des anti cancéreux, qui doivent posséder un certain caractère hydrophobe pour pouvoir être internalisés dans les cellules et être actifs.⁷⁹ A l'opposé, la faible solubilité de ces molécules pose différents problèmes : une faible adsorption et biodisponibilité, des complications liées à l'agrégation de ces molécules lors de l'administration par voie intraveineuse (embolie) et une concentration élevée dans les sites d'agrégation causant des problèmes de toxicité locale.⁸⁰ Pour réduire ces effets, des nanovecteurs biodégradables et biocompatibles ont été développés dans le but de solubiliser ces molécules, d'augmenter leur biodisponibilité et de les transporter vers des organes cibles. Ces vecteurs doivent être de petite taille, avoir un temps de demi-vie plasmatique élevé, pouvoir inclure une quantité importante de principe actif et cibler un site pathologique. Récemment, les micelles de polymères ont connu un essor considérable. Ces nanovecteurs ont permis d'augmenter la solubilité des principes actifs, prolongé leur temps de circulation systémique, améliorant ainsi leur efficacité et leurs propriétés pharmacocinétiques pour le traitement du cancer.^{81,82}

I-4-1- Les micelles de polymères

Les micelles de polymères désignent des dispersions colloïdales composées de polymères amphiphiles avec des domaines hydrophiles et hydrophobes distincts.⁷⁹⁻⁸⁴ La dispersion de ces polymères dans l'eau induit une séparation de phase spontanée des domaines hydrophiles et hydrophobes pour donner lieu à une structure supramoléculaire cœur/coque (« *core/shell* ») : les micelles. Cet assemblage a la caractéristique d'être hydrophile en surface et hydrophobe dans le cœur (Figure I-11) et de dépendre de la concentration et de la température. A faible concentration, les polymères amphiphiles sont sous forme de chaînes distinctes et s'assemblent en micelles à partir d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (CMC). De la même façon, la température à partir de laquelle les polymères amphiphiles s'agrègent est appelée température micellaire critique (TMC).

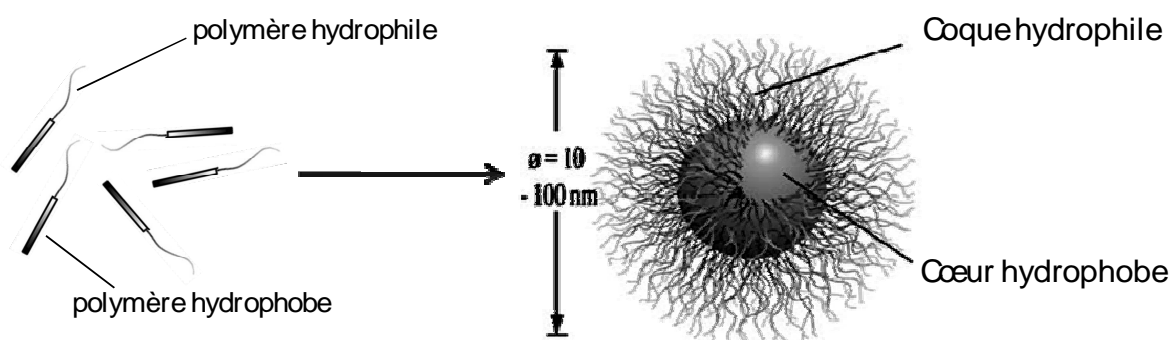


Figure I-11 – Schéma de principe de formation de micelles de polymères

De par leur structure, les micelles de polymères ont la capacité de solubiliser des principes actifs hydrophobes dans leur cœur : cette solubilisation dépend de la molécule à inclure et du polymère utilisé.

Différents types de polymères sont utilisés pour former les copolymères amphiphiles (diblocs ou triblocs) (Tableau I-1).⁷⁹⁻⁸²

Le segment hydrophile le plus couramment utilisé est le poly(éthylène glycol) (PEG 1 kDa à 15 kDa) pour sa solubilité dans l'eau, sa faible toxicité, sa neutralité et son effet de protection stérique pour les macromolécules biologiques actives (augmentation du temps de demi-vie plasmatique). D'autres segments hydrophiles ont été utilisés comme le poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP), le poly(alcool vinylique) ou le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM).⁸⁵

Le segment hydrophobe peut être composé de différents types de polymères, biodégradables dans la majorité des cas.

Les polyéthers (Tableau I-1) sont une famille de polymère très largement utilisée en combinaison de chaînes de poly(éthylène glycol) pour former des polymères amphiphiles sous forme de copolymères diblocs (*pluroniques* : PPO-co-PEG) ou de copolymères triblocs (*poloxamers* : PEG-co-PPO-co-PEG). La famille des poloxamers est un type de surfactants le plus utilisée. Ces espèces forment des micelles d'une taille comprise entre 50 nm et 100 nm.⁸⁶

Les poly(amino-acides) (Tableau I-1) sont une famille de polymères qui présente de nombreux avantages, de par les nombreux acides aminés utilisables et leurs fonctionnalisations possibles, permettant d'ajuster l'hydrophobie du cœur de la micelle (benzyle, butyle, lauryl). Le principal avantage provient de leur biodégradation qui intervient naturellement dans le corps, par hydrolyse et dégradation enzymatique. L'acide aspartique est la molécule la plus utilisée pour former le segment hydrophobe du copolymère amphiphile et sert à greffer directement un principe actif (adriamycine),⁸⁷⁻⁸⁹ ou, sous une forme protégée par un benzyle, à augmenter l'hydrophobie du cœur de la micelle.⁹⁰⁻⁹²

Les polyesters (Tableau I-1) sont une famille de polymères biodégradables par hydrolyse et dégradation enzymatique. Les produits de dégradation sont non toxiques et facilement éliminables. Comme dans les cas précédents, ce type de polymère est principalement couplé au poly(éthylène glycol) pour conduire à un copolymère amphiphile. Contrairement aux poly(amino-acides), les polyesters ne peuvent pas être fonctionnalisés par greffage covalent de motifs hydrophobes ou de principes actifs et sont par conséquent utilisés pour l'inclusion physique uniquement (à l'opposé de l'inclusion par greffage chimique). Les polymères les plus couramment utilisés pour la synthèse de copolymères peggylés sont le poly(acide lactique),⁹³⁻⁹⁶ le poly(acide lactique-co-acide glycolique),⁹⁷ le poly(ϵ -caprolactone).⁹⁸⁻¹⁰¹

Enfin, les phospholipides sont les derniers segments hydrophobes utilisés en combinaison avec le poly(éthylène glycol) (2,5 kDa à 12 kDa). Ces lipides ont l'avantage d'avoir un cœur extrêmement hydrophobe permettant une meilleure stabilisation de la micelle. Les micelles obtenues à partir de ces espèces ont des diamètres compris entre 7 nm et 40 nm¹⁰²⁻¹⁰⁷ et sont utilisées pour de l'encapsulation non-covalente uniquement.¹⁰²⁻¹⁰⁷

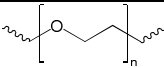
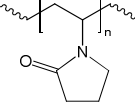
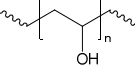
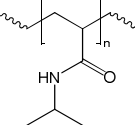
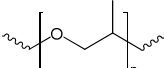
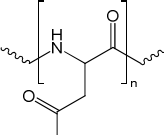
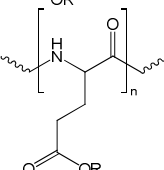
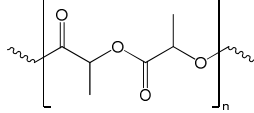
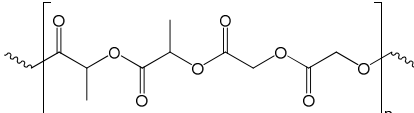
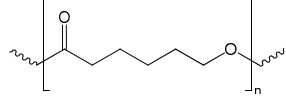
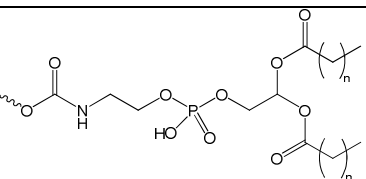
POLYMERE	SIGLE	STRUCTURE DU POLYMERE
Polymère hydrophile		
poly(éthylène glycol)	PEG	
poly(N-vinylpyrrolidone)	PVP	
poly(alcool vinylique)	PVA	
poly(N-isopropylacrylamide)	PNIPAM	
Polymère hydrophobe		
Polyéthers		
poly(oxyde de propylène)	PPO	
Poly(aminoacides)		
acide poly(aspartique)	PAsp	
acide poly(glutamique)	PGlu	
Polyesters		
poly(acide lactique)	PLA	
acide poly(lactique-co-glycolique)	PLGA	
poly(ε-caprolactone)	PCL	
Phospholipides		
distéaroylphosphatidyléthanamine	DSPE	

Tableau I-1 – Polymères utilisés pour la synthèse de copolymères amphiphiles

I-4-2- Inclusion de principes actifs dans les micelles de polymères

L'assemblage de copolymères amphiphiles en micelles conduit à la formation d'un cœur hydrophobe dans lequel il est possible d'inclure des principes actifs hydrophobes (doxorubicine, camptothécine, paclitaxel, cyclosporine, ...).

Deux voies générales d'inclusion de principes actifs ont été explorées : une voie chimique, par couplage covalent du principe actif sur le squelette du polymère hydrophobe, et une voie physique, par encapsulation du principe actif dans le domaine hydrophobe de la micelle.

Le couplage chimique du principe actif se fait sur le segment hydrophobe du copolymère amphiphile. Le greffage peut se faire par formation d'une liaison peptidique entre le principe actif et le copolymère⁹⁷ ou formation d'une fonction hydrolysable en milieu acide de type acétal (Figure I-12 – A) ou hydrazone (Figure I-12 – B). Par exemple, l'adriamycine (intercalant de l'ARN) a été greffée sur PAsp-co-PEG par l'intermédiaire d'une liaison hydrazone (Figure I-12 – C).^{87-89,108} Ce type d'inclusion permet de protéger le principe actif du milieu environnant et de le libérer une fois internalisé dans les cellules. Le pH de la paroi des cellules cancéreuses étant plus acide (pH=5,8-7,2) que celui de la paroi des cellules saines, la fonction hydrazone se clive pour libérer le principe actif dans la cellule. Ce mode d'inclusion induit une meilleure biodistribution, un meilleur ciblage et une meilleure biodisponibilité du principe actif que lorsqu'il est administré seul.

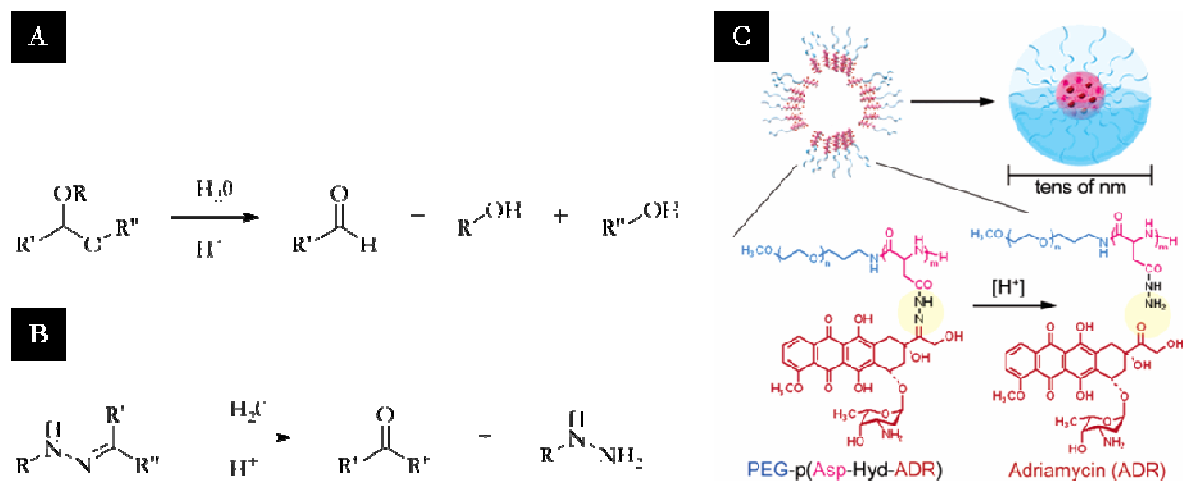


Figure I-12 – (A) Clivage acide des acétals ; (B) Clivage acide des fonctions hydrazones
(C) Greffage d'adriamycine sur le poly(acide aspartique)-co-poly(éthylène glycol) (pASP-co-PEG)

La deuxième voie d'inclusion se ***fait par encapsulation physique du principe actif*** dans le domaine hydrophobe de la micelle et peut être effectué par quatre approches différentes :

- ***Inclusion directe*** par agitation du principe actif dans une solution de micelles de polymère.⁸²
- ***Inclusion par évaporation***: le copolymère amphiphile et le principe actif sont solubilisés dans un solvant organique, puis évaporés pour donner un film de polymère et de PA. Ce film est ensuite redispersé par agitation et sonication dans de l'eau puis filtré pour donner des micelles de polymère incluant du PA.^{91,93,94,99,103} Les taux d'inclusion obtenus par cette méthode sont compris entre 0,1% et 30%.
- ***Inclusion par dialyse***: le copolymère amphiphile et le principe actif sont solubilisés dans un solvant miscible à l'eau puis dialysés contre de l'eau afin d'éliminer le solvant organique. Au final, le principe actif en excès précipite et est éliminé par filtration.^{85,87-89,96,100,105} Les taux d'inclusion obtenus par cette méthode sont compris entre 8,7% et 40%.
- ***Inclusion par co-solvant et évaporation (nanoprécipitation)***: Le principe actif est solubilisé dans un solvant organique miscible à l'eau, puis ajouté goutte-à-goutte sous agitation dans une solution aqueuse de micelles de polymère. La solution est évaporée dans le but d'éliminer le solvant organique, puis filtrée pour éliminer le principe actif en excès.^{98,101} Les taux d'inclusion obtenus par cette méthode sont compris entre 7% et 22%.

I-4-3- Ciblage et relargage contrôlé de principes actifs

Pour induire un ciblage spécifique vers des cellules tumorales et l'internalisation par ces cellules, un greffage de ligands à la surface des micelles de polymère est nécessaire.^{80,81} Deux méthodes de greffage mènent à la fonctionnalisation de surface de ces micelles par des ligands. La première méthode consiste à attacher le ligand sur le copolymère amphiphile avant la formation de la micelle (Figure I-13 – A). Par cette méthode, le greffage s'effectue préférentiellement sur les chaînes de poly(éthylène glycol) les plus courtes, conduisant au masquage de ces ligands par les longues chaînes de PEG. A l'opposé, la seconde méthode consiste à former la micelle de copolymère amphiphile puis à greffer les ligands, dans un second temps. Cette méthode permet d'obtenir des ligands plus accessibles pour l'accrochage aux récepteurs de la cellule ciblée (Figure I-13 – B).

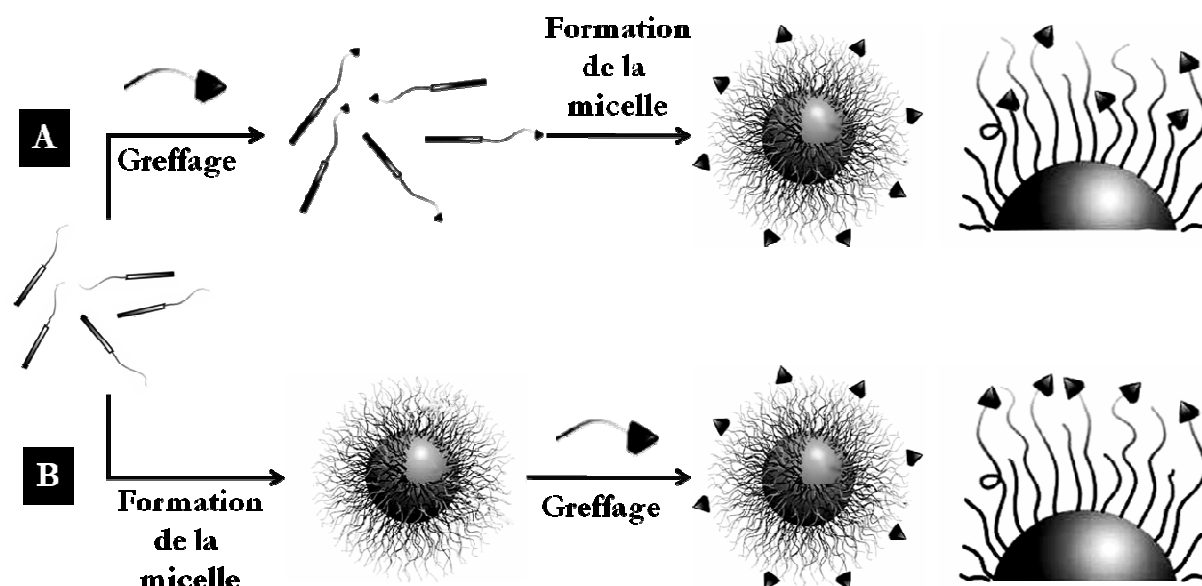


Figure I-13 – Voies de greffage des micelles par des ligands
(A) Greffage du polymère ; (B) Greffage de la micelle

Différents types de ligands peuvent être greffés à la surface des micelles de polymères.

Des petites molécules comme l'acide folique peuvent cibler les récepteurs folate surexprimés à la surface de certaines cellules cancéreuses (ovaires, sein, cerveau et poumon).⁸¹ Le greffage d'acide folique à la surface de micelles de PEG-PLGA, avec de la doxorubicine incluse (taux d'inclusion 19,5%), a permis d'améliorer le ciblage et l'internalisation dans les cellules tumorales.⁹⁷ Les micelles-folate ont permis d'accroître la cytotoxicité de la doxorubicine d'un facteur 1,5 par rapport à la doxorubicine seule et d'un facteur 1,4 par rapport à la doxorubicine incluse dans la micelle sans acide folique. Cet effet a été observé *in vivo* : dans le cas où elle est incluse dans une micelle folate, l'accumulation de la doxorubicine, dans une tumeur implantée chez la souris, est 45 fois plus élevée que dans le cas de la doxorubicine seule et 2 fois plus élevée que dans le cas de doxorubicine incluse dans une micelle de PEG-PLGA. Des résultats similaires ont été obtenus avec de l'adriamycine incluse dans une micelle de PEG-co-PAsp⁸⁸ et avec du paclitaxel inclus dans une micelle de PEG-co-PCL.¹⁰⁹

Les sucres, comme le mannose ou le galactose, peuvent être utilisés comme ligands des récepteurs membranaires (glycoprotéines) présents dans les cellules du foie.⁸¹ Des études ont montré l'accrochage préférentiel de micelles de PEG-PLA fonctionnalisées avec du galactose sur des récepteurs de surface de cellules hépatiques (*ricinus communis lectin*).⁹⁶

Les anticorps sont utilisés comme ligands de ciblage à la surface de micelles de polymère dans le traitement du cancer.¹⁰⁴ Des micelles de PEG-DSPE avec du paclitaxel inclus ont été

fonctionnalisées par un anticorps monoclonal (mAb 2G4). Le ciblage par ces anticorps a permis d'atteindre une accumulation de paclitaxel dans la tumeur 4 fois plus importante que pour le paclitaxel seul, avec une efficacité anti-tumorale améliorée.

Enfin, les micelles de polymères ont été fonctionnalisées par *des polypeptides* comme les ligands intégrine ou RGD.⁸¹

Les micelles de polymères sont des nanovecteurs très prometteurs avec plusieurs avantages dans le traitement ciblé du cancer :

- ✓ Augmentation de la solubilité des anti cancéreux et diminution des effets secondaires (liés à la toxicité des principes actifs vis-à-vis des cellules saines) ;
- ✓ Augmentation du temps de demi-vie plasmaticque ;
- ✓ Accumulation accrue du principe actif dans les tumeurs par un ciblage passif (petite taille, PEG) ou par un ciblage actif (ligands) ;
- ✓ Augmentation de la cytotoxicité et de l'efficacité anti-tumorale ;
- ✓ Libération contrôlée des molécules actives par l'utilisation de fonctions hydrolysables à pH acide.

La combinaison de tous ces avantages devrait permettre de traiter les cellules cancéreuses de façon très ciblée par l'utilisation de ligands spécifiques, de méthodes de relargage contrôlé et de véhicules biodégradables facilement excrétables.

I-5- Vectorisation par les liposomes et les vésicules

Les avancées dans le domaine pharmaceutique ont permis de synthétiser de nombreux principes actifs avec des activités potentielles contre des cibles thérapeutiques. Néanmoins, la plupart de ces molécules n'a pas pu être étudiée dans des phases cliniques, malgré des activités importantes (comme les agents anti cancéreux ayant une cytotoxicité élevée contre les cellules tumorales), du fait de leur faible indice thérapeutique (faible concentration de PA sur le site d'action, faible sélectivité des PA cytotoxiques, problèmes de formulation liés à la solubilité).¹¹⁰ La recherche pharmaceutique essaie de concevoir des systèmes de délivrance de médicaments permettant de changer la biodistribution du principe actif pour cibler et augmenter la dose vers les tissus malades, de diminuer les effets secondaires (cytotoxicité pour les cellules saines) et de solubiliser les molécules insolubles. Les systèmes de vectorisation par les liposomes et les vésicules sont étudiés de façon intensive et plusieurs formulations de médicaments par ces systèmes sont actuellement approuvées pour une utilisation clinique.¹¹¹

I-5-1- Liposomes et vésicules

Les liposomes (découverts en 1965 par Bangham¹¹²) et les vésicules sont des microparticules colloïdales dont la structure est fermée et constituée d'une ou plusieurs bicouche(s) de phospholipides ou polymères, avec une phase aqueuse au cœur et entre les couches (Figure I-14 – A). Les liposomes sont constitués de phospholipides et les vésicules, de polymères.

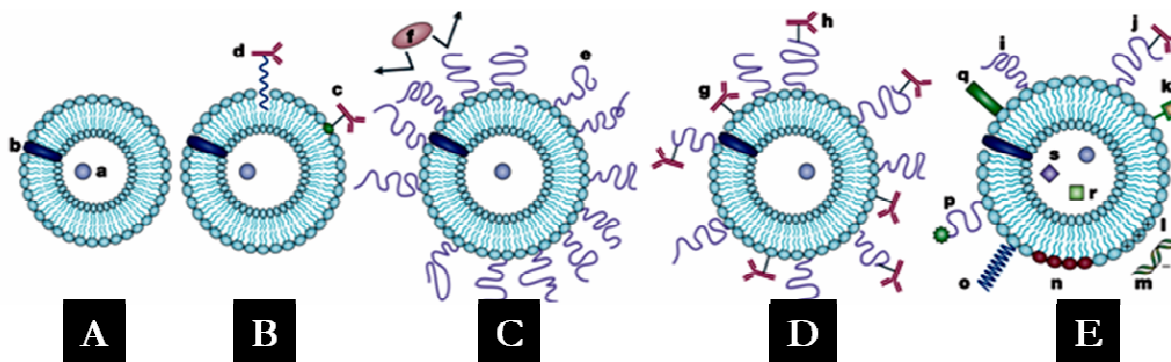


Figure I-14 – Evolution des vésicules¹¹³ : (A) vésicules de 1^{ère} génération ; (B) vésicules avec ligands de ciblage ; (C) vésicules à circulation prolongée de 2nde génération ; (D) vésicules de 3^{ème} génération à circulation prolongée avec ligands de ciblage ; (E) vésicules de dernière génération avec des fonctions de ciblage, de diagnostique, de complexation ou d'imagerie

Les vésicules (comme les liposomes) peuvent être classées en quatre catégories, selon leur taille et leur structure :^{110,113,114}

- ✓ **Les vésicules multilamellaires (MLV)**, dont la taille est comprise entre 500 nm et 5000 nm sont constituées de plusieurs bicouches concentriques ;
- ✓ **Les vésicules unilamellaires de petites tailles (SUV)**, dont la taille est d'environ 100 nm sont formées d'une simple bicouche ;
- ✓ **Les vésicules unilamellaires de grande taille (LUV)**, dont la taille est comprise entre 200 nm et 800 nm ;
- ✓ **Les vésicules géantes (GUV)**, dont la taille est supérieure à 1000 nm.

La structuration en vésicule (ou liposome) est gouvernée par un **facteur f** , correspondant à la fraction hydrophile dans le polymère (ou phospholipide).¹¹⁵⁻¹¹⁹ Ce facteur a une grande influence sur la forme géométrique de l'assemblage : une trop forte fraction hydrophile ($f > 50\%$) donne lieu à la formation préférentielle de micelles sphériques, une fraction hydrophile comprise entre 40% et 50% forme des micelles cylindriques (forme tubulaire). Les vésicules (ou les liposomes) sont formées uniquement pour des fractions hydrophiles comprises entre 25% et 40%

(Figure I-15). La flexibilité de la chaîne hydrophobe joue aussi un rôle très important dans la formation des vésicules ou des liposomes : une chaîne hydrophobe flexible formera des vésicules (ou liposomes), à l'opposé de chaînes rigides, qui ne formeront pas de structures tridimensionnelles.¹¹⁹

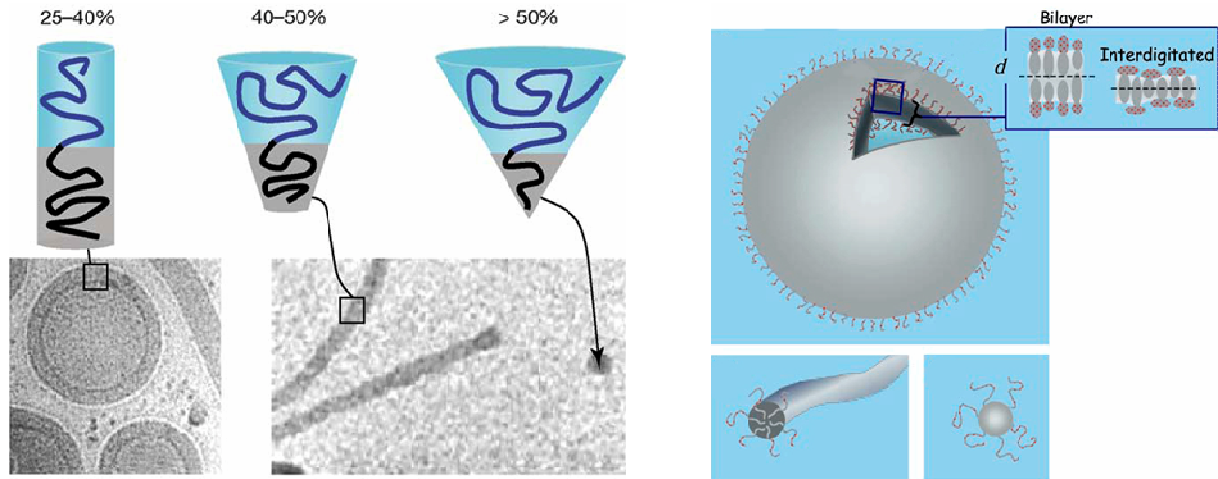


Figure I-15 – Effet de la fraction hydrophile sur la structuration des lipides et polymères¹¹⁷

Le poids moléculaire du polymère n'influe pas sur la structuration en vésicule tant que le facteur f est compris entre 25% et 40%. Néanmoins, les polymères de poids moléculaire très élevé (supérieur à 20000 Da) ne forment pas de vésicules. Le poids moléculaire influe uniquement sur l'épaisseur de la membrane du corps de la vésicule (Figure I-16) : les membranes de liposomes formées à partir de lipides ont des épaisseurs comprises entre 3 nm et 5 nm, alors que des polymères d'un poids moléculaire de 2000-20000 Da forment des vésicules avec une épaisseur de membrane comprise entre 8 nm et 21 nm.

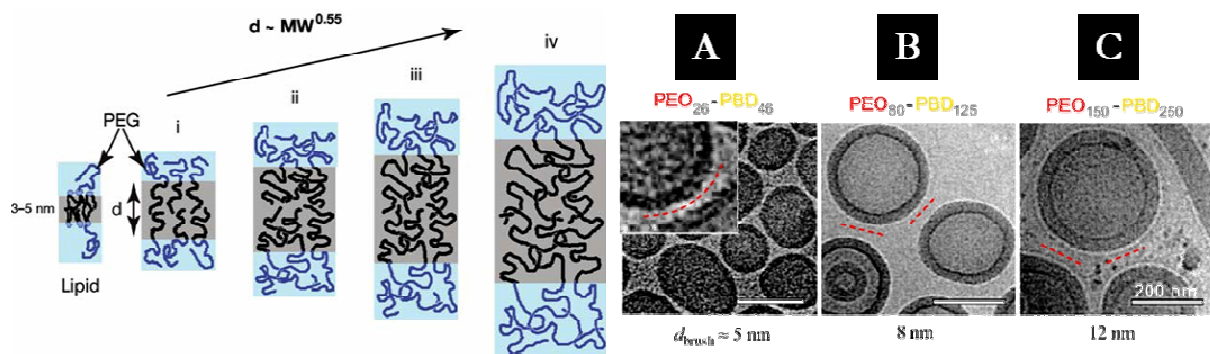


Figure I-16 – Effet de la masse molaire sur l'épaisseur de la membrane de la vésicule¹¹⁷

I-5-2- Préparations des liposomes et des vésicules de polymères

Les liposomes et vésicules sont préparés par différentes techniques, selon la taille et les caractéristiques désirées.^{110,111,114}

La voie la plus simple pour préparer des vésicules (liposomes) est la méthode par d'hydratation d'un film mince (« *thin film hydration* ») qui conduit à la formation de vésicules multilamellaires (MLV). Cette méthode consiste à évaporer une solution organique de lipide ou polymère, et à remettre le résidu en suspension dans un solvant aqueux, à une température supérieure à la température de transition de phase du lipide ou du polymère (en dessous de cette température, les molécules sont dans un état pseudo-solide, et au dessus, dans un état liquide-cristallin). Les vésicules formées sont de type multilamellaire et de taille comprise entre 1 et 5 μm . Une seconde voie de formation de MLV emploie un co-solvant. Cette méthode consiste à additionner une solution organique de lipide ou polymère dans une solution aqueuse sous forte agitation et à éliminer le solvant par évaporation, pour donner une émulsion ou une dispersion de vésicules.

Les vésicules unilamellaires de petites tailles (SUV) sont obtenues à partir de vésicules multilamellaires par sonication ou extrusion à travers une membrane en polycarbonate, à une température supérieure à la température de transition de phase des lipides ou polymères.

Les vésicules unilamellaires de grande taille (LUV) sont obtenues à partir des vésicules multilamellaires par différentes méthodes. La principale technique consiste à soumettre une solution de MLV à des cycles répétés de congélation/décongélation, dans le but de fragiliser la membrane des MLV, pour qu'elles se recombinent en vésicules monolamellaires.¹¹⁴

Enfin, les vésicules géantes (GUV) sont produites par électroformation.¹²⁰ Cette méthode consiste à placer une électrode à proximité d'un film mince de polymère et à déclencher un courant alternatif. Par cette méthode, des vésicules de taille comprise entre 20 μm et 50 μm sont formées.

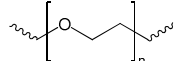
Les liposomes sont construits à partir de phospholipides tels que les phosphatidylcholines (PC)^{114,121} avec une amine tertiaire, ou le distéaroylphosphatidyléthanolamine poly(éthylène glycol) (DSPE-PEG) (Tableau I-2).¹²²⁻¹²⁴

Les vésicules sont constituées de copolymères amphiphiles construits à partir de polyesters, de poly(acrylate) ou de poly(amino-acide) hydrophiles et hydrophobes. Différents copolymères amphiphiles sont utilisés : le poly(butadiène)-co-poly(acide glutamique),¹²⁵ le

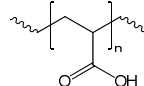
poly(éthylène glycol)-co-poly(éthyléthylène),¹²⁰ le poly(éthylène glycol)-co-poly(acide lactique)^{115,117,126,127} ou le poly(lysine)-co-poly(leucine) (Tableau I-2).¹²⁸

POLYMERE HYDROPHILE

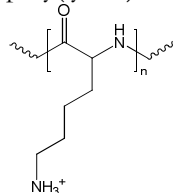
poly(éthylène glycol) – **PEG**



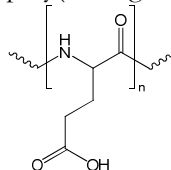
poly(acide acrylique) – **PAA**



poly(lysine) – **Plys**

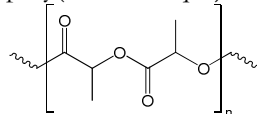


poly(acide glutamique) – **PGA**

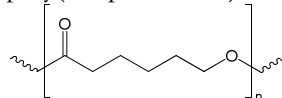


POLYMERE HYDROPHOBE

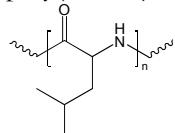
poly(acide lactique) – **PLA**



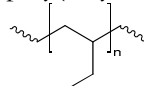
poly(ε-caprolactone) – **PCL**



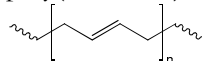
poly(leucine) – **Pleu**



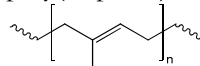
poly(éthyléthylène) – **PEE**



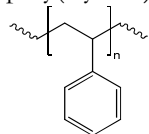
poly(butadiène) – **PBD**



poly(isoprène) – **PI**

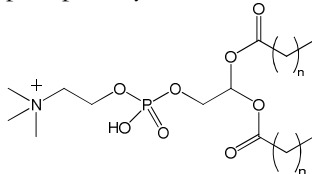


poly(styrène) – **PS**



PHOSPHOLIPIDE

phosphatidylcholine – **PC**



distearoylphosphatidylethanolamine poly(éthylène glycol) – **DSPE-PEG**

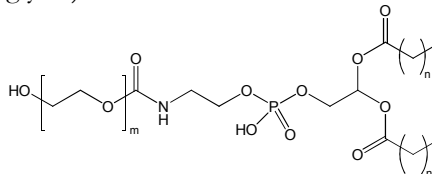


Tableau I-2 – Polymères et phospholipides utilisés pour la synthèse de vésicules et liposomes

I-5-3- Inclusion de principes actifs

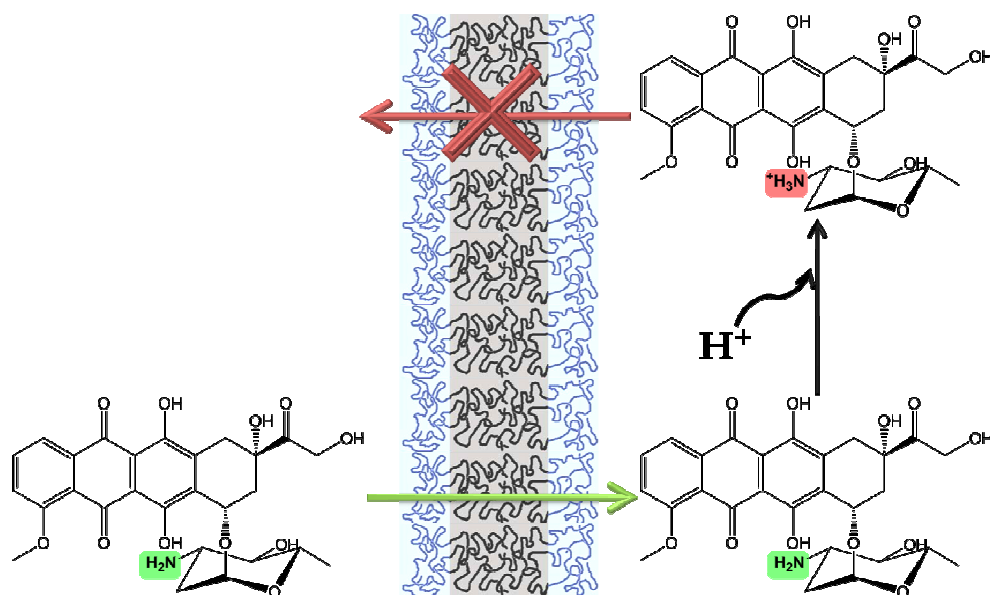
Les liposomes et les vésicules peuvent inclure des principes actifs hydrophiles dans le cœur aqueux ou des molécules hydrophobes dans la bicouche de lipides ou de polymères. L'inclusion de principes actifs peut s'effectuer de façon passive, lors de la formation de la vésicule ou du liposome, ou de façon active, après leur formation.

L'inclusion de principes actifs hydrophobes s'effectue :

- ✓ de façon ***passive, par incorporation directe de la molécule*** dans une solution de lipide ou polymère lors de la formation des vésicules (ou liposomes), avec une efficacité d'inclusion généralement de 5 à 15%.^{110,123}
- ✓ de façon ***active, par addition d'une solution organique de principe actif*** dans une solution aqueuse de vésicules (ou liposomes), suivie d'une dialyse pour éliminer le solvant et le principe actif.^{126,127}

L'inclusion de principes actifs hydrophiles s'effectue :

- ✓ de façon passive, ***par la méthode d'hydratation de film mince***. Le solvant de réhydratation contient le principe actif qui est encapsulé lors de la formation des vésicules^{123,128}. Le taux d'inclusion par cette méthode est faible mais peut être amélioré lors de la formation de SUV par extrusion, en utilisant comme solvant d'extrusion une solution aqueuse de principe actif.¹²⁸
- ✓ de façon active : ***par utilisation de la méthode d'inclusion par gradient de pH***.^{123,124,126,127,129,130} Cette méthode est utilisée dans le cas d'un principe actif faiblement basique et consiste à créer un gradient de pH (de 2 à 4 unités) entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule dans le but d'inclure la molécule (Figure I-17). La molécule dans sa forme neutre va tendre à diffuser à travers la membrane jusqu'à atteindre l'équilibre de concentration entre l'intérieur et l'extérieur. L'intérieur de la vésicule étant acide, la molécule internalisée va se protoner et ainsi déséquilibrer le système, du fait de l'incapacité de la molécule protonée à diffuser à travers la membrane. Cette diffusion continuera jusqu'à inclusion de la totalité du principe actif de la solution externe ou jusqu'à la disparition du gradient de pH. Par cette méthode, des taux d'inclusion importants peuvent être atteints.



EXTERIEUR pH NEUTRE MEMBRANE INTERIEUR pH ACIDE

Figure I-17 – Principe d’inclusion d’un principe actif dans les vésicules par gradient de pH

I-5-4- Ciblage et relargage de principes actifs

Les vésicules peuvent être fonctionnalisées par des ligands (anticorps, peptides, sucres, acide folique) dans le but de cibler un tissu tumoral (Figure I-14 – B)¹³¹ par différents motifs permettant d’induire une amélioration de la transfection, la complexation de l’ADN, le diagnostic ou le relargage contrôlé (Figure I-14 – E).

Le relargage de principes actifs hydrophiles est gouverné par la structure de la vésicule (ou liposome), et en particulier par l’épaisseur de la membrane, qui dépend du poids moléculaire du lipide ou du polymère.^{111,115,117} La perméation de l’eau à travers la membrane d’une vésicule de polymère dépend de la mobilité des chaînes hydrophobes de la membrane. Les chaînes hydrophobes des copolymères ont des poids moléculaires élevés et forment des domaines hydrophobes compacts, avec une mobilité de chaînes réduite comparée aux chaînes de phospholipides. Les liposomes auront donc des temps de relargage courts et les vésicules, des temps de relargage longs.

Ces temps de relargage peuvent être contrôlés en mélangeant des molécules ou polymères ayant la capacité de changer la mobilité des chaînes de la membrane et donc la perméabilité. Pour réduire la mobilité, des molécules de cholestérol sont ajoutées à la solution de phospholipide, conduisant à une réduction de la perméabilité du liposome par la réduction de l’espace entre phospholipides. A l’opposé, des polymères tels que le poly(butadiène)-co-poly(éthylène glycol)

sont ajoutés à la solution de copolymère amphiphile dans le but d'augmenter la perméabilité et la mobilité du domaine hydrophobe, par introduction d'une chaîne hydrophobe rigide.

Le relargage de molécules peut aussi être induit par l'utilisation de polymères biodégradables tels que le PLA-co-PEG ou le PCL-co-PEG. En effet, des études ont montré que la dégradation de la partie hydrophobe du polymère changeait la balance hydrophile/hydrophobe caractérisée par le facteur f . Par conséquent, la structuration de la vésicule change à mesure que le facteur f évolue (Figure I-15/Figure I-18),^{126,127} : la vésicule se transforme en micelle cylindrique, puis sphérique. Ce changement de structure permet de relarguer rapidement les principes actifs inclus dans ce type de vésicules.

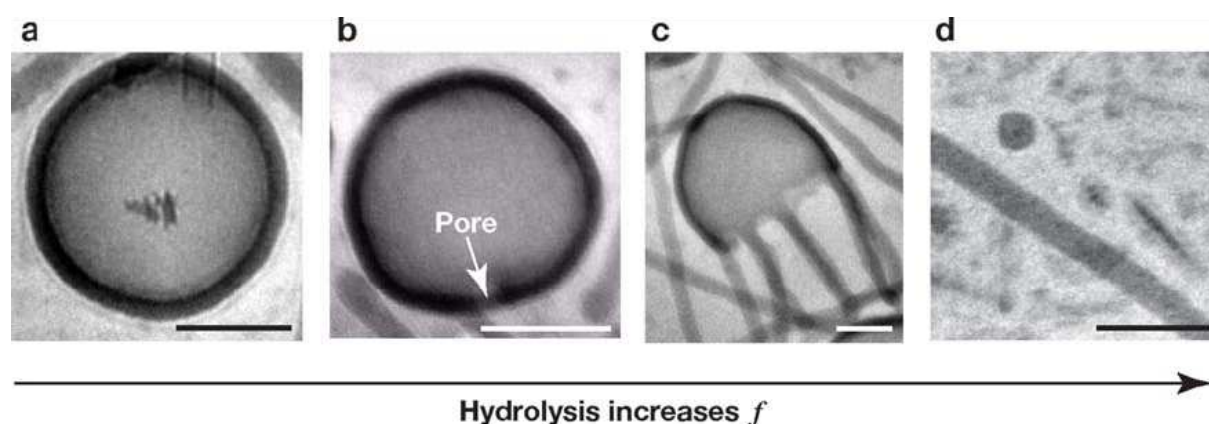


Figure I-18 – Evolution de la structure d'une vésicule de PLA-co-PEG en fonction du taux de dégradation de la chaîne de PLA¹¹⁷

Les vésicules ont été utilisées pour la vectorisation combinée de doxorubicine et de paclitaxel par des vésicules mixtes de PLA-co-PEG et de PBD-co-PEG.^{126,127} Le paclitaxel est inclus dans la membrane de la vésicule par inclusion directe, et la doxorubicine par gradient de pH. Cette étude a été conduite afin de comparer la différence de comportement entre un polymère biodégradable et un polymère non-dégradable. Ces travaux ont mis en évidence une différence au niveau des taux de relargage au bout d'une journée : 80% de la doxorubicine et de 60% du paclitaxel ont été relargués dans le cas des vésicules biodégradables ; les vésicules non-dégradables ont libéré, pendant la même période, seulement 25% de paclitaxel et de doxorubicine.

Enfin, une étude comparative de décroissance de tumeurs a été conduite entre les deux principes actifs inclus dans la vésicule biodégradable et les deux principes actifs injectés seuls en solution. Elle a mis en évidence une efficacité accrue du système de vectorisation par les vésicules, avec une diminution de la taille de la tumeur de 40% au bout de 24 heures. Au bout d'une journée, ce système montre une efficacité sur la décroissance de tumeurs deux fois plus

importante que la doxorubicine et le paclitaxel seuls et 25 fois plus importante que la tumeur non traitée. Cette étude a montré que les vésicules biodégradables de PLA-co-PEG permettent de transporter les principes actifs sur le site de la tumeur, de relarguer dans un temps court les molécules et ainsi d'augmenter l'efficacité de ces médicaments sur la décroissance de tumeurs.

Les liposomes et les vésicules sont des véhicules de principes actifs importants principalement dans la prise en charge de molécules hydrophiles. La fonctionnalisation par des PEGs et des ligands de ciblage permet à ces objets d'atteindre les tissus tumoraux et de libérer les médicaments sur la cible thérapeutique.

I-6- Vectorisation par des dendrimères

Le mot dendrimère provient du mot grec « *dendron* » (arbre ou branche) et « *meros* » (« partie »).¹³² Les dendrimères sont considérés comme une classe de macromolécules monodisperses avec une architecture tridimensionnelle, symétrique et très ramifiée, et une surface possédant un nombre très important de groupements fonctionnalisables.¹³³ Le contrôle de la synthèse des dendrimères (poids moléculaire et composition chimique) permet de régler la biocompatibilité et la pharmacocinétique de ces espèces.¹³⁴

I-6-1- Les dendrimères : structures et synthèses

Les dendrimères sont des molécules de polymère avec une architecture « en arbre », composées de multiples monomères ramifiés qui sont connectés radialement à un cœur central multifonctionnel^{134,135} (Figure I-19). Le dendrimère est constitué d'un corps central autour duquel sont connectés des dendrons qui peuvent être divisés en trois régions spécifiques : le cœur, l'intérieur (composé de branches dendritiques connectées au cœur) et la périphérie fonctionnalisable. Le nombre de points de branchements entre le cœur et la périphérie définit la génération du dendrimère. Ainsi, les dendrimères de générations élevées auront un nombre important de groupements fonctionnels en périphérie.

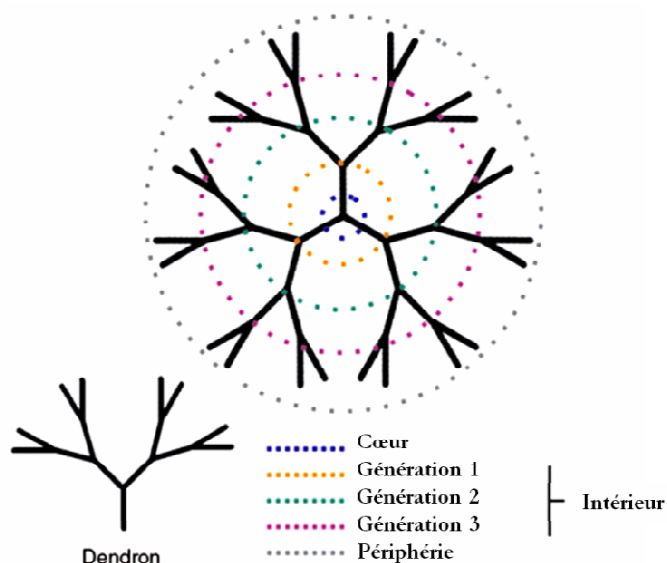


Figure I-19 – Structure des dendrimères¹³⁴

La synthèse des dendrimères peut être conduite selon deux stratégies distinctes :¹³⁶

- ✓ **L'approche divergente** (Figure I-20 – 1) consiste à construire le dendrimère à partir du cœur en multipliant le nombre de fonctions réactives à chaque nouvelle génération. Cette méthode, utilisée industriellement, a le désavantage d'augmenter le nombre de réactions à effectuer et d'accroître le nombre de réactions parasites à chaque nouvelle génération. Le dendrimère obtenu a une faible polydispersité.
- ✓ **L'approche convergente** (Figure I-20 – 2) consiste à construire le dendrimère à partir de la périphérie et à attacher les différents dendrons sur un cœur pour conduire au dendrimère désiré. Cette méthode a l'avantage de minimiser les étapes de synthèse, et conduit à des dendrimères homogènes et monodisperses.

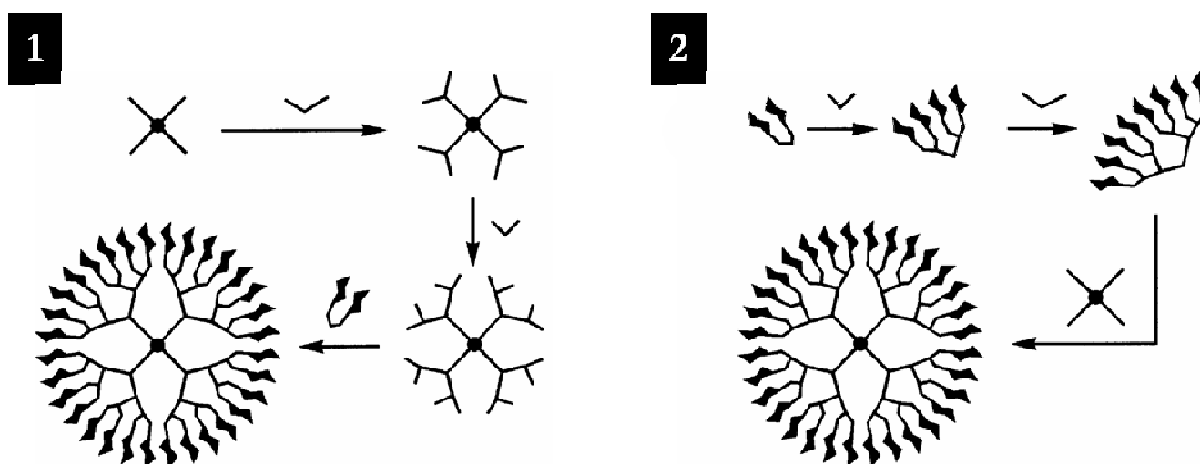


Figure I-20 – (1) Synthèse divergente d'un dendrimère (2) Synthèse convergente d'un dendrimère

Différents types de polymères peuvent être utilisés pour contrôler la solubilité, la biodégradabilité ou l'activité biologique des dendrimères.¹³⁷ Les plus couramment utilisés sont les polyamidoamine -PAMAM-, les polyamines, les polyamides (ou polypeptides), les poly(éthers d'aryle) ou les polyesters (Schéma I-5). Les nombreuses fonctions en périphérie des dendrimères permettent d'obtenir des dendrimères hydrosolubles avec un corps hydrophobe, par fonctionnalisation par des groupements hydrophiles (amine, acide, poly(éthylène glycol), sucres, ...), ou des dendrimères solubles en milieu organique par fonctionnalisation par des espèces hydrophobes (chaîne alkyle,...).

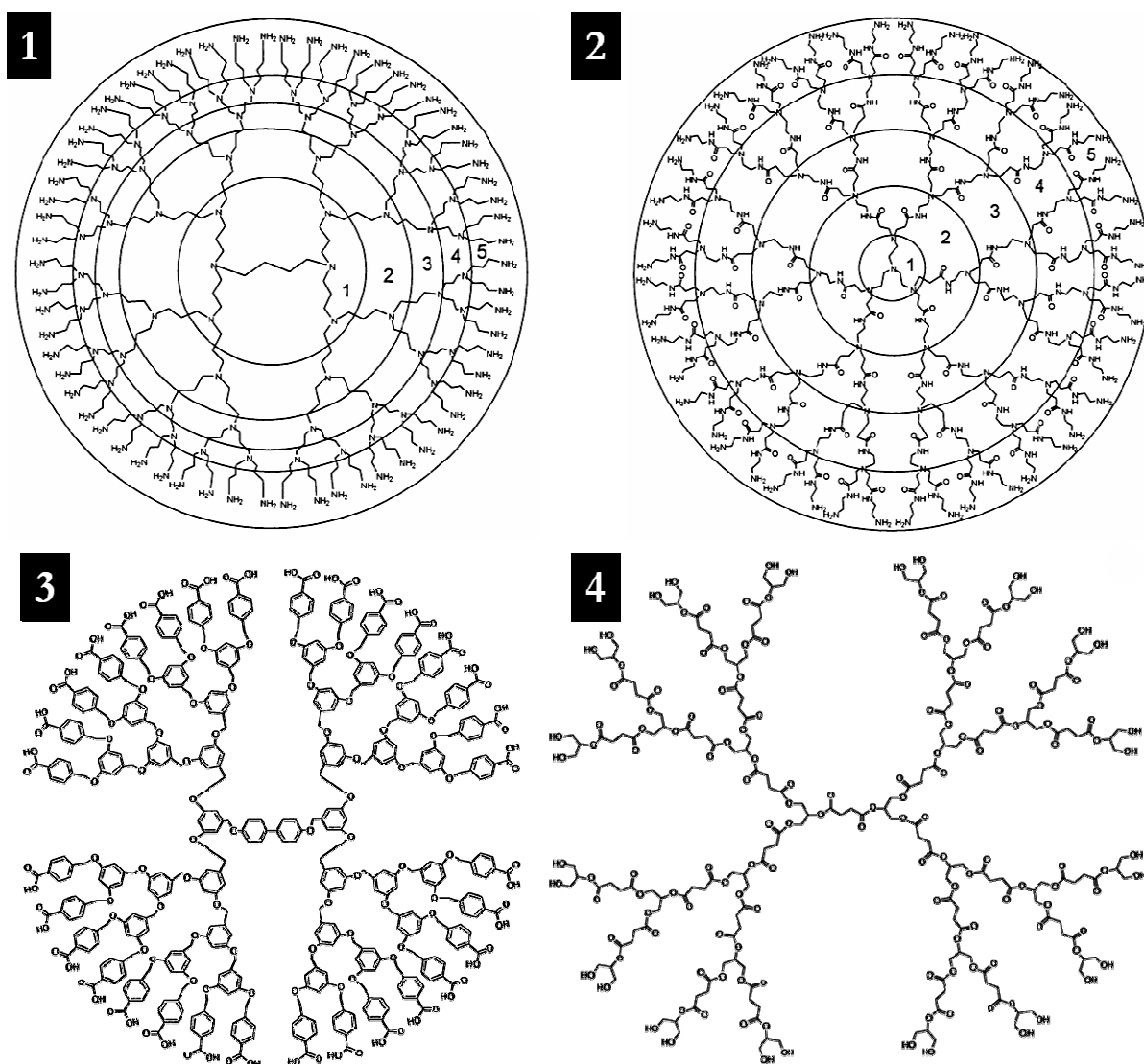


Schéma I-5 – Structures de différents dendrimères : (1) polyamine ;
(2) polyamidoamine (PAMAM) ; (3) poly(éther d'aryle) ; (4) polyester

La structure tridimensionnelle des dendrimères dépend de la génération de celui-ci. Les dendrimères de basse génération (1^{ère} à 3^{ème} génération) ont des structures en forme de disques,

tandis que les dendrimères de génération élevée (supérieurs à la 4^{ème} avec un maximum de 10) ont des structures globulaires, avec un diamètre maximal de 10 nm dans le cas de dendrimères de 10^{ème} génération. Cette structure particulière permet d'inclure des molécules hydrophobes de façon physique, dans le cœur du dendrimère, ou de façon covalente, à la périphérie. De plus, la périphérie peut être fonctionnalisée par des molécules hydrophiles (PEG), pour augmenter le temps de demi-vie plasmatique de ces espèces ou par des ligands, pour induire un ciblage spécifique.

I-6-2- Encapsulation de principes actifs par les dendrimères

Les dendrimères ont tout d'abord été utilisés comme **agents de solubilisation non-covalente de molécules hydrophobes** (micelles unimoléculaires ou boîtes dendritiques - « *dendritic boxes* »).^{132,133,137,138} Les dendrimères peuvent inclure de différentes manières des principes actifs dans leur structure : par des interactions hydrophobes, par des liaisons hydrogène ou par des interactions ioniques (Schéma I-6 – 1).

La taille (ou la génération) des dendrimères a un effet important sur le taux d'inclusion de molécules hydrophobes. En effet, une étude sur l'inclusion du paclitaxel (Schéma I-1 – F) par des dendrimères de poly(glycérol) (Schéma I-6 – 3) a montré que la solubilité du paclitaxel pouvait être multipliée par 270 par un dendrimère de 3^{ème} génération, par 370 par un dendrimère de 4^{ème} génération et par 430 par un dendrimère de 5^{ème} génération.¹³⁷ Des études similaires ont été conduites à partir de dendrimères de poly(éther d'alkyle et d'aryle) avec le pyrène. Elles ont montré des inclusions 5, 8 et 24 fois plus importantes avec des dendrimères respectivement de générations 1, 2 et 3.

Toutes les études montrent que la solubilisation de molécules hydrophobes par les dendrimères augmente avec le nombre de générations. A basse génération, la structure du dendrimère est ouverte, et à mesure que le nombre de génération augmente, la structure devient de plus en plus globulaire et fermée. Ainsi, la génération du dendrimère influe sur la solubilité par un changement conformationnel et un changement de sa perméabilité.

Enfin, le nombre de branches du cœur du dendrimère influe également sur le taux d'inclusion et la solubilisation de molécules hydrophobes. Il a ainsi été montré qu'un dendrimère de poly(éther d'aryle) composé d'un cœur à trois branches (Schéma I-6 – 2) pouvait augmenter la solubilité du pyrène d'un facteur 120 alors qu'un cœur à quatre branches augmentait la solubilité d'un facteur 356. La modification du nombre de branches du cœur permet donc de moduler la cavité interne du dendrimère et son pouvoir de solubilisation.

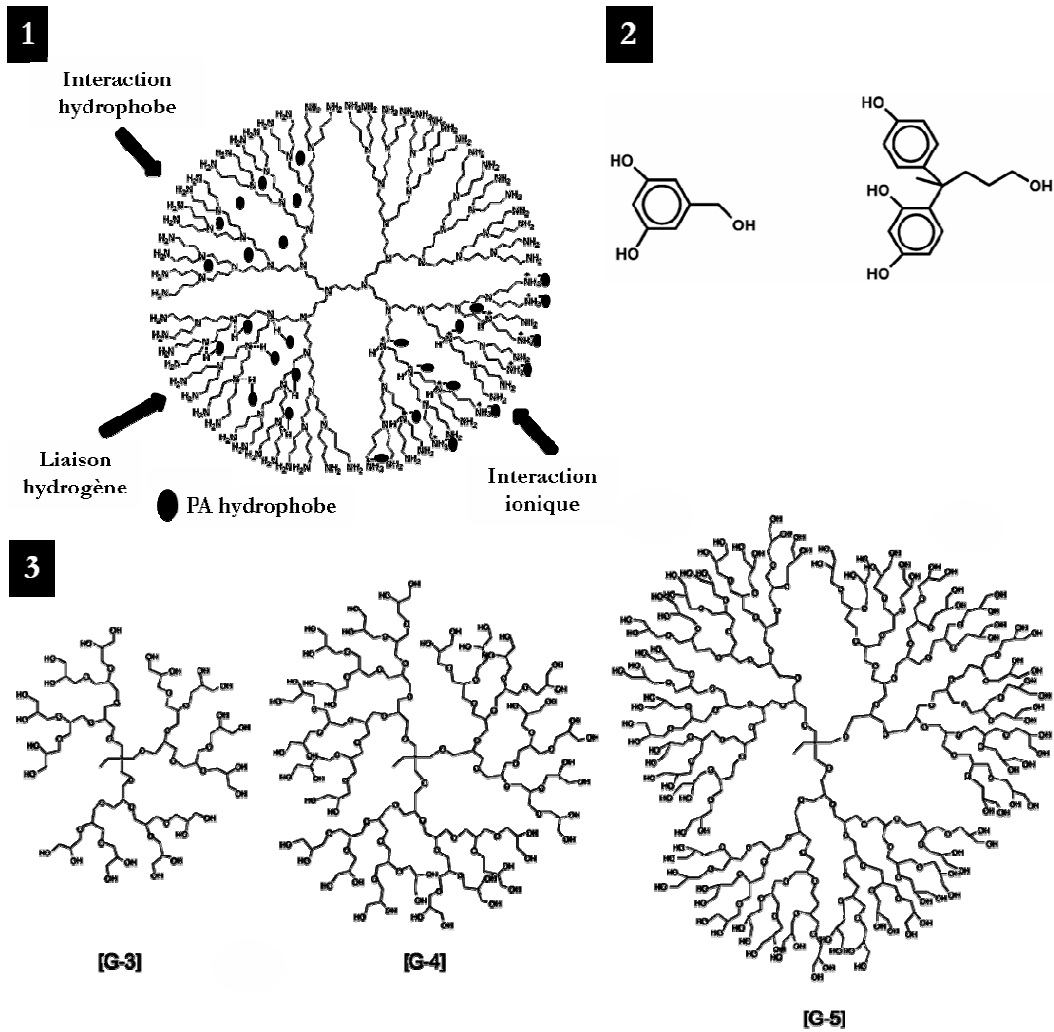


Schéma I-6 – (1) Mode d'inclusion de molécules hydrophobes par les dendrimères ; (2) Structure de monomères utilisés pour le cœur de dendrimères ; (3) Dendrimères de poly(glycérol) de 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} génération

La deuxième approche consiste à utiliser les nombreuses fonctions de surface du dendrimer pour l'accroche covalente de principes actifs, de molécules hydrophiles ou de ligands de ciblage. Cette méthode est la plus couramment utilisée.^{134,138} Ainsi, différents anti cancéreux tels que le 5-fluorouracile, la doxorubicine, le *cis*-platine ou le Taxol[®] ont été greffés à la surface de dendrimères (PAMAM, polyester-PEG). Ces complexes ont montré une augmentation de l'efficacité du principe actif (PA) et un relargage contrôlé par l'utilisation de fonctions hydrolysables entre le dendrimer et le PA (Figure I-12).

L'utilisation d'un ligand tel que l'acide folique a permis d'augmenter l'internalisation des dendrimères dans les cellules et ainsi d'accroître la cytotoxicité du complexe PA-dendrimer, comparée au PA seul.

Les dendrimères présentent de nombreux avantages pour une utilisation en tant que vecteurs de principes actifs :

- ✓ Des propriétés de biodistribution et de pharmacocinétique contrôlées par la structure et le nombre de générations des dendrimères ;
- ✓ Une forte homogénéité structurale et chimique ;
- ✓ De nombreux groupements fonctionnalisables en surface, permettant l'accroche de principes actifs, ligands, ... ;
- ✓ Une dégradation contrôlée par l'utilisation de monomères biodégradables.

Néanmoins, malgré ces avantages, les problèmes liés à la synthèse des dendrimères (synthèse multi-étape coûteuse et contrôle de la qualité du produit final) ralentissent le passage du laboratoire aux applications cliniques.

I-7- Vectorisation par les nanotubes de carbone

Depuis la découverte des nanotubes de carbone par Iijima en 1991,¹³⁹ de nombreuses études ont mis en évidence les applications prometteuses de ces objets dans le domaine de l'électronique, des matériaux, des senseurs et, récemment, de la biologie.

Les nanotubes de carbone, assimilés à une forme enroulée d'un plan de graphite, sont par nature insolubles dans la quasi-totalité des solvants et, de ce fait, toxiques en milieu biologique. Le développement de différents types de fonctionnalisation covalente^{140,141} ou non covalente¹⁴² des nanotubes de carbone a permis de les rendre solubles dans différents solvants, selon la nature des groupements greffés à leur surface. La fonctionnalisation par des espèces hydrophiles a donc permis de rendre ces nanotubes hydrophiles et solubles dans l'eau. Dès lors, ces nanotubes de carbone hydrosolubles ont été employés dans de nombreuses applications biologiques et en particulier, pour la vectorisation de médicaments. Ils semblent prometteurs du fait de leur grande surface spécifique qui permet de transporter un ou plusieurs principes actifs, en même temps que des agents de ciblage, de reconnaissance ou d'imagerie, par exemple. Ces caractéristiques font de ces objets des novovecteurs de « 3^{ème} génération ».

Deux approches de fonctionnalisation des nanotubes de carbone ont été envisagées pour la vectorisation ciblée de principes actifs : une approche covalente, développée principalement par les groupes de *Bianco* et de *Prato*, et une approche non covalente, développée principalement par le groupe de *Dai*.

I-7-1- Approche par fonctionnalisation covalente

La première approche utilisée pour la vectorisation ciblée de médicaments est celle de la fonctionnalisation covalente. Cette stratégie se base sur une fonctionnalisation double et orthogonale. Cette méthodologie permet d'introduire et de contrôler de façon sélective et combinée le greffage de molécules à la surface de nanotubes de carbone. Le greffage peut être réalisé aux extrémités des nanotubes de carbone *via* les acides carboxyliques formés par l'oxydation des nanotubes de carbone dans l'acide nitrique et sulfurique (Schéma I-7 – A), ou sur la parois des nanotubes de carbone, par cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures d'azométhine (Schéma I-7 – B).¹⁴³⁻¹⁴⁵

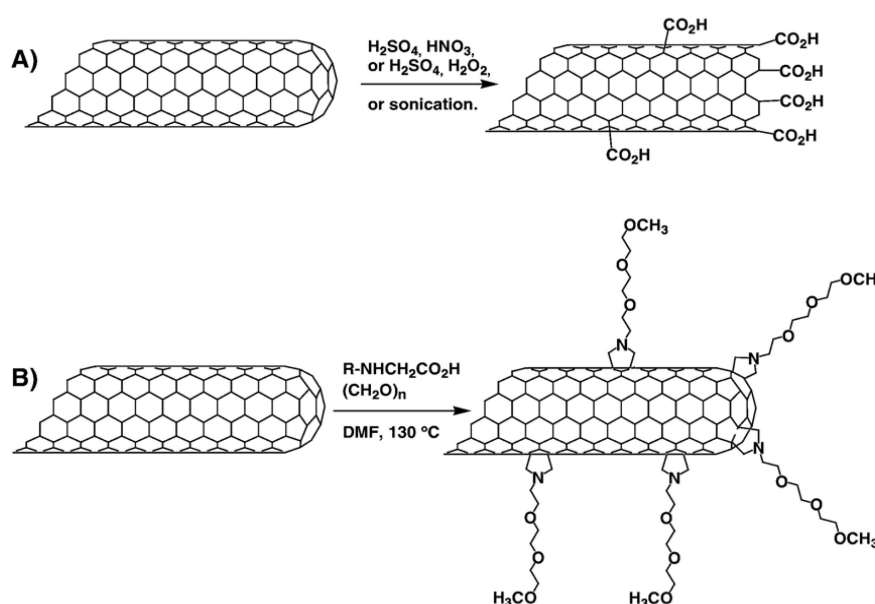


Schéma I-7 – Voies de fonctionnalisation covalente des nanotubes de carbone¹⁴⁵

Dans un premier temps, Bianco et Prato mirent en évidence que la fonctionnalisation des nanotubes de carbone par des groupements hydrophiles (Schéma I-8 – A) augmentait de façon remarquable la biocompatibilité de ces espèces avec l'organisme, ainsi que leur solubilité.

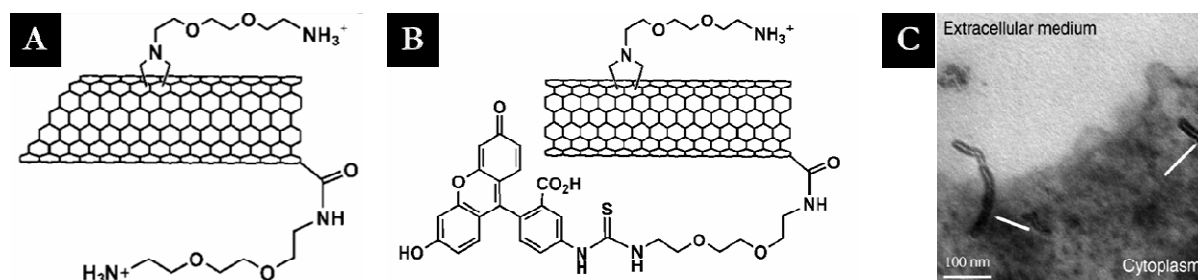


Schéma I-8 – (A & B) structures de nanotubes de carbone fonctionnalisés pour la vectorisation de principes actifs – (C) Image TEM de nanotubes de carbone présents dans le cytoplasme d'une cellule

A l'aide d'un marqueur radioactif greffé à la surface du nanotube, l'injection intraveineuse (IV) d'une solution de nanotubes de carbone hydrosolubles dans une souris permit de mettre en évidence l'élimination rapide des nanotubes du système sanguin par la voie d'excrétion rénale (*via* les urines) sans effet secondaire (toxicité, mortalité,...).^{146,147} En complément, une étude de biodistribution montra qu'après trois heures, moins de 1% des espèces radioactives étaient détectables dans les organes. Enfin, différentes études *in vitro* démontrèrent la capacité de ces espèces solubles (Schéma I-8 – A & B) à traverser la membrane plasmique et à se distribuer uniformément dans la cellule^{143,148} (Schéma I-8 – C).

La biocompatibilité et l'excrétion rapide des nanotubes de carbone hydrosolubles incitèrent ce groupe à développer des nanovecteurs de médicaments couplés à des sondes fluorescentes suivre leur évolution *in vitro*. De cette façon, différents vecteurs ont été synthétisés à partir de nanotubes de carbone hydrosolubles, par la méthode de greffage orthogonal comportant un motif fluorescent (fluorescéine) et un médicament (anti cancéreux, antibiotique ou vaccin).

Ce groupe montra que la conjugaison d'un anti-infectieux (amphotéricine B) à un nanotube de carbone hydrosoluble (Schéma I-9 – A) avait la capacité d'augmenter la solubilité du principe actif, d'éviter son agrégation et d'augmenter son efficacité par leur capacité d'internalisation^{144,145,148-150}. En effet, le complexe A a montré une efficacité accrue de l'amphotéricine B liée de façon covalente au nanotube, comparée à la molécule seule sur différents types de cellules. De plus, ce complexe a montré une diminution de la toxicité de l'amphotéricine B d'un facteur 4. La conjugaison de nanotubes de carbone hydrosolubles avec des anti-cancéreux comme le méthotrexate (améthoptérine) (Schéma I-9 – B) ou avec des peptides conduisant à l'activation du système immunitaire (vaccins) (Schéma I-9 – C) ont montré des résultats similaires.^{143,145,148,149} La conjugaison avec un anti-cancéreux a montré une accumulation préférentielle des nanotubes de carbone dans les cellules cancéreuses malgré une activité plus faible. La conjugaison avec des peptides a exhibé une forte réponse immunitaire avec une production d'anticorps plus importante que le peptide seul.^{151,152} Ces anticorps ont par la suite prouvé leur efficacité par la neutralisation du virus associé. De plus, cette étude a mis en évidence l'absence de réponse immunitaire dirigée contre les nanotubes de carbone seuls. Les CNTs ne sont pas immunogènes, et peuvent donc avoir des applications prometteuses dans la vaccination antigénique.

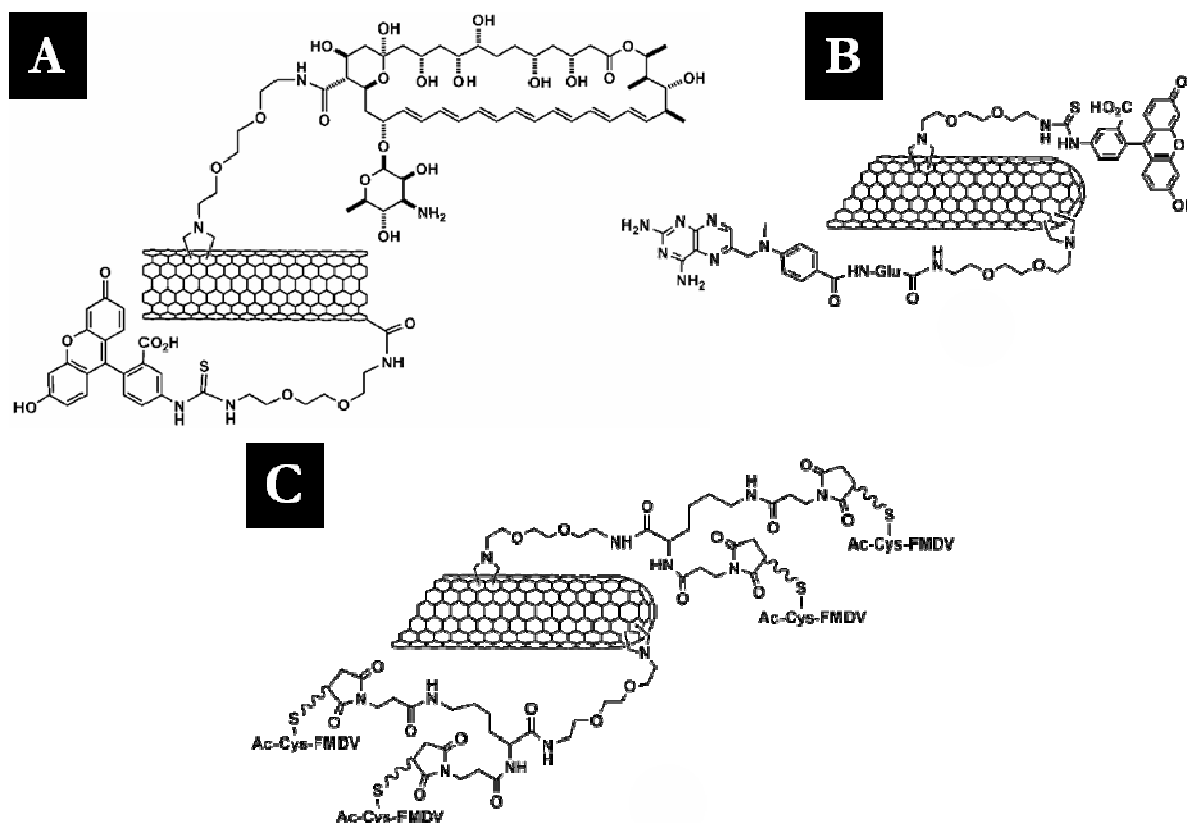


Schéma I-9 – Structures de nanotubes de carbone fonctionnalisés pour la vectorisation de principes actifs

L'approche covalente met en avant le bénéfice des systèmes à multi-présentation dans le traitement de certaines maladies. Cette approche a été rendue possible par la biocompatibilité des nanotubes de carbone hydrosolubles et de leur excréation rapide, par leur capacité à être internalisés dans des cellules cibles et par l'augmentation de l'efficacité des principes actifs vectorisés.

I-7-2- Approche par fonctionnalisation non covalente

La deuxième approche, développée principalement par le groupe de Dai, est basée sur la fonctionnalisation non-covalente des nanotubes de carbone à partir de dérivés de phospholipides. Son approche a rendu possible le développement de nanovecteurs de 3^{ème} génération par la solubilisation des nanotubes de carbone par des groupements poly(éthylène glycol), l'inclusion de principes actifs, de manière covalente ou non, et par le greffage d'un ligand (RGD).

La solubilisation des nanotubes de carbone est atteinte par l'utilisation d'un phospholipide bi-brin, composé de deux chaînes lipophiles de 18 carbones et d'une chaîne hydrophile poly(éthylène glycol) de poids moléculaire 2000 g/mol ou 5400 g/mol (Schéma I-10 – A). Ces espèces, adsorbées à la surface des nanotubes, induisent la solubilisation des nanotubes et une

stabilité accrue dans l'organisme.¹⁵³ La longueur de la chaîne hydrophile PEG influe sur le temps de circulation de ces nanovecteurs. Le rallongement de la chaîne PEG augmente de façon significative le temps de demi-vie plasmatique et diminue l'élimination par le système macrophagique.¹⁵³ Néanmoins, l'excrétion des nanotubes fonctionnalisés est plus lente que dans le cas de l'approche covalente¹⁴⁶ car la quasi-totalité des nanotubes hydrosolubles reste dans l'organisme après 24 heures. L'utilisation de phospholipides peggylés conduit donc à la formation de nanovecteurs de seconde génération à caractère « furtif ».

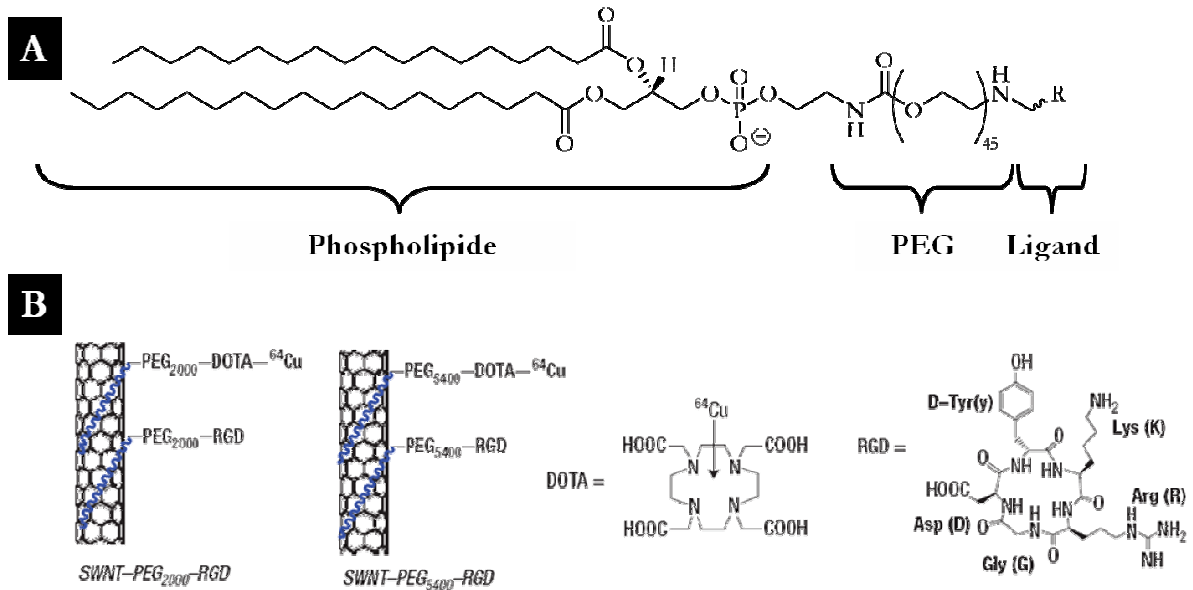


Schéma I-10 – (A) Structure du phospholipide peggylé ; (B) Structures des nanotubes de carbone pour l'étude de distribution et d'élimination

Le greffage d'un ligand, reconnaissant le récepteur d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (RGD) à l'extrémité de certains phospholipides et d'un radiomarqueur (DOTA / ^{64}Cu) (Schéma I-10 – B) à l'extrémité d'autres phospholipides, a permis de mettre en évidence, par une étude de biodistribution par tomographie par émission de positon (TEP), une augmentation rapide de l'accumulation des nanotubes fonctionnalisés au niveau de la tumeur.¹⁵³ L'internalisation de ces nanotubes de carbone se réalise en 6 heures de façon spécifique dans la tumeur : le ratio entre les nanotubes présents dans la tumeur et ceux présents dans le muscle est de 15 / 1. Cette forte accumulation découle de la circulation prolongée des nanotubes dans le flux sanguin (par le greffage de PEG₅₄₀₀) et la forte sélectivité du ligand RGD pour les cellules tumorales. Cette sélectivité accrue proviendrait de l'effet de multiprésentation dû à la présence de nombreux groupements RGD à la surface des nanotubes de carbone hydrosolubles.

Enfin, ce groupe étudia la vectorisation ciblée de principe actif anti-cancéreux (doxorubicine, *cis*-platine) ou d'ADN et de siARN. Deux approches ont été étudiées pour le transport de ces médicaments : une approche non covalente pour des principes actifs aromatiques et une approche covalente, pour les autres, par greffage en bout de chaîne du phospholipide.

L'étude de l'approche non-covalente du transport de principes actifs a été réalisée avec la doxorubicine qui a la particularité d'être une molécule aromatique.¹⁵⁴ Elle est donc capable de s'adsorber par π -stacking à la surface de nanotubes de carbone solubilisés par le phospholipide peggylé (Schéma I-11).

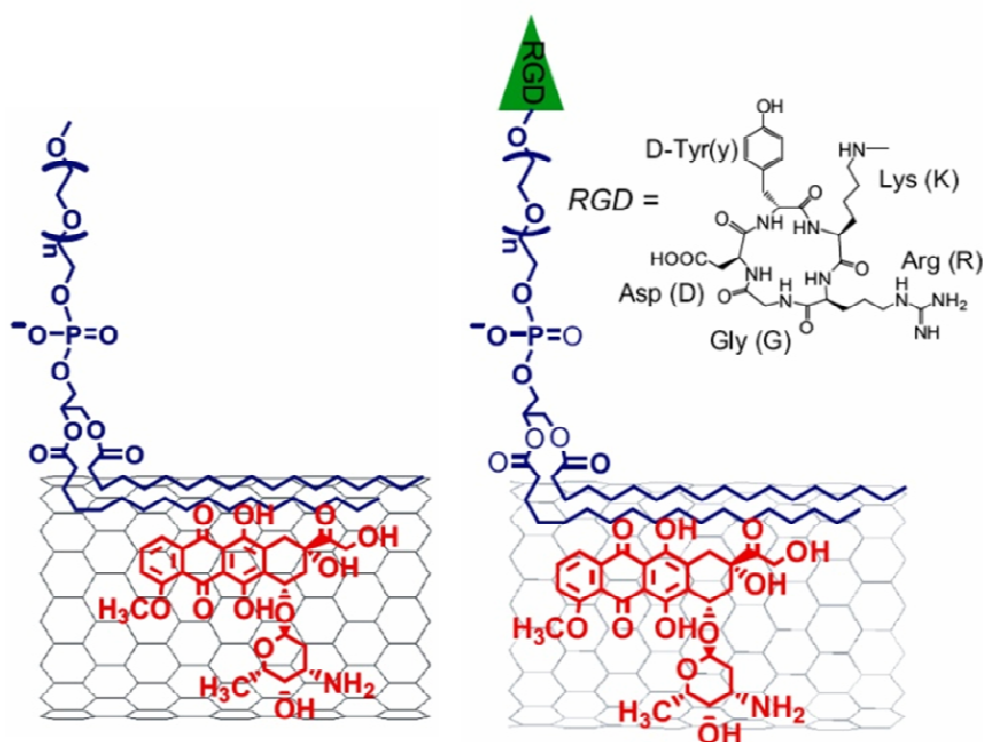


Schéma I-11 – Structures des nanotubes de carbone utilisés pour l'étude de vectorisation de la doxorubicine

Un taux d'inclusion très important est atteint par cette méthode, correspondant à un ratio massique de 4 (doxorubicine) pour 1 (nanotubes). Cette étude montra que 70 à 80% de la surface du nanotube de carbone était recouverte par la doxorubicine et environ 10% par le phospholipide. La doxorubicine étant une molécule insoluble en milieu basique, la réduction du pH de la solution aqueuse environnante de 9 à 5,5 permet de relarguer 40% du principe actif en 24 heures. Enfin, le greffage d'un ligand RGD sur le motif peggylé (Schéma I-11) a permis l'adressage de la doxorubicine vers des récepteurs de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, avec un taux d'internalisation plus important que dans le cas de l'espèce sans RGD.

De même, le greffage covalent d'anti cancéreux tel que le *cis*-platine à l'extrémité du phospholipide peggylé (Schéma I-12 – A) a montré une augmentation significative de la cytotoxicité de ce principe actif sur les cellules cancéreuses.¹⁵⁵ Cette augmentation provient de l'internalisation par endocytose de l'espèce nanotube hydrosoluble / complexe de platine qui relargue et fournit six fois plus de platine dans le cytoplasme. Enfin, une étude a mis en évidence la possibilité de vectorisation d'ADN et de siARN par greffage covalent sur le phospholipide par des liaisons clivables *in vivo* (Schéma I-12 – B & C). Cette étude démontra la capacité de ces nanotubes à transporter, relarguer et transloquer de l'ADN dans les cellules, ainsi que du siARN.^{156,157} Ces nanotubes de carbone pourraient donc être utilisés pour la thérapie génique.

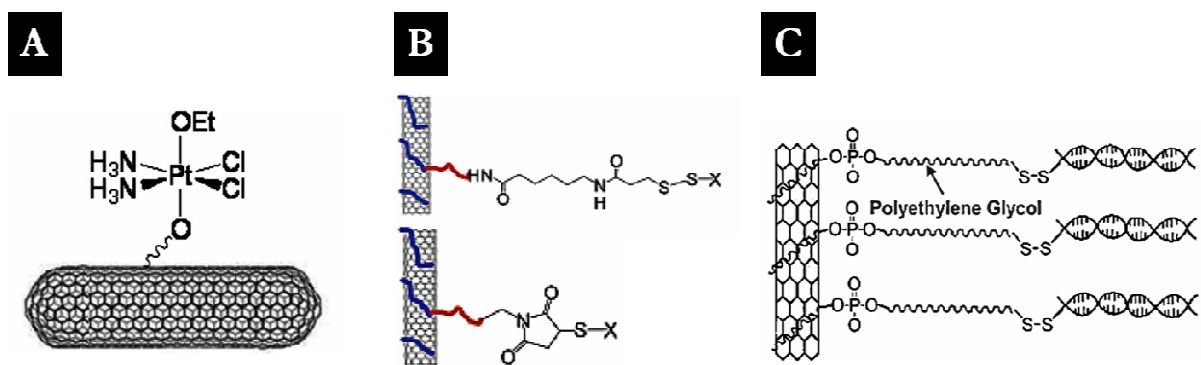


Schéma I-12 – (A) Structures des nanotubes de carbone pour l'étude de vectorisation de cisplatine (B & C) Structures des nanotubes de carbone pour l'étude de vectorisation d'ADN et de siARN

En conclusion, les nanotubes de carbone solubilisés par voie covalente et non covalente présentent une toxicité amoindrie et la capacité de traverser la membrane des cellules. Ces espèces couplées à un ligand d'adressage ont présenté une accumulation accrue dans le cytoplasme de la cellule. Enfin, le greffage covalent ou non covalent de principes actifs, peptides, protéines, ADN ou ARN accroît l'efficacité de l'espèce vectorisée par l'effet de multiprésentation et l'internalisation cellulaire.

I-8- Conclusion

Les nanovecteurs de médicaments sont au centre des enjeux de l'industrie pharmaceutique pour leur capacité à transporter des médicaments sur une cible précise avant de s'éliminer du corps. Ces différents véhicules (nanoparticule de polymères, microsphère, micelle polymérique, liposome, dendrimère et nanotube de carbone) présentent des propriétés particulières selon leurs structures chimiques et physiques. Le greffage de molécules hydrophiles conduit à une circulation sanguine prolongée (furtivité), l'utilisation de polymères biodégradables, à une élimination du corps et à un relargage contrôlé, et le greffage de ligands, à un ciblage spécifique de tissus tumoraux. Enfin, suivant le type de nanovecteur utilisé, différents principes actifs peuvent être transportés, qu'ils soient hydrophiles ou hydrophobes, avec des taux d'inclusion spécifiques s'échelonnant de 0,1% à 400%.

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier les propriétés de vectorisation de médicaments d'un nouveau vecteur amphiphile construit sur des nanotubes de carbone. Notre approche consiste à utiliser le nanotube de carbone comme support de formation (« *template* ») du vecteur amphiphile. Nous montrerons que ce transporteur, une fois isolé du nanotube de carbone, permet de solubiliser des principes actifs hydrophobes et affiche des propriétés prometteuses dans le domaine de la vectorisation.

- ¹ Smalley, R. E. *U.S. House Testimony of Richard E. Smalley* - http://www.house.gov/science/smalley_062299.html; 1999.
- ² Andrieux, K.; Desmaele, D.; D'Angélo, J.; Couvreur, P., Nanotechnologies et nouveaux médicaments. *L'actualité chimique* **2003**, 135-138.
- ³ Tong, R.; Cheng, J., Anticancer polymeric nanomédecines. *Polymer reviews* **2007**, 47, 345-381.
- ⁴ Amiji, M. M., Nanotechnology - improving targeted delivery. *Nanotechnology* **2007**, 53-56.
- ⁵ Rawat, M.; Singh, D.; Saraf, S., Nanocarriers : promising vehicle for bioactive drugs. *Biological and pharmaceutical bulletin* **2006**, 29, (9), 1790-1798.
- ⁶ *The scale of things*; Office of Basic Energy Sciences: 2006.
- ⁷ Cheng, J. Y.; Ross, C. A.; Smith, H. I.; Thomas, E. L., Templated self-assembly of block copolymers : top-down helps bottom-up. *Advanced materials* **2006**, 18, 2505-2521.
- ⁸ Chung, S.-W.; Ginger, D. S.; Morales, M. W.; Zhang, Z.; Chandrasekhar, V.; Ratner, M. A.; Mirkin, C. A., Top-down meets bottom-up : Dip-pen nanolithography and DNA-directed assembly of nanoscale electrical circuits. *Small* **2005**, (1), 2-7.
- ⁹ Lu, W.; Lieber, C. M., Nanoelectronics from the bottom up. *Nature* **2007**, 6, 841-850.
- ¹⁰ Molnar, G.; Cobo, S.; Real, J. A.; Carcenac, F.; Daran, E.; Vieu, C.; Bousseksou, A., A combined top-down/bottom-up approach for the nanoscale patterning of spin-crossover coordination polymers. *Advanced materials* **2007**, 19, 2163-2167.
- ¹¹ Teo, B. K.; Sun, X. H., From top-down to bottom-up to hybrid nanotechnologies : road to nanodevices. *Journal of cluster science* **2006**, 17, (4), 529-540.
- ¹² Zhang, X.; Sun, C.; Fang, N., Manufacturing at nanoscale : top-down, bottom-up and system engineering. *Journal of nanoparticle research* **2004**, 6, 125-130.
- ¹³ Evans, F.; Wennerstrom, H., Chapter 1: Solute and solvents, self-assembly of amphiphiles. In *The colloidal domain - where physics, chemistry and biology meet*, Wiley-VCH: 1999; pp 1 - 43.
- ¹⁴ Holmberg, K.; Jonsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B., *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. John Wiley & Sons: 2002.
- ¹⁵ Israelachvili, J. N., *Intermolecular and surface forces, with applications to colloidal and biological systems*. Academic Press: 1985.
- ¹⁶ Lehn, J.-M., Toward self-organization and complex matter. *Science* **2002**, 295, 2400-2403.
- ¹⁷ Whitesides, G. M.; Grzybowski, B., Self-assembly at all scales. *Science* **2002**, 295, 2418-2421.
- ¹⁸ Zhang, S., Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature biotechnology* **2003**, 21, (10), 1171-1178.
- ¹⁹ Hérino, R. In *Sciences Physiques Etats-Unis : Nanosciences, microélectronique, matériaux*, 2007.
- ²⁰ Letchford, K.; Burt, H., A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures : micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* **2007**, 65, 259-269.
- ²¹ Sinha, R.; Kim, G. J.; Nie, S.; Shin, D. M., Nanotechnology in cancer therapeutics : bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular cancer therapeutics* **2006**, 5, (8), 1909-1917.
- ²² Gu, F. X.; Karnik, R.; Wang, A. Z.; Alexis, F.; Levy-Nissenbaum, E.; Hong, S.; Langer, R. S.; Farokhzad, O. C., Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nanotoday* **2007**, 2, (3), 14-21.
- ²³ Allen, T. M.; Cullis, P. R., Drug delivery systems : entering the mainstream. *Science* **2004**, 303, 1818-1822.
- ²⁴ Daniels, T. R.; Delgado, T.; Helguera, G.; Penichet, M. L., The transferrin receptor part II : targeted delivery of therapeutic agent into cancer cells. *Clinical immunology* **2006**, 121, 159-176.
- ²⁵ Hillaireau, H.; Couvreur, P., Polymeric nanoparticles as drug carriers. In *Polymers in drug delivery*, Group, T. F., Ed. 2006; pp 101-110.
- ²⁶ Reis, C. P.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F., Nanoencapsulation II : Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* **2006**, 2, 53-65.
- ²⁷ Vauthier, C.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H.; Couvreur, P., Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews* **2003**, 55, 519-548.
- ²⁸ Brigger, I.; Morizer, J.; Aubert, G.; Chacun, H.; Terrier-Lacombe, M.-J.; Couvreur, P.; Vassal, G., Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2002**, 303, (3), 928-936.
- ²⁹ Park, K.; Lee, G. Y.; Kim, Y.-S.; Yu, M.; Park, R.-W.; Kim, I.-S.; Kim, S. Y.; Byun, Y., Heparin-deoxycholic acid chemical conjugate as an anticancer drug carrier and its antitumor activity. *Journal of controlled release* **2006**, 114, 300-306.
- ³⁰ Peracchia, M. T.; Fattal, E.; Desmaele, D.; Besnard, M.; Noel, J. P.; Gomis, J. M.; Appel, M.; d'Angélo, J.; Couvreur, P., Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *Journal of controlled release* **1999**, 60, (121-128).

- ³¹ Peracchia, M. T.; Harnisch, S.; Pinto-Alphandary, H.; Gulik, A.; Dedieu, J. C.; Desmaele, D.; d'Angélo, J.; Muller, S.; Couvreur, P., Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* **1999**, *20*, 1269-1275.
- ³² Peracchia, M. T.; Vauthier, C.; Desmaele, D.; Gulik, A.; Dedieu, J. C.; Demoy, M.; d'Angélo, J.; Couvreur, P., Pegylated nanoparticles form a novel methoxypolyethylene glycol cyanoacrylate - hexadecyl cyanoacrylate amphiphilic copolymer. *Pharmaceutical research* **1998**, *15*, (4), 550-556.
- ³³ Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmaele, D.; Hoebeke, J.; Renoir, M.; D'Angélo, J.; Cattel, L.; Couvreur, P., Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *Journal of pharmaceutical sciences* **2000**, *89*, (11), 1452-1464.
- ³⁴ Kim, H. R.; Andrieux, K.; Gil, S.; Taverna, M.; Chacun, H.; Desmaele, D.; Taran, F.; Georgin, D.; Couvreur, P., Translocation of poly(ethylene glycol-co-hexadecyl)cyanoacrylate nanoparticles into rat brain endothelial cells: role of apolipoproteins in receptor-mediated endocytosis. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 793-799.
- ³⁵ Stella, B.; Arpicco, S.; Rocco, F.; Marsaud, V.; Renoir, J.-M.; Cattel, L.; Couvreur, P., Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *International journal of pharmaceutics* **2007**, *344*, 71-77.
- ³⁶ Balland, O.; Pinto-Alphandary, H.; Pecquet, S.; Andremont, A.; Couvreur, P., The uptake of ampicillin-loaded nanoparticles by murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium*. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **1994**, *33*, 509-522.
- ³⁷ Balland, O.; Pinto-Alphandary, H.; Viron, A.; Puvion, E.; Andremont, A.; Couvreur, P., Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium* and treated with (³H) Ampicillin-loaded nanoparticles. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **1996**, *37*, 105-115.
- ³⁸ Forestier, F.; Gerrier, P.; Chaumard, C.; Quero, A.-M.; Couvreur, P.; Labarre, C., Effect of nanoparticle-bound ampicillin on the survival of *Listeria monocytogenes* in mouse peritoneal macrophages. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **1992**, *30*, 173-179.
- ³⁹ Youssef, M.; Fattal, E.; Alonso, M.-J.; Roblot-Treupel, L.; Sauzières, J.; Tancredi, C.; Omnès, A.; Couvreur, P.; Andremont, A., Effectiveness of nanoparticle-bound ampicillin in the treatment of *Listeria monocytogenes* infection in athymic nude mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1988**, *32*, 1204-1207.
- ⁴⁰ Lemarchand, C.; Gref, R.; Couvreur, P., Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **2004**, *58*, 327-341.
- ⁴¹ Uhrich, K. E.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S.; Shakesheff, K. M., Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical reviews* **1999**, *99*, 3181-3198.
- ⁴² Zhang, Z.; Feng, S.-S., The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4025-4033.
- ⁴³ Zhang, Z.; Lee, S. H.; Feng, S.-S., Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1889-1899.
- ⁴⁴ Bouissou, C.; Van Der Walle, C., Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. In *Polymers in drug delivery*, Group, T. F., Ed. 2006; pp 81-99.
- ⁴⁵ Zweers, M. L. T.; Engbers, G. H. M.; Grijpma, D. W.; Feijen, J., Release of anti-restenosis drugs from poly(ethylene oxide)-poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Journal of controlled release* **2006**, *114*, 317-324.
- ⁴⁶ Leamon, C. P.; Reddy, J. A., Folate-targeted chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews* **2004**, *56*, 1127-1141.
- ⁴⁷ Park, E. K.; Lee, S. B.; Lee, Y. M., Préparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol) / poly(caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs. *Biomaterials* **2005**, *26*, 1053-1061.
- ⁴⁸ Farokhzad, O. C.; Cheng, J.; Teply, B. A.; Sherifi, I.; Jon, S.; Kantoff, P. W.; Richie, J. P.; Langer, R., Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *PNAS* **2006**, *103*, (16), 6315-6320.
- ⁴⁹ Farokhzad, O. C.; Jon, S.; Khademhosseini, A.; Tran, T.-N. T.; Lavan, D. A.; Langer, R., Nanoparticle-aptamer bioconjugates : a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer research* **2004**, *64*, 7668-7672.
- ⁵⁰ Nobs, L.; Buchegger, F.; Gurny, R.; Allémann, E., Biodegradable nanoparticles for direct or two step tumor immunotargeting. *Bioconjugate chemistry* **2006**, *17*, 139-145.
- ⁵¹ Liang, H. F.; Chen, S.-C.; Chen, M.-C.; Lee, P.-W.; Chen, C.-T.; Sung, H.-W., Paclitaxel-loaded poly(glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system against cultured HepG2 cells. *Bioconjugate chemistry* **2006**, *17*, 291-299.
- ⁵² Wang, J.; Wang, B. M.; Schwendeman, S. P., Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of controlled release* **2002**, *82*, 289-307.
- ⁵³ Capan, Y.; Jiang, G.; Giovagnoli, S.; Na, K.-H.; DeLuca, P. P., Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of human growth hormone. *AAPS PharmSciTech* **2003**, *4*, (2), 1-10 (Article 28).
- ⁵⁴ Lemaire, V.; Bélair, J.; Hildgen, P., Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *International journal of pharmaceutics* **2003**, *258*, 95-107.

- 55 Lagarce, F.; Renaud, P.; Faisant, N.; Nicolas, G.; Cailleux, A.; Richard, J.; Menei, P.; Benoit, J.-P., Baclofen-loaded microspheres : preparation and efficacy testing in a new rabbit model. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **2005**, 59, 449-459.
- 56 Siepmann, J.; Faisant, N.; Akiki, J.; Richard, J.; Benoit, J.-P., Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release : experiment and theory. *Journal of controlled release* **2004**, 96, 123-134.
- 57 Pekarek, J.; Jacob, J. S.; Mathiowitz, E., Double-walled polymer microspheres for controlled drug release. *Nature* **1994**, 367, 258-260.
- 58 Lynn, D. M.; Amiji, M. M.; Langer, R., pH-reponsive polymer microspheres : rapid release of encapsulated material within the range of intracellular pH. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, (9), 1707-1710.
- 59 Wang, C.; Ge, Q.; Ting, D.; Nguyen, D.; Shen, H.-R.; Chen, J.; Eisen, H. N.; Heller, J.; Langer, R.; Putnam, D., Molecularly engineered poly(ortho ester) microspheres for enhanced delivery of DNA vaccines. *Nature materials* **2004**, 3, 190-196.
- 60 Zielhuis, S. W.; Nijsen, J. F. W.; Figueiredo, R.; Feddes, B.; Vredenberg, A. M.; Van het Schip, A. D.; Hennink, W. E., Surface characteristics of holmium-loaded poly(L-lactic acid) microspheres. *Biomaterials* **2005**, 26, 925-932.
- 61 Cheng, Y.-H.; Illum, L.; Davis, S. S., A poly(D,L-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol. *Journal of controlled release* **1998**, 55, 203-212.
- 62 Dani, B. A.; DeLuca, P. P., Preparation, characterization, and in vivo evaluation of salmon calcitonin microspheres. *AAPS PharmSciTech* **2001**, 2, (4), 1-7 (Article 22).
- 63 Roullin, V.-G.; Mege, M.; Lemaire, L.; Cueyssac, J.-P.; Vernier-Julienne, M.-C.; Menei, P.; Gamelin, E.; Benoit, J.-P., Influence of 5-fluorouracil-loaded microsphere formulation on efficient rat glioma radiosensitization. *Pharmaceutical research* **2004**, 21, (9), 1558-1563.
- 64 Lagarce, F.; Faisant, N.; Desfontis, J.-C.; Marescaux, L.; Gautier, F.; Richard, J.; Menei, P.; Benoit, J.-P., Baclofen-loaded microspheres in gel suspensions for intrathecal drug delivery : in vitro and in vivo evaluation. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **2005**, 61, 171-180.
- 65 Aubert-Pouessel, A.; Vernier-Julienne, M.-C.; Clavreul, A.; Sergent, M.; Jollivet, C.; Montero-Menei, C. N.; Garcion, E.; Bibby, D. C.; Menei, P.; Benoit, J.-P., In vitro study of GDNF from biodegradable PLGA microspheres. *Journal of controlled release* **2004**, 95, 463-475.
- 66 Benoit, J.-P.; Faisant, N.; Vernier-Julienne, M.-C.; Menei, P., Development of microspheres for neurological disorders : from basics to clinical applications. *Journal of controlled release* **2000**, 65, 285-296.
- 67 Bouissou, C.; Potter, U.; Altroff, H.; Mardon, H.; Van Der Walle, C., Controlled release of the fibronectin central cell binding domain from polymeric microspheres. *Journal of controlled release* **2004**, 95, 557-566.
- 68 Fu, K.; Park, D. W.; Klibanov, A. M.; Langer, R., Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharmaceutical research* **2000**, 17, (1), 100-106.
- 69 He, J.-T.; Su, H.-B.; Li, G.-P.; Tao, X.-M.; Mo, W.; Song, H.-Y., Stabilization and encapsulation of a staphylokinase variant (K35R) into poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *International journal of pharmaceutics* **2006**, 309, 101-108.
- 70 Jollivet, C.; Aubert-Pouessel, A.; Clavreul, A.; Vernier-Julienne, M.-C.; Remy, S.; Montero-Menei, C. N.; Benoit, J.-P.; Menei, P., Striatal implantation of GDNF releasing biodegradable microspheres promotes recovery of motor function in a partial model of Parkinson's disease. *Biomaterials* **2004**, 25, 933-942.
- 71 Pean, J.-M.; Menei, P.; Morel, O.; Montero-Menei, C. N.; Benoit, J.-P., Intraseptal implantation of NGF-releasing microspheres promote the survival of axotomized cholinergic neurons. *Biomaterials* **2000**, 21, 2097-2101.
- 72 Pean, J.-M.; Vernier-Julienne, M.-C.; Boury, F.; Menei, P.; Denizot, B.; Benoit, J.-P., NGF release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability. *Journal of controlled release* **1998**, 56, 175-187.
- 73 Tatard, V. M.; Vernier-Julienne, M.-C.; Saulnier, P.; Prechter, E.; Benoit, J.-P.; Menei, P.; Montero-Menei, C. N., Pharmacologically active nanocarriers : a tool for cell therapy. *Biomaterials* **2005**, 26, 3727-3737.
- 74 Galeska, I.; Kim, T.-K.; Patil, S. D.; Bhardwaj, U.; Chattopadhyay, D.; Papadimitrakopoulos, F.; Burgess, D. J., Controlled release of dexamethasone from PLGA microspheres embedded within polyacid-containing PVA hydrogels. *AAPS PharmSciTech* **2005**, 7, (1), E231-E240 (article 222).
- 75 Zlonik, B. S.; Burgess, D. J., Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *Journal of controlled release* **2007**, 122, 338-344.
- 76 von Burkersroda, F.; Schedl, L.; Gopferich, A., Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* **2002**, 23, 4221-4231.
- 77 Elkharraz, K.; Faisant, N.; Guse, C.; Siepmann, J.; Arica-Yegin, B.; Oger, J. M.; Gust, R.; Goepferich, A.; Benoit, J.-P.; Siepmann, J., Paclitaxel-loaded microparticles and implants for the treatment of brain cancer : preparation and physicochemical characterization. *International journal of pharmaceutics* **2006**, 314, 127-136.
- 78 Hubbel, J. A., Enhancing drug function. *Science* **2003**, 300, 595-596.
- 79 Torchilin, V. P., Polymeric micelles as pharmaceutical carriers. In *Polymers in drug delivery*, Group, T. F., Ed. 2006; pp 111-130.
- 80 Torchilin, V. P., Micellar nanocarriers : pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research* **2007**, 24, (1), 1-16.
- 81 Sutton, D.; Nasogkla, N.; Blanco, E.; Gao, J., Functionalized systems for cancer targeted drug delivery. *Pharmaceutical research* **2007**, 24, (6), 1029-1046.

- ⁸² Croy, S. R.; Know, G. S., Polymeric micelles for drug delivery. *Current pharmaceutical design* **2006**, 12, (00), 1-15.
- ⁸³ Haag, R., Supramolecular drug-delivery systems based on polymeric core-shell architectures. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43, 278-282.
- ⁸⁴ Nishiyama, N.; Kataoka, K., Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology & therapeutics* **2006**, 112, 630-648.
- ⁸⁵ Zhang, J. X.; Li, X. J.; Qiu, L. Y.; Li, X. H.; Yan, M. Q.; Zhu, K. J., Indomethacin-loaded polymeric nanocarriers based on amphiphilic polyphosphazenes with poly(N-isopropylacrylamide) and ethyl tryptophan as side groups : preparation, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of controlled release* **2006**, 116, 322-329.
- ⁸⁶ Oh, K. T.; Bronich, T. K.; Bromberg, L.; Hatton, T. A.; Kabanov, A. V., Block ionomer complexes as prospective nanocontainers for drug delivery. *Journal of controlled release* **2006**, 115, 9-17.
- ⁸⁷ Bae, Y.; Futushima, S.; Harada, A.; Kataoka, K., Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery : polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, 42, 4640-4643.
- ⁸⁸ Bae, Y.; Jang, W.-D.; Nishiyama, N.; Futushima, S.; Kataoka, K., Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Molecular biosystems* **2005**, 1, 242-250.
- ⁸⁹ Bae, Y.; Nishiyama, N.; Futushima, S.; Koyama, H.; Yasuhiro, M.; Kataoka, K., Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property : tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. *Bioconjugate chemistry* **2005**, 16, 122-130.
- ⁹⁰ Kawano, K.; Watanabe, M.; Yamamoto, T.; Yokoyama, M.; Opanasopit, P.; Okano, T.; Maitani, Y., Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles. *Journal of controlled release* **2006**, 112, 329-332.
- ⁹¹ Opanasopit, P.; Yokoyama, M.; Watanabe, M.; Kabanov, A. V.; Maitani, Y.; Okano, T., Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting. *Pharmaceutical research* **2004**, 21, (11), 2001-2008.
- ⁹² Watanabe, M.; Kawano, K.; Yokoyama, M.; Opanasopit, P.; Okano, T.; Maitani, Y., Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability. *International journal of pharmaceutics* **2006**, 308, 183-189.
- ⁹³ Burt, H. M.; Zhang, X.; Toilekis, P.; Embree, L.; Hunter, W. L., Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel. *Colloids and surfaces B : biointerfaces* **1999**, 16, 161-171.
- ⁹⁴ Kim, S. C.; Kim, D. W.; Shim, Y. H.; Bang, J. S.; Oh, H. S.; Kim, S. W.; Seo, M.-H., In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation : toxicity and efficacy. *Journal of controlled release* **2001**, 72, 191-202.
- ⁹⁵ Liggins, R. T.; Burt, H. M., Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations. *Advanced drug delivery reviews* **2002**, 54, 191-202.
- ⁹⁶ Yasugi, K.; Nakamura, T.; Nagasaki, Y.; Kato, M.; Kataoka, K., Sugar-installed polymer micelles : synthesis and micellization of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers having sugar groups at the PEG chain end. *Macromolecules* **1999**, 32, 8024-8032.
- ⁹⁷ Yoo, H. S.; Park, T. G., Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *Journal of controlled release* **2004**, 96, 273-283.
- ⁹⁸ Aliabadi, H. M.; Elhasi, S.; Maahmud, A.; Gulamhusein, R.; Mahdipoor, P.; Lavasanifar, A., Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through co-solvent evaporation : the effect of solvent composition on micellar properties and drug loading. *International journal of pharmaceutics* **2007**, 329, 158-165.
- ⁹⁹ Lee, S.-W.; Chang, D.-H.; Shim, M.-S.; Kim, B.-O.; Kim, S.-O.; Seo, M.-H., Ionically fixed polymeric nanoparticles as a novel drug carrier. *Pharmaceutical research* **2007**, 24, (8), 1508-1516.
- ¹⁰⁰ Opanasopit, P.; Ngawhirunpat, T.; Chaidedgumjorn, A.; Rojanarata, T.; Apirakarawong, A.; Phongying, S.; Choochottiros, C.; Chirachanchai, S., Incorporation of camptothecin into N-phthaloyl chitosan-g-mPEG self-assembly micellar system. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **2006**, 64, 269-276.
- ¹⁰¹ Zhang, L.; Hu, Y.; Yang, C.; Lu, W.; Yang, Y. H., Camptothecin derivative-loaded poly(caprolactone-co-lactide)-b-PEG-b-poly(caprolactone-co-lactide) nanoparticles and their biodistribution in mice. *Journal of controlled release* **2004**, 96, 135-148.
- ¹⁰² Gao, Z.; Lukyanov, A. N.; Singhal, A.; Torchilin, V. P., Diacyllipid-polymer micelles as nanocarriers for poorly soluble anticancer drugs. *Nano letters* **2002**, 2, (9), 979-982.
- ¹⁰³ Koo, O. M.; Rubinstein, I.; Onyuksel, H., Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles : a novel nanomedicine. *Nanomedicine* **2005**, 1, 77-84.
- ¹⁰⁴ Sawant, R. M.; Hurlley, J. P.; Salmaso, S.; Kale, A.; Tolcheva, E.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P., "SMART" drug delivery systems : double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers. *Bioconjugate chemistry* **2006**, 17, 943-949.
- ¹⁰⁵ Sezgin, Z.; Yuksel, N.; Baykara, T., Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **2006**, 64, 261-268.

- ¹⁰⁶ Slaughter, J. N.; Schmidt, K. M.; Byram, J. L.; Mecozzi, S., Synthesis and self-assembly properties of a novel [poly(ethylene glycol)]-fluorocarbon-phospholipid triblock copolymer. *Tetrahedron letters* **2007**, 48, 3879-3882.
- ¹⁰⁷ Tian, L.; Yam, L.; Wang, J.; Tat, H.; Uhrich, K. E., Core crosslinkable polymeric micelles from PEG-lipid amphiphiles as drug carriers. *Journal of materials chemistry* **2004**, 14, 2317-2324.
- ¹⁰⁸ Oh, K. T.; Yin, H.; Lee, E. S.; Bae, Y. H., Polymeric nanovehicles for anticancer drugs with triggering release mechanisms. *Journal of materials chemistry* **2007**, 17, 3987-4001.
- ¹⁰⁹ Park, E. K.; Kim, S. Y.; Lee, S. B.; Lee, Y. M., Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly(caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *Journal of controlled release* **2005**, 109, 158-168.
- ¹¹⁰ Sharma, A.; Sharma, U. S., Liposomes in drug delivery : progress and limitations. *International journal of pharmaceutics* **1997**, 154, 123-140.
- ¹¹¹ Ranade, V. V.; Hollinger, M. A., Chapter 1 : Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. In *Drug delivery systems - 2nd edition*, CRC, Ed. 2004; pp 13-44.
- ¹¹² Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology* **1965**, 13, 238-252.
- ¹¹³ Torchilin, V. P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews : drug discovery* **2005**, 4, 145-160.
- ¹¹⁴ Lorin, A.; Flore, C.; Thomas, A.; Brasseur, R., Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2004**, 8, (3), 163-176.
- ¹¹⁵ Ahmed, F.; Discher, D. E., Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL : hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *Journal of controlled release* **2004**, 96, 37-53.
- ¹¹⁶ Discher, B. M.; Ortiz, V.; Srinivas, G.; Klein, M. L.; Kim, Y.; Christain, D.; Cai, S.; Photos, P.; Ahmed, F., Emerging applications of polymersomes in delivery : from molecular dynamics to shrinkage of tumors. *Progress in polymer science* **2007**, 32, 838-857.
- ¹¹⁷ Discher, D. E.; Ahmed, F., Polymersomes. *The annual review of biomedical engineering* **2006**, 8, 323-241.
- ¹¹⁸ Discher, D. E.; Eisenberg, A., Polymer vesicles. *Science* **2002**, 297, 967-973.
- ¹¹⁹ Uchegbu, I. F.; Anderson, S.; Brownlie, A., Polymeric vesicles. In *Polymers in drug delivery*, Group, T. F., Ed. 2006; pp 131-153.
- ¹²⁰ Discher, B. M.; Won, Y.-Y.; Ege, D. S.; Lee, J. C.-M.; Bates, F. S.; Discher, D. E.; Hammer, D. A., Polymersomes : tough vesicles made from diblock copolymers. *Science* **1999**, 284, 1143-1146.
- ¹²¹ Saetern, A. M.; Skar, M.; Braaten, A.; Brandl, M., Camptothecin-catalyzed phospholipid hydrolysis in liposomes. *International journal of pharmaceutics* **2005**, 288, 73-80.
- ¹²² Lee, R. J.; Low, P. S., Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. *The journal of biological chemistry* **1994**, 269, (5), 3198-3204.
- ¹²³ Pakunlu, R. I.; Wang, Y.; Saad, M.; Khandare, J. J.; Starovoytov, V.; Minko, T., In vitro and in vivo intracellular liposomal delivery of antisense oligonucleotides and anticancer drug. *Journal of controlled release* **2006**, 114, 153-162.
- ¹²⁴ Saul, J. M.; Annapragada, A. V.; Bellamkonda, R. V., A dual-ligand approach for enhancing targeting selectivity of therapeutic nanocarriers. *Journal of controlled release* **2006**, 114, 277-287.
- ¹²⁵ Chécot, F.; Rodriguez-Hernandez, J.; Gnanou, Y.; Lecommandoux, S., pH-responsive micelles and vesicles nanocapsules based on polypeptide diblock copolymers. *Biomolecular engineering* **2007**, 24, 81-85.
- ¹²⁶ Ahmed, F.; Pakunlu, R. I.; Brannan, A.; Bates, F. S.; Minko, T.; Discher, B. M., Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxoubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *Journal of controlled release* **2006**, 116, 150-158.
- ¹²⁷ Ahmed, F.; Pakunlu, R. I.; Srinivas, G.; Brannan, A.; Bates, F. S.; Klein, M. L.; Minko, T.; Discher, B. M., Shrinkage of a rapidly growing tumor by drug-loaded polymersomes : pH-triggered release through copolymer degradation. *Molecular pharmaceutics* **2005**, 3, (3), 340-350.
- ¹²⁸ Holowka, E. P.; Pochan, D. J.; Deming, T. J., Charged polypeptide vesicles with controllable diameter. *Journal of the american chemical society* **2005**, 127, (35), 12423-12428.
- ¹²⁹ Chonn, A.; Cullis, P. R., Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. *Advanced drug delivery reviews* **1998**, 30, 73-83.
- ¹³⁰ Cullis, P. R.; Hope, M. J.; Bally, M. B.; Madden, T. D.; Mayer, L. D.; Fenske, D. B., Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* **1997**, 1331, 187-211.
- ¹³¹ Opsteen, J. A.; Brinkhuis, R. P.; Teeuwen, R. L. M.; Lowik, D. W. P. M.; van Hest, J. C. M., "Clickable" polymersomes. *Chemical communications* **2007**, 30, 3136-3138.
- ¹³² Crampton, H. L.; Simanek, E. E., Dendrimers as drug delivery vehicles : non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers. *Polymer international* **2007**, 56, 489-496.
- ¹³³ D'Emanuele, A.; Attwood, D., Dendrimer-drug interactions. *Advanced drug delivery reviews* **2005**, 57, 2147-2162.
- ¹³⁴ Lee, C. L.; MacKay, J. A.; Fréchet, J. M. J.; Szoka, F. C., Designing dendrimers for biological applications. *Nature biotechnology* **2005**, 23, (12), 1517-1526.
- ¹³⁵ Gingras, M.; Raimundo, J.-M.; Chabre, Y. M., Cleavable dendrimers. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46, 1010-1017.

- ¹³⁶ Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F., Design and synthesis of glycodendrimers. *Molecular biotechnology* **2002**, 90, 231-255.
- ¹³⁷ Gupta, U.; Agashe, H. B.; Asthana, A.; Jain, N. K., Dendrimers : novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (3), 649-658.
- ¹³⁸ Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J., Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug discovery today* **2005**, 10, (1), 35-43.
- ¹³⁹ Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, 354, 56.
- ¹⁴⁰ Banerjee, S.; Kahn, M. G. C.; Wong, S. S., Rational Chemical Strategies for Carbon Nanotube Functionalization. *Chemistry a european journal* **2003**, 9, 1898-1908.
- ¹⁴¹ Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M., Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chemical reviews* **2006**, 106, 1105-1136.
- ¹⁴² Britz, D. A.; Khlobystov, A. N., Noncovalent interactions of molecules with single walled carbon nanotubes. *Chemical society reviews* **2006**, (35).
- ¹⁴³ Bianco, A.; Kostarelos, K.; Partidos, C. D.; Prato, M., Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chemical communications* **2005**, (571-577).
- ¹⁴⁴ Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M., Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current opinion in chemical biology* **2005**, 9, 674-679.
- ¹⁴⁵ Klumpp, C.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A., Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochimica et biophysica acta* **2006**, 1758, 404-412.
- ¹⁴⁶ Singh, R.; Pantarotto, D.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Klumpp, C.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K., Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *PNAS* **2006**, 103, (9), 3357-3362.
- ¹⁴⁷ Lacerda, L.; Soudararajan, A.; Singh, R.; Pastorin, G.; Al-Jamaj, K. T.; Turton, J.; Frederik, P.; Herrero, M. A.; Li, S.; Bao, A.; Emfietzoglou, D.; Mather, S.; Phillips, W. T.; Prato, M.; Bianco, A.; Goins, B.; Kostarelos, K., Dynamic imaging of functionalized multi-walled carbon nanotube systemic circulation and urinary excretion. *Advanced materials* **2007**, 20, 225-230.
- ¹⁴⁸ Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A., Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Accounts of chemical research* **2007**, 41, (1), 60-68.
- ¹⁴⁹ Kostarelos, K.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.; Luangsivilay, J.; Godefroy, S.; Pantarotto, D.; Briand, J.-P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A., Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature nanotechnology* **2007**, 2, 108-113.
- ¹⁵⁰ Wu, W.; Wieckowski, S.; Pastorin, G.; Benincasa, M.; Klumpp, C.; Briand, J.-P.; Gennaro, R.; Prato, M.; Bianco, A., Targeted delivery of Amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44, 6358-6362.
- ¹⁵¹ Pantarotto, D.; Partidos, C. D.; Graff, R.; Hoebeke, J.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Bianco, A., Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides. *Journal of the american chemical society* **2003**, 125, 6160-6164.
- ¹⁵² Pantarotto, D.; Partidos, C. D.; Hoebeke, J.; Brown, F.; Kramer, E.; Briand, J.-P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A., Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chemistry & Biology* **2003**, 10, 961-966.
- ¹⁵³ Liu, Z.; Cai, W.; He, L.; Nakayama-Ratchford, N.; Chen, K.; Sun, X.; Chen, X.; Dai, H., In vivo distribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nature nanotechnology* **2007**, 2, 47-52.
- ¹⁵⁴ Liu, Z.; Sun, X.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H., Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. *ACS nano* **2007**, 1, (1), 50-56.
- ¹⁵⁵ Feazell, R. P.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H.; Lippard, S. J., Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinumium (IV) anticancer drug design. *Journal of the american chemical society* **2007**, 129, 8438-8439.
- ¹⁵⁶ Kam, N. W. S.; Liu, Z.; Dai, H., Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. *Journal of the american chemical society* **2005**, 127, 12492-12493.
- ¹⁵⁷ Liu, Z.; Winters, M.; Holodniy, M.; Dai, H., siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon-nanotube transporters. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46, 2023-2027.

CHAPITRE II

DU NANOTUBE DE CARBONE
AUX NANOBAGUES

Les nanotubes de carbone – découverts en 1991 par *Sumio Iijima* – sont une nouvelle forme allotropique du carbone avec des propriétés électroniques et mécaniques remarquables. Cette nouvelle espèce a suscité un engouement important dans le monde scientifique notamment dans l'étude de leur synthèse et de leur utilisation. Ces objets, par nature, sont insolubles dans la quasi-totalité des solvants et en particulier dans l'eau.

Au sein du laboratoire de *Charles Mioskowski* au CNRS à Strasbourg et au CEA à Saclay, différents travaux ont été menés sur la manipulation et l'utilisation des nanotubes de carbone pour diverses applications dans des domaines tels que la biologie, la catalyse ou la physique. Au cours de ces différentes études, il a été mis en évidence que certains amphiphiles avaient la propriété de s'adsorber à la surface des nanotubes de carbone et d'induire une dispersabilité en milieu aqueux. Une étude par microscopie électronique menée sur ces suspensions a mis en évidence une organisation particulière de ces tensio-actifs, sous forme d'hémicylindres circulaires, à la surface des nanotubes de carbone.

Suivant la nature des tensio-actifs utilisés, des arrangements stables en anneaux ont pu être obtenus après polymérisation des surfactants autour des nanotubes de carbone. Ces anneaux, une fois réticulés, peuvent être isolés de leur support carboné. Ces objets présentent des propriétés particulières de par leur forme et leur structure amphiphile.

Dans ce chapitre, nous discuterons de la structure et du mode de synthèse des nanotubes de carbone qui ont été utilisés comme moule (« *template* ») lors de la fabrication des anneaux d'amphiphiles. Le premier objectif a été d'explorer la première voie d'obtention des nanobagues puis nous avons poursuivi par l'amélioration du procédé de synthèse des nanobagues. Pour ce faire, nous avons d'abord synthétisé de nouveaux amphiphiles polymérisables permettant d'obtenir des anneaux plus robustes, puis optimisé le procédé d'extraction afin de séparer les nanobagues du nanotube de carbone tout en maintenant leur structuration initiale. Enfin, nous avons caractérisé les anneaux de tensio-actifs polymérisés afin de connaître plus précisément leur structure.

II-1- Les nanotubes de carbone

II-1-1- Les différentes formes allotropiques du carbone

Le graphite et le diamant sont les deux formes allotropiques (naturelles) les plus connues de carbone cristallin.^{1,2} Le graphite est formé d'hexagones de carbone hybridé sp^2 qui forment des structures planes, dont chaque unité hexagonale peut être assimilée à un noyau benzénique

(Figure II-1 – A). Le diamant est constitué d'atomes de carbone tétraédrique hybridé sp^3 qui forment des structures tridimensionnelles, dont chaque unité peut être assimilée à un motif cyclohexane dans la conformation chaise (Figure II-1 – B).

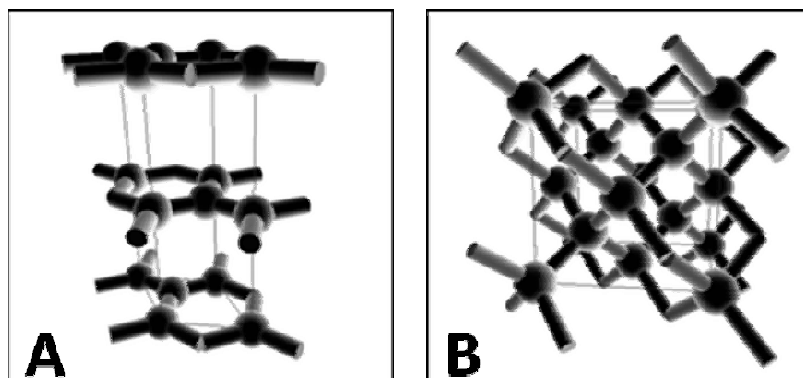


Figure II-1 – Structures du graphite (A) et du diamant (B)

Dans les années 80-90, deux nouvelles formes allotropiques du carbone ont été mises en évidence : le fullerène et les nanotubes de carbone.

Le fullerène (ou buckminsterfullerene) fut découvert accidentellement par le groupe de *Kroto et al.* en 1985 lors d'une expérience de vaporisation laser d'un plan de graphite dans le but d'étudier la formation de clusters et de chaînes de carbone.³ La spectrométrie de masse montra que le fullerène est une espèce chimique stable grâce à sa configuration en pentagone (Figure II-2).⁴ Suite à cette découverte, le professeur *Rick Smalley*, le professeur *Robert Curl* et le professeur *Harry Kroto* obtinrent le prix Nobel de chimie en 1996.

Le fullerène, avec sa forme en ballon de football, est composé de pentagones et d'hexagones formant une structure fermée en forme de cage où chaque atome de carbone est lié à trois autres atomes de carbone. Néanmoins, le fullerène n'est pas aromatique et se comporte plus comme un alcène pauvre en électron. Cette propriété lui permet de réagir avec des molécules riches en électrons. Enfin, de par sa structure particulière, le fullerène est une espèce très stable et constitue la troisième forme allotropique connue du carbone (non naturelle).



Figure II-2 – Structure du fullerène (ou buckminsterfullerene)

Six ans plus tard, en 1991, le scientifique japonais *Sumio Iijima*⁵ mit en évidence la présence de «microtubules cylindriques de carbone graphitique» sur l'électrode négative de son système de synthèse de fullerènes par arc électrique. L'observation de ce dépôt par microscopie électronique à transmission montra la présence de différents types de nanotubes de carbone : des nanotubes de carbone à double parois ou multi parois (Figure II-3). Ainsi, le nanotube de carbone constitue la quatrième et dernière forme allotropique connue du carbone (non naturelle).

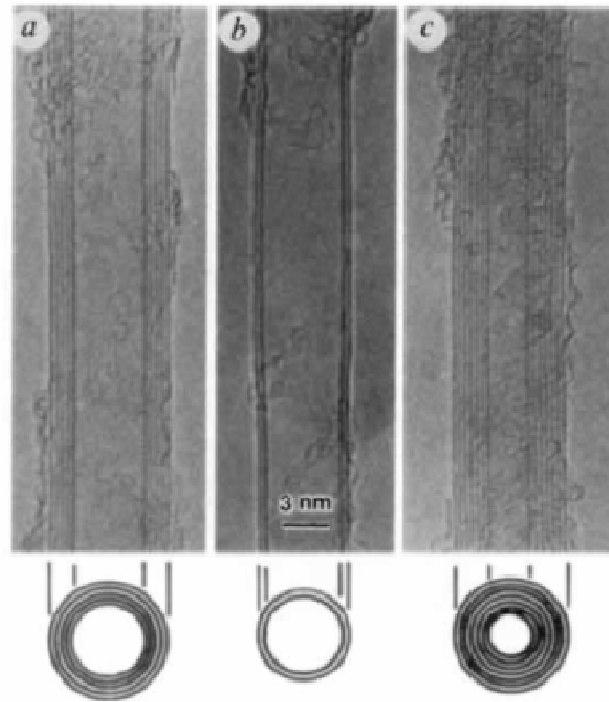


Figure II-3 – Premières observations par MET de nanotubes de carbone par S. Iijima⁵

Dès lors, la découverte de ce nouveau matériau incita de nombreux groupes de recherche à étudier les différents modes de synthèse et de purification.

II-1-2- Structure des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone peuvent être classés en deux catégories : les nanotubes simple feuillet (aussi appelés mono paroi ou *single-walled carbon nanotubes* – SWNT) et les nanotubes multi feuillets (aussi appelés multi parois ou *multi-walled carbon nanotubes* – MWNT).^{1,2,4}

Les SWNTs peuvent être considérés comme des longs plans de graphite enroulés sur eux-mêmes (Figure II-4 – A) et fermés aux extrémités par deux fullerènes (Figure II-4 – C). De ce fait, les nanotubes de carbone sont classés dans la même famille que les fullerènes et peuvent être assimilés à des fullerènes allongés. Néanmoins, comme le graphite, les nanotubes de carbone sont

formés d'hexagones de carbone hybridé sp^2 dont chaque unité hexagonale peut être assimilée à un noyau benzénique. Les nanotubes de carbone sont donc des espèces aromatiques.

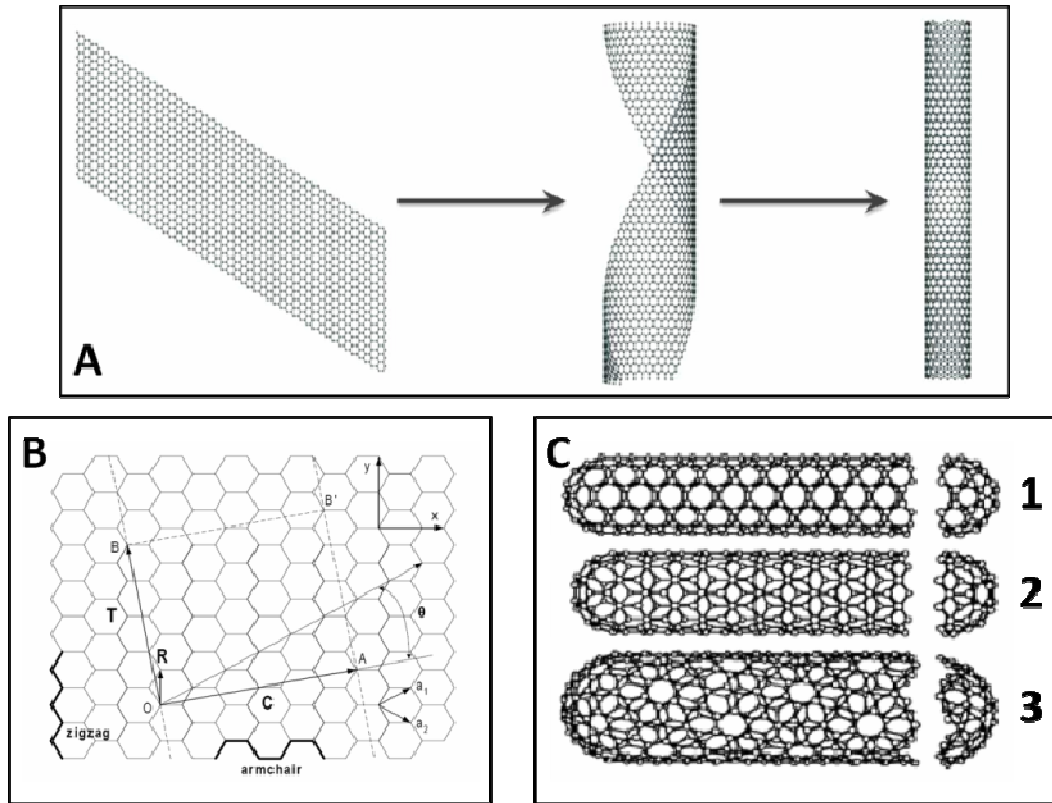


Figure II-4 – Structures des nanotubes de carbone²

Les propriétés électroniques des nanotubes de carbone changent selon l'enroulement du feuillet de graphite⁶ (feuillet externe dans le cas des nanotubes de carbone multi parois) dans une orientation spécifique et peuvent être classés en trois catégories :

- ✓ Les nanotubes dits « *armchair* », dont l'enroulement s'effectue parallèlement au côté des hexagones (Figure II-4 – B & C-1), ont la propriété électronique d'être métallique.
- ✓ Les nanotubes dits « *zigzag* », dont l'enroulement s'effectue perpendiculairement au côté des hexagones (Figure II-4 – B & C-2), et les nanotubes dits « *chiraux* », dont l'enroulement s'effectue selon un vecteur OA (Figure II-4 – B) et qui sont les intermédiaires des « *armchair* » et « *zigzag* » (Figure II-4 – C-3), ont la propriété d'être pour 1/3 métallique et pour 2/3 semi-conducteur.

Les SWNTs, d'un diamètre nanométrique pour une longueur micrométrique, ont un ratio longueur sur diamètre d'environ 1000. Ces structures peuvent être considérées comme un objet à une dimension.

II-1-3- Généralités sur la synthèse des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone sont synthétisés par trois méthodes principales : les techniques par arc électrique, par ablation laser et par décomposition catalytique. La synthèse des différents types de nanotubes (mono, double ou multi parois) dépend de la présence ou non de catalyseur.

II-1-3-1- Technique par décharge d'un arc électrique

La technique de l'arc électrique est la méthode la plus ancienne et la plus communément utilisée pour la synthèse de nanotubes de carbone. Elle a permis de synthétiser les premiers nanotubes multifeuillets mis en évidence par *Sumio Iijima* en 1991.⁵ Elle consiste à sublimer du graphite à l'anode (température de sublimation=3650°C) et à le condenser à la cathode dans une enceinte sous atmosphère inerte à pression réduite ou atmosphérique.^{2,7,8} L'utilisation de graphite pur a permis la synthèse de nanotubes multi parois, et l'utilisation de graphite contenant des catalyseurs métalliques comme le fer, le cobalt ou le nickel, a permis la synthèse de nanotubes mono parois.⁹⁻¹¹

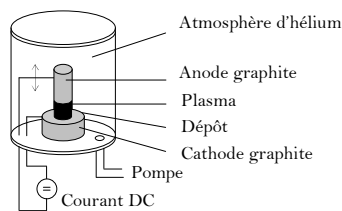


Figure II-5 – Schéma de principe du montage de synthèse de nanotubes de carbone par arc électrique

La méthode consiste à créer un arc électrique, entre deux électrodes de graphite sous atmosphère inerte, qui engendre la formation d'un plasma d'une température proche de 6000°C sublimer le graphite de l'anode (Figure II-5). La température à la cathode étant inférieure à la température de sublimation du graphite, le carbone sublimé se dépose à cette électrode sous forme de nanotubes de carbone et de carbone amorphe. Ce procédé, peu coûteux et facilement réalisable, permet d'obtenir des nanotubes avec très peu de défauts de structure. L'inconvénient de cette méthode réside dans le faible rendement de synthèse, du fait de la présence d'une grande quantité d'impuretés : fullerènes, carbone amorphe ou catalyseurs métalliques (dans la synthèse de nanotubes mono parois).

II-1-3-2- Technique par ablation laser

La technique de l'ablation laser, utilisée pour la première fois pour la synthèse de fullerène par le groupe de *Smalley* à l'Université de Rice en 1985,³ fut employée pour synthétiser des

nanotubes de carbone en 1995.¹² Ce procédé¹³ consiste à viser une cible de graphite placée dans une enceinte chauffée à 1200°C par un rayonnement laser de forte énergie (en continu¹⁴ ou pulsé¹⁵), dans le but de sublimer ou d'expulser du carbone, qui vient se condenser sous forme de nanotubes de carbone, sur une tige de cuivre refroidie par de l'eau glacé (Figure II-6).

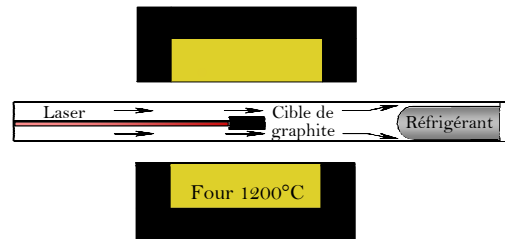


Figure II-6 – Schéma de principe du montage de synthèse des nanotubes de carbone par ablation laser

Cette méthode est similaire à la technique par arc électrique, puisque la vaporisation de la cible graphitique se fait dans une atmosphère inerte et en présence de graphite contenant un catalyseur métallique. Néanmoins, cette technique est plus onéreuse du fait du coût élevé du laser utilisé et de la puissance requise pour vaporiser le graphite. Les nanotubes de carbone obtenus sont uniquement des nanotubes de carbone simple paroi avec un diamètre contrôlé et une pureté importante (Figure II-7).

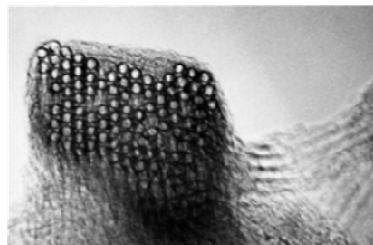


Figure II-7 – Image MEB d'un faisceau de nanotubes mono paroi synthétisés par ablation laser¹³

II-1-3-3- Technique par décomposition catalytique

La méthode par décomposition thermique en phase vapeur a été utilisée pour la première fois en 1993 pour synthétiser des nanotubes multi parois par décomposition catalytique d'acétylène sur des particules de fer à 700°C.¹⁶ Cette méthode a permis d'obtenir des nanotubes d'une longueur d'environ 50 µm pour un diamètre compris entre 5 et 50 nm. La taille des nanotubes de carbone est gouvernée celle des particules de fer à partir desquelles les nanotubes croissent. Des nanotubes ont été synthétisés de façon similaire par décomposition thermique à 1100°C de molécules de benzène.¹⁷

La croissance de nanotubes par dépôt chimique en phase vapeur (CVD) a permis d'obtenir des nanotubes de carbone dont le diamètre est contrôlé par celui des particules de catalyseurs (Fe, Ni ou Co). Cette méthode consiste à décomposer un gaz carboné (acétylène, méthane ou monoxyde de carbone) dans un four à haute température en présence d'un catalyseur.¹⁸ Néanmoins, cette méthode ne peut produire que quelques milligrammes à quelques grammes de nanotubes mono paroi.

Pour synthétiser des nanotubes de carbone à plus grande échelle, une méthode de croissance de nanotubes par dépôt chimique en phase vapeur à haute pression (« HiPCO ») a été mise au point par le groupe de *Smalley*.¹⁹ Ce procédé consiste à décomposer sous haute pression du monoxyde de carbone en présence de métallocène ou de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ (Figure II-8) et permet de synthétiser en continu des nanotubes mono paroi.

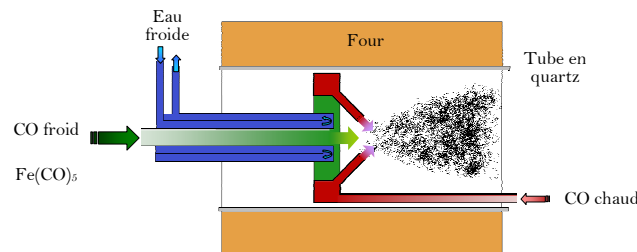


Figure II-8 – Schéma de principe de la synthèse de nanotubes par CVD par la technique HiPCO¹⁹

Les nanotubes synthétisés par cette méthode présentent une distribution en diamètre de 0,7 à 1,4 nm et un fort rayon de courbure (Figure II-9).

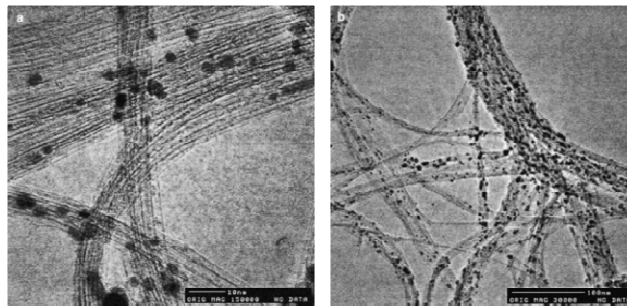


Figure II-9 – Images MET de nanotubes de carbone mono paroi synthétisés par la méthode HiPCO¹⁹

II-1-4- Purification des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone, après synthèse, contiennent une grande quantité d'impuretés, ce qui peut être ennuyeux selon les applications envisagées. Les impuretés les plus courantes sont le graphite, le carbone amorphe, les catalyseurs métalliques ou les fullerènes.

Une étape de purification est nécessaire avant l'utilisation de ces composés. Différentes méthodes, que nous ne développerons pas, existent pour purifier les nanotubes de carbone telles que l'oxydation, les traitements acides, le traitement aux ultrasons, la purification magnétique, la microfiltration, la fonctionnalisation ou la chromatographie.²⁰

II-1-5- Synthèse de nanotubes de carbone multi parois à l'EPFL

Dans le cadre de notre étude, des nanotubes de carbone réguliers et sans défauts, avec un faible rayon de courbure, ont été nécessaires afin de mener à bien l'étude sur les nanobagues.

Une étude a été menée au laboratoire sur la morphologie de différents types de nanotubes de carbone provenant de sources commerciales ou non. Cette étude a mis en évidence que les nanotubes de carbone multi parois, synthétisés par la méthode de l'arc électrique, étaient les plus appropriés. En effet, par cette méthode, les MWNTs obtenus sont rectilignes avec un rayon de courbure très faible voir quasi nul dans la plupart des cas (Figure II-10).

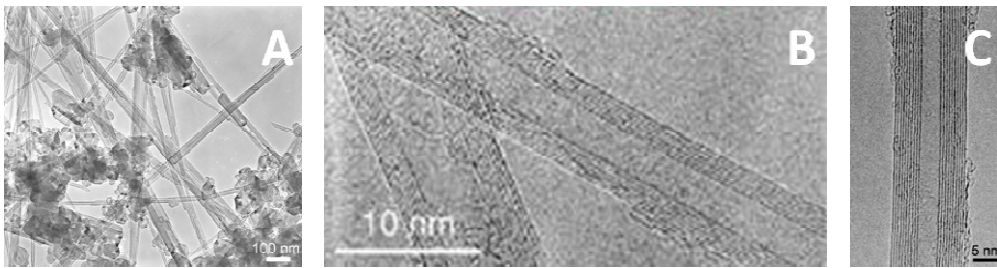


Figure II-10 – Images MET de nanotubes de carbone multi parois n-Tec synthétisés par arc électrique^{7,21}

A l'opposé, les nanotubes de carbone mono paroi comme les multi parois synthétisés par ablation laser ou CVD sont caractérisés par un fort rayon de courbure qui peut être gênant dans le cadre de nos travaux sur l'étude des nanobagues. De plus, les SWNTs ont la particularité de former des faisceaux de nanotubes très difficiles à dissocier (Figure II-11).

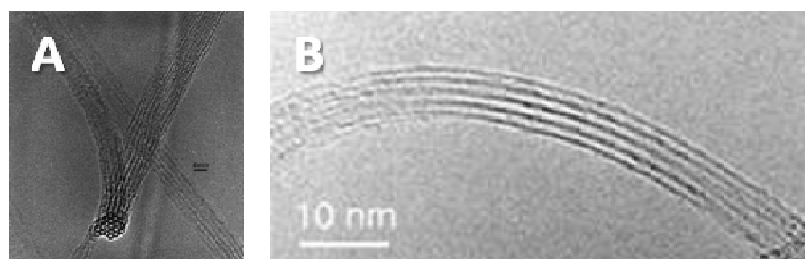


Figure II-11 – Images MET de faisceaux de nanotubes de carbone mono paroi⁷

Suite à ces observations, les MWNTs les plus adéquats pour notre étude étaient ceux synthétisés par le laboratoire du docteur László Forró de l'Ecole Polytechnique Fédérale de

Lausanne (EPFL) en Suisse. Le CEA et les laboratoires de Technologie SERVIER ont conjointement décidé de m'envoyer dans ce laboratoire afin de synthétiser et de purifier quelques grammes de nanotubes de carbone multi parois.

II-1-5-1- Synthèse des nanotubes de carbone par arc électrique dans le laboratoire du Dr Forró

La première méthode de synthèse de nanotubes de carbone a été effectuée par arc électrique. Cette méthode est encore très largement utilisée et étudiée car elle permet d'obtenir des nanotubes de carbone multi parois rectilignes, avec très peu de défauts, idéaux pour nos applications. Ce moyen de production consiste à créer un arc électrique entre deux électrodes : l'anode où un bâton de graphite pur est fixé (Figure II-12 – A) et la cathode. La décharge électrique sublime le graphite (Figure II-12 – B) pour former un dépôt solide de carbone riche en nanotubes, à la cathode (Figure II-12 – C). Ce dépôt est constitué d'une coque de carbone amorphe et d'un cœur de nanotubes de carbone.

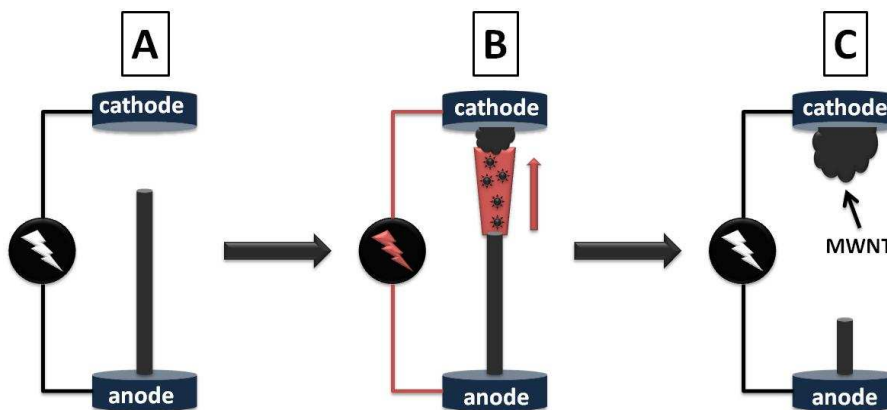


Figure II-12 – Schéma de principe de la synthèse de MWNT par arc électrique

L'arc électrique nécessaire à la synthèse des nanotubes est généré dans une enceinte close sous atmosphère d'hélium à une pression d'environ 500 mbar. L'arc électrique est formé en appliquant un voltage d'environ 30 V et une intensité d'environ 80 A entre l'anode et la cathode.

Les deux électrodes sont rapprochées l'une de l'autre pour maintenir une intensité quasi constante (~ 80 A) et ainsi maintenir l'arc électrique nécessaire à la synthèse. Le maintien de l'intensité à une valeur proche de 80 ampères est un paramètre important car une trop forte augmentation ou diminution de celle-ci peut entraîner la formation de plus grande quantité de fullerène ou de carbone amorphe. Lorsque la totalité du bâton de graphite a été consommé, la synthèse est stoppée puis les nanotubes, entourés de la coque de carbone amorphe, sont détachés de la cathode pour pouvoir être purifiés.

La synthèse des nanotubes de carbone a été effectuée pendant une semaine dans le laboratoire du Dr. Forró et a permis d'obtenir environ 4 grammes de nanotubes bruts. Le solide obtenu est composé principalement de carbone amorphe et de nanotubes de carbone. Pour commencer à les utiliser, une étape de purification est nécessaire pour séparer les deux espèces carbonées.

II-1-5-2- Purification des nanotubes de carbone par sédimentation

La purification des nanotubes de carbone synthétisés est une étape très importante avant leur utilisation.

La méthode de purification pour le traitement des nanotubes de carbone bruts que nous avons utilisé est celle mise au point par *Bonard, Forró et al.*²² Cette méthode, basée sur la sédimentation et la centrifugation, permet de séparer efficacement les MWNTs du carbone amorphe. Cette purification se fait en deux étapes : l'élimination des grosses particules de carbone dans un premier temps et l'élimination des petites particules dans un deuxième temps.

Dans un premier temps, le dépôt recueilli à la cathode est découpé pour séparer la coque externe du cœur riche en nanotubes. La coque externe est principalement constituée de carbone amorphe sous forme de particules graphitiques plus ou moins grosses (Figure II-13 – *A, B*), alors que l'intérieur de la coque de carbone est plus riche en nanotubes avec néanmoins un grand nombre de particules graphitiques (Figure II-13 – *C, D*).

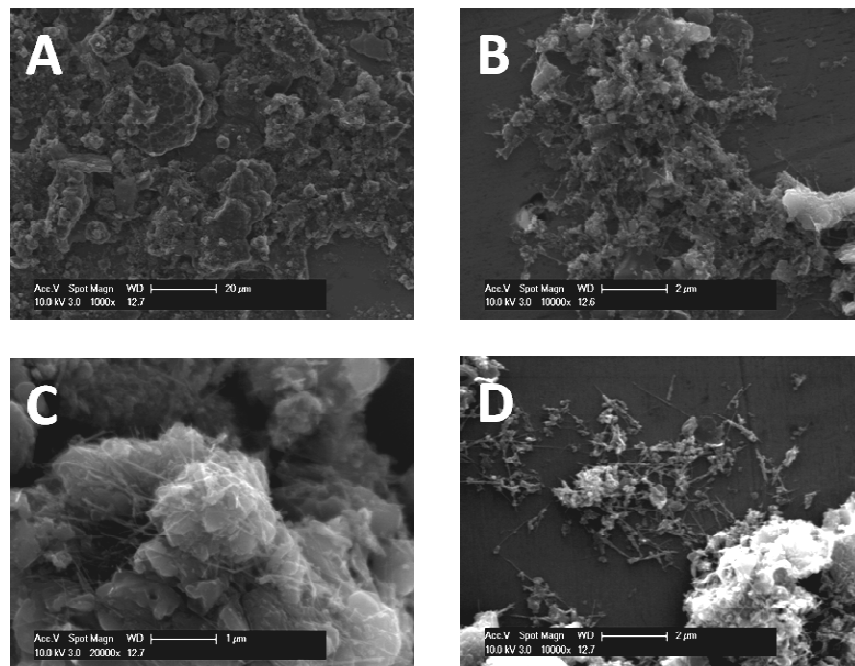


Figure II-13 – Images MEB de la coque externe (*A & B*) et du cœur (*C & D*) du dépôt graphitique

L'étape suivante consiste à suspendre dans un surfactant la partie du dépôt riche en nanotubes de carbone pour séparer en phase liquide les nanotubes des particules de graphite. Pour cela, 100 mg de nanotubes de carbone bruts sont suspendus dans un litre d'une solution aqueuse de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 5 g/L. Cette solution est soniquée pendant 15 minutes pour détacher les nanoparticules graphitiques collées à la surface des nanotubes de carbone, et laissée au repos pendant une nuit pour permettre aux grosses particules de graphite de sédimenter (Figure II-14 – A).

Dans la dernière étape, le surnageant est récupéré puis centrifugé pendant 15 minutes à 5000 tours/min pour éliminer toutes les particules supérieures à 500 nanomètres (Figure II-14 – B). A cette vitesse de rotation, seules les nanoparticules sédimenter car celles-ci ne sont pas suspendues par le SDS contrairement aux nanotubes de carbone. Enfin, le surnageant est filtré sur une membrane de 0,45 μm pour séparer les nanotubes de carbone des particules de graphite de taille inférieure à 500 nm (Figure II-14 – C). Le résidu récolté sur le filtre est riche en nanotubes de carbone avec quelques particules de carbone. Un deuxième cycle de purification est nécessaire pour éliminer le reste de particules collées à la surface des nanotubes (Figure II-14 – D).

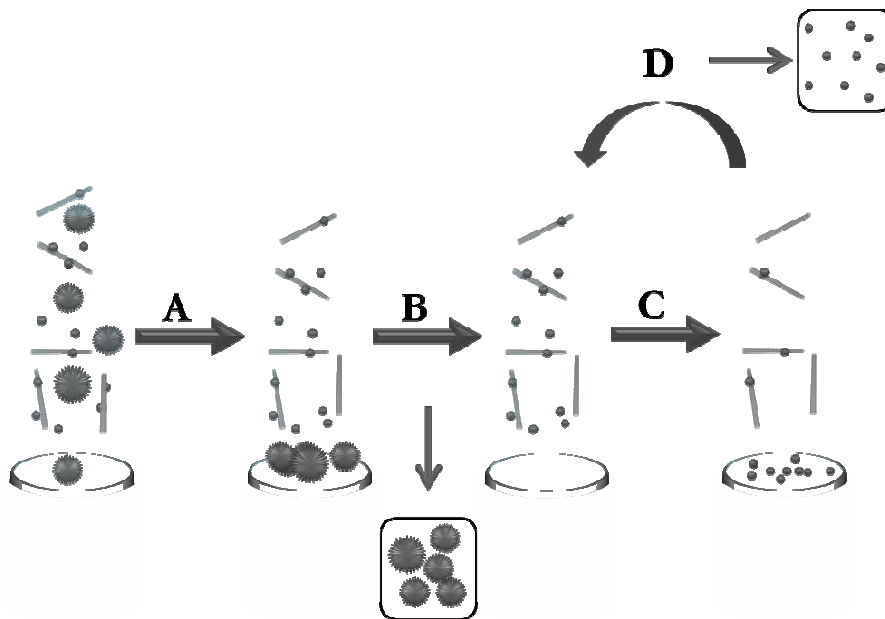


Figure II-14 – Schéma de principe de purification des nanotubes de carbone par sédimentation/centrifugation

A l'issue de ces deux cycles de purification, les nanotubes de carbone multi parois sont quasiment exempts de nanoparticules de graphite (Figure II-15).

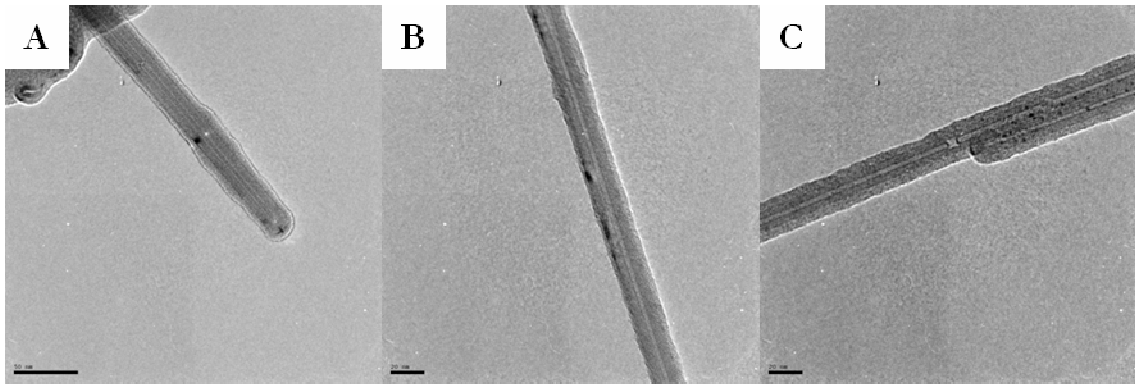


Figure II-15 – Images MET de nanotubes de carbone synthétisés dans le laboratoire du docteur László Forró de l'EPFL

Cette méthode de purification donne de bons résultats car les nanotubes de carbone obtenus contiennent très peu de carbone amorphe. Cependant, les rendements de purification sont faibles : pour 100 mg de nanotubes bruts, seulement 10 à 15 mg de nanotubes purs sont récupérés. Ces rendements montrent que la synthèse de nanotubes par arc électrique génère une grande quantité de carbone amorphe principalement sous forme de nanoparticule de graphite. De plus, au cours de la filtration, une partie des nanotubes de carbone de taille inférieure à 500 nm passe à travers le filtre en même temps que les particules de carbone. Cette perte devient encore plus importante au deuxième cycle de purification car la deuxième sonication raccourcit à nouveau les nanotubes de carbone. Au-delà de deux cycles de purification, la perte de nanotubes de carbone devient trop importante bien que les nanotubes récupérés soient d'une plus grande pureté.

Au vu du faible rendement de purification des nanotubes de carbone synthétisés dans le laboratoire du docteur László Forró de l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), nous avons décidé d'acquérir des nanotubes commerciaux auprès de la société n-Tec à Oslo en Norvège pour la suite de notre étude.

II-1-5-3- Nanotubes de carbone n-Tec (Norvège)

Ces nanotubes de carbone sont synthétisés par la méthode de l'arc électrique et ont la particularité d'être parfaitement rectiligne, avec de très bonnes propriétés mécaniques et électriques. Ce produit est composé de 65% de nanotubes de carbone et de 35% d'impuretés sous forme de nanoparticules graphitiques. La distribution en diamètre est comprise entre 5 nm et 50 nm avec un diamètre moyen d'environ 20 nm, pour une longueur moyenne d'environ 2 μm (Figure II-16).

Notre étude demandant une quantité importante de nanotubes de carbone, il a donc été décidé d'acquérir ces nanotubes auprès de la société n-Tec pour un coût d'environ 30 €/g.

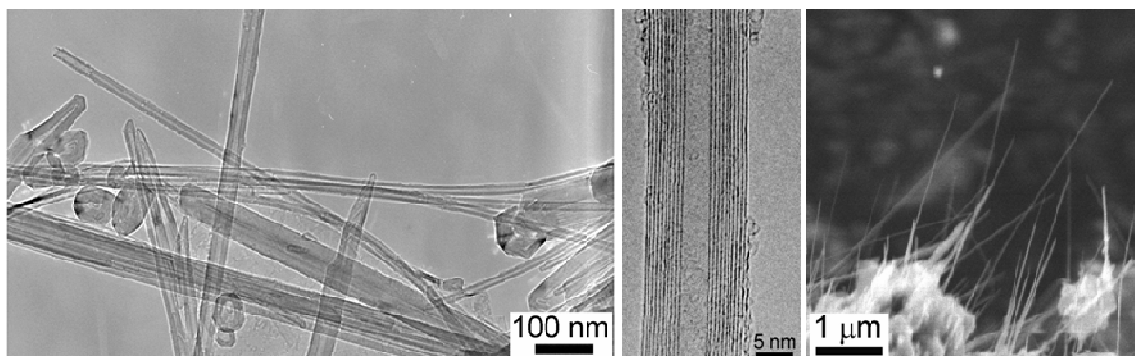


Figure II-16 – Images MET et MEB de nanotubes de carbone fabriqués par n-Tec²³

II-2- Autoorganisation des amphiphiles en solution et aux interfaces

L'assemblage supramoléculaire de surfactants en anneaux à la surface de nanotubes de carbone a été mis en évidence par notre équipe dirigée par le Dr. Charles Mioskowski qui réalisa l'étude de ces assemblages et de leurs applications.²⁴⁻²⁶ Pour appréhender les assemblages de surfactants à la surface des nanotubes de carbone, il est nécessaire de connaître et de comprendre les assemblages de surfactants en solutions et aux interfaces.

II-2-1- Autoassemblages supramoléculaires d'amphiphiles en solution

Les molécules amphiphiles (*amphi*, dérivé du grec, signifie *les deux*), plus communément appelées surfactants ou « savons », sont des molécules organiques ayant la particularité d'être à la fois hydrophiles et hydrophobes. Ces espèces aux propriétés antagonistes s'organisent spontanément en solution aqueuse sous différentes microstructures telles que la micelle par exemple.²⁷⁻³²

Pour expliquer le phénomène d'agrégation des amphiphiles, il est important de comprendre comment l'ajout de ces espèces en solution aqueuse provoque ce processus. Prenons comme exemple une molécule amphiphile usuelle : le dodécylsulfate de sodium (SDS) qui est connu pour former spontanément des micelles en solution (Schéma II-1).

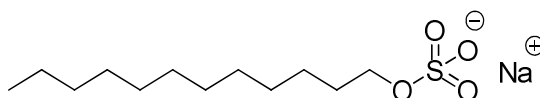


Schéma II-1 – Structure du dodécylsulfate de sodium (SDS)

Cette molécule est constituée d'une partie polaire, avec une fonction sulfate de sodium, et d'une partie hydrophobe, constituée d'une chaîne alkyle de douze carbones. Cette espèce a donc un caractère amphiphile. Le SDS, en solution dans l'eau à une concentration inférieure à 2,3 g/L, se comporte de façon similaire à un électrolyte tel que le NaCl, à une exception près : la tension de surface de la solution aqueuse diminue à mesure que la concentration en SDS augmente (Figure II-17). La chaîne lipophile de la molécule de SDS étant insoluble en milieu aqueux, cette espèce vient se concentrer à l'interface air-eau avec les chaînes hydrophobes orientées du côté de la phase gazeuse. La tension de surface entre l'eau et l'air étant plus importante que celle entre les chaînes carbonées et l'air, l'ajout de surfactants diminue la tension de surface.²⁷

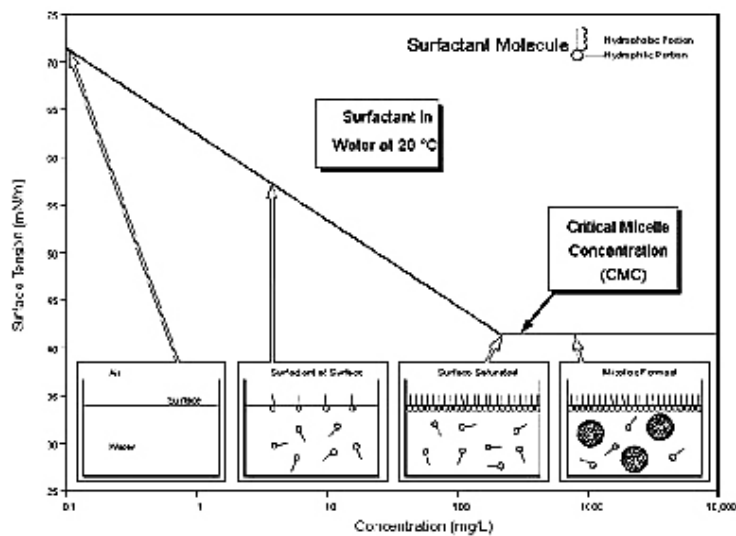


Figure II-17 – Schéma de principe de la formation de micelles³³

Cette diminution persistera jusqu'à la saturation complète de la surface de la solution aqueuse par le surfactant. Au-delà, l'ajout de surfactant ne change pas la tension de surface, qui devient quasiment constante. Ce point particulier, où la tension de surface n'évolue plus par ajout de tensio-actifs, est appelé la concentration micellaire critique (CMC).

A la concentration micellaire critique, un phénomène de séparation de phase et de dispersion moléculaire en solution apparaît, engendrant la formation de microphases dans lesquelles les surfactants s'autoorganisent. Dans ces phases, les chaînes lipophiles s'agrègent pour former un domaine hydrophobe au cœur de la micelle, et les chaînes hydrophiles s'orientent du côté de la phase aqueuse. Les chaînes de carbone dans ce type de micelles sont généralement désordonnées, de telle façon que le cœur de la micelle se comporte comme un petit volume liquide de chaînes carbonées.³⁴

La formation des micelles résulte de deux effets opposés : le transfert de la chaîne carbonée de la phase aqueuse vers la phase lipophile du cœur de la micelle, et la répulsion des têtes hydrophiles au fur et à mesure qu'elles se rapprochent. La résultante de ces deux facteurs est la création de micelles avec des tailles maximales définies. Par exemple, dans le cas du SDS, les micelles sphériques sont formées de 60 molécules. Enfin, au-delà de la CMC, l'ajout de surfactants n'a pour effet que la formation de micelles supplémentaires.

Trois caractéristiques générales peuvent être exposées concernant la capacité des molécules amphiphiles à former des micelles :²⁷

- ✓ Les agrégats micellaires se forment spontanément en solution aqueuse à une concentration précise appelée concentration micellaire critique (CMC). Cette concentration dépend de la nature chimique de la molécule et de la nature de la solution aqueuse (température, pH, sels, ...).
- ✓ Les agrégats micellaires sont formés selon un procédé « start and stop », car l'ajout de surfactants dans la solution (au dessus de la CMC) n'engendre que la formation de nouvelles micelles de mêmes tailles.
- ✓ Les propriétés des micelles sont bien définies. Par exemple, le rayon d'une micelle sphérique ne dépend que de la longueur de la chaîne carbonée de la molécule de surfactants.

Le terme « micelle » ne désigne pas uniquement des espèces sphériques, mais aussi la totalité des agrégats solubles dans l'eau, qui apparaissent lors de la séparation de phase des surfactants à une concentration supérieure à la CMC, et qui se forment spontanément et de façon réversible.³⁴ Ces agrégats peuvent être de petites sphères ou disques, de longs cylindres, des bicouches planes, des vésicules ou liposomes, des structures bicontinues...

Israelachvili démontra qu'il est possible de prédire la structure et la taille des agrégats micellaires, possédant un domaine hydrophobe à l'état fluidique, en connaissant le volume et la longueur de la chaîne hydrophobe, et la surface de la tête polaire du surfactant.³² Pour cela, il détermina un paramètre d'empilement critique (« *Critical packing parameter* » : CPP) ou paramètre de surfactants (« *Surfactant parameter* » : N_s) pour des systèmes dilués, permettant la prédiction de chaque structure micellaire (Figure II-18). Ce paramètre prend en compte trois variables :

- ✓ une contribution hydrophobe favorable due à l'agrégation des chaînes lipophiles dans le domaine hydrophobe.

- ✓ un terme de surface prenant en compte la tendance opposée des têtes polaires à se rapprocher pour limiter les interactions entre la phase aqueuse et le domaine hydrophobe, et à se repousser par des effets de répulsion électrostatique, de répulsion stérique et d'hydratation.
- ✓ un terme d'empilement prenant en compte l'exclusion de l'eau de la partie lipophile et la géométrie des agrégats dirigés par la tête hydrophile.

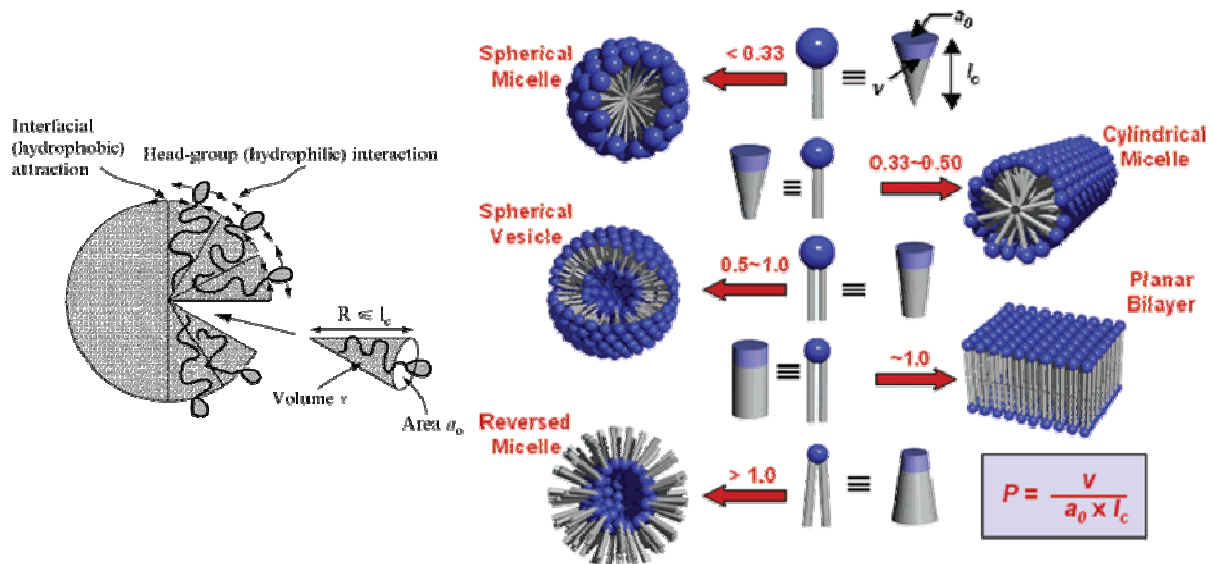


Figure II-18 – Structures des agrégats micellaires selon la structure des surfactants^{29,32}

Le paramètre CPP est calculé par la relation suivante :^{27,29,30,32,35}

$$CPP = N_s = \frac{v}{l_c \times a_0}$$

Le terme v correspond au volume de la partie carbonée en nm^3 et est donnée par la relation suivante :

$$v = 0,027 \times (n_c + n_{Me})$$

où n_c est le nombre total de carbone, n_{Me} le nombre de méthyles (qui sont deux fois plus grands qu'un CH_2) et 0,027 correspond au volume d'un méthyle en nm^3 .

Le terme l_c correspond à la longueur totale de la chaîne hydrocarbonée en nm et est donnée par :

$$l_c = 0,15 + 0,127 \times n_c$$

où n_c est le nombre total d'atomes de carbone, 0,15 correspond au rayon en nm du méthyle terminal et 0,127 à la longueur de la liaison carbone-carbone en nm de la chaîne hydrocarbonée, projetée dans la direction de la chaîne en configuration trans.

Le terme a_o correspond à l'aire de la tête polaire. Le calcul de cette valeur est assez compliqué car, pour un amphiphile ionique, l'aire de la partie polaire va dépendre de l'environnement externe et en particulier du pH, de la force ionique ou de la concentration en surfactants et électrolytes. Pour des surfactants zwitterioniques ou neutres, l'aire est moins sensible à l'environnement externe. Le paramètre d'empilement critique étant utilisé à titre qualitatif, la structure des agrégats micellaires peut être calculée à partir de gammes de valeurs de a_o . On peut donc déterminer des ordres de grandeurs de CPP pour chaque structure micellaire :

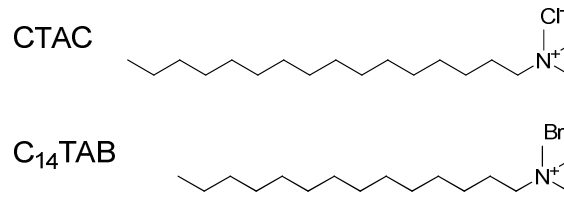
- ✓ pour des micelles sphériques, $CPP < 0,33$
- ✓ pour des micelles cylindriques, $0,33 < CPP < 0,50$
- ✓ pour des liposomes ou vésicules, $0,50 < CPP < 1,00$
- ✓ pour des bicouches, $CPP \approx 1,0$
- ✓ pour des micelles sphériques ou cylindriques inverses, $1,0 < CPP$

A partir de la valeur du paramètre d'empilement critique calculée, les structures micellaires peuvent être prédites à partir de la structure de la molécule amphiphile étudiée. Dans le cas du SDS, le paramètre d'empilement critique est de 0,35 ($a_o = 60 \text{ \AA}^2$, $l = 1,7 \text{ nm}$, $v = 0,35 \text{ nm}^3$), donc la structure est principalement sous forme de micelles sphériques. Le rayon d'une micelle sphérique telle que le SDS est quasiment égal à la longueur de la chaîne hydrocarbonée, soit environ 2,0 nm. La micelle de SDS comporte environ 60 molécules pour un poids moléculaire d'environ 18000 Da et une CMC d'environ 0,2% (w/v).

II-2-2- Autoassemblages supramoléculaires d'amphiphiles aux interfaces

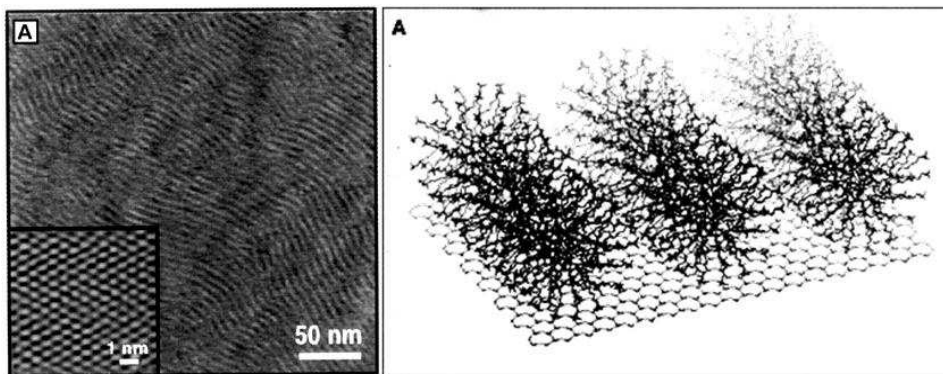
Comme il a été exposé dans la partie précédente, les tensio-actifs peuvent former des assemblages moléculaires de différentes formes (micelles sphériques, micelles cylindriques, bicouches, ...) selon leurs structures et l'environnement extérieur.

Des assemblages similaires de surfactants à l'interface solide-liquide ont été mis en évidence par le groupe de *Manne et Gaub* de l'Université de Princeton, avec des tensio-actifs cationiques tels que le bromure de tétradécyltriméthyle ammonium (C_{14} TAB) ou le chlorure d'héxadécyltriméthyle ammonium (CTAC) (Schéma II-2).^{36,37}

Schéma II-2 – Structures des surfactants CTAC et C₁₄TAB

Selon les surfaces utilisées, différents arrangements ont pu être observés.

Sur des surfaces hydrophiles, le surfactant C₁₄TAB, à une concentration supérieure à la CMC, a montré deux types d'arrangements différents. Sur du silica, le tensio-actif s'autoorganise sous forme de micelles sphériques bien définies, espacées de façon régulière.³⁷ Sur un substrat du type mica, le tensio-actif se structure sous forme de micelles cylindriques alignées les unes par rapport aux autres. Le groupe de *Manne et Gaub* mit en évidence la même structuration avec le tensio-actif CTAC (Figure II-19).³⁸

Figure II-19 – Structuration en cylindre du CTAC sur un substrat de mica³⁸

La différence de structuration entre ces deux substrats proviendrait d'un mécanisme d'adsorption distinct, provenant de la différence d'état de charge de la tête polaire du tensio-actif lié à la surface.

Sur des surfaces hydrophobes comme le graphite, ce groupe mit en évidence un assemblage supramoléculaire différent de ceux sur surfaces hydrophiles.³⁶⁻³⁸ En effet, à l'opposé des substrats hydrophiles comme le mica ou le silica, les surfaces hydrophobes interagissent avec les chaînes lipophiles des surfactants par des interactions hydrophobes et des interactions de type Van der Waals. Ces interactions conduisent les surfactants à s'arranger en hémicylindres parfaitement alignés les uns aux autres, lorsque la concentration est supérieure à la CMC (Figure II-20).

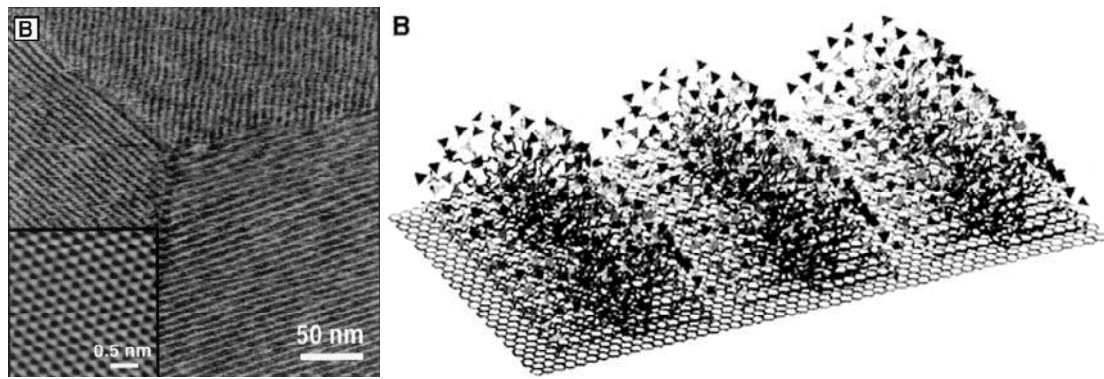


Figure II-20 – Structuration en hémicylindre du CTAC sur un substrat de graphite³⁸

Une étude similaire a été réalisée par le groupe de *Wanless et Ducker* sur les interactions entre le dodécylsulfate de sodium (Schéma II-1) et le graphite (Figure II-21).³⁹ Cette étude mit en évidence le même assemblage supramoléculaire en hémicylindre ainsi que l'influence de la force ionique sur l'espacement entre ces structures (l'augmentation de la force ionique de la solution diminue l'espacement entre les hémicylindres).

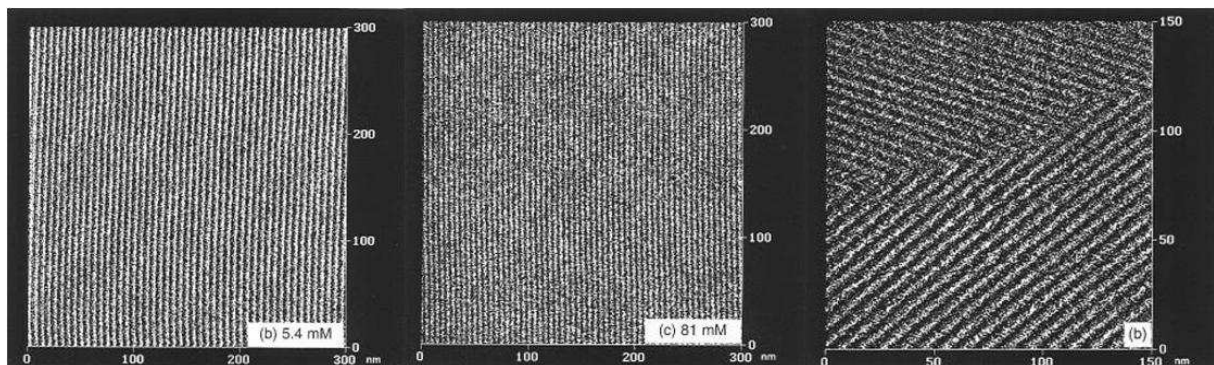


Figure II-21 – Structuration en hémicylindre du SDS sur un substrat de graphite³⁹

II-2-3- Autoassemblages d'amphiphiles à la surface de nanotubes de carbone

Par nature, les nanotubes de carbone sont des espèces insolubles dans la quasi-totalité des solvants.¹¹ Néanmoins, le groupe de *Bonard et al.* montra qu'il est possible de former des suspensions stables de nanotubes de carbone, par sonication de ces espèces dans une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) à une concentration de 1% (w/v).²² Ces suspensions de couleur noire demeurent stables pendant plusieurs mois.

Les nanotubes de carbone peuvent être assimilés à une forme enroulée d'un plan de graphite (Figure II-4 – A). En effet, les nanotubes de carbone, comme le graphite, sont constitués exclusivement de noyaux aromatiques tous conjugués. En s'appuyant sur ces observations et sur les travaux de *Bonard et al.*²² et de *Manne et Gaub*,³⁶⁻³⁸ l'équipe du Dr C.

Mioskowski a voulu mettre en évidence la présence ou non d'une structuration particulière du dodécylsulfate de sodium (SDS) à la surface des nanotubes de carbone.²⁴ Trois arrangements pouvaient être envisagés en accord avec les précédentes études réalisées sur les autoarrangements supramoléculaires de surfactants à l'interface solide/liquide :

- ✓ un recouvrement uniforme monocouche de la surface du nanotube de carbone par le SDS (Figure II-22 – A).
- ✓ un arrangement en hémicylindre, similaire à ceux présentés précédemment,³⁶⁻³⁹ orienté de façon parallèle à l'axe du nanotube de carbone (Figure II-22 – B).
- ✓ un arrangement en hémicylindre orienté perpendiculairement à l'axe du nanotube de carbone, pouvant former des anneaux sur toute la longueur du nanotube (Figure II-22 – C).

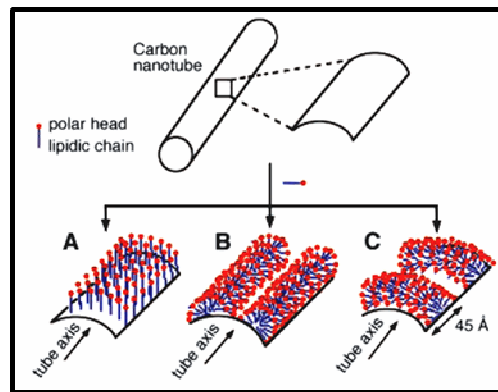


Figure II-22 – Différents arrangements possibles du SDS à la surface de nanotubes de carbone²⁶

Une expérience d'adsorption de SDS à une concentration de 1% (w/v) (concentration 5 fois supérieure à la CMC) sur des nanotubes mono paroi et multi parois a été effectuée pour caractériser le type d'arrangement moléculaire présent à la surface des nanotubes.^{24,26} L'observation de ces échantillons par microscopie électronique à transmission a mis en évidence la présence de striations orientées perpendiculairement à l'axe du tube (Figure II-23). La largeur des anneaux observés est d'environ $45 \pm 5 \text{ \AA}$, valeur proche de celle observée par *Wanless et Ducker* sur un plan de graphite avec une distance de 46 \AA .³⁹ Aucun arrangement en hémicylindre parallèle à l'axe du nanotube de carbone n'a été observé, indiquant que la structuration en anneaux est privilégiée.

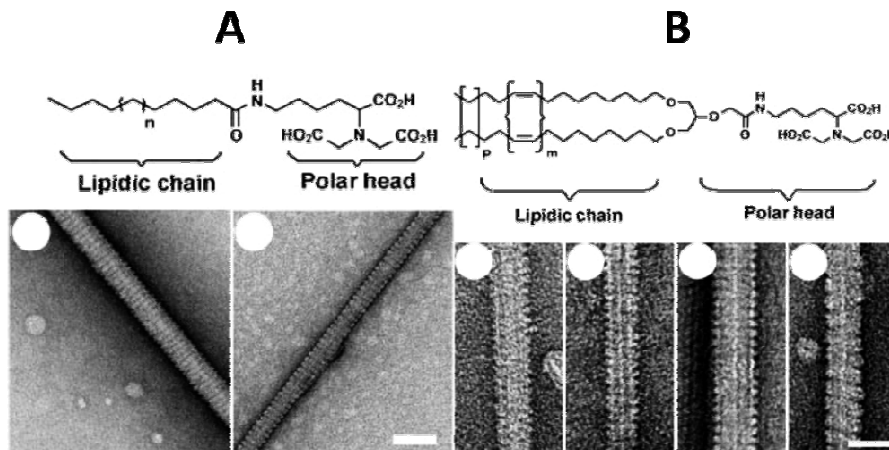


Figure II-23 – Arrangements en anneaux de différents surfactants à la surface de nanotubes de carbone^{24,26}

Il a également été montré que ces assemblages sont dépendants de la concentration, et en particulier de la concentration micellaire critique et que ces structurations ne sont possible qu'à des concentrations supérieures à la CMC, signifiant que l'assemblage de ces espèces doit obligatoirement passer par une structuration initiale en micelles.²⁴

D'autres amphiphiles ont été synthétisés avec comme partie hydrophile une tête acide nitrilotriacétique (NTA) couplée à des chaînes lipophiles mono-brin (Figure II-23 – B) ou bi-brins (Figure II-23 – C). Ces molécules peuvent former des suspensions stables de nanotubes de carbone avec des chaînes lipophiles comportant au minimum 12 carbones par brins. De plus, l'observation par MET de ces suspensions montra que la totalité de la surface des nanotubes de carbone est recouverte d'anneaux.

A la suite de cette observation initiale, il a été montré que l'utilisation de molécules amphiphiles polymérisables permettait de réticuler les anneaux de tensio-actifs afin de figer leur structure.²⁵ Cette polymérisation, effectuée à partir de motifs photopolymérisables, a l'avantage d'être douce car aucun agent chimique n'a besoin d'être introduit dans le milieu pour l'initier : une simple irradiation lumineuse suffit.

Des suspensions stables de nanotubes de carbone ont pu être observées pour des amphiphiles constitués d'une chaîne lipophile photopolymérisable d'au moins 18 carbones, et en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 1% en masse qui favorise la structuration en anneaux. La stabilité de ces édifices, à l'issue de la polymérisation, a été vérifiée par des lavages successifs avec des solvants organiques tels que le méthanol. Dans les mêmes conditions, les suspensions non polymérisées ne sont pas résistantes à ces lavages.

La réticulation des amphiphiles confère à ces édifices une certaine cohésion qui leur permet d'exister en tant qu'objets individuels une fois isolés de leur support carboné. Une méthode de séparation électrochimique a été utilisée pour extraire et isoler les anneaux des nanotubes de carbone.^{25,40}

Ces anneaux polymérisés et isolés de leur support carboné ont une cavité centrale hydrophobe et une coque externe hydrophile. Cette structuration amphiphile pourrait leur permettre d'encapsuler des composés hydrophobes et de les emmener en solution aqueuse (Figure II-24).

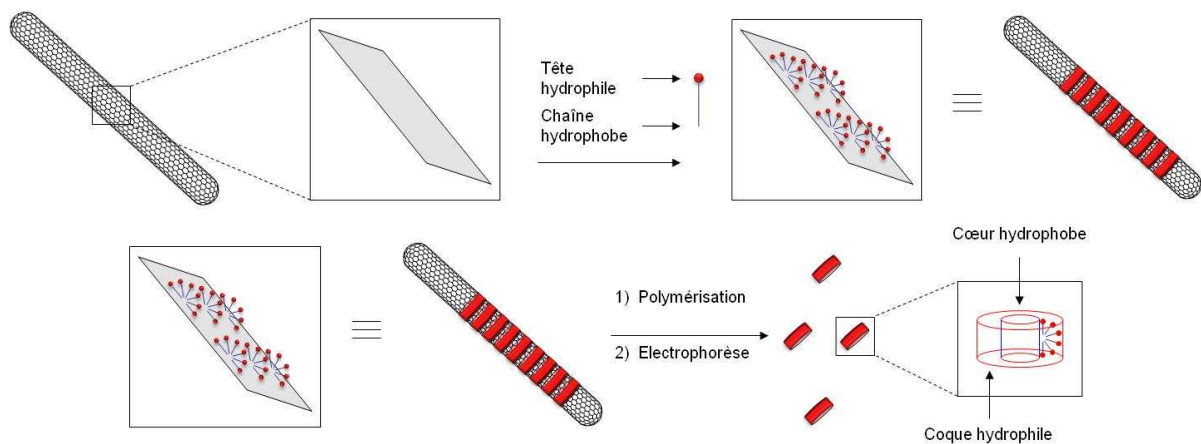


Figure II-24 – Schéma de principe de formation de nanobagues⁴¹

Des études préliminaires ont été menées sur la capacité de ces anneaux à solubiliser des molécules hydrophobes colorées, des fullerènes ou des protéines membranaires. Cette étude a permis de mettre en évidence la capacité des anneaux à solubiliser des molécules hydrophobes dans leur cœur.

La fabrication et les applications de ces anneaux ont donné lieu en 2004 à un brevet intitulé : Macromolécules auto assemblées et photopolymérisées autour de nanotubes de carbone, un procédé pour leur préparation, et leurs applications.⁴²

II-3- Objectif du projet « Nanobagues »

L'objectif de ce projet est d'explorer les propriétés particulières des nanobagues amphiphiles obtenues sur matrice de nanotubes de carbone, pour la vectorisation de composés d'intérêt pharmacologique. En effet, la cavité des anneaux offre un environnement particulièrement adapté à l'incorporation de substances hydrophobes. Ces dernières, une fois introduites dans le cœur hydrophobe, seront rendues solubles en phase aqueuse grâce à l'enveloppe externe hydrophile.

Cette technique, développée par le SCBM du CEA Saclay, sera mise en œuvre pour incorporer des molécules d'intérêt pharmacologique dans les nanobagues. Des variantes de cette technologie de base seront étudiées pour un meilleur rendement incorporation/libération des molécules ; études qui prendront en compte les propriétés physiques et la stabilité des dites molécules. En particulier, les études porteront sur :

- (i) les conditions d'inclusion de molécules pharmacologiques hydrophobes
- (ii) la quantité de molécules actives incorporées par nanobague
- (iii) la stabilité de la molécule (qui peut être différente une fois au cœur de la nanobague)

La robustesse du complexe [molécules actives - nanobagues] sera évaluée *in vitro* dans un premier temps mais devra ensuite être mesurée *in vivo*. Cela conduira à comparer les trois entités (nanobagues libre, principe actif (PA) libre et le complexe [PA-nanobague]) en matière de stabilité et des propriétés ADME^b et toxicologiques. Il sera ainsi envisageable de procéder au marquage chimique (par introduction d'un marqueur fluorescent) ou isotopique de chacune des espèces et de suivre leur comportement dans l'organisme, notamment la distribution systémique, l'accumulation éventuelle dans certains tissus et la capacité à traverser les différentes barrières biologiques (BHE, membrane cellulaire, paroi intestinale...).

La présence des nombreuses fonctions carboxylates en surface des nanobagues devrait également permettre d'effectuer une fonctionnalisation chimique afin, d'une part, de moduler les propriétés de la nanobagues vis-à-vis des différentes barrières biologiques et, d'autre part, d'introduire des vecteurs spécifiques en relation avec le principe actif transporté. Enfin, une fois à proximité du site d'action et si le « *leaching* » est suffisamment rapide, le principe actif pourra être libéré au fur et à mesure.

^b ADME est un acronyme pour Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion

II-4- Nanobagues de première génération

La première partie de ce travail a consisté à synthétiser des anneaux de surfactants polymérisés (que nous appellerons « nanobagues ») dans le but d'étudier et de se familiariser avec la synthèse de ces objets.

II-4-1- Synthèse de la molécule amphiphile

La première étude a été conduite à partir d'un amphiphile photopolymérisable. Ce tensio-actif est constitué d'une partie hydrophobe de 25 carbones avec un motif diacétylénique, polymérisable par irradiation lumineuse, et d'une partie hydrophile, dérivée de l'acide nitrilotriacétique (Schéma II-3).

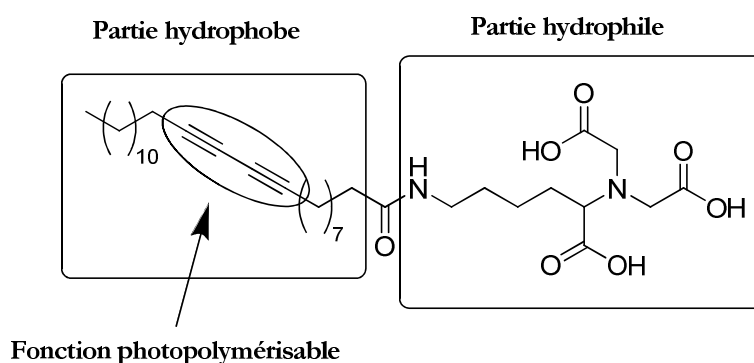


Schéma II-3 – Structure de l'amphiphile **II-4**

II-4-1-1- Synthèse de la tête hydrophile « NTA »

La première étape de cette synthèse consiste à préparer la partie hydrophile de la molécule amphiphile (dérivée de l'acide nitrilotriacétique) à partir de la *N*-benzyloxycarbonyl-L-lysine (Z-L-lysine) (Schéma II-4).^{25,43-45}

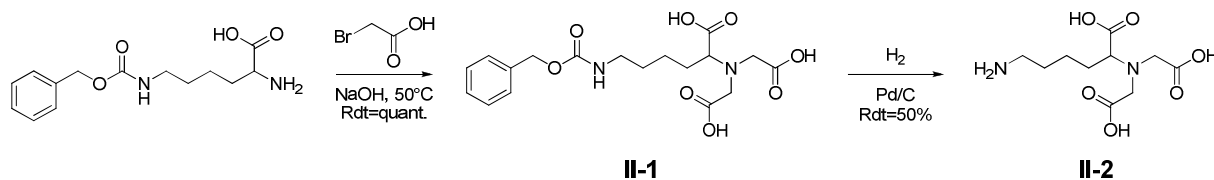


Schéma II-4 – Synthèse de la tête hydrophile « NTA » (**II-2**)

La molécule **II-1** est préparée par alkylation en milieu basique de l'amine en position 2 de la Z-L-lysine par l'acide bromoacétique. L'amine en position 6 de la molécule **II-1** est ensuite déprotégée par hydrogénolyse du groupement benzyloxycarbamate pour donner la tête hydrophile : acide 2,2'-(5-amino-1-carboxypentylazanediyl)diacétique **II-2**.

II-4-1-2- Couplage de la tête hydrophile NTA avec l'acide 10,12-pentacosadiynoïque

La deuxième étape de la synthèse consiste à coupler la tête hydrophile **II-2** avec l'acide 10,12-pentacosadiynoïque préalablement activé (Schéma II-5).^{44,46-48}

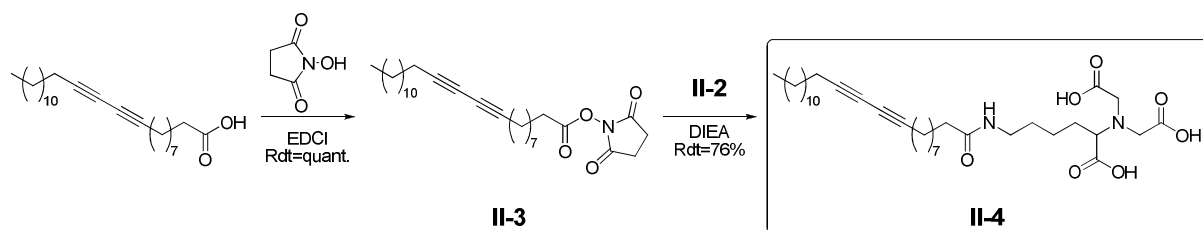


Schéma II-5 – Synthèse de la molécule amphiphile première génération (**II-4**)

L'acide pentacosadiynoïque est activé par le N-hydroxysuccinimide (NHS) en présence *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N*'-éthylcarbodiimide (EDCI) pour donner l'acide activé **II-3**. Le tensio-actif **II-4** est obtenu par un couplage peptidique dans un mélange eau/DMF entre la tête hydrophile « NTA » **II-2** et de l'acide activé **II-3** en présence de triéthylamine. Le produit pur est obtenu par précipitation dans l'eau par ajout d'acide chlorhydrique.

II-4-2- Autoassemblage du surfactant **II-4** autour de nanotubes de carbone

L'étude de l'autoassemblage de la molécule **II-4** à la surface de nanotubes de carbone a été menée dans le but d'améliorer et d'optimiser les conditions de formation des nanobagues.

II-4-2-1- Détermination de la CMC de la molécule **II-4**

La connaissance de la valeur de la concentration micellaire critique est une donnée importante pour cette étude car les autoassemblages spontanés en anneaux à la surface des nanotubes de carbone ne se produisent en milieux aqueux qu'à une concentration supérieure à la CMC. En dessous de cette concentration, les nanotubes de carbone forment des suspensions stables mais aucune striation n'est visible par microscopie électronique à transmission.

Dans cette étude, deux méthodes ont été utilisées pour déterminer cette valeur : par absorbance et par tension de surface.

Mesure de la CMC par absorbance

La détermination de la CMC de l'amphiphile **II-4** a été effectuée par mesure de l'absorbance UV de pyrène encapsulé dans les micelles.

Le principe est de mesurer par absorbance UV la concentration à laquelle la molécule amphiphile solubilise le pyrène présent à une concentration constante dans le milieu (la solubilité du pyrène seul dans l'eau est de $1,3 \times 10^{-5}$ g/L). Cette solubilisation est accompagnée de l'augmentation de l'absorbance UV des bandes spécifiques du pyrène à mesure que la molécule **II-4** est additionnée dans le système.

A une concentration en **II-4** inférieure à la CMC, l'absorbance UV doit rester constante car aucune micelle n'est présente dans le système (Figure II-25) et le pyrène n'est donc pas solubilisé. Lorsque la concentration micellaire critique est atteinte ou dépassée, l'absorbance UV augmente à mesure que le surfactant est additionné et que de nouvelles micelles se forment pour solubiliser le pyrène.

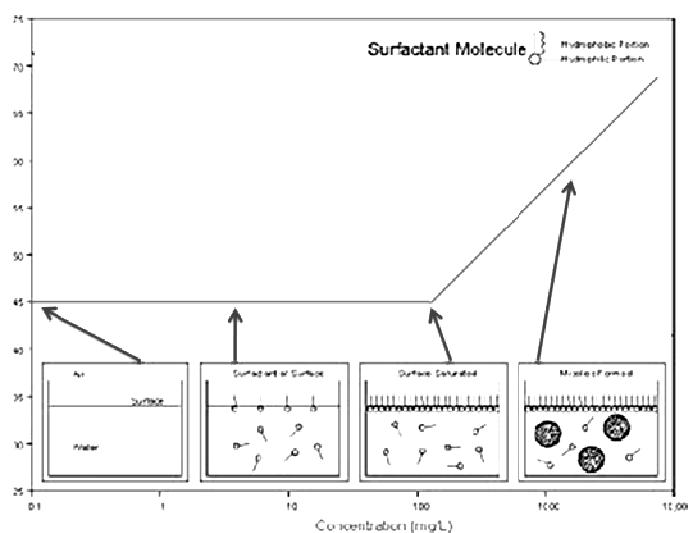


Figure II-25 – Détermination de la concentration micellaire critique par absorbance UV

La mesure de la CMC de notre molécule a été effectuée en milieu tamponné, à pH=8 (TRIS 3,03 g/L et glycine 14,4 g/L), en utilisant une concentration constante de pyrène (5 mg/mL) et une concentration croissante de **II-4** (0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL et 5 mg/mL).

50 μ l d'une solution concentrée de pyrène dans le DMSO (100 mg/mL) sont additionnés dans 1 mL de chacune des solutions de **II-4**. Ces solutions sont ensuite soniquées à l'aide d'une sonde de sonication pendant 3 minutes afin de solubiliser le pyrène. Le pyrène en excès (resté insoluble) est éliminé par filtration (filtre millipore 0,2 μ m) et l'absorption de chaque échantillon est mesurée (Figure II-26).

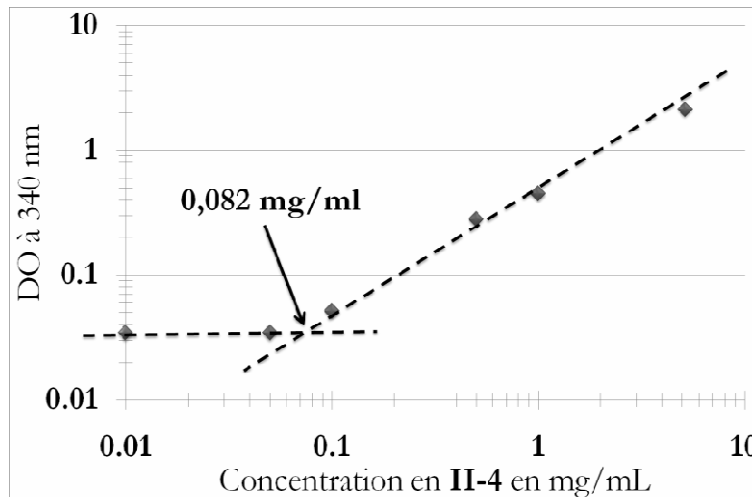


Figure II-26 – Détermination expérimentale de la CMC de **II-4** par absorbance UV

La CMC de **II-4** a été mesurée en utilisant une bande d'absorption spécifique du pyrène à 340 nm à laquelle la micelle n'absorbe pas. La concentration micellaire critique de la molécule amphiphile **II-4** a été déterminée expérimentalement à **0,082 mg/mL** (0,0082% w/v).

Détermination de la CMC par mesure de la tension de surface

Cette deuxième méthode de mesure basée sur la tension de surface a été effectuée par Marguerite Lepicard et Stéphanie Marsas de l'institut d'innovation galénique (I2G) de Technologie SERVIER à Orléans.

La tension de surface peut être définie de la façon suivante :³³

« Des interactions s'établissent entre les molécules d'un liquide et celles d'un autre liquide ou d'une substance gazeuse insoluble dans le premier liquide ; ces interactions donnent lieu à la formation d'une interface. Pour modifier la forme de cette interface ou surface, il faut apporter une énergie au système. Le travail pour changer la forme d'une surface donnée est ainsi défini comme étant la tension interfaciale ou tension de surface. »

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer la concentration micellaire critique :

- ✓ La méthode de l'anneau
- ✓ La méthode de la lame

La **méthode de l'anneau** est la méthode la plus utilisée car beaucoup de résultats publiés se réfèrent à celle-ci.⁴⁹ Dans cette méthode, l'échantillon est approché de l'anneau jusqu'au contact entre l'anneau et la surface du liquide (Figure II-27 – A), puis l'échantillon est éloigné dans la direction inverse pour déterminer le point où la force est maximale (Figure II-27 – B).

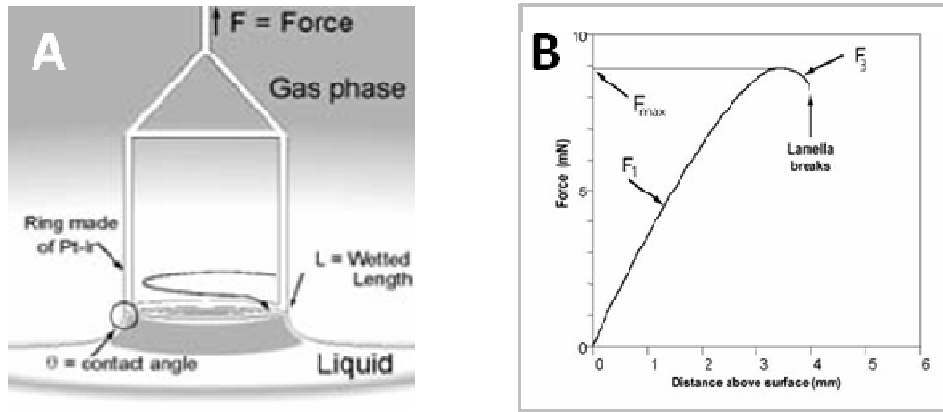


Figure II-27 – Schéma de principe de la mesure de CMC par la méthode de l'anneau³³

La tension de surface est ensuite déterminée par l'équation simplifiée suivante :

$$\sigma = \frac{F_{\max} - F_v}{L}$$

où σ est la tension de surface, F_{\max} la force maximale, F_v le poids du volume de liquide soulevé et L le périmètre de mouillage.

Par la méthode de l'anneau, la concentration micellaire critique de la molécule **II-4** dans l'eau a été mesurée à **0,120 mg/mL** (0,012% w/v) (Figure II-28).

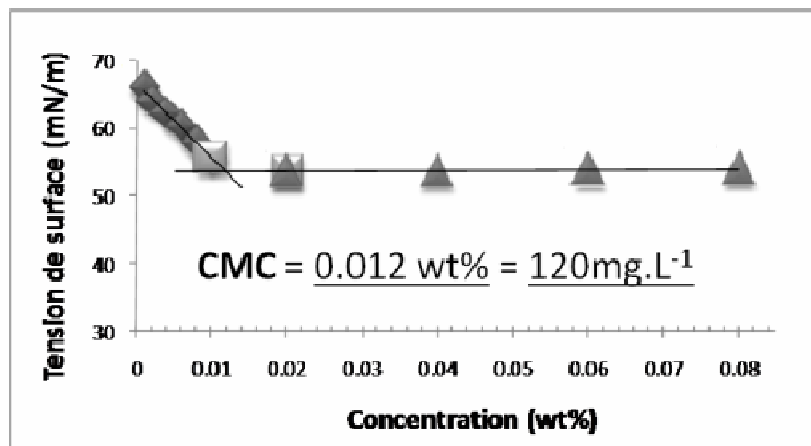


Figure II-28 – Détermination expérimentale de la CMC par la méthode de l'anneau

Par la **méthode de la lame**, l'échantillon est approché de la lame jusqu'à avoir contact entre la lame et la surface du liquide.⁴⁹ La tension maximale est obtenue dès le contact. L'échantillon n'a plus besoin d'être déplacé pour la mesure (Figure II-29).

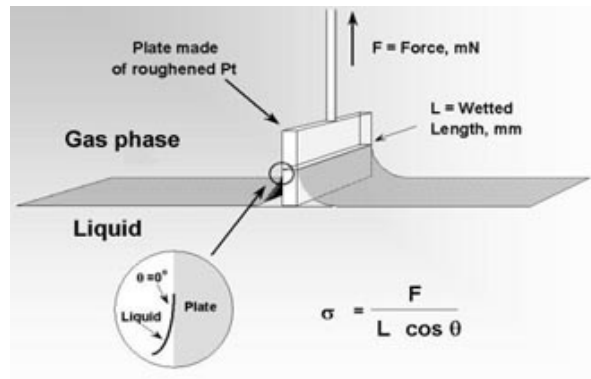


Figure II-29 – Schéma de principe de la mesure de CMC par la méthode de la lame³³

La tension de surface est ensuite déterminée par l'équation simplifiée suivante :

$$\sigma = \frac{F}{L \times \cos \theta} = \frac{F}{L}$$

où σ est la tension de surface, F la force exercée sur la balance, L le périmètre de mouillage et θ l'angle de mouillage égal à 0° .

Par la méthode de la lame, la concentration micellaire critique de la molécule **II-4** dans l'eau a été mesurée à **0,110 mg/mL** (0,011% w/v) (Figure II-30).

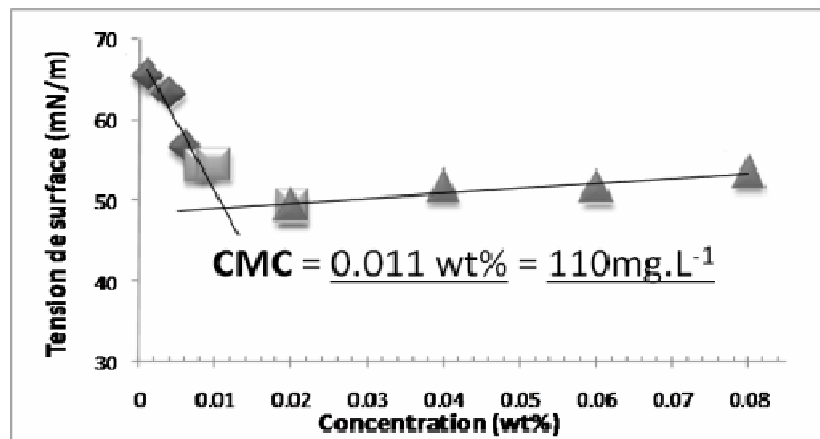


Figure II-30 – Détermination expérimentale de la CMC par la méthode de la lame

Les deux mesures de CMC effectuées par la méthode de tension de surface ont donné des résultats similaires. En revanche, la méthode par absorbance donne une valeur légèrement plus faible mais reste du même ordre de grandeur.

La valeur moyenne de la concentration micellaire critique de la molécule **II-4** est de **0,10 mg/mL** (**0,01% w/v**). Cette molécule a une CMC environ 20 fois inférieure au dodécylsulfate de sodium.

II-4-2-2- Autoassemblage de la molécule **II-4** autour des nanotubes de carbone

Dans cette partie, nous nous proposons d'étudier l'assemblage de l'amphiphile **II-4** à la surface de nanotubes de carbone. Différents types de nanotubes à disposition dans notre laboratoire ont été utilisés au cours de ce travail :

- ✓ des SWNTs de la société Mer corporation,
- ✓ des DWNTs de la société Nanocyl,
- ✓ des MWNTs de la société n-Tec.

Des essais préliminaires ont été effectués sur les nanotubes de carbone multi parois synthétisés à l'EPFL dans le laboratoire du Dr *Forró*. Cependant, malgré leur qualité satisfaisante et pour des raisons de quantités, la suite de l'étude a été conduite avec les nanotubes multi parois n-Tec.

Dans un premier temps, chaque type de nanotubes de carbone a été observé par microscopie électronique à transmission (Figure III-31) :

- ✓ Les SWNTs de Mer *Corporation* ont un diamètre moyen de 1,2 à 1,4 nm pour une longueur de quelques dizaines de microns. Ces SWNTs se trouvent sous forme de faisceaux d'environ 20 nanotubes.
- ✓ Les DWNTs de Nanocyl ont un diamètre moyen de 4,7 nm pour une longueur de 1 à 10 micromètres.
- ✓ Enfin, les MWNTs de n-Tec ont un diamètre moyen compris entre 10 et 30 nm centré sur 20 nm pour une longueur de quelques micromètres.

Ces trois types de nanotubes ont été utilisés lors de l'étude d'adsorption, et plus particulièrement les nanotubes MWNTs de n-Tec.

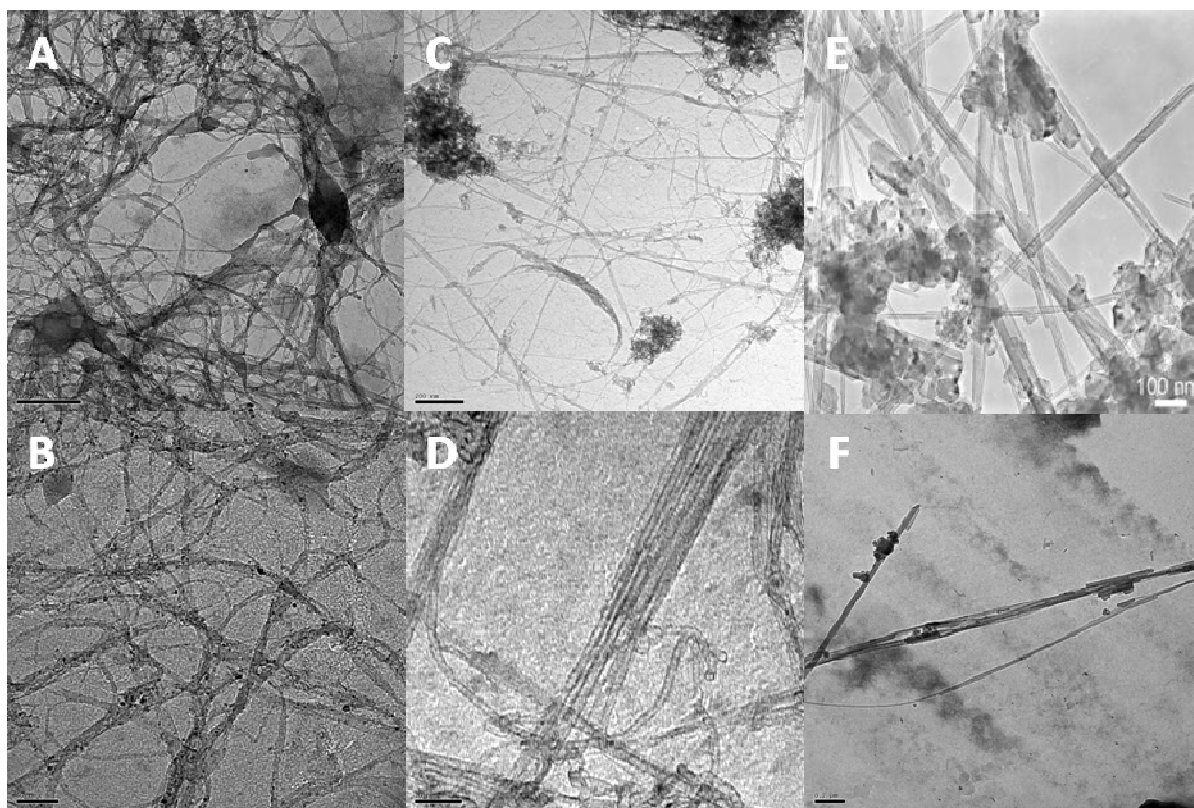


Figure III-31 – Images MET de SWNTs de Mer Corporation (A & B), de DWNTs de Nanocyl (C & D) et de MWNTs de n-Tec (E & F)
 Echelles : A 200nm ; B 50nm ; C 200nm ; D 200nm ; E 100nm ; F 200nm

L'adsorption de la molécule **II-4** à la surface des nanotubes de carbone a été effectuée en milieu tamponné en présence de SDS (TRIS 25 mM, glycine 190 mM et SDS 3,5 mM avec un pH final de 8). Ce tampon permet de déprotomer les acides carboxyliques de la tête hydrophile « NTA » (pKa=3) mais ne permet pas de déprotomer l'amine tertiaire (pKa=10) (Schéma II-6).

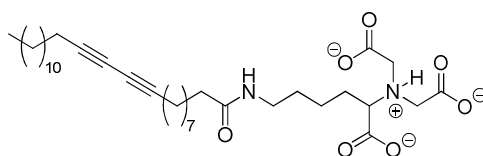


Schéma II-6 – Structure de la molécule **II-4** dans le tampon TRIS/glycine/SDS

La méthode d'adsorption simple des surfactants à la surface des nanotubes de carbone nous a permis de visualiser les arrangements en anneaux par microscopie électronique à transmission. L'adsorption de la molécule amphiphile à la surface du nanotube de carbone s'effectue en trois étapes :

- ✓ La **première étape** (Figure II-32 – A) consiste à solubiliser le surfactant dans un tampon TRIS/glycine/SDS à une concentration de 1 mg/mL, concentration à laquelle la molécule **II-4** se trouve en quasi-totalité sous forme de micelles (90% sous forme de micelles, 10% sous forme non organisée et libre en solution).
- ✓ La **deuxième étape** (Figure II-32 – B) consiste à mélanger 1 mg de nanotubes de carbone de manière à obtenir un rapport massique de 1 pour 1.
- ✓ La **troisième étape** (Figure II-32 – C) consiste à soniquer au doigt soniquant la solution de nanotubes de carbone et de surfactants pendant environ trois minutes pour obtenir une solution stable de nanotubes avec un arrangement en anneaux.

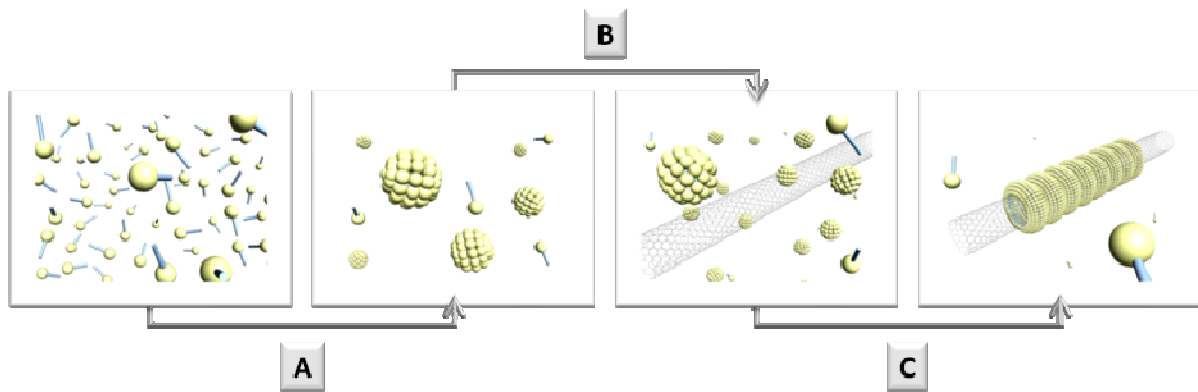


Figure II-32 – Principe d'adsorption de surfactants à la surface de nanotubes de carbone

Une première expérience d'adsorption a été réalisée sur les trois types de nanotubes de carbone. Pour cela, 5 mL d'une solution du surfactant **II-4** ont été mélangées avec 5 mg de SWNTs, DWNTs et MWNTs respectivement.

Les échantillons ont été ensuite observés par microscopie électronique à transmission par coloration négative à l'acétate d'uranyle. L'acétate d'uranyle est un agent de contraste utilisé de façon courante en microscopie. Cette substance se fixe de manière préférentielle autour des nanotubes de carbone recouverts de surfactants. L'acétate d'uranyle, avec son poids moléculaire élevé, a la capacité de dévier le faisceau d'électron du microscope. De ce fait, l'échantillon apparaît blanc sur un fond sombre.

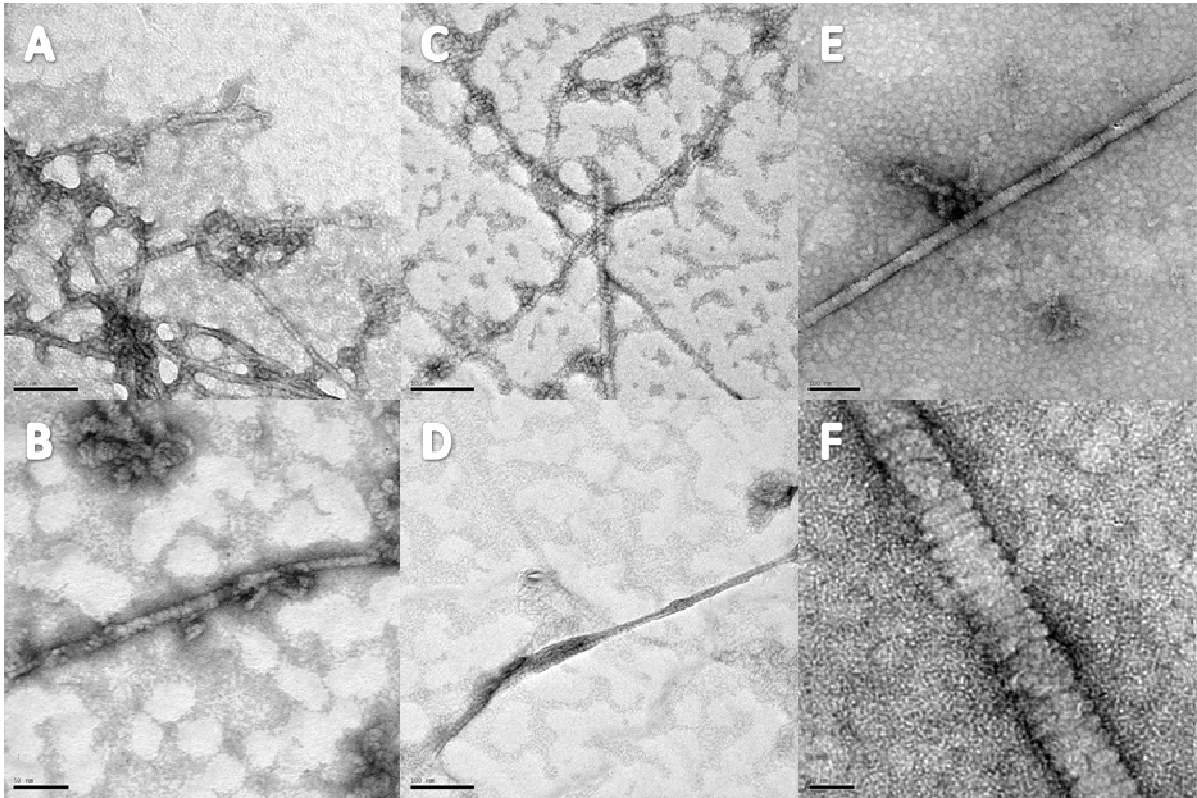


Figure II-33 – Images de microscopie électronique à transmission (MET) d'autoassemblages de surfactants **II-4** sur des nanotubes simple paroi (*A & B*), double parois (*C & D*) et multi parois (*E & F*) -Echelles : *A 100nm* ; *B 50nm* ; *C 100nm* ; *D 100nm* ; *E 100nm* ; *F 20nm*

Les clichés de microscopie électronique (Figure II-33) montrent que les autoassemblages sont possibles sur différents types de nanotubes de carbone. L'analyse des différentes images de microscopie a montré que les anneaux formés à la surface de SWNTs ont un diamètre d'environ 8 nanomètres pour une épaisseur de 6 à 7 nanomètres, à la surface de DWNTs un diamètre de 12 à 13 nanomètres pour une épaisseur de 7 à 8 nanomètres et à la surface de MWNTs un diamètre d'environ 25 à 30 nanomètres pour une épaisseur de 7 à 8 nanomètres.

Au vu de ces résultats, on peut remarquer que le diamètre des anneaux dépend du diamètre externe des nanotubes mais que leur épaisseur ne dépend que de la longueur de l'amphiphile (Figure II-34). La longueur totale théorique du tensio-actif, depuis le méthyle de la chaîne lipophile jusqu'aux acides de la tête NTA, a été mesurée à 3,9 nm (Figure II-34 – *A*). La largeur d'un anneau correspond à deux amphiphiles contigus (Figure II-34 – *B*), et donne donc une valeur comprise entre 7 et 8 nm, cohérente avec les données expérimentales.

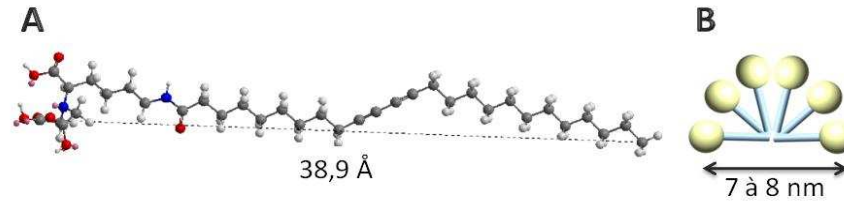


Figure II-34 – A - Longueur du tensio-actif mesurée par *ChemBio3D* / B – Largeur des anneaux sur les nanotubes correspondant à deux molécules de surfactants

De plus, pour une masse donnée de nanotubes de carbone, la surface externe d'un nanotube sera différente selon qu'il est à simple paroi, à double parois ou à multi parois. Les SWNTs nécessiteront une quantité plus importante de surfactants que les DWNTs ou que les MWNTs pour obtenir un arrangement en anneaux sur la totalité de leurs surfaces. Il est donc important de déterminer ce ratio pour optimiser le taux d'adsorption des surfactants à la surface des nanotubes de carbone.

II-4-3- Optimisation du ratio nanotubes de carbone / surfactants

Pour une même unité de masse, les nanotubes de carbone simple, double ou multi parois, ont des surfaces externes, accessibles aux surfactants, différentes. La détermination du ratio massique entre le surfactant et les nanotubes de carbone est donc importante afin d'optimiser le procédé d'obtention des nanobagues.

Le but de cette étude est ainsi de déterminer le ratio massique entre le surfactant **II-4** et les nanotubes de carbone multi feuillets fabriqués par n-Tec, dans un tampon TRIS/glycine et dans une solution aqueuse de NaOH. La détermination de ce ratio a été effectuée sur les nanotubes multi parois car les études qui suivent ont été menées avec ce type de nanotube uniquement.

Pour cela, une solution de tensio-actifs **II-4** est préparée à 5 mg/mL dans un tampon TRIS/glycine (TRIS 25 mM, glycine 190 mM, à pH=8) et dans une solution de NaOH à une concentration de 0,01 mol/L (pH=12). A ces solutions, une quantité croissante de nanotubes de carbone est ajoutée à des concentrations s'échelonnant de 5 mg/mL à environ 35 mg/mL. Chaque échantillon est soniqué pendant trois minutes à la sonde de sonication afin de suspendre la totalité des nanotubes de carbone, puis polymérisé par irradiation lumineuse à 254 nm pendant 4 heures avant d'être centrifugé pendant 30 minutes à 15500 trs/min. Enfin, le surnageant de chaque solution est prélevé pour être analysé par spectroscopie d'absorption UV.

L'étude menée sur les solutions de la molécule amphiphile **II-4** a montré qu'à mesure que la concentration en nanotubes de carbone augmente, l'absorption du surnageant diminue jusqu'à atteindre un palier (Figure II-35) à une concentration de 20 mg/mL en nanotubes. Cette valeur correspond à la concentration maximale en CNT au-delà de laquelle les nanotubes ajoutés ne seront plus suspendus. Le ratio massique optimal entre les MWNT's et le surfactant **II-4** dans le tampon TRIS/glycine est de ***4 pour 1***.

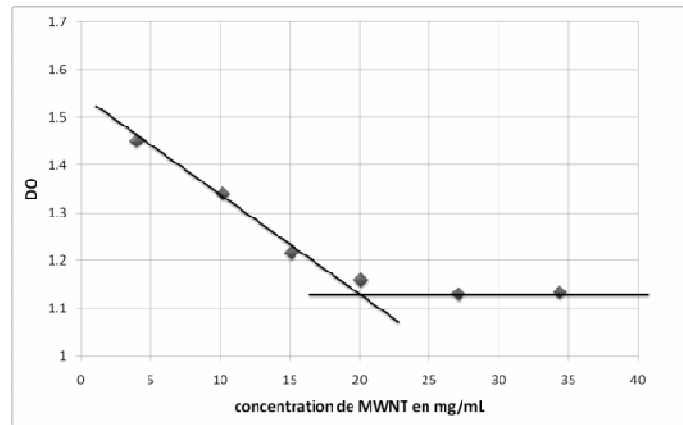


Figure II-35 – Détermination du ratio CNT/surfactants dans le tampon TRIS/glycine

Enfin, la structure de l'assemblage du surfactant à la surface des nanotubes a été contrôlée par microscopie électronique à transmission par coloration négative. Pour un ratio de 4 pour 1, les anneaux sont toujours présents à la surface de tous les nanotubes de carbone observés (Figure II-36).

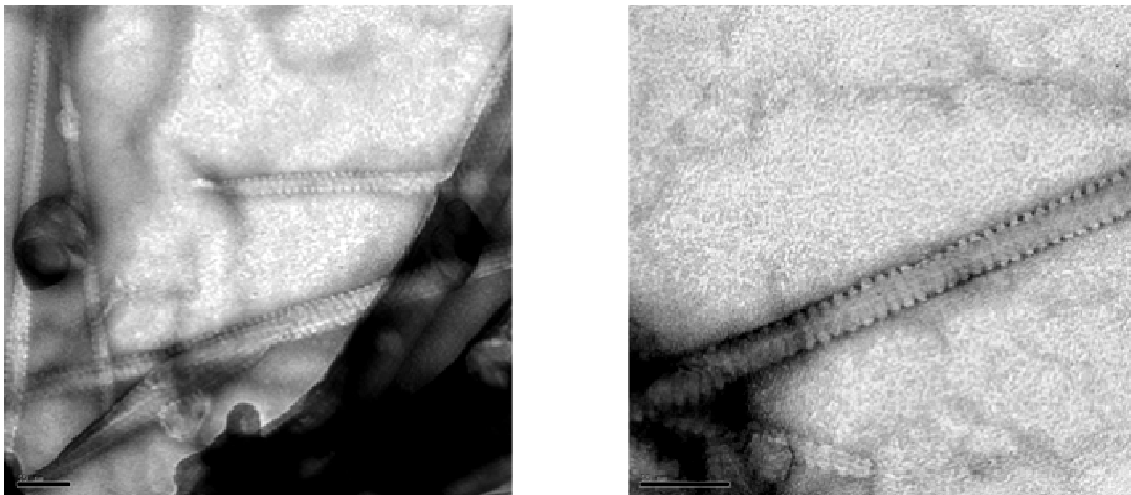


Figure II-36 – Images MET des échantillons dans le tampon TRIS/Glycine à un ratio de 4 pour 1-
Echelles : 50nm

De la même manière, une étude a été menée sur une solution de tensio-actifs **II-4** dans une solution de NaOH à une concentration de 0,01 mol/L (pH=12) (Figure II-37). Ce travail a

été effectué dans une solution de soude pour savoir si des arrangements similaires pouvaient être observés dans des milieux différents. Dans ce cas, la valeur du pH est importante car le surfactant **II-4** forme des micelles uniquement à des pH supérieurs à 10, dans des solutions sans tampons ni sels. Cette valeur de pH correspond au pKa de l'amine tertiaire de la molécule **II-4** au-delà de laquelle tous les acides carboxyliques et les amines sont déprotonés (Schéma II-7).

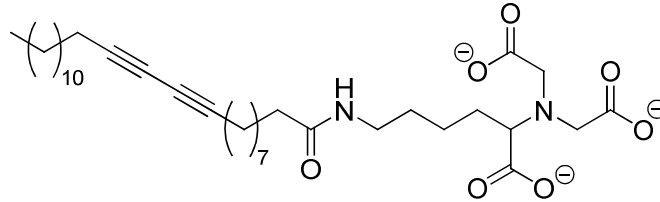


Schéma II-7 – Structure de la molécule amphiphile **II-4** à pH=12

Cette étude a montré que le ratio massique optimal entre les nanotubes de carbone multi parois et le surfactant **II-4** dans une solution de NaOH à pH=12 est de **4,8 pour 1**.

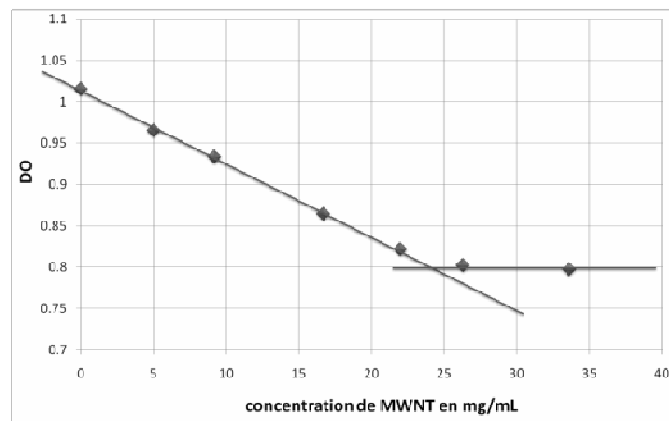


Figure II-37 – Détermination du ratio CNT/surfactants dans une solution de NaOH

La structure de ces arrangements a été contrôlée par microscopie électronique à transmission par coloration négative (Figure II-38). A ce ratio, les clichés de microscopie montrent que tous les nanotubes de carbone sont recouverts d'anneaux.

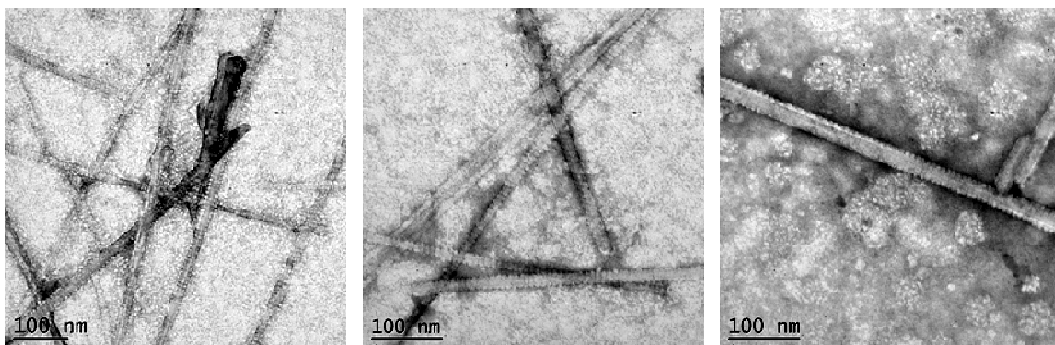


Figure II-38 – Images MET des échantillons dans le NaOH à pH=12 - Echelles : 100 nm

Cette étude a montré qu'il est nécessaire de déterminer pour chaque type de nanotubes de carbone le ratio massique entre la quantité de surfactants et de nanotubes de carbone. Dans le cas des nanotubes de carbone multi parois de chez *n-Tec*, le ratio massique est de 4 (MWNT) pour 1 (surfactant) dans le tampon TRIS/Glycine, et de 4,8 (MWNT) pour 1 (surfactant) dans une solution de NaOH à pH=12. Cependant, il a été observé que l'ajout d'une quantité de SDS, à une concentration bien inférieure à la CMC, favorise et stabilise la structuration en nanobagues. En revanche, le SDS additionné à l'étape de l'assemblage est éliminé par dialyse avant la photopolymérisation des surfactants.

II-4-4- Polymérisation des motifs diacétyléniques par irradiation hv

La polymérisation des motifs diacétyléniques peut s'effectuer de différentes manières : par irradiation lumineuse à 254 nm, par l'action de radiation de haute énergie, ou par initiation thermique à haute température en dessous de la température de fusion du monomère.

La polymérisation des anneaux à la surface des nanotubes de carbone a été effectuée à partir de motifs diacétyléniques, polymérisable par irradiation lumineuse à 254 nm. Ce type de polymérisation a été utilisé car cette méthode est « propre », car aucun agent chimique externe n'est utilisé pour initier la réaction de polymérisation.

II-4-4-1- Mécanisme et structure de la polymérisation

Le polymère obtenu par irradiation lumineuse est constitué d'une alternance d'alcène et d'alcyne conjugué. Pour cela, différentes conditions doivent être réunies :

- ✓ L'état doit être hautement ordonné
- ✓ Les molécules doivent former des structures auto-assemblées
- ✓ Les donneurs et accepteurs doivent former un arrangement dans lequel les chaînes sont parallèles et équidistantes

Peu de références dans la littérature traitent du mécanisme de polymérisation des motifs diacétyléniques. Néanmoins, deux mécanismes ont été proposés pour expliquer cette polymérisation : un premier mécanisme par la formation de dicarbènes et un deuxième mécanisme par voie radicalaire.

Un premier mécanisme, proposé par G. Wegner, est celui impliquant la formation de dicarbènes.⁵⁰ Le monomère excité soit par irradiation directe du chromophore de la triple liaison

ou par couplage « exciton phonon » donne lieu à la formation d'un motif dicarbène (Schéma II-8).

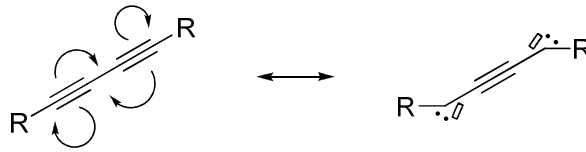


Schéma II-8 – Excitation du monomère en dicarbène

L'espèce réactive est donc un dicarbène (Schéma II-9 – A) qui vient réagir avec un dicarbène voisin pour former un dimère lié par une double liaison (Schéma II-9 – B).⁵¹ Cette molécule formée peut ensuite s'ajouter à d'autre dicarbène voisin (Schéma II-9 – C) pour donner lieu au final à un polymère.

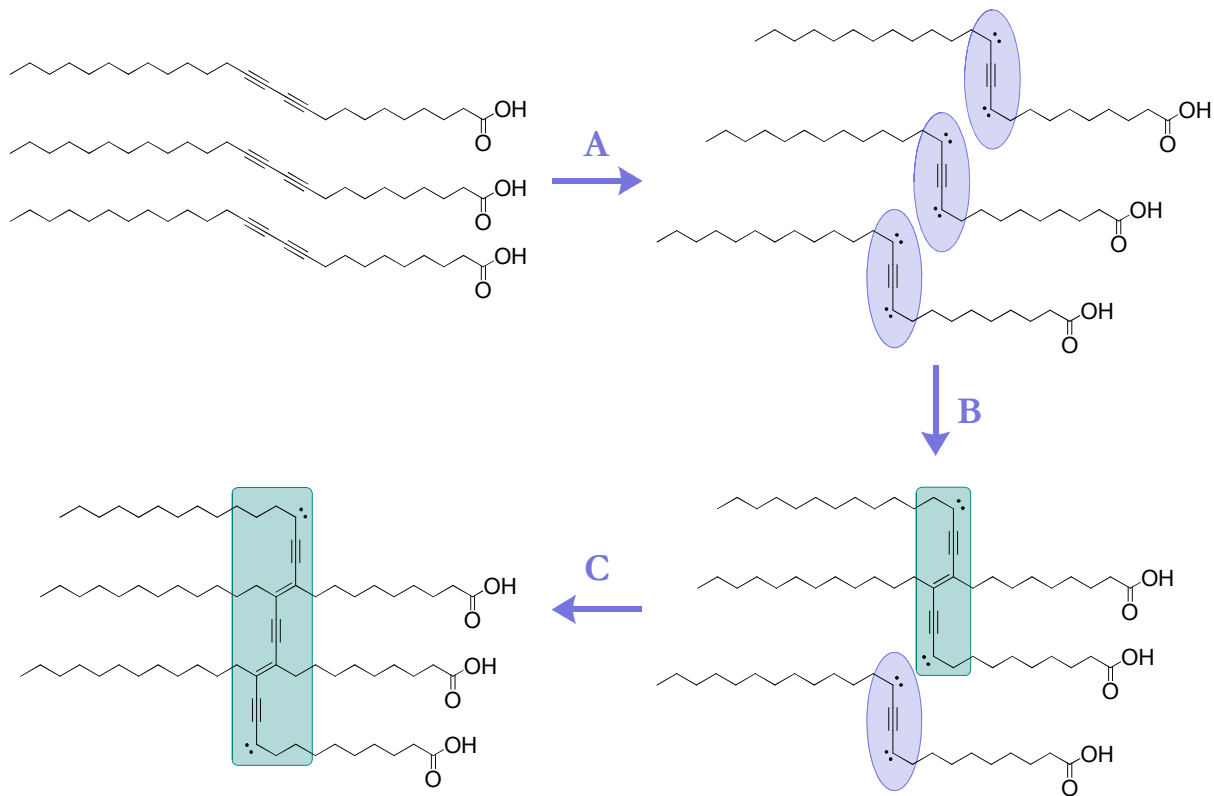


Schéma II-9 – Principe de polymérisation par formation de dicarbène

Ce mécanisme semble passer par un procédé coopératif où plusieurs molécules s'ajoutent ensemble en même temps.⁵⁰ Néanmoins, il a été montré que ce mécanisme ne semble pas être uniquement du type réaction en chaîne car les carbènes terminaux paraissent stables et une post-polymérisation n'a aucun effet sur la réaction. Le mécanisme paraît être un mélange de réaction en chaîne (« *chain reaction* ») et de réaction à étape (« *step-reaction* ») car seules les molécules excitées en dicarbène s'ajoutent aux chaînes terminales réactives.

Le deuxième mécanisme de polymérisation des diacétyléniques est celui impliquant la formation d'intermédiaires diradicaux.⁵¹⁻⁵⁵ Ce mécanisme est le plus probable et implique deux excitations lors de la formation du polymère : la première étape du mécanisme consiste à former l'espèce di-radical par une excitation électronique (par irradiation lumineuse $h\nu$, Figure II-39 – 1). La deuxième étape est l'approche d'une espèce diacétylénique voisine par excitation vibrationnelle (Figure II-39 – 2) suivie de la formation d'un radical dimère par une réaction d'addition (Figure II-39 – 3). La dernière étape est la réaction de propagation de la chaîne de polymère par le mécanisme décrit précédemment (Figure II-39 – 4).

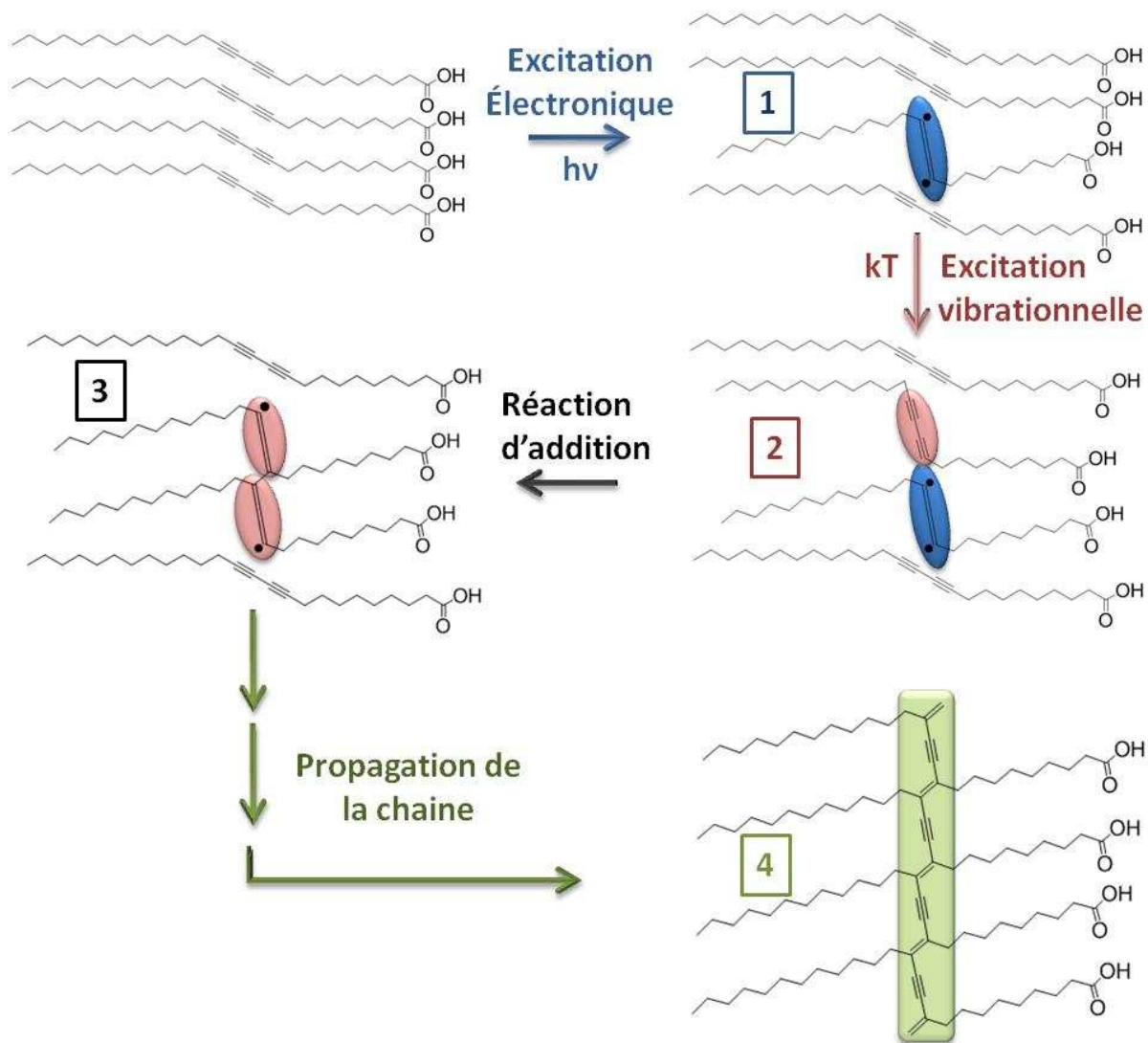


Figure II-39 – Mécanisme de polymérisation par l'intermédiaire diradicalaire⁵³

Les deux mécanismes passent par la formation d'une espèce intermédiaire réactive, le dicarbène ou le diradical, qui engendre la polymérisation. Dans la littérature, le mécanisme le plus couramment décrit, pour la polymérisation des motifs diacétyléniques, est celui par voie radicalaire.

II-4-4-2- Polymérisation des anneaux à la surface des nanotubes de carbone

L'étape suivant l'autoassemblage des surfactants à la surface des nanotubes est la polymérisation par irradiation lumineuse à 254 nm. Cette étape doit être précédée d'une dialyse, à l'aide de membranes de porosité de 25000 daltons, afin d'éliminer le SDS présent dans le tampon et nécessaire à la structuration des nanobagues.

La polymérisation des nanobagues à la surface des nanotubes de carbone a été effectuée par une lampe d'irradiation à 254 nm (Lampe HERAEUS de 40 watts) pendant 5 heures sous agitation magnétique. Les nanotubes recouverts d'anneaux polymérisés sont par la suite observés par microscopie électronique à transmission par coloration négative (Figure II-40).

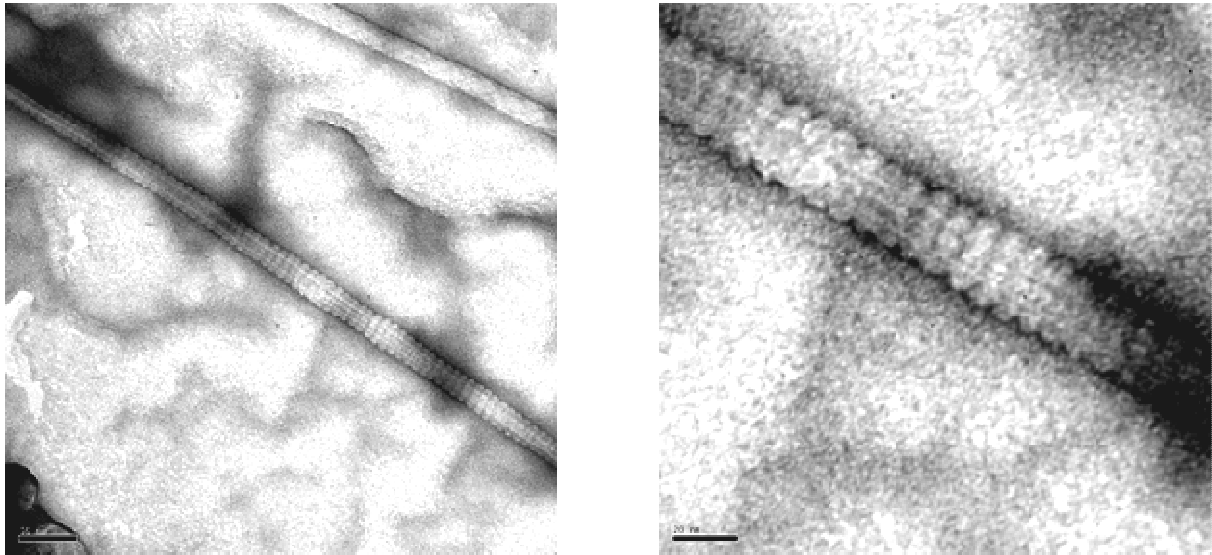


Figure II-40 – Clichés MET d'anneaux polymérisée à la surface des nanotubes de carbone multi-feuillets -
Echelles : (gauche) 50 nm ; (droite) 20 nm

Ces clichés de microscopie ont montré que cette méthode de polymérisation n'était pas destructive car l'assemblage supramoléculaire n'est pas altéré après réticulation. Une question peut néanmoins être soulevée : la polymérisation se produit-elle uniquement entre les molécules d'un même anneau ou peut-il y avoir une polymérisation croisée entre deux anneaux adjacents ?

En s'appuyant sur la structure particulière des anneaux, il semble que la polymérisation ne se fasse qu'entre molécules d'un même anneau pour deux raisons : premièrement, les surfactants de deux anneaux distincts ont leurs parties hydrophiles têtes bêches (Figure II-41), et, leurs motifs polymérisables étant au cœur de la partie hydrophobe, la polymérisation ne pourra s'effectuer qu'entre des molécules d'un même anneau car elle ne se produit que dans des systèmes structurés.

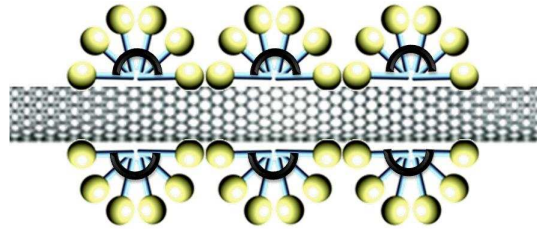


Figure II-41 – Polymérisation intra-anneaux des molécules II-4

II-4-5- Séparation des anneaux polymérisés des nanotubes de carbone

Nous avons montré que le surfactant II-4 formait des assemblages particuliers en anneaux à la surface des nanotubes de carbone. Par la suite, ces structures ont pu être polymérisées à la surface des nanotubes par irradiation lumineuse à 254 nm.

Ces anneaux réticulés se comportent comme des objets uniques constitués de plusieurs chaînes de polymères entrelacées. Une fois séparés du support carboné, ces objets peuvent avoir des propriétés particulières de par leur nature amphiphile : l'anneau est constitué d'une coque externe hydrophile et d'un cœur hydrophobe (Figure II-42). Ces propriétés peuvent donc permettre à l'anneau de stabiliser ou d'encapsuler des espèces à caractère hydrophobe en solution aqueuse.

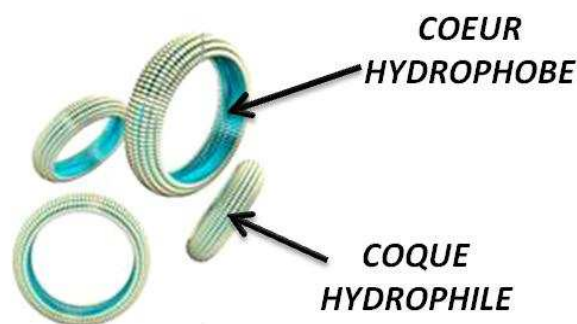


Figure II-42 – Propriétés des anneaux polymérisés

Pour étudier les propriétés de ces espèces, une méthode permettant de séparer les anneaux des nanotubes de carbone a été mise au point dans une étude antérieure au laboratoire en utilisant la technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Ce procédé repose sur les propriétés qu'ont les molécules chargées à migrer dans un gel sous l'influence d'un champ électrique : une molécule migrera plus ou moins vite dans un gel selon son poids moléculaire et sa charge totale.⁵⁶⁻⁵⁹ La réticulation du gel est aussi un paramètre important car, selon le degré de polymérisation de celui-ci, il est possible de faire migrer plus ou

moins une molécule par rapport à une autre. Un gel très réticulé aura un pouvoir de séparation important sur les petites molécules.

Dans le cas des nanobagues, cette technique peut être utilisée car la surface des anneaux d'amphiphiles **II-4** est chargée négativement et, de ce fait, les nanobagues migreront sous l'influence d'un champ électrique. A l'opposé, les nanotubes de carbone sont des espèces neutres et, par conséquent, ne migreront pas sous l'influence d'un champ électrique (Figure II-43).

La séparation des anneaux des nanotubes de carbone a été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,25% à partir d'une solution de nanotubes de 1 mg/mL. La séparation est réalisée à intensité fixe de 30 mA pendant 1h30.

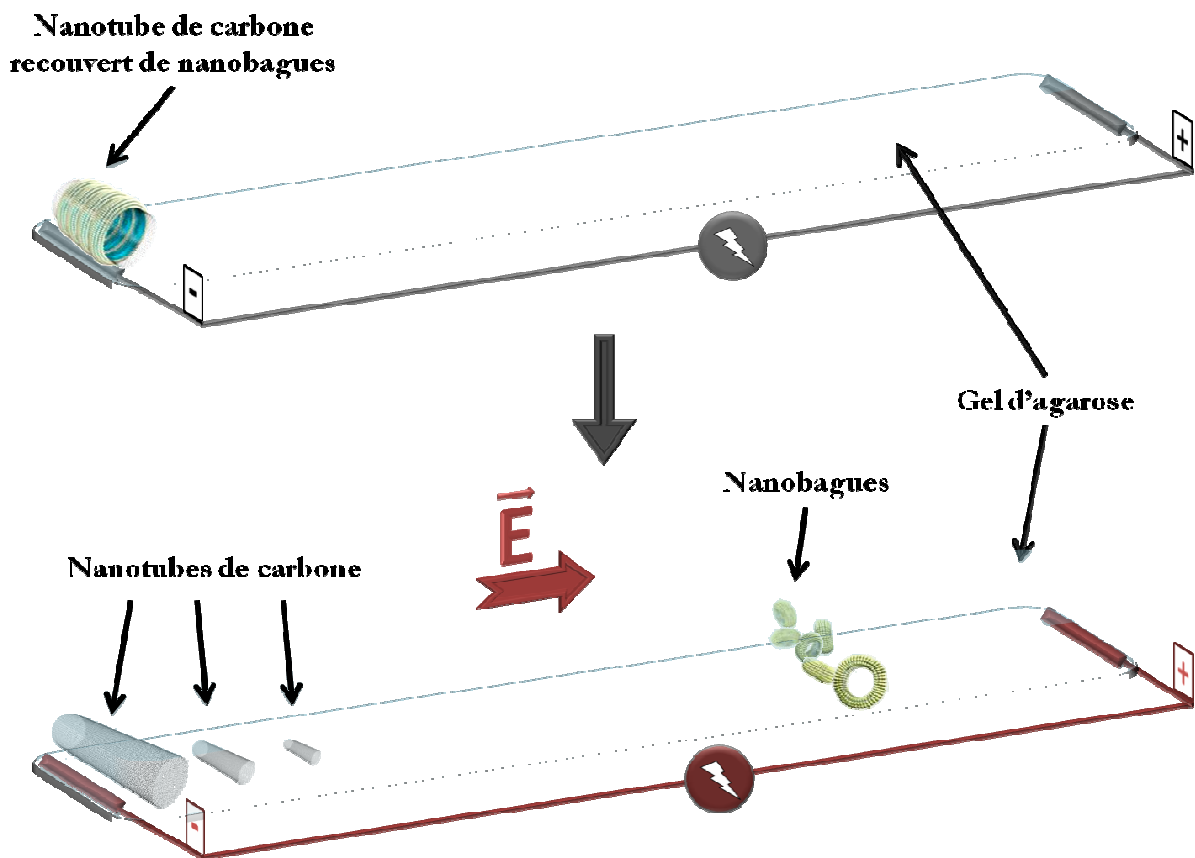


Figure II-43 – Principe de séparation des nanobagues des nanotubes de carbone par électrophorèse

Au terme de la manipulation, trois zones distinctes peuvent être identifiées : une première zone (dépôt noir de nanotubes) correspondant aux puits où la solution de départ a été déposée, une seconde zone (trainée noire), proche de la précédente, correspondant à la migration de petits nanotubes de carbone et enfin une troisième (bande jaunâtre) correspondant aux nanobagues ayant migrées au $\frac{3}{4}$ du gel d'agarose (Figure II-43).

La bande jaunâtre est par la suite découpée pour procéder à l'extraction des nanobagues emprisonnées dans cette partie du gel d'agarose. Pour cela, une seconde méthode d'extraction fondée sur le principe de l'électrophorèse a été utilisée: l'électroélution. Cette technique permet d'extraire des molécules du gel d'agarose, et est communément utilisée en biologie pour extraire des protéines ou de l'ADN séparés par électrophorèse sur gel d'agarose.⁶⁰⁻⁶²

Par conséquent, pour extraire les anneaux de surfactants polymérisés, le gel d'agarose est placé dans ce système de séparation comportant deux compartiments : le compartiment de gauche où se trouve la bande de gel d'agarose à extraire et le compartiment de droite qui permet de récolter les molécules une fois l'extraction terminée (Figure II-44). Lorsque le courant électrique est en circulation, seules les nanobagues migrent sous l'influence du champ électrique puisque le gel d'agarose est une espèce neutre et les anneaux sont des espèces chargées négativement. En fin de séparation, les anneaux d'amphiphiles polymérisés sont récupérés dans le compartiment de droite sous forme d'une « solution » de nanobagues dans du tampon TRIS/glycine/SDS puis purifiés par dialyse avec des membranes d'une porosité de 25000 Daltons.

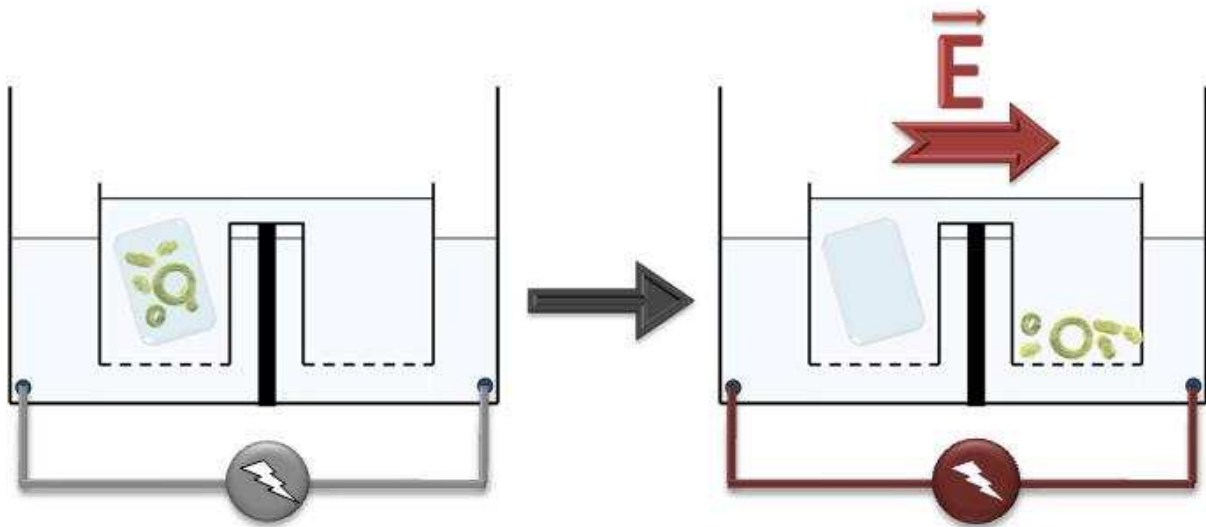


Figure II-44 – Schéma de principe de l'extraction des nanobagues du gel d'agarose par électroélution

La « solution » de nanobagues est analysée par microscopie électronique à transmission par coloration négative à l'acétate d'uranyle.

Les clichés de microscopie d'anneaux isolés (Figure II-45 – *A* à *F*) montrent des espèces de forme circulaire d'un diamètre moyen d'environ 50 nm pour une épaisseur moyenne de l'anneau d'environ 5 à 7 nm suivant les clichés. Les diamètres des anneaux isolés diffèrent de ceux observés à la surface des nanotubes de carbone de 30 nm (Figure II-33 – *E* & *F*).

Cette observation peut être expliquée par le fait que, les anneaux isolés n'ayant plus d'interactions hydrophobes fortes avec la surface du nanotube pourraient se structurer dans une configuration thermodynamiquement plus stable. Ceci se traduit par un espacement plus important des chaînes de surfactants polymérisées et par conséquent d'un accroissement du diamètre de l'anneau.

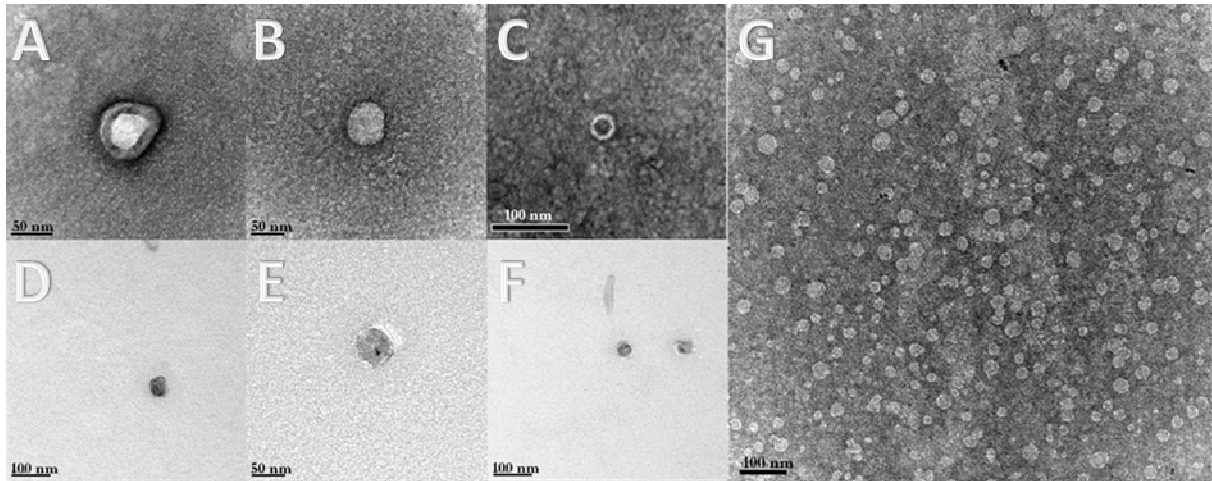


Figure II-45 – Images MET d'anneaux d'amphiphiles polymérisés

Echelles : (A) 50 nm ; (B) 50 nm ; (C) 100 nm ; (D) 100 nm ; (E) 50 nm ; (F) 100 nm ; (G) 100 nm

Toutefois, l'analyse des clichés de microscopie d'une population d'anneaux dévoile une polydispersité en taille importante des échantillons, s'échelonnant de 35 à 90 nm. Tout d'abord, cette polydispersité importante ne semble pas être liée à la dispersité en diamètre des nanotubes de carbone n-Tec (données n-Tec : 5 à 50 nm ; dispersité observée : 10 à 30 nm).

Cette polydispersité proviendrait plus vraisemblablement d'une destruction partielle de la structuration en anneaux, lors de la phase de séparation par électrophorèse, qui engendrerait la formation d'anneaux brisés. En effet, dans le cas où un nanotube est parallèle au champ électrique, les anneaux de surfactants polymérisés sont extraits intacts (Figure II-46 – A). A l'inverse, dans le cas d'un nanotube perpendiculaire au champ électrique, les anneaux ne peuvent être extraits que par déchirement. Ces structures altérées pourraient par la suite se recombinaison sous forme de multimères formant ainsi des arrangements en anneaux de plus ou moins grandes tailles (Figure II-46 – B).

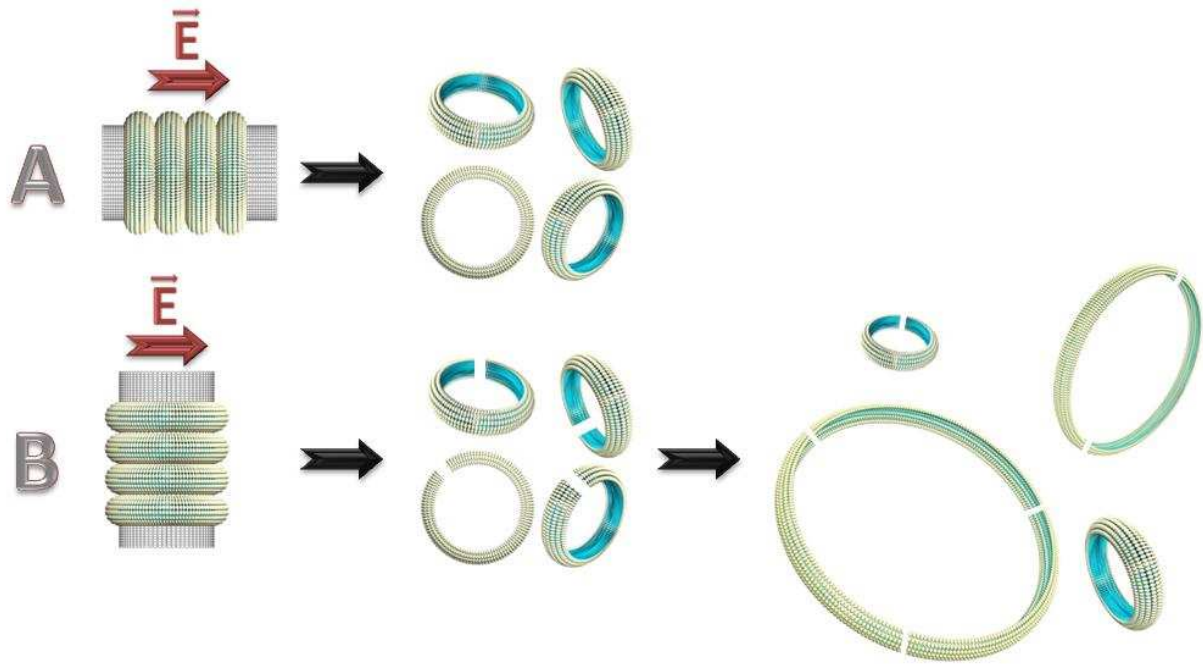


Figure II-46 – Extraction des nanobagues par électrophorèse – (A) extraction intacte des anneaux de surfactants polymérisés ; (B) extraction par déchirement des anneaux

Au cours de cette étude, nous avons réalisé la synthèse de « nanobagues » à partir de la molécule amphiphile **II-4**. Cette molécule s'assemble de façon remarquable à la surface de nanotubes de carbone simple paroi, double parois et multi parois. L'extraction des anneaux de surfactants, arrangés à la surface de nanotubes multifeuillets, a été réalisée par électrophorèse. Toutefois, cette technique d'extraction s'est avérée partiellement altérante puisqu'une majorité des anneaux ont été déchirés lors de la séparation.

Pour résoudre ce problème, deux solutions ont été envisagées :

- ✓ La première, qui consiste à synthétiser un nouveau surfactant réticulable comportant deux fonctions polymérisables, devrait permettre une polymérisation plus importante avec un degré de réticulation accru. Les objets synthétisés à partir de ce tensio-actif devraient être plus robustes et ainsi éviter de se déchirer lors de l'extraction.
- ✓ La seconde méthode consiste à concevoir un nouveau système d'extraction permettant de séparer les anneaux des nanotubes de carbone tout en maintenant leur structuration initiale.

Les deux approches ont été explorées en parallèle.

II-5- Synthèse de nanobagues doublement polymérisées

Cette étude consiste à synthétiser un surfactant doublement polymérisable permettant d'obtenir des anneaux plus robustes pour éviter leur déchirement lors de l'extraction. Nous avons choisi deux types de motifs polymérisables pour ces tensio-actifs : un motif diacétylénique polymérisable par irradiation lumineuse, et un motif acrylate réticulable par bombardement électronique.

La première partie de cette étude a consisté en la synthèse et l'étude de la polymérisation d'un tensio-actif constitué d'un seul motif acrylate, dans le but de valider l'utilisation du bombardement électronique pour la réticulation d'anneaux à la surface de nanotubes de carbone. Dans un deuxième temps, un tensio-actif doublement polymérisable a été synthétisé, puis assemblé à la surface de nanotubes de carbone multi parois avant d'être polymérisé.

II-5-1- Synthèse et étude d'un amphiphile acrylate

Afin de valider la polymérisation par les motifs acrylates, un tensio-actif polymérisable par voie radicalaire a été synthétisé. Ce surfactant est composé d'une tête polaire comportant un diacide, d'une chaîne lipophile de 18 carbones et d'un motif acrylate polymérisable par voie radicalaire (Schéma II-10). L'amorce que nous avons choisi est le bombardement électronique, car cette technique a l'avantage de polymériser les motifs acrylates sans introduction d'agent chimique extérieur. Cette étude a pu être réalisée grâce à la collaboration avec l'équipe de Serge Pin et Jean-Philippe Renault du laboratoire de radiolyse au CEA Saclay (CEA/Saclay/DSM/DRECAM).

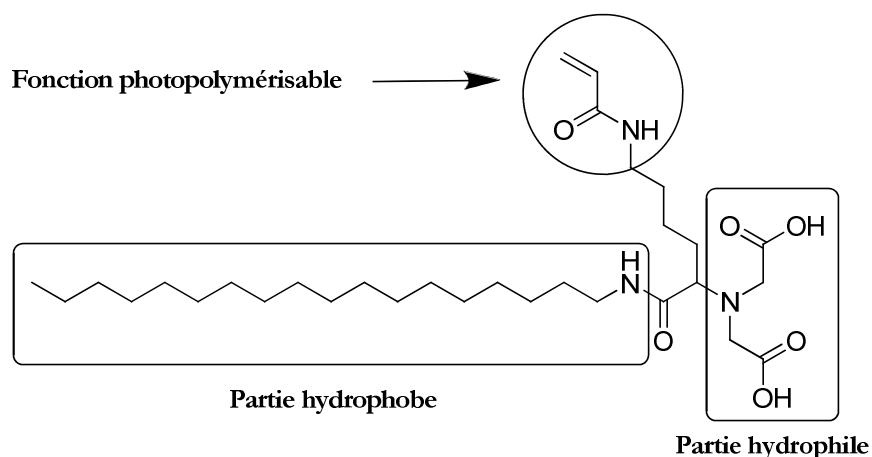


Schéma II-10 – Structure de l'amphiphile II-11 polymérisable via le motif acrylate

II-5-1-1- Synthèse d'un amphiphile constitué d'un motif polymérisable acrylate

La synthèse de la molécule **II-11** s'effectue en 6 étapes (Schéma II-11) à partir de l'acide 6-(benzyloxycarbonylamino)-2-(tert-butoxycarbonylamino)hexanoïque qui, après activation préalable de l'acide par le NHS en présence d'EDCI, est couplé à l'octadécylamine pour donner la molécule **II-6**. Le groupement protecteur tert-butoxycarbonyle de la molécule **II-6** est déprotégé par l'acide trifluoroacétique et conduit à l'amine **II-7**.

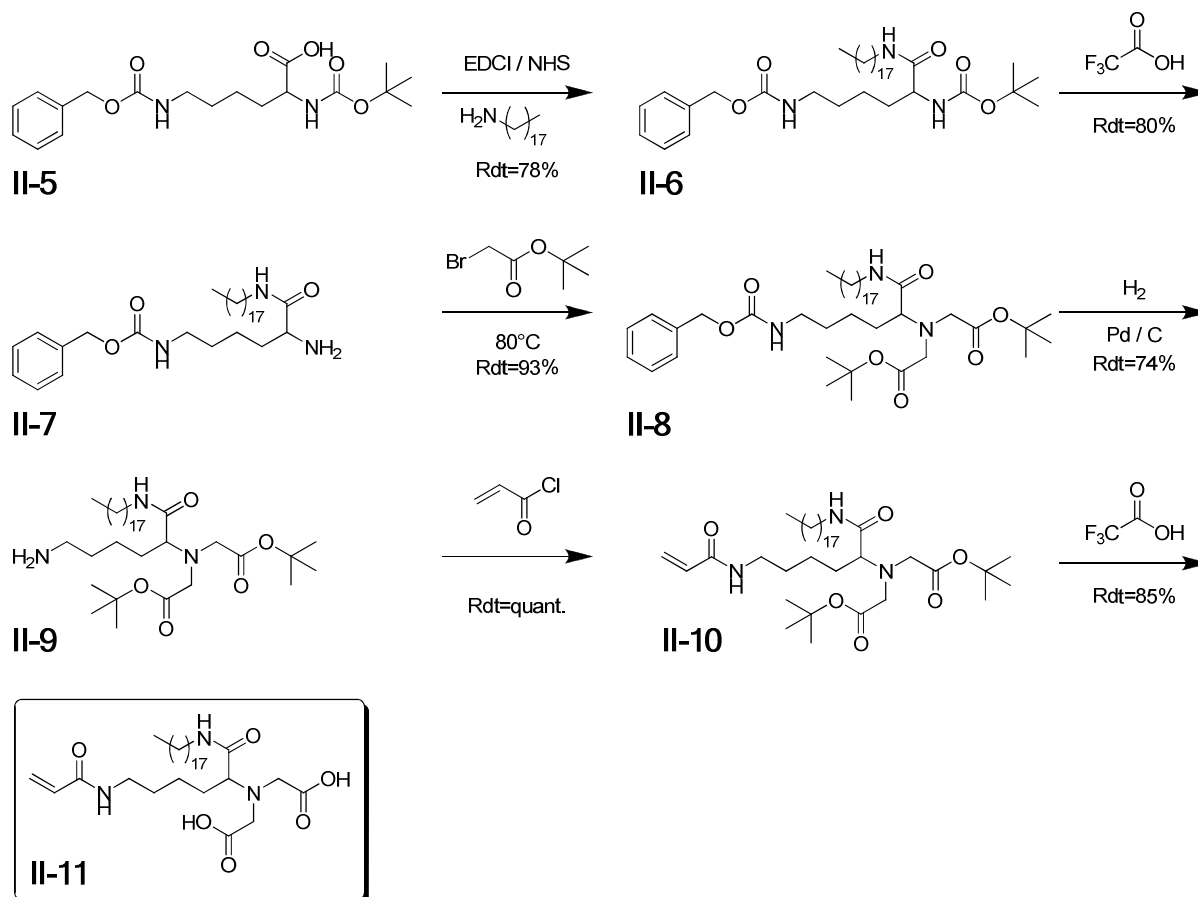


Schéma II-11 – Synthèse de l'amphiphile polymérisable par un motif acrylate (**II-11**)

La dialkylation de **II-7** par le 2-bromoacétate de tertbutyle dans l'acétonitrile à 80°C conduit à l'espèce **II-8**. L'amine en position 6 du composé **II-8** est ensuite déprotégée par hydrogénolyse du groupement benzyloxycarbonyle dans le méthanol, pour donner le produit **II-9**. Le composé **II-10** est obtenu par acylation de la molécule **II-9** par le chlorure d'acryloyle. Enfin, la déprotection des deux esters *tert*-butyliques de la molécule **II-10** par l'acide trifluoroacétique conduit à la molécule amphiphile polymérisable **II-11** avec un rendement global de 30%.

L'amphiphile polymérisable par le motif acrylate a ensuite été assemblé à la surface de nanotubes de carbone multi parois avant d'être polymérisé par bombardement électronique.

*II-5-1-2- Autoassemblage de l'amphiphile **II-11** à la surface de nanotubes de carbone*

Une expérience d'adsorption a été réalisée avec le tensio-actif **II-11** sur des MWNTs n-Tec dans le but de vérifier si ce type de molécule a la capacité de s'assembler sous forme d'anneaux à la surface des nanotubes.

Pour ce faire, 50 mg de la molécule **II-11** ont été solubilisés dans un tampon TRIS/glycine/SDS à une concentration de 1 mg/mL, auquel ont été rajoutés 50 mg de nanotubes de carbone multi parois. Cet échantillon a par la suite été soniqué pendant 3 min à la sonde de sonication afin d'obtenir une suspension stable de nanotubes de carbone. La solution est ensuite dialysée avec une membrane de dialyse de porosité 25000 daltons afin d'éliminer le SDS présent dans le tampon.

Les échantillons sont ensuite observés par microscopie électronique à transmission par coloration négative à l'acétate d'uranyle (Figure II-47).

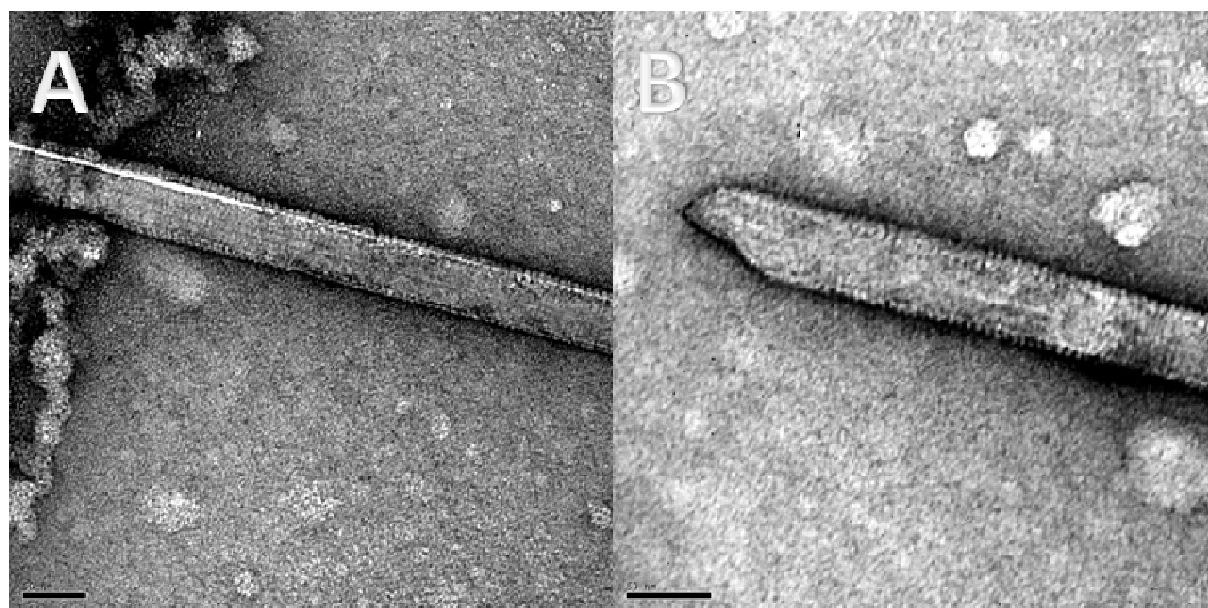


Figure II-47 – Images MET de l'assemblage de la molécule **II-11** à la surface de nanotubes de carbone –
Echelles : (A) 50 nm ; (B) 50 nm

Les clichés de microscopie électronique montrent que les autoassemblages en anneaux sont possibles à partir de la molécule amphiphile **II-11**. L'observation de ces arrangements est toutefois moins évidente en comparaison de ceux observés avec le tensio-actif **II-4**, car les

anneaux ne sont visibles en microscopie qu'à la périphérie des nanotubes et non sur toute leur surface, comme dans le cas des anneaux de première génération.

Au vu de ces résultats, il peut être remarqué, par analyse des différentes images de microscopie, que les anneaux formés à la surface des MWNTs ont un diamètre de 20 à 25 nanomètres pour une épaisseur d'environ 5 nanomètres.

II-5-1-3- Méthode de polymérisation des motifs acrylates

La nouvelle méthode de polymérisation envisagée pour ce type de surfactant est la polymérisation radicalaire de motifs acrylates.

La polymérisation radicalaire est une réaction en chaîne qui s'effectue en trois étapes :⁶³

- ✓ La première étape est **l'initiation ou amorçage de la réaction**, qui nécessite la production d'un radical. Celui-ci est généralement produit par coupure homolytique d'un initiateur, donnant lieu à deux radicaux réactifs qui viennent s'additionner sur le premier monomère pour produire la réaction d'initiation (Schéma II-12 – A).

- ✓ La deuxième étape est **la propagation de chaîne**, qui consiste en l'addition successive d'un grand nombre de monomères sur le radical initié à l'étape précédente. Chaque addition crée un nouveau radical de la même espèce, plus grand d'une unité monomère (Schéma II-12 – B).

- ✓ Enfin, la dernière étape est **la terminaison de chaîne**, qui stoppe le processus de propagation. Deux mécanismes de terminaison peuvent se produire : le mécanisme de terminaison par recombinaison consiste en la recombinaison de deux macro-radicaux l'un sur l'autre conduisant à la formation d'un « polymère mort » (Schéma II-12 – C) ; le mécanisme par dismutation implique le transfert d'un hydrogène radicalaire, en bêta du centre radicalaire, vers un autre centre, lui aussi radicalaire, qui donne lieu à la formation de deux polymères : l'un saturé et l'autre insaturé (Schéma II-12 – D).

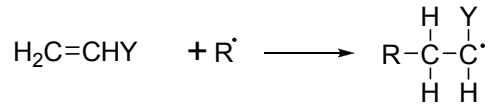
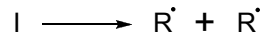
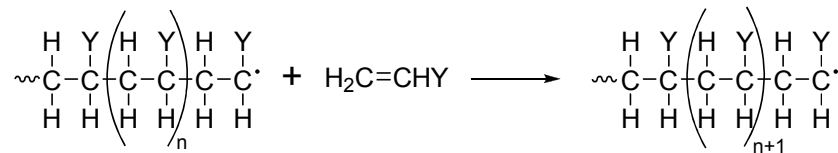
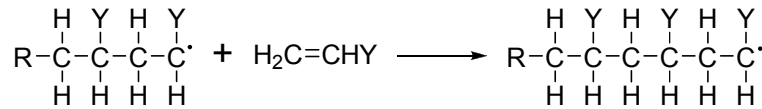
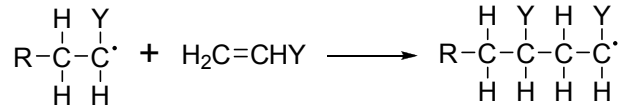
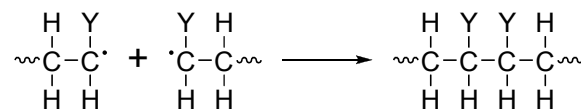
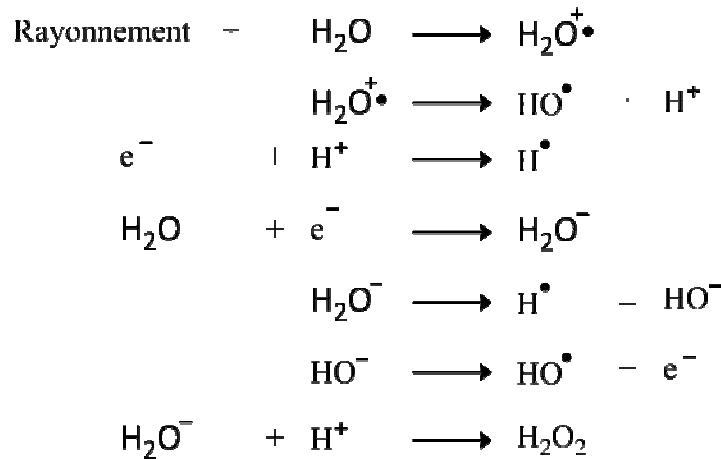
A - Initiation

B - Propagation

C - Terminaison par recombinaison

D - Terminaison par dismutation

 Schéma II-12 – Mécanisme de polymérisation par voie radicalaire⁶³

La première étape de cette réaction est l'initiation de la chaîne par formation d'un radical réactif qui vient s'ajouter sur le premier monomère. L'initiation de la polymérisation peut être déclenchée par une variété de méthodes permettant la production d'un radical réactif. Ces espèces peuvent être générées par des méthodes telles que thermiques, photochimiques, oxydoréductions ou par un rayonnement ionisant.

La méthode d'initiation de polymérisation, que nous avons retenu pour notre étude, est **la production de radicaux par des rayons ionisants** et plus particulièrement par des radicaux hydroxyles formés lors de la radiolyse de l'eau par un accélérateur linéaire d'électrons (LINAC) ou par une source de rayons γ . Cette méthode est très intéressante car, comme pour les motifs diacétyléniques, cette polymérisation n'implique pas l'utilisation d'agent chimique pour initier la réaction et supporte différentes conditions expérimentales. Néanmoins, les interactions de ces radiations avec la matière sont complexes et peuvent produire différents types de radicaux lors de la radiolyse de l'eau (Schéma II-13). L'espèce majoritaire reste cependant le radical hydroxyle.

Schéma II-13 – Réaction intervenant au cours de la radiolyse de l'eau⁶³

La polymérisation est conduite par irradiation des échantillons pour induire la formation de radicaux hydroxyles qui viennent initier la réaction. L'énergie apportée à l'échantillon, aussi appelée dose (exprimée en Gray, Gy , ou Joule par kilogramme, J/kg), est proportionnelle à une quantité finie de radicaux. Il est donc possible de contrôler l'initiation de la réaction, et donc le nombre de radicaux formés, en influant sur la dose fournie à l'échantillon. Pour chaque source (électrons ou rayon γ), un débit de dose, correspondant à l'énergie fournie à la matière par unité de temps (en Gray par heure, Gy/h), est mesuré. Connaissant cette valeur, la production des radicaux hydroxyles peut être contrôlée par une exposition à la source plus ou moins prolongée.

Dans le cas du LINAC au laboratoire de radiolyse du CEA à Saclay, le débit de dose généré par la source d'électron pulsée est très important et permet d'obtenir une dose de 20 Gy par impulsion de 10 ns à une fréquence d'environ 20 Hz. L'avantage de ce système est que les électrons accélérés possèdent une énergie pouvant atteindre 10 MeV, permettant d'atteindre des doses importantes sur des temps très courts : 60000 Gy en 2 minutes environ.

Par la suite, une source de rayons γ a été utilisée pour initier les réactions de polymérisation. L'irradiation a été conduite en utilisant une source de ^{137}Cs à l'institut Curie (installation IBL637, université d'Orsay) délivrant un débit de dose de 38 Gy/min. Cette source d'irradiation a été utilisée suite à la panne du LINAC. Les temps d'irradiation ont du être rallongés pour obtenir une dose similaire à celle délivrée par le LINAC.

II-5-1-4- Polymérisation des assemblages de **II-11** sur MWNT au LINAC

Pour la mise en évidence de la polymérisation des motifs acrylates, des échantillons de nanotubes de carbone, recouverts de l'amphiphile **II-11** structuré en anneaux, ont été irradiés par le LINAC.

Pour ce faire, trois échantillons de nanotubes de carbone multi parois recouverts de l'amphiphile **II-11** ont été irradiés à différentes doses (30000 Gy, 60000 Gy et 90000 Gy) dans le but de déterminer la dose efficace engendrant la polymérisation des motifs acrylates. Pour favoriser la production préférentielle de radicaux hydroxyles, chaque échantillon est dégazé et conditionné à l'azote. De plus, le milieu tamponné de la solution (pH=8) permet de produire majoritairement des électrons aqueux par rapport aux atomes d'hydrogène radicalaires. Ces électrons peuvent, de la même manière que les radicaux hydroxyles, initier la polymérisation.

Après polymérisation, chacun des échantillons est centrifugé puis lavé avec du tampon TRIS/Glycine sans SDS afin d'éliminer les produits de dégradation qui auraient pu se former lors de la polymérisation. En effet, lors de la radiolyse, la présence de nombreux radicaux peut dégrader le tensio-actif **II-11** par des réactions radicalaires ayant lieux sur des sites autres que les motifs acrylates.

Les échantillons ont ensuite été observés par microscopie électronique à transmission par coloration négative à l'acétate d'uranyle dans le but de vérifier si les anneaux de surfactants étaient intacts après polymérisation.

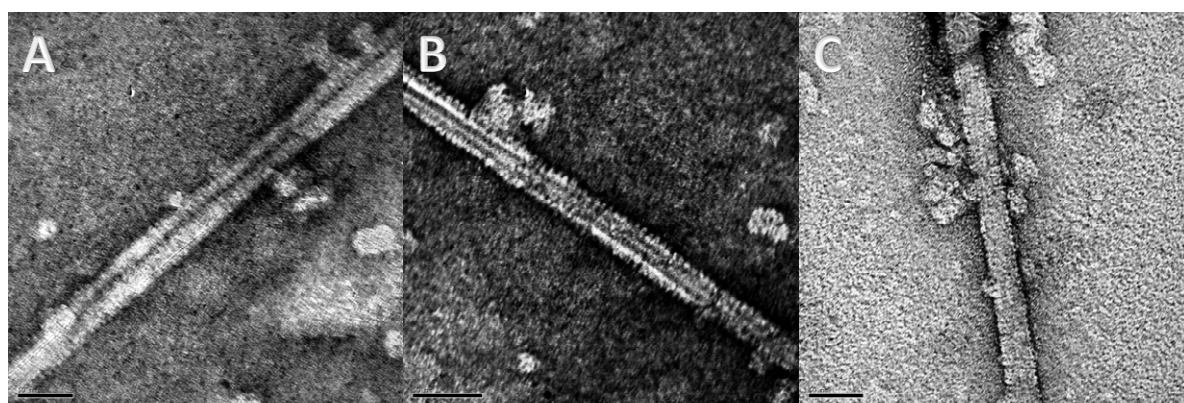


Figure II-48 – Images MET de l'assemblage de la molécule **II-11** à la surface de nanotubes de carbone après polymérisation par bombardement électronique à 3000 coups (A & B) et à 4500 coups (C) -
Echelles : (A) 50 nm ; (B) 50 nm ; (C) 50 nm

Les clichés de microscopie électronique à transmission ont montré que les autoassemblages n'avaient pas été détruits lors de la polymérisation initiée par les radicaux hydroxyles (Figure II-48). Cette observation nous indique que la nouvelle voie de polymérisation envisagée peut être appliquée à la réticulation des anneaux de surfactants. Les doses utilisées semblent un peu élevée par rapport aux données de la littérature sur la polymérisation de motifs acrylates par radiolyse de l'eau.⁶⁴⁻⁶⁷ En effet, des doses moins importantes de 10 à 20 kGy devraient être suffisantes pour effectuer cette réticulation.

Enfin, l'efficacité de la polymérisation de l'amphiphile **II-11** a été évaluée par une extraction en milieu organique de deux échantillons de nanotubes recouverts d'anneaux : un polymérisé et l'autre non. Pour cela, chaque échantillon est centrifugé dans le but de faire sédimenter les nanotubes. Le surnageant est éliminé, et remplacé par un mélange de dichlorométhane et de méthanol. Cette solution est soniquée pendant 5 minutes dans un bain à ultrason et centrifugée à nouveau, de façon à éliminer le solvant organique. Les nanotubes sont repris dans un tampon TRIS/glycine et dispersés à l'aide de la sonde de sonication. Au final, l'échantillon non polymérisé sédimente au bout de quelques minutes, alors que celui qui a été polymérisé est redispersé en solution et stable, du fait de la persistance des anneaux à la surface des nanotubes de carbone. Ce test simple met en évidence l'efficacité de la réticulation.

Un nouveau surfactant polymérisable *via* des motifs acrylates a été synthétisé afin de valider une nouvelle voie de polymérisation. Celle-ci est initiée par les radicaux hydroxyles formés lors de la radiolyse de l'eau par bombardement électronique (LINAC). Le tensio-actif **II-11** se structure en anneaux à la surface des nanotubes de carbone, de la même façon que l'amphiphile **II-4**. La chaîne lipophile de **II-11** étant plus courte, les anneaux formés à partir de cet amphiphile sont plus fins que les nanobagues formées à partir de **II-4**, mais avec un diamètre comparable.

Cette voie de polymérisation peut donc être employée pour la synthèse d'anneaux doublement polymérisables en diminuant la dose de radiation pour initier la polymérisation par les radicaux hydroxyles avec une dose d'environ 10 kGy. Au vu des résultats présentés dans cette partie, un nouveau surfactant doublement polymérisable a été synthétisé et étudié, ce dernier étant polymérisé *via* des motifs diacétyléniques (irradiation UV à 254 nm) et des motifs acrylates (radiolyse de l'eau).

II-5-2- Synthèse et étude d'un amphiphile doublement polymérisable

Afin d'étudier de nouveaux surfactants plus résistants à la séparation des anneaux des nanotubes de carbone, une première étude a mis en évidence la possibilité de polymériser des anneaux par une nouvelle voie de réticulation *via* des motifs acrylates. Cette étude nous a permis de valider cette technique de réticulation.

L'objectif de cette partie a été de développer un nouveau surfactant comportant deux types de motifs polymérisables afin de renforcer la structure des anneaux. Le tensio-actif **II-4** ayant donné une structuration en anneaux remarquable, un nouveau surfactant a été conçu sur la base de celui-ci de manière à garder les mêmes propriétés d'autoassemblage à la surface des

nanotubes de carbone. La différence provient de la présence du motif acrylate intercalé entre la partie lipophile et la partie hydrophile de la molécule (Figure II-49).

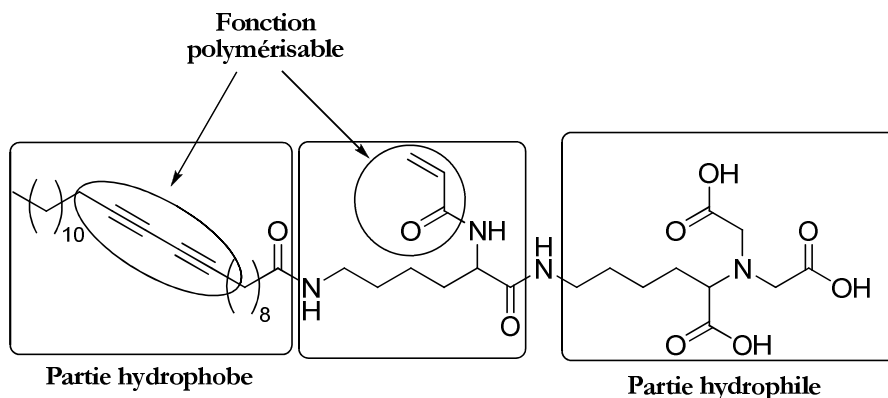


Figure II-49 – Structure de l'amphiphile polymérisable **II-23** via les motifs diacétyléniques et acrylates

II-5-2-1- Synthèse de l'amphiphile polymérisable via les motifs diacétyléniques et acrylates

La première étape de cette synthèse consiste à préparer la partie hydrophile de la molécule à partir de la *N*-benzyloxycarbonyl-L-lysine. Pour des raisons de facilité de purification, les acides carboxyliques ont été protégés sous forme d'esters *tert*-butyliques (Schéma II-14).

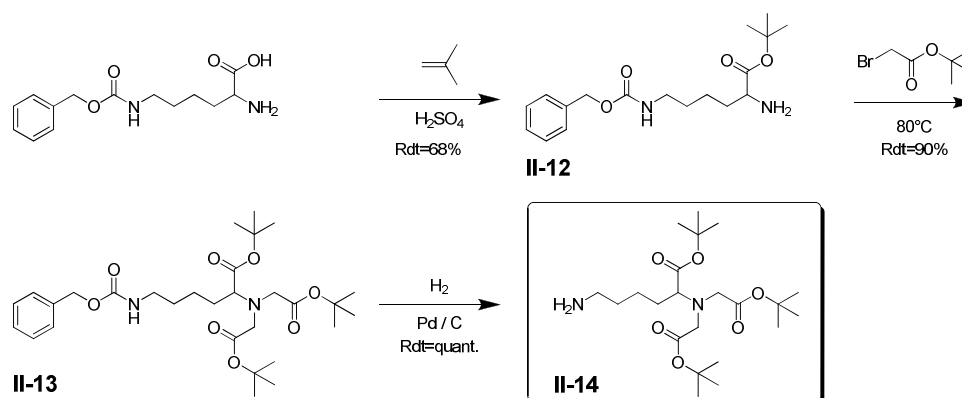
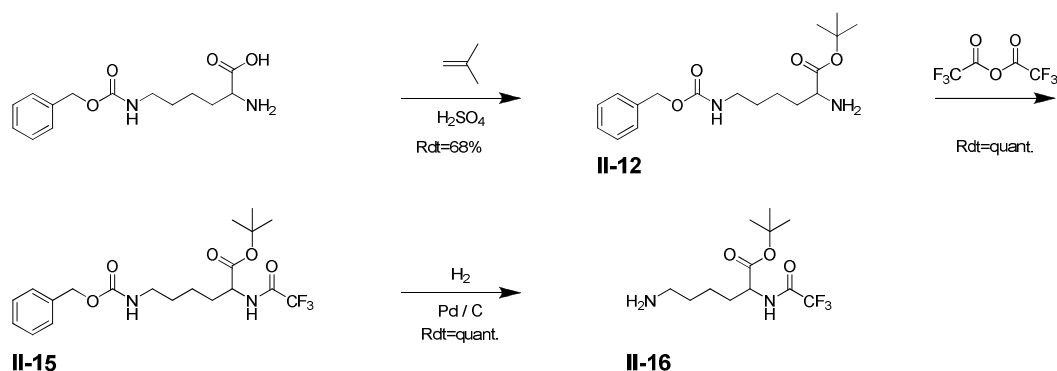


Schéma II-14 – Schéma réactionnel de synthèse de la tête hydrophile protégée « *tBu*-NTA »

La molécule **II-14** est préparée par estérification de l'acide carboxylique de la *Z*-L-Lysine par le 2-méthylpropène en milieu acide pour donner la molécule **II-12**. Le composé **II-12** est ensuite alkylé en milieu basique par le bromoacétate de *tert*-butyle dans l'acétonitrile à 80°C pour conduire au produit **II-13**. Enfin, **II-13** est déprotégée par hydrogénolyse du groupement benzyloxycarbamate dans le méthanol pour donner la tête hydrophile protégée (*tBu*-NTA) **II-14** avec un rendement global de 61%.

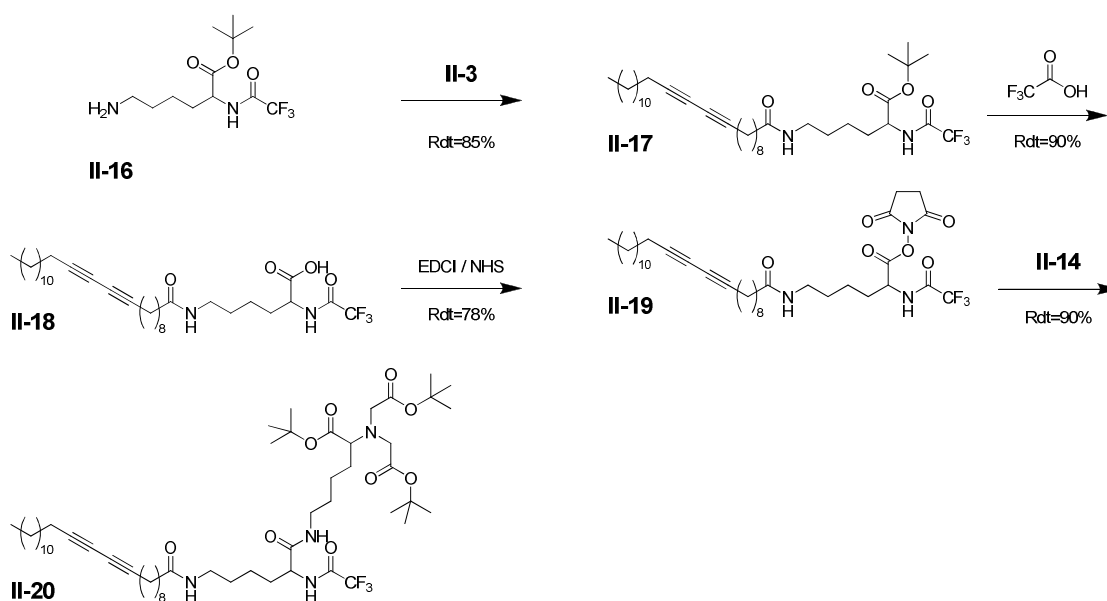
La deuxième étape consiste à synthétiser la partie centrale de la molécule sur laquelle seront greffés la partie lipophile, la tête « NTA » et le motif acrylate (Schéma II-15).



L'acide carboxylique de la Z-L-Lysine a été protégé par estérification en présence de 2-méthylpropène en milieu acide pour donner le produit **II-12**. L'amine en position 2 de la molécule **II-12** est ensuite protégée quantitativement par une réaction d'amidation en présence de l'anhydride trifluoroacétique pour conduire à l'espèce **II-15**. L'amine en position 6 du composé **II-15** est déprotégée par hydrogénolyse du groupement benzoyloxycarbamate dans le méthanol pour mener à la molécule **II-16**.

L'étape suivante va consister à insérer le fragment **II-16** à la partie lipophile polymérisable, puis à coupler la partie hydrophile, « NTA-*tBu* » (Schéma II-16).

Pour cela, dans un premier temps, l'acide 10,12-pentacosadiynoïque est activé par le NHS en présence d'EDCI pour donner l'acide activé **II-3** (Schéma II-5). Le composé **II-17** est obtenu par un couplage peptidique entre les composés **II-3** et **II-16** en présence de DIEA avec un rendement de 85%.



L'ester *tert*-butylique en position 1 de l'espèce **II-17** est déprotégé par l'acide trifluoroacétique pour conduire au produit **II-18**. L'acide carboxylique de ce dernier est activé par le NHS en présence d'EDCI pour donner l'acide activé **II-19**. Ce dernier réagit avec la tête hydrophile protégée, « *tBu*-NTA » **II-14**, par un couplage peptidique, en présence de DIEA, pour former le composé **II-20** avec un rendement de 90%.

Enfin, la dernière étape consiste à insérer le deuxième motif polymérisable et à déprotéger les groupements protecteurs *tert*-butyles, des acides de la tête « NTA » (Schéma II-17).

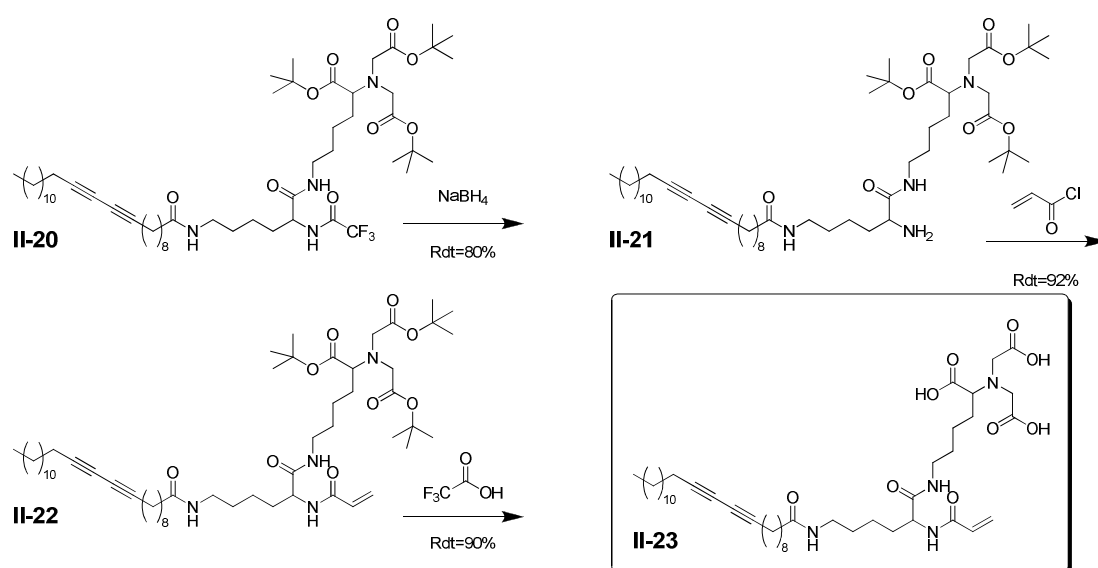


Schéma II-17 – Schéma réactionnelle de synthèse de l'amphiphile **II-23**

La molécule **II-21** est obtenue par déprotection du trifluoroacétamide en position 2 de l'espèce **II-20** par le borohydrure de sodium dans l'éthanol avec un rendement de 80%. Le composé **II-22** est formé par acylation de l'amine en position 2 du produit **II-21** par le chlorure d'acryloyle. Enfin, la déprotection des trois esters *tert*-butyliques de la molécule **II-22** par l'acide trifluoroacétique conduit à la molécule amphiphile doublement polymérisable **II-23** avec un rendement global de 22%.

II-5-2-2- Autoassemblage et polymérisation de la molécule **II-23** autour des nanotubes

L'adsorption de la molécule **II-23** à la surface des nanotubes de carbone a été étudiée en milieux tamponnés dans le but de vérifier la présence de structure en anneaux après double polymérisation : irradiation lumineuse à 254 nm des motifs diacétyléniques et bombardement électronique des motifs acrylates.

Pour adsorber le composé **II-23** à la surface des CNT's, nous nous sommes appuyés sur les travaux réalisés sur l'optimisation du ratio nanotubes/surfactants, le tensio-actif **II-23** est solubilisé à une concentration de 5 mg/mL dans du tampon TRIS/glycine/SDS (TRIS 25 mM, glycine 190 mM et SDS 3,5 mM avec un pH=8) auquel est ajouté 25 mg/mL de MWNT's (n-Tec). Cet échantillon est ensuite soniqué pendant 10 minutes, à l'aide d'une sonde de sonication, afin d'autoorganiser le surfactant à la surface des nanotubes de carbone sous forme d'anneaux. Afin d'éliminer le SDS présent dans l'échantillon, la suspension de nanotubes est dialysée à l'aide de membranes de porosité de 25000 Da pendant 3 jours.

La double polymérisation de ces assemblages peut être effectuée de deux manières selon l'ordre de polymérisation des motifs diacétyléniques et des motifs acrylates. Néanmoins, il nous est apparu préférable de polymériser dans un premier temps le motif diacétylénique qui se trouve le plus au cœur de l'anneau et de finir par le motif acrylate qui se trouve en périphérie de la tête polaire NTA (Figure II-50).

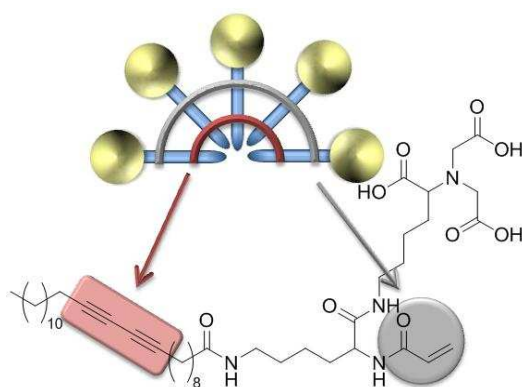


Figure II-50 – Niveau de polymérisation des différents motifs : le motif diacétylénique au cœur et le motif acrylate en périphérie de la tête hydrophile

La polymérisation de la fonction diacétylénique de la molécule **II-23** a été effectuée par une lampe d'irradiation lumineuse à 254 nm pendant 5 heures sous agitation magnétique. La fonction acrylate de cette molécule a ensuite été réticulée par une source de rayons γ pendant 80 minutes, ce qui correspond à une dose de 3000 Gy.

Les échantillons, doublement polymérisés, sont purifiés par centrifugation et lavages successifs à l'eau pour éliminer les possibles produits de dégradation formés lors de la seconde polymérisation.

Les échantillons sont ensuite observés par microscopie électronique à transmission par coloration négative à l'acétate d'uranyle pour vérifier la présence et l'intégrité des anneaux après les deux polymérisations successives (Figure II-51).

Les clichés de microscopie électronique montrent que des autoassemblages en anneaux sont possibles à partir de la molécule amphiphile **II-23**. Cette structuration est semblable à celle observée dans le cas du tensio-actif **II-4** (Figure II-40 & Figure II-36), avec une largeur d'anneaux d'environ 25 nm pour une épaisseur d'environ 8 à 9 nm. Comme dans le cas de la molécule **II-4**, l'épaisseur de l'anneau ne dépend que de la longueur totale de la molécule, mesurée à 46 Å (*Chembio3D*) dans le cas de **II-23**.

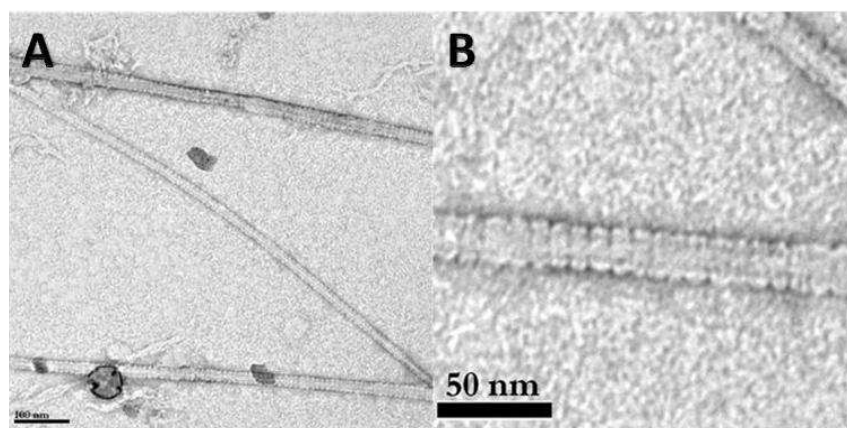


Figure II-51 – Images MET de l'assemblage de la molécule **II-23** à la surface de nanotubes de carbone après polymérisation par irradiation lumineuse à 254 nm et irradiation par source de rayons γ –
Echelles : (A) 100 nm ; (B) 50 nm.

Pour conclure, cette étude a consisté en la synthèse d'un surfactant doublement polymérisable permettant d'obtenir des anneaux plus robustes afin d'éviter leur déchirement lors de l'extraction.

Dans un premier temps, un surfactant constitué d'un motif acrylate a été synthétisé dans le but de prouver que les anneaux pouvaient être réticulés par voie radicalaire. En collaboration avec le laboratoire de radiolyse, une amorce par des rayons ionisants a été employée. Cette méthode permet de produire des radicaux hydroxyles, générés lors de la radiolyse de l'eau (LINAC ou rayon γ), pour initier la réaction de polymérisation. Nous avons montré que le tensio-actif **II-11** a la capacité de se structurer en anneaux sur la surface des nanotubes de carbone et d'être polymérisé par bombardement électronique (LINAC) sans perte de la structure en nanobagues.

Au vu de ces résultats, la synthèse d'un nouveau surfactant doublement polymérisable a été réalisée afin d'obtenir des anneaux polymérisés avec un degré de réticulation plus important. La molécule **II-23** est constituée de deux groupements polymérisables : un motif diacétylénique polymérisable par irradiation lumineuse à 254 nm et un motif acrylate réticulable par radiolyse de l'eau. Ce composé, une fois adsorbé à la surface des nanotubes de carbone et réticulé, a présenté

une structuration en anneaux sur toute la surface des nanotubes, similaire à celle observée pour l'amphiphile **II-4**.

En parallèle à la synthèse de l'amphiphile doublement polymérisable, l'amélioration du procédé d'extraction a été étudiée dans le but d'obtenir des objets intacts en fin de synthèse. Une nouvelle méthode de séparation plus simple et plus performante a été mise au point, permettant d'extraire une quantité beaucoup plus importante de nanobagues et sans les dénaturer. Par conséquent, ce procédé étant plus performant que celui par électrophorèse/électroélution, les anneaux formés à la surface de MWNTs à partir de l'amphiphile **II-23** ont été extraits par cette nouvelle méthode.

II-6- Mise au point d'une nouvelle méthode d'extraction des anneaux

Nous avons montré qu'il était possible de séparer des anneaux d'amphiphiles polymérisés à la surface de nanotubes de carbone sous l'influence d'un champ électrique. Dans un premier temps, la séparation de ces anneaux a été réalisée en deux phases : par électrophorèse sur gel d'agarose pour séparer les nanobagues des nanotubes, puis par électroélution pour séparer les anneaux du gel d'agarose. Les clichés de microscopie réalisés sur ces échantillons ont montré une dispersité en taille importante provenant très vraisemblablement de la méthode d'extraction. En effet, lors de l'électrophorèse, suivant l'orientation des nanotubes de carbone enchevêtrés dans le gel d'agarose, les anneaux peuvent être déchirés lors de leur extraction.

Pour résoudre ce problème, deux solutions avaient été envisagées. La première consistait à synthétiser un nouveau surfactant doublement réticulable dans l'optique de former des anneaux plus robustes et ainsi éviter leur déchirement à l'extraction. La seconde méthode, que nous développerons dans ce chapitre, consiste à concevoir un nouveau système d'extraction permettant de séparer les anneaux des nanotubes de carbone tout en maintenant la structuration des nanobagues.

II-6-1- Système d'extraction par électroélution directe (DES)

Afin d'éviter la déstructuration des anneaux au cours du processus d'extraction, un nouveau système de séparation a été réalisé au laboratoire. Ce système devra autoriser la libre rotation des nanotubes de carbone pour permettre l'extraction des nanobagues au moment où le nanotube se trouve orienté parallèlement au champ électrique (Figure II-46 – A). De ce fait, par cette méthode, le déchirement des anneaux devrait être réduit (Figure II-46 – B).

Comme le système d'électroélution utilisé précédemment, ce procédé de séparation se compose de deux compartiments : le compartiment où se trouve la solution de nanotubes de carbone recouverts d'anneaux et le compartiment qui permet de récolter les nanobagues (Figure II-52). Ce dispositif emploie deux types de membranes semi-perméables. Une membrane imperméable aux nanotubes et aux anneaux (*porosité de 25000 Da*) est utilisée aux extrémités des deux compartiments. Et, entre ceux-ci, un second type de membrane (*porosité de 0,1 μm ou 0,2 μm*) perméable aux anneaux de surfactants et imperméable aux nanotubes de carbone est employé.

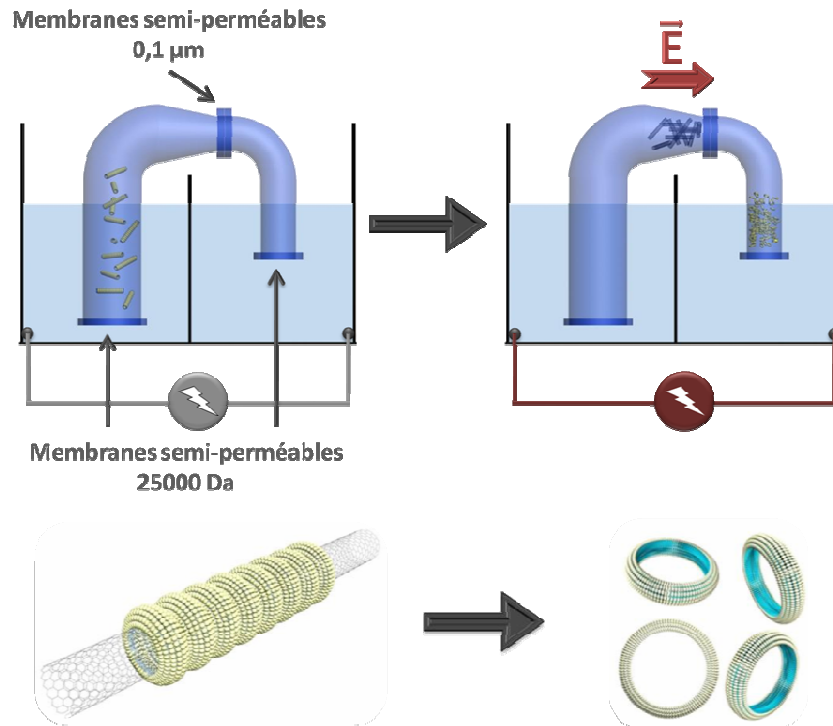


Figure II-52 – Schéma de principe du système d'extraction par électroélution directe (DES)

La séparation des anneaux des nanotubes de carbone est effectuée à partir d'une solution de nanotubes à 25 mg/mL à une intensité de 80 à 100 mA. Lorsque le courant électrique est mis en circulation, les nanobagues migrent sous l'influence du champ électrique puisque les nanotubes de carbone sont des espèces neutres et les anneaux des espèces chargées négativement. Le système est laissé sous tension pendant une journée, et, pour éviter de saturer la membrane semi-perméable située entre les deux compartiments du système, le champ électrique est inversé toutes les 30 minutes par inversion de la polarité des électrodes. Enfin, la dernière élution de la journée est laissée dans le sens normal de migration des anneaux pendant une heure. Tout au long du processus d'extraction, les solutions de nanobagues, situées dans le compartiment de récupération, sont prélevées et remplacées par du tampon. De ce fait, deux à trois solutions d'anneaux, de moins en moins concentrées, sont récupérées au cours de cette séparation.

Enfin, ces solutions sont dialysées contre une solution de soude à pH=8, proche du pH physiologique, à l'aide de membrane de dialyse de porosité 25000 Da, avant d'être centrifugées à 15000 G pendant 20 minutes dans le but d'éliminer les reliquats de nanotubes de carbone qui aurait pu traverser la membrane semi-perméable au cours du processus de séparation. Ces solutions peuvent par la suite être lyophilisées pour connaître la masse d'anneaux récupérés.

Ce système d'extraction a donc été utilisé par la suite pour extraire les différents types d'anneaux obtenus à partir des différents amphiphiles synthétisés.

II-6-2- Extraction des anneaux d'amphiphiles par électroélution directe

II-6-2-1- Extraction des anneaux formés à partir de l'amphiphile **II-23**

Les assemblages formés à partir de l'amphiphile **II-23** (cf partie II-5-2-2) ont été extraits des nanotubes de carbone par le système d'électroélution directe présenté ci-dessus. Les échantillons d'anneaux ont été dialysés et centrifugés pour donner des solutions aqueuses de nanobagues, à pH=8, de couleur jaunâtre.

Les clichés de microscopie d'anneaux isolés (Figure II-53 – A à D) montrent des objets de forme circulaire d'un diamètre moyen d'environ 45 nm et d'une épaisseur moyenne de 5 nm. Ces anneaux présentent une distribution en taille réduite et comprise entre 35 et 55 nm (Figure II-53 – E à G), bien inférieure à celle observée dans le cas des anneaux d'amphiphile **II-4**, extraits pas la méthode d'électrophorèse/électroélution, avec une dispersité s'échelonnant de 35 à 90 nm.

Enfin, le compartiment contenant les nanotubes de carbone a été observé par microscopie électronique dans le but de vérifier l'efficacité du nouveau procédé d'extraction. Les clichés de microscopie montrent que, sur l'ensemble d'un échantillon, la grande majorité des nanotubes sont exempts d'anneaux de surfactants (Figure II-53 – H), et seuls quelques-uns sont recouverts de nanobagues. Ces derniers présentent généralement une très grande longueur, supérieure au micromètre (Figure II-53 – I), rendant probablement l'extraction des bagues plus difficile.

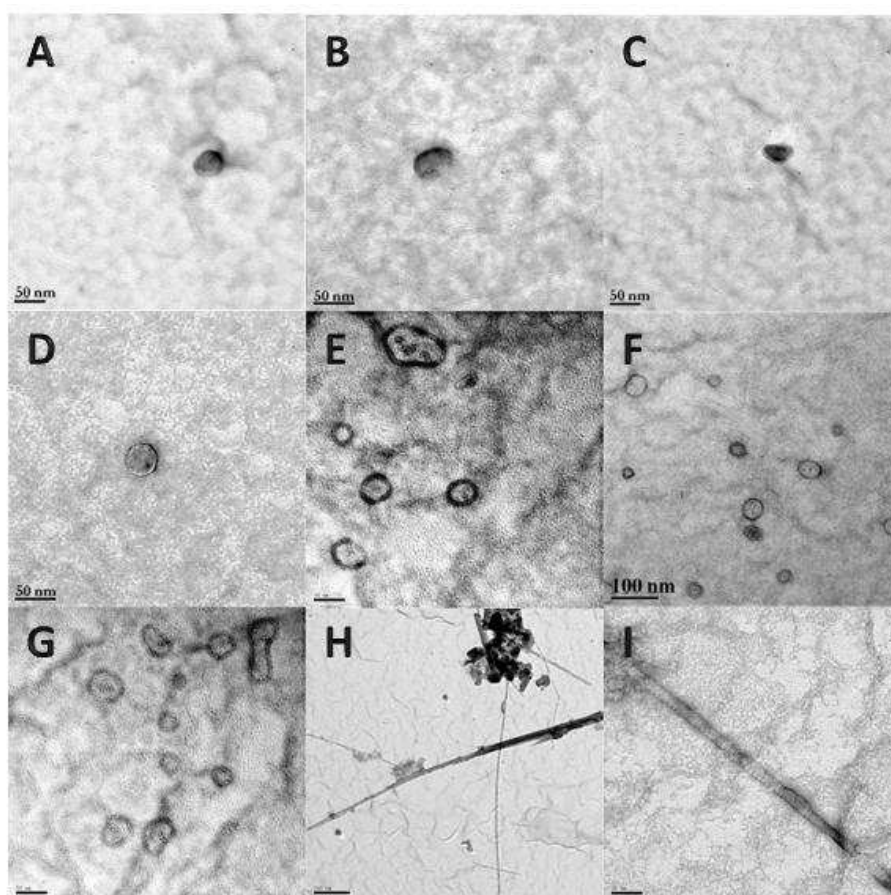


Figure II-53 – Clichés de microscopie électronique à transmission d’anneaux formés à partir de l’amphiphile **II-23** – Echelles: (A) 50 nm ; (B) 50 nm ; (C) 50 nm ; (D) 50 nm ; (E) 50 nm (F) 100 nm ; (G) 50 nm ; (H) 200 nm ; (I) 50 nm

L’approche mise en œuvre pour extraire les anneaux de surfactants de façon indemne donne de bons résultats. Elle s’appuie sur le renforcement de leur structuration par la synthèse d’un amphiphile doublement polymérisable et par le développement d’une méthode d’extraction permettant une séparation plus douce et efficace. La combinaison de ces deux améliorations a permis de diminuer grandement leur distribution en taille. Par la méthode de l’électrophorèse sur gel d’agarose combinée à l’électroélution, les anneaux récupérés présentaient une distribution en taille s’échelonnant de 35 à 90 nm alors que ceux extraits par électroélution directe présentent une distribution en taille comprise entre 35 et 55 nm.

Pour établir l’influence de la polymérisation et de la méthode d’extraction sur la dispersité en taille des nanobagues, nous avons renouvelé cette étude sur des anneaux formés à la surface de nanotubes de carbone à partir du tensio-actif **II-4**. Si les anneaux récupérés à l’issue de cette expérience ont une distribution en taille identique à ceux synthétisés à partir de l’amphiphile **II-23**, cela signifiera que le mode d’extraction a une influence majeure sur cette distribution.

A l'opposé, s'ils ont une dispersité proche des nanobagues de l'amphiphile **II-4** récupérés par la méthode de l'électrophorèse/électroélution, cela signifiera que la méthode d'extraction n'a aucun effet sur la distribution en taille, et que la double polymérisation a un effet important sur celle-ci.

II-6-2-2-Extraction des anneaux formés à partir de l'amphiphile **II-4**

Pour déterminer l'influence de la double polymérisation et de la méthode d'extraction sur la distribution en taille, les assemblages formés à la surface des nanotubes de carbone à partir du surfactant **II-4** (*cf. chapitre 2.4*) ont été extraits par la méthode de l'électroélution directe. Les échantillons ont été dialysés et centrifugés pour donner des solutions aqueuses de nanobagues à pH=8 de couleur jaune pâle.

Les anneaux, récupérés à l'issue de l'extraction, ont ensuite été observés par microscopie électronique à transmission par coloration négative à l'acétate d'uranyle.

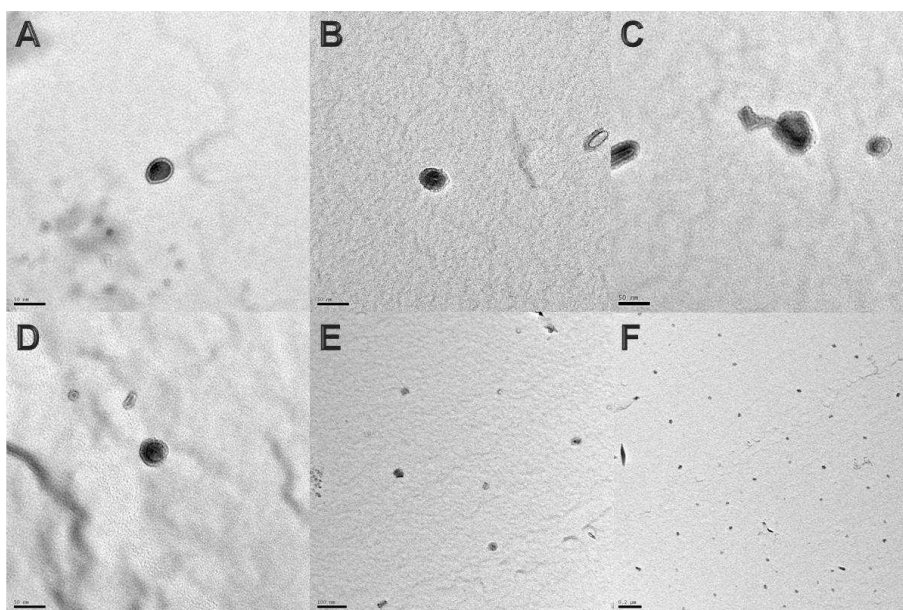


Figure II-54 – Clichés de microscopie électronique à transmission d'anneaux formés à partir de l'amphiphile **II-4** extraits par électroélution directe

Echelles: (A) 50 nm ; (B) 50 nm ; (C) 50 nm ; (D) 50 nm ; (E) 100 nm ; (F) 200 nm

Les clichés de microscopie d'objets isolés (Figure II-54 – *A à D*) mettent en évidence la présence de structures circulaires avec un diamètre moyen de 45 nm pour une épaisseur moyenne de 5 nm, identiques à celles observées précédemment.

L'analyse d'une population d'anneaux (Figure II-54 – *E & F*) montre une dispersité en taille comprise entre 30 et 60 nm. Cette distribution est plus étroite que celle d'anneaux extraits

par électrophorèse suivie de l'électroélué, mais légèrement plus large que celle observée pour les anneaux formés à partir de l'amphiphile doublement polymérisable.

Ces résultats révèlent que la méthode d'extraction a un impact important sur la dispersité en taille des objets récupérés, et permet d'extraire ces anneaux de façon plus douce et sans destruction. De plus, la double polymérisation présente elle aussi un effet bénéfique sur leur dispersité car la distribution d'anneaux formés à partir de l'amphiphile **II-23** est légèrement plus étroite que celle de nanobagues formées par le surfactant **II-4**.

En résumé, il semble que les deux facteurs, la double polymérisation et la séparation par électroélué directe, influent sur la distribution en taille des populations d'anneaux extraits. Le facteur majoritaire s'avère être la méthode d'extraction qui permet de procéder à une séparation efficace et non altérante. La différence entre les deux méthodes exposées dans ce chapitre provient du libre mouvement des nanotubes de carbone en solution qui permet aux anneaux de s'extraire préférentiellement lorsque les nanotubes s'orientent parallèlement au champ électrique.

Comme déjà évoqué, nous avons remarqué que le diamètre des anneaux à la surface des nanotubes de carbone différait du diamètre des anneaux extraits. Nous avons expliqué ce phénomène par le fait que les anneaux isolés, en absence d'interactions hydrophobes fortes avec la surface du nanotube, se structurent dans une configuration thermodynamiquement plus stable. Ceci se traduit par un espacement plus important entre les chaînes de surfactants polymérisées et, par conséquent, d'un accroissement du diamètre de l'anneau. Ainsi, la synthèse d'un composé doublement réticulable, engendrant la formation d'anneaux rigides, pourrait influencer sur ce phénomène de réarrangement des chaînes de polymères. La réticulation de ces chaînes étant deux fois plus importante, le phénomène de gonflement (« swelling ») devrait être amoindri et donc conduire à la formation d'objet plus étroit. Cependant, les diamètres moyens des anneaux construits à partir des amphiphiles **II-4** et **II-23** étant similaires, la double polymérisation ne semble pas empêcher le réarrangement des chaînes des nanobagues et la réduction du phénomène de gonflement, mais influe plus particulièrement sur la dispersité en taille des anneaux.

Enfin, la lyophilisation des anneaux de surfactants a été étudiée afin de vérifier l'effet de ce procédé sur la structure de ces objets. Pour ce faire, nous avons lyophilisé un échantillon de nanobagues purifiées. Les nanobagues ainsi lyophilisées se présentent sous la forme d'un solide moussieux de faible densité de couleur jaune pâle. Ces anneaux ont ensuite été solubilisés dans une solution de NaOH à pH=8. L'analyse des clichés de microscopie de cette solution montre

que ce procédé ne modifie pas la structure de ces objets (Figure II-55 – A). L'observation d'une population d'anneaux montre une légère agrégation (Figure II-55 – B) qui ne semble pas altérer la structure des anneaux (Figure II-55 – C).

Ainsi, la lyophilisation n'altère pas la structure des nanobagues lors de leur solubilisation. Ce procédé, couramment utilisé lors de la formulation de médicaments, peut donc être employée, en particulier pour le stockage et la quantification de la masse des anneaux.

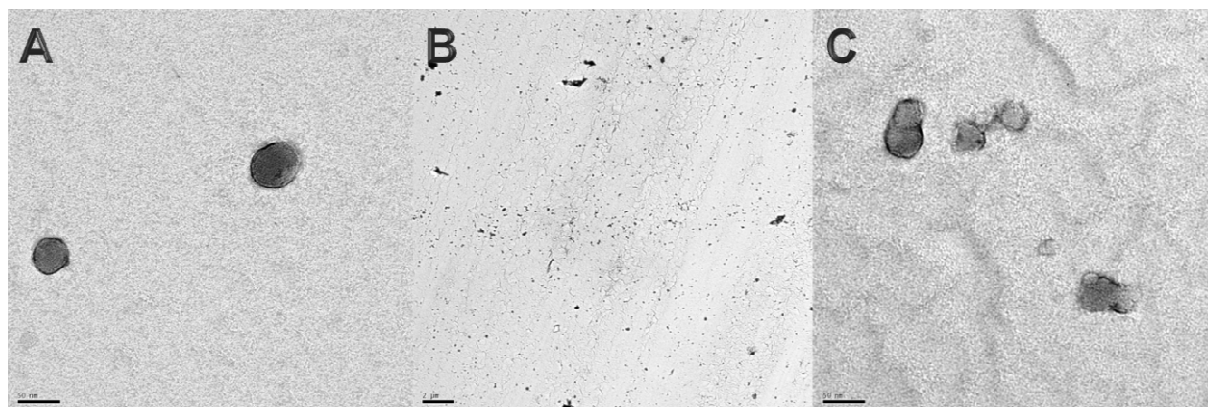


Figure II-55 – Clichés de microscopie électronique à transmission d'anneaux formés à partir de l'amphiphile **II-4** extraits par électroélution directe et lyophilisés
Echelles : (A) 50 nm ; (B) 2 μm ; (C) 50 nm

Pour conclure, cette étude a montré que la méthode d'extraction était le facteur impactant le plus sur la dispersité en taille des anneaux. La réticulation accrue des anneaux, par l'utilisation de l'amphiphile **II-23**, permet d'obtenir une population en taille légèrement plus étroite mais n'apporte pas de grande modification sur la structure des anneaux isolés. La synthèse de cette amphiphile s'effectuant en 14 étapes et les objets issus de celui-ci étant très proche de ceux conçus à partir du tensio-actif **II-4**, il a été décidé d'étudier la structure et les propriétés d'inclusion des anneaux formés à partir de la molécule **II-4**. Pour réaliser cette étude, la synthèse de ce surfactant a été sous-traitée à la société *Novalyt* à Strasbourg qui nous a fourni 300 g de l'amphiphile **II-4**.

II-6-3- Caractérisations des anneaux formés à partir de la molécule **II-4**

Dans le but de connaître plus précisément la structure des nanobagues, différentes études ont été menées.

Dans un premier temps, la microscopie électronique à transmission nous a permis de suivre, pas à pas, la synthèse des anneaux de surfactants polymérisés, de l'assemblage supramoléculaire de surfactants à la surface de nanotubes de carbone aux anneaux isolés après

extraction. Cette technique nous a donné des informations générales sur les dimensions et la forme de leurs structures. Malgré cela, cette technique, étant une méthode de caractérisation d'échantillon à l'état solide, ne nous a pas permis de caractériser les anneaux de surfactants en solution.

En effet, la structure de ces objets en solution doit différer de celle à l'état solide du fait des interactions électroniques, des interactions hydrophile/hydrophobe, ou encore de l'effet du solvant (molécules d'eau et les ions) sur la structure des nanobagues. Toutefois, des techniques de microscopie électronique à transmission permettent de visualiser la structure d'objets ou d'autoassemblages supramoléculaires en solution tel que le cryoTEM ou la cryofracture. Malheureusement, ces études de microscopie n'ont pu être réalisées car le microscope à notre disposition ne le permettait pas.

D'autres techniques, telles que la diffusion dynamique de la lumière ou la diffusion des neutrons aux petits angles, ont été ainsi mises en œuvre afin d'étudier la structure des nanobagues en solution.

II-6-3-1- Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

L'analyse de ces échantillons a été réalisée par granulométrie laser à l'aide d'un appareil mis au point par la société SympaTEC, le Nanophox. Cette technique, basée sur la diffusion quasi élastique de la lumière et la spectroscopie croisée de corrélation de photon, permet de déterminer la distribution en taille d'un échantillon.⁶⁸

La mesure de la taille de ces anneaux a été réalisée à partir de solutions de nanobagues à 20 mg/mL. Les résultats obtenus sont donnés en distribution différentielle en intensité en fonction de la taille des particules. La taille moyenne de ces anneaux, formés à partir de l'amphiphile **II-4**, est de 100 nm avec une distribution comprise entre 70 nm et 125 nm. Cette analyse met en évidence l'effet de l'état physique de l'échantillon sur la distribution en taille suivant qu'il est libre en solution ou à l'état solide (microscopie électronique à transmission).

Au vu de ces résultats, il semble que l'espacement entre les chaînes de polymères soit plus important en solution et conduise à un accroissement substantiel du diamètre des anneaux. La polymérisation de ces anneaux étant linéaire, les chaînes de polymères peuvent s'entrelacer pour former un réseau de chaînes enchevêtrées, engendrant une réticulation physique au moment du gonflement de l'anneau. Cette réticulation impose un diamètre maximal lorsque la tension entre les chaînes devient trop importante et qu'elles ne peuvent plus s'éloigner les unes des autres.

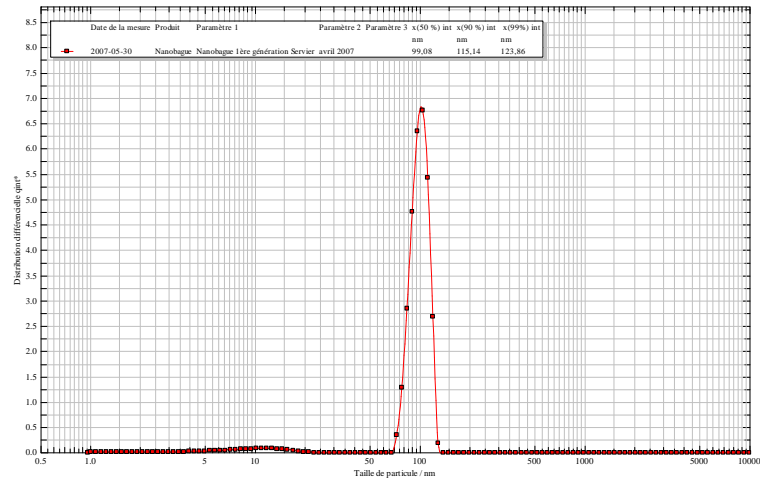


Figure II-56 – Distribution différentielle en intensité en fonction de la taille des anneaux polymérisés de surfactants II-4

Enfin, la taille de ces anneaux diffère selon qu'ils sont à la surface des nanotubes de carbone (25 à 30 nm), à l'état solide sur une grille de microscopie (45 nm) ou en solution aqueuse (100 nm). De ce fait, les nanobagues ne semblent pas être des objets avec une structure rigide et une cavité hydrophobe bien délimitée, mais des espèces fluides ayant la capacité de se réarranger dans des structures stables et plus favorables.

Une des possibilités serait que la structuration de l'objet en anneaux ne soit pas celle adoptée en solution aqueuse. En effet, cette structure implique l'existence d'interactions très forte entre la cavité hydrophobe de l'anneau et la solution aqueuse environnante. Une structure thermodynamiquement plus stable pourrait être celle en forme de tore (Figure II-57).

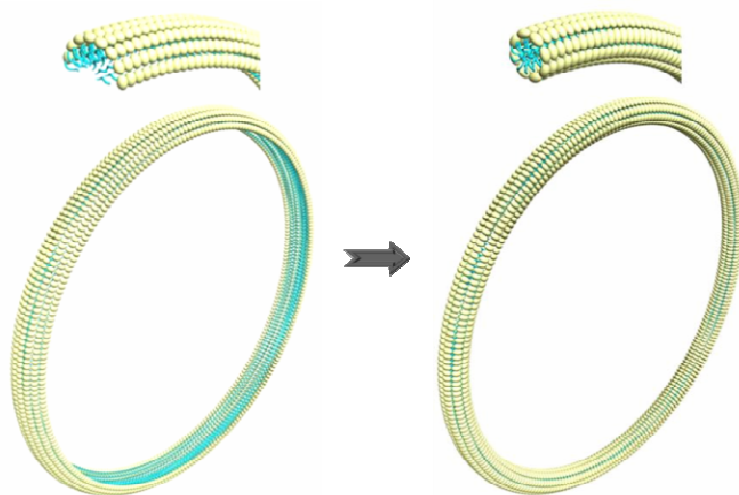


Figure II-57 – Structuration possible des nanobagues en tore

Le réarrangement de la nanobague sous cette forme interviendrait lors de son extraction du nanotube de carbone et de la disparition des interactions hydrophobe/hydrophobe entre la

surface du CNT et les chaînes lipophiles de l'amphiphile. L'anneau ainsi extrait de son support carboné se réarrangerait par un repliement des têtes hydrophiles, fermant la structure et limitant ainsi les interactions hydrophiles/hydrophobes proposées par la structure en anneaux. Le tore semble donc plus stable en solution aqueuse car la totalité de sa surface est recouverte par les têtes hydrophiles.

II-6-3-2-Diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA)

L'étude de la matière au niveau atomique ou moléculaire s'appuie sur les interactions entre des particules et la matière. Parmi ces particules, le neutron est une des plus intéressantes de par ses propriétés et de ses possibilités. En effet, les neutrons pénètrent la matière et permettent d'obtenir des informations sur la structure et la dynamique des échantillons étudiés.

Les neutrons

Le neutron peut être considéré comme une particule neutre ou une onde, et est caractérisée par une masse ($m = 1,675 \times 10^{-24}$ g), une longueur d'onde (λ), une vitesse (v) et une énergie (E). La relation entre ces deux descriptions est donnée par la relation de Broglie⁶⁹ :

$$\lambda = \frac{h}{m \times v} = \frac{2 \times \pi}{k}$$

Équation 1

$$E = \frac{1}{2} m v^2 = \frac{\hbar^2 k^2}{2m \lambda^2}$$

Équation 2

Où h est la constante de Planck, \hbar la constante de Planck réduite.

La fenêtre de longueur d'onde pour l'étude de la matière molle s'étend de 3 Å à 25 Å, correspondant à une fenêtre d'énergie comprise entre 0,1 meV et 10 meV.

Diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA)

La diffusion des neutrons aux petits angles est utilisée pour déterminer la structure moyenne (ou statistique) de la matière avec des tailles caractéristiques comprises entre 0,5 nm et 50 nm. Cette technique permet de mesurer les grandeurs moyennes qui caractérisent les objets telles que la taille et la forme, ainsi que les interactions.^{70,71}

L'expérience de diffusion des neutrons aux petits angles consiste à envoyer un faisceau de neutrons de faible divergence angulaire, de longueur d'onde moyenne λ , sur l'échantillon à étudier et à mesurer, grâce à un détecteur, la variation de l'intensité diffusée $I(\theta)$ en fonction de l'angle de diffusion θ .

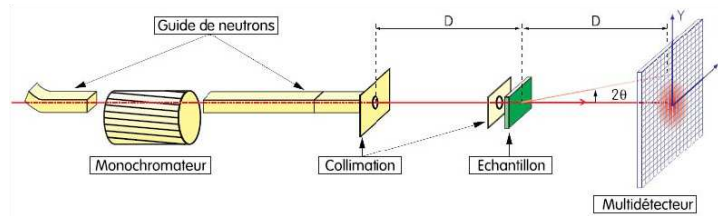


Figure II-58 – Schéma de principe de diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA)

L'échange d'énergie entre l'échantillon et les neutrons étant nul, le paramètre physique du processus est le vecteur q (Équation 3) qui permet de regrouper sur une même courbe $I(q)$, les données acquises avec différentes valeurs de θ et de λ . La dimension de cette grandeur est l'inverse d'une longueur.

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta)$$

Équation 3

L'analyse de la courbe $I(q)$ permet de déduire la forme et la taille de l'objet, et n'est possible qu'à deux conditions :

- ✓ Le domaine de vecteur de diffusion q doit être du même ordre de grandeur que celui de l'inverse des distances à mesurer. Les longueurs d'onde λ en DNPA sont comprises entre 0,2 nm et 2 nm, correspondant à des tailles caractéristiques comprises entre 0,5 nm et 50 nm. Ces valeurs de q ne sont accessibles qu'à des valeurs de θ inférieures à 10° (d'où le nom de diffusion aux petits angles).
- ✓ L'intensité diffusée doit être mesurable, ce qui implique que le contraste de la particule dans son milieu doit être suffisant.

Enfin, l'intensité diffusée mesurée est donnée par la relation suivante :

$$I(q) = \Phi \times v_p \times \Delta\rho^2 \times P(q) \times S(q)$$

Équation 4

Où Φ est la fraction volumique, v_p le volume de la particule, $\Delta\rho$ la différence de densité de longueur de diffusion entre l'objet et le solvant (aussi appelé contraste), $P(q)$ le facteur de forme, et $S(q)$ le facteur de structure de l'objet.

Notion de contraste

L'analyse de la courbe d'intensité diffusée $I(q)$ n'est possible qu'à condition que le contraste $(\Delta\rho)^2$, c'est-à-dire la différence de densité de longueur de diffusion entre la particule et le solvant, soit suffisamment important.

En DNPA, la densité de longueur de diffusion d'un objet (particule, polymère, suspension, ...) est calculée à partir du diffuseur élémentaire qui correspond à la plus petite unité élémentaire de l'objet (le monomère dans le cas des polymères par exemple). La densité de longueur de diffusion ou contraste est donnée par la relation suivante :

$$\rho = \frac{d \times N_A \times \sum_{i=0}^n a_i b_i}{M}$$

Équation 5

Où d est la densité de l'objet en g/cm^3 , N_A le nombre d'Avogadro, M la masse molaire du diffuseur élémentaire, et a_i le nombre d'élément de longueur de diffusion cohérente b_i (Tableau II-1).

Elément	Longueur de diffusion cohérente ($\times 10^{-12}$ cm)	Masse molaire (g/mol)
H	0,374	1,0
D	0,667	2,0
O	0,580	16,0
N	0,926	14,0
C	0,665	12,0
Cl	0,960	35,5

Tableau II-1 – Exemples de valeurs de longueurs de diffusion de certains éléments chimiques

Ainsi, le contraste entre le diffuseur élémentaire et le solvant doit être le plus grand possible afin de pouvoir mesurer une intensité diffusée $I(q)$.

Facteur de forme

Dans des systèmes dilués, l'intensité diffusée $I(q)$ se réduit au facteur de forme $P(q)$ qui rend compte de la forme des objets.

Aux petites valeurs de q , le facteur de forme peut s'écrire sous la forme suivante :

$$P(q) \approx e^{-\frac{q^2 \times R_g^2}{3}} \approx 1 - \frac{q^2 \times R_g^2}{3} \text{ avec } qR_g < 1$$

Équation 6

Où R_g est le rayon de giration de l'objet. Ce résultat est correct quelle que soit la forme des objets et uniquement dans le cas où $qR_g < 1$. Ce domaine de vecteur de diffusion est appelé le **domaine de Guinier**.

Lorsque les objets sont trop grands, l'intensité diffusée doit être exprimée à partir de facteurs de forme particuliers tels que la sphère, le cylindre, le bâton ou la coquille par exemple.

Différents modèles permettent de définir la forme de l'objet^{72,73} :

- Modèle de sphère de rayon R

Le facteur de forme d'une sphère de rayon R est défini par la relation suivante :

$$P(q) = 9 \times \left[\frac{\sin qR - qR \cos qR}{q^3 R^3} \right]^2$$

Équation 7

Dans le domaine de Guinier, aux petites valeurs de vecteurs d'onde q , $P(q)$ est définie par l'Équation 6 avec un rayon de giration défini par la relation suivante :

$$R_g^2 = \frac{3}{5} R^2$$

Équation 8

Lorsque les valeurs de vecteurs d'onde sont telles que $qR \gg 1$, on se trouve dans le **domaine dit de Porod**. Dans ce domaine, le facteur de forme est défini par :

$$P(q) = \frac{9}{2q^4 R_g^4}$$

Équation 9

- Modèle de cylindre d'un rayon R et de longueur L

Dans le régime intermédiaire de vecteur de diffusion tel que $1/L < q < 1/R$, le facteur de forme est définie par :

$$P(q) = \frac{\pi}{qL} e^{-\frac{q^2 R^2}{4}} \text{ avec } R_g^2 = \frac{L^2}{12} + \frac{R^2}{4}$$

Équation 10

Etude des nanobagues

Cette étude a été menée en collaboration avec Géraldine Carrot du laboratoire Léon Brillouin (LLB) au CEA à Saclay sur les spectromètres de diffusion des neutrons aux petits angles PACE et PAXE.

Les intensités diffusées utilisées pour l'interprétation des résultats sont en unités absolues et obtenues par soustraction du témoin et correction par un facteur de normalisation (erreur sur l'appareillage).

Les spectres de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) des nanobagues ont été effectuée dans l'eau lourde afin d'avoir un contraste maximal entre l'échantillon et le solvant. Ces expériences ont été conduites à quatre concentrations différentes : 0,003 mg/mL (0,3%), 0,005 mg/mL (0,5%), 0,009 mg/mL (0,9%) ; 0,010 mg/mL (1,0%).

Les courbes de diffusion des nanobagues (Figure II-59 – *gauche*) montrent une augmentation de l'intensité diffusée avec la fraction massique de l'échantillon. Néanmoins, les spectres de diffusion des neutrons aux très petits angles (Figure II-59 – *droite*) présentent une remontée aux très petites valeurs de q , indiquant la présence d'une longueur caractéristique supplémentaire de notre objet se trouvant hors de la fenêtre d'étude de diffusion des neutrons.

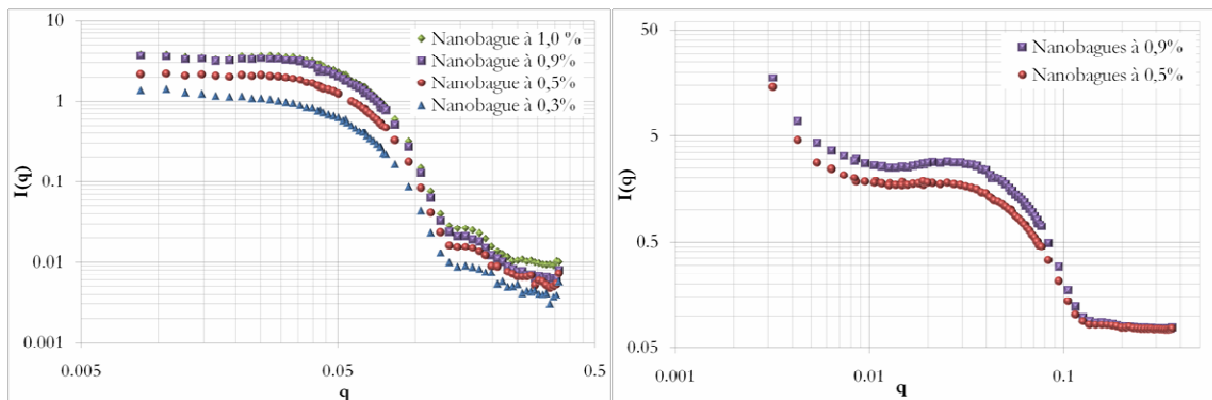


Figure II-59 – (*gauche*) Spectres de DNPA des nanobagues à différentes fractions massiques ; (*droite*) Spectres de diffusion des neutrons des nanobagues aux très petits angles

Les expériences de diffusion des neutrons aux petits angles sur les nanobagues ne nous permettent pas d'observer cet objet dans son intégralité. Il est donc nécessaire de partager le tore en sous unité pour être en mesure de déterminer le rapport entre la masse molaire du tore sur sa longueur totale. Pour ce faire, le tore peut être modélisé par la succession de sous unité sphérique, collée les unes aux autres et formant un anneau (Figure II-60 – C).

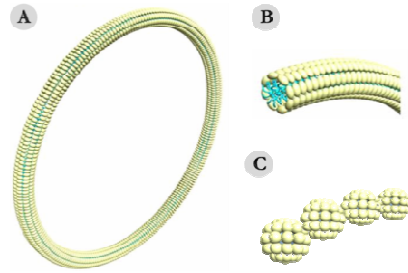


Figure II-60 – (A) Structuration de l'anneau en tore (B) Coupe du cylindre du tore (C) Modèle utilisé pour la caractérisation du tore

Dans des systèmes dilués, les courbes d'intensité diffusée en fonction de q peuvent être modélisées facilement puisqu'elles ne dépendent que du facteur de forme de l'objet. A l'aide d'un modèle de sphère, le rayon des unités sphériques peut être déterminé pour chacune des concentrations (Figure II-61).

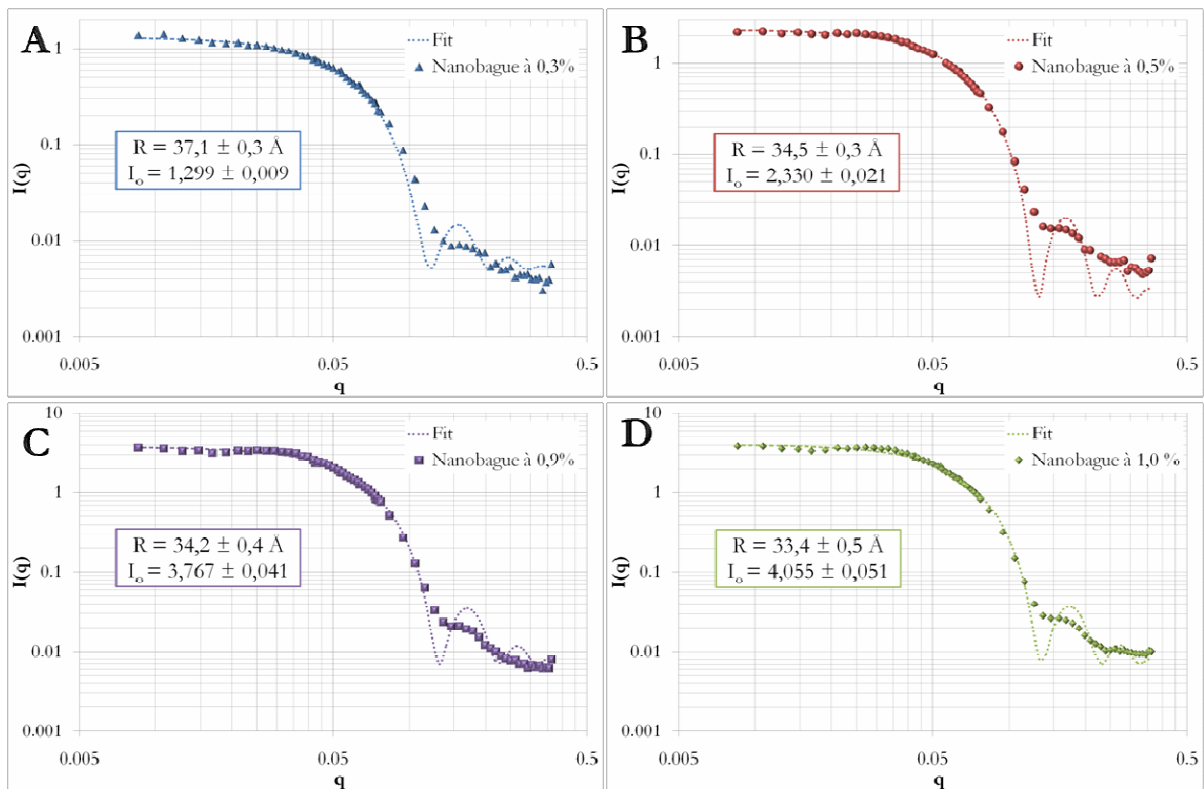


Figure II-61 – Modélisation par un modèle de sphère des courbes de diffusion des échantillons de nanobagues : 0,3% (A), 0,5% (B), 0,9% (C) et 1,0% (D)

Par cette méthode, le rayon de sphère obtenu est dépendant de la concentration et varie de 33,4 à 37,1 Å lorsque la concentration diminue. On est donc dans le cas d'un régime répulsif où les objets se contractent quand la concentration augmente. Enfin, il est possible de déterminer la masse apparente des sphères élémentaires par extrapolation à $q \rightarrow 0$ de l'Équation 4. L'extrapolation à $q=0$ de l'intensité diffusée peut être écrite de la façon suivante :

$$I(q \rightarrow 0) \equiv c \times M_{app} \times (\Delta\rho^2) \times N_A \times (1 - 2 \times M_{app} \times A_2 \times c \dots)$$

Équation 11

Où C est la concentration, M_{app} la masse molaire apparente, $(\Delta\rho)^2$ le facteur de contraste ($0,7 \times 10^{-26} \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-2} \cdot \text{mol}^2$), A_2 le coefficient du Viriel et N_A le nombre d'Avogadro.

Le tracé du rapport de l'intensité diffusée à $q=0$ et de la concentration en fonction de la concentration permet de déterminer la masse molaire apparente des sphères élémentaires et le signe du coefficient du Viriel (Figure II-62). L'ordonnée à l'origine est égale au produit de la masse molaire, du facteur de contraste et du nombre d'Avogadro. Par cette méthode, on obtient une masse molaire apparente de **125 885 g/mol**. La pente de la droite étant négative, le coefficient du Viriel est de signe positif, caractéristique d'un système répulsif.

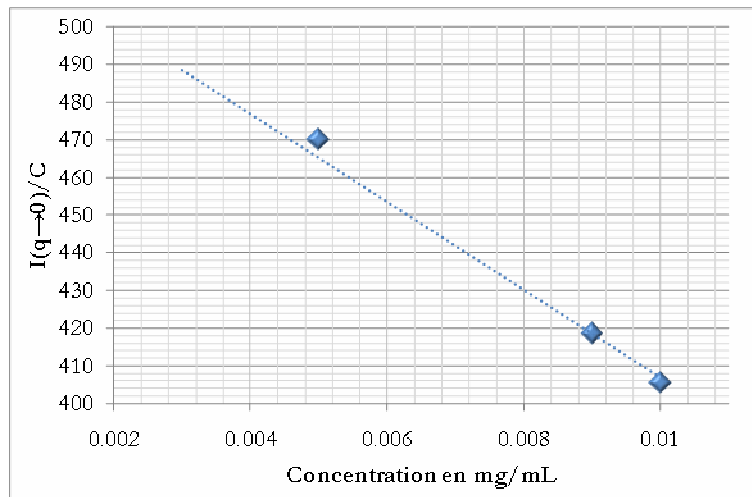


Figure II-62 – Détermination de la masse molaire et du signe du coefficient du Viriel

De la même manière, le rayon des sphères à concentration nulle peut être déterminé par extrapolation avec une valeur de 38,6 Å. Ainsi, le rapport $M_{app}/2R$ moyen est donc égal à 1630 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-1}$. A partir de cette valeur et du diamètre des nanobagues déterminées par diffusion de la lumière ($d=100 \text{ nm}$), la masse molaire de l'anneau peut ainsi être calculée. La longueur totale du cylindre du tore est de 314 nm, ce qui correspond à une masse molaire apparente de la nanobague de **5 120 000 g/mol** ce qui correspond à 8300 molécules amphiphiles.

II-6-3-3- Calorimétrie différentielle à balayage (« DSC » : differential scanning calorimetry)

Les techniques d'analyse thermique sont utilisées dans le but de caractériser le comportement d'un matériau soumis à une variation de température qu'il soit à l'état liquide, cristallin ou solide. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est employée pour caractériser un changement d'état, de phase ou de structure d'un matériau par mesure de la différence

d'échange de chaleur entre un échantillon et une référence. En effet, chaque transition d'état, de phase ou de structure est accompagnée d'une absorption d'énergie (endothermique) ou d'un dégagement d'énergie (exothermique) caractéristique d'un phénomène de fusion, de cristallisation ou de transition de phase.

Cette technique a été utilisée dans l'étude des anneaux de surfactants polymérisés de manière à repérer les différences de comportement entre le monomère (molécule amphiphile **II-4**) et les anneaux à l'état solide, avec la température de fusion ou la température de transition vitreuse par exemple. Pour ce faire, les deux échantillons ont été caractérisés par DSC avec le même protocole d'analyse afin de pouvoir les comparer.

Le thermogramme du surfactant **II-4** présente principalement quatre événements thermiques (Figure II-63). Un premier à 60°C correspond à une transition solide-solide. La deuxième transition, endothermique, à 140°C, est caractéristique d'un phénomène de fusion, mettant en évidence le caractère cristallin du tensio-actif. La troisième, également endothermique, à 217°C est assimilée à une transition de phase liquide-liquide du surfactant. Enfin, le dernier événement thermique, caractérisé par un pic exothermique à 301°C, correspond à la dégradation de la molécule, mettant en évidence un domaine de stabilité avec comme limite supérieure 250°C.

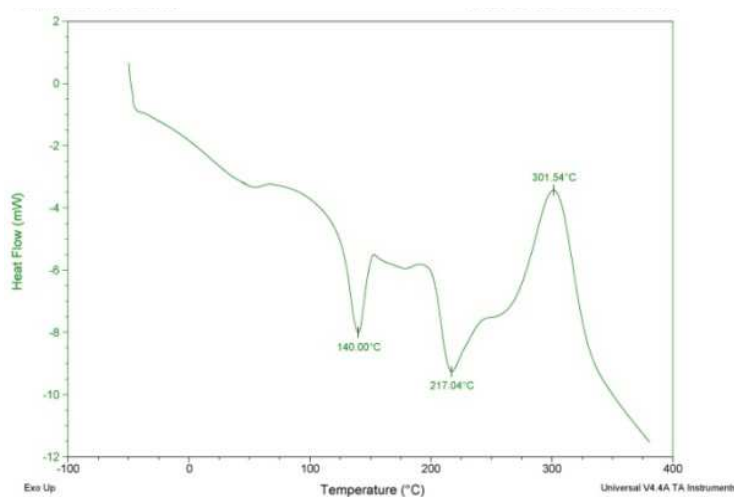


Figure II-63 – Thermogramme du composé **II-4**

Le thermogramme des anneaux de surfactants **II-4** (Figure II-64 – A) diffère de celui de l'amphiphile **II-4** non polymérisé. La principale différence provient de la disparition du point de fusion à 140°C observé dans le cas du monomère, mettant en évidence le caractère amorphe de cette espèce polymère. On retrouve à 55°C une transition solide-solide qui pourrait correspondre à une transition vitreuse dans le cas du polymère. Néanmoins, il semble que les anneaux de surfactants polymérisés soient stables jusqu'à 200°C. Au-delà, des événements

thermiques, exothermiques, correspondant à la dégradation du composé (à 265°C et 318°C) apparaissent. Cette observation a, par la suite, été confirmée par l'analyse thermogravimétrique (ATG) du composé qui permet de suivre la perte de masse d'un échantillon en fonction de la température. L'analyse du thermogramme ATG (Figure II-64 – B) indique que le début de dégradation des anneaux se trouve à une température proche de 200°C.

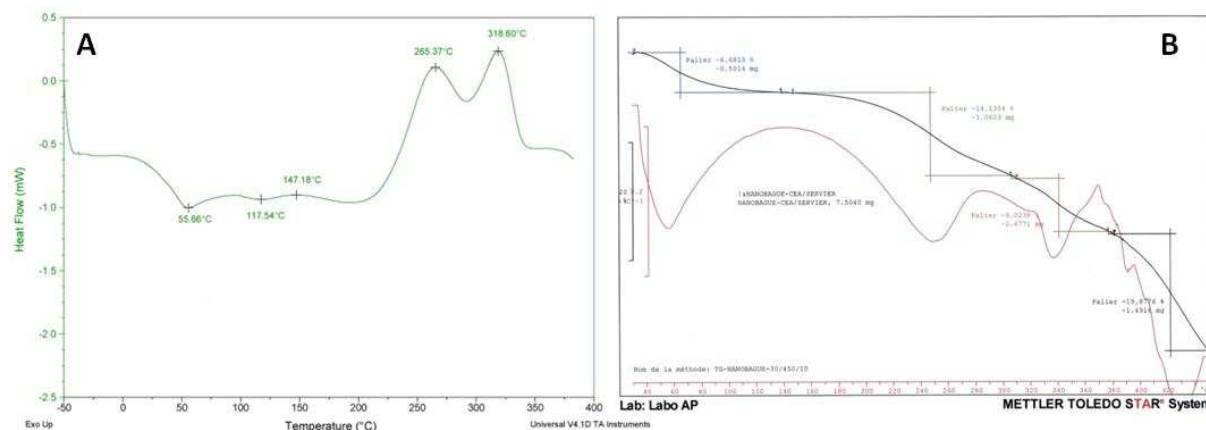


Figure II-64 – (A) Thermogramme DSC des anneaux de surfactants **II-4** polymérisés – (B) Thermogramme ATG des anneaux de surfactants

La comparaison des analyses thermiques du monomère et des anneaux révèle des différences de comportements. La première provient de la différence d'état entre le monomère qui se trouve sous forme cristalline et les anneaux sous forme amorphe. Cette perte de cristallinité peut être caractéristique de la polymérisation du composé qui se trouve sous forme amorphe après réticulation. La deuxième différence provient de la température à laquelle les composés commencent à se dégrader. En effet, dans les deux cas, un pic exothermique à une température supérieure à 300°C est présent, et correspond très certainement à la dégradation de la tête hydrophile « NTA ». Malgré cela, le thermogramme des anneaux de surfactants présente un pic exothermique supplémentaire à 265°C qui correspond à la dégradation du polymère constitué de liaisons alcènes et alcynes conjugués.

Pour conclure, cette étude a révélé la différence de comportement thermique entre le monomère et les anneaux de surfactants. Ces différences montrent que ces composés ne sont pas structurés de la même manière. La polymérisation des anneaux engendre la disparition du point de fusion et l'apparition d'un événement exothermique pouvant provenir de la dégradation de la chaîne du polymère.

II-6-3-4- Conclusion

Les différentes caractérisations ont mis en évidence que la taille des anneaux différait selon qu'ils soient sur le nanotube de carbone (Figure II-65 – A), sur la grille de microscopie (Figure II-65 – B) ou libres en solution (Figure II-65 – C). Cette différence provient, dans un premier temps, de la disparition des interactions hydrophobe/hydrophobe entre la surface du nanotube de carbone et les chaînes lipophiles de l'amphiphile **II-4**, et dans un second temps, de l'accroissement de l'espacement entre les têtes hydrophiles et donc des chaînes de polymères. Enfin, une hypothèse de structure thermodynamiquement la plus stable pourrait être une structure en forme de tore où la totalité des têtes hydrophiles serait orientée en direction de la solution aqueuse, limitant ainsi les interactions hydrophiles–hydrophobes, entre les chaînes lipophiles et l'eau, proposées par la structure en anneaux (Figure II-65 – D).

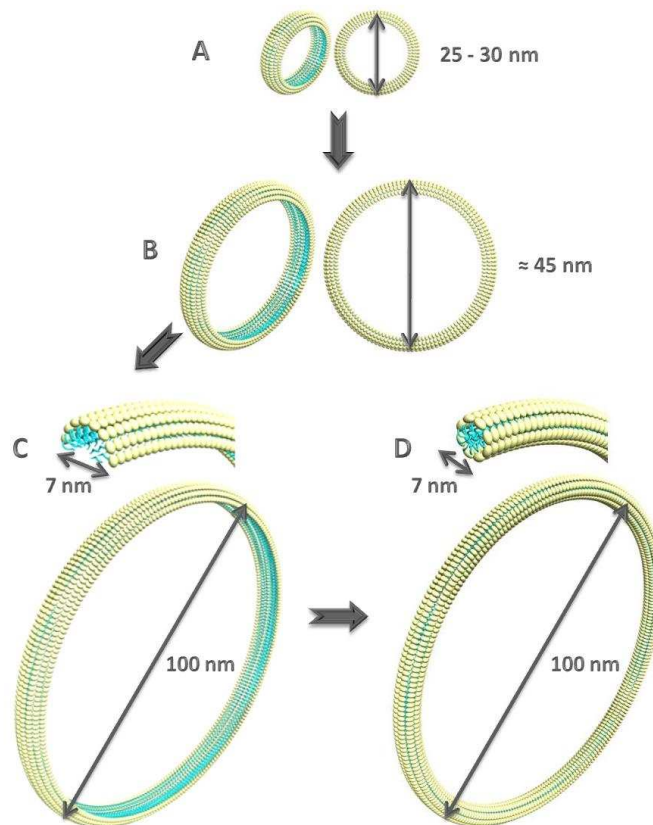


Figure II-65 – Schéma de synthèse de la structure des anneaux : (A) sur nanotubes de carbone ; (B) à l'état solide sur la grille de microscopie ; (C) en solution aqueuse ; (D) structure hypothétique plus stable en solution

Enfin, l'étude par DSC a mis en évidence la différence de comportement entre le monomère et la nanobague. L'amphiphile **II-4** est une espèce cristalline avec un point de fusion de 140°C et une température de dégradation de 300°C. La nanobague est une espèce amorphe

avec une température de dégradation inférieure à celle du monomère due à la fragilité thermique de la chaîne polymérique. La disparition du pic de fusion et l'apparition d'un pic de dégradation mettent en évidence la polymérisation des nanobagues.

II-7- Conclusion

L'objectif de ce travail a été d'étudier la synthèse d'anneaux de surfactants polymérisés formés à la surface de nanotubes de carbone, dans le but de les utiliser comme agents de solubilisation de principes actifs hydrophobes une fois séparée de leur support carboné. A partir de travaux antérieurs réalisés au laboratoire, un premier tensio-actif polymérisable **II-4** a été synthétisé pour réaliser la synthèse de « nanobagues ». L'extraction des anneaux de surfactants, arrangés à la surface de nanotubes multifeuillets, a été réalisée par électrophorèse/électroélution. Toutefois, cette technique d'extraction s'est avérée destructive puisqu'une grande majorité des anneaux ont été déchirés lors de leur séparation.

Pour résoudre ce problème, deux solutions ont été envisagées. Dans un premier temps, un surfactant doublement polymérisable a été synthétisé qui a permis d'obtenir des anneaux plus robustes. Cette molécule **II-23**, constituée de deux groupements polymérisables (un motif diacétylénique polymérisable par irradiation lumineuse à 254 nm et un motif acrylate réticulable par radiolyse de l'eau), a montré une structuration en anneaux sur toute la surface des nanotubes, similaire à celle observée pour l'amphiphile **II-4**. En parallèle, une nouvelle méthode de séparation de ces anneaux par électroélution directe a été mise au point et nous a amené à montrer que la méthode d'extraction était le facteur impactant le plus sur la dispersité en taille des anneaux. La réticulation accrue de ces anneaux, par l'utilisation de l'amphiphile **II-23**, combinée à l'utilisation de la nouvelle méthode d'extraction nous a permis d'obtenir des anneaux de surfactants avec une très faible dispersité en taille.

Différentes méthodes d'analyse ont permis de caractériser la structure des nanobagues à l'état solide et en solution. Les anneaux construits à partir de l'amphiphile **II-4** ont donné des objets d'un diamètre de 100 nm, pour une épaisseur de 7 à 8 nm. La diffusion des neutrons aux petits angles a permis d'obtenir une valeur approximative de la masse molaire apparente des nanobagues de 5 120 000 g/mol.

Du fait de la structure de la tête hydrophile « *NTA* », les nanobagues ont la particularité d'être fortement soluble en solution aqueuse. La structuration en anneaux de l'amphiphile **II-4** avec une cavité centrale hydrophobe est discutée car il semblerait qu'une structure en tore soit plus probable. Néanmoins, la présence d'un domaine hydrophobe confère à la structure en tore

des propriétés d'incorporation de molécules hydrophobes avec des applications prometteuses dans différents domaines, et en particulier dans le domaine pharmaceutique. De ce fait, une étude d'évaluation des nanobagues comme agent de solubilisation et de vectorisation de médicaments a été menée dans les laboratoires du CEA à Saclay et de Technologie SERVIER à Orléans.

- ¹ Chiu, P.-W., Towards Carbon Nanotube-based Molecular Electronics, PhD thesis. *Technischen Universitat Munchen* **2003**, PhD dissertation.
- ² Govindaraj, A.; Rao, C. N. R., Nanotubes and nanowires. In *The chemistry of nanomaterials*, Wiley: 2004; pp 208-284.
- ³ Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C., C₆₀ : Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, 318, 162.
- ⁴ Daenen, M.; de Fouw, R. D.; Hamers, B.; Janssen, P. G. A.; Schouteden, K.; Veld, M. A. J., Introduction. In *The wonderful world of carbon nanotubes*, Eindhoven University of Technology: 2003; p 4.
- ⁵ Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, 354, 56.
- ⁶ Avouris, P., Carbon nanotube electronics. *Chemical physics* **2002**, 281, (2-3), 429.
- ⁷ Daenen, M.; de Fouw, R. D.; Hamers, B.; Janssen, P. G. A.; Schouteden, K.; Veld, M. A. J., Synthesis. In *The wonderful world of carbon nanotubes*, Eindhoven University of Technology: 2003; pp 8-23.
- ⁸ Ebbesen, T. W.; Ajayan, P. M., Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature* **1992**, 358, 220-222.
- ⁹ Bethune, D. S.; Kiang, C. H.; De Vries, M. S.; Gorman, G.; Savoy, R.; Vazquez, J.; Beyers, R., Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layers walls. *Nature* **1993**, 363, 605-607.
- ¹⁰ Iijima, S.; Ichihashi, T., Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* **1993**, 363, 603-605.
- ¹¹ Journet, C.; Maser, W. K.; Bernier, P.; Loiseau, A., Large-scale production of SWNT by electric arc technique. *Nature* **1997**, 388, 217-223.
- ¹² Guo, T.; Nikolaev, P.; Thess, A.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E., Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chemical physics letters* **1995**, 243, 49-54.
- ¹³ Thess, A.; Lee, R.; Nikolaev, P.; Dai, H.; Petit, P.; Robert, J.; Xu, C.; Lee, Y. H.; Kim, S. G.; Rinzler, A. G.; Colbert, D. T.; Scuseria, G. E.; Tomanek, D.; Fisher, J. E.; Smalley, R. E., Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. *Science* **1996**, 273, 483-487.
- ¹⁴ Maser, W. K.; Munoz, E.; Benito, A. M.; Martinez, M. T.; de la Fuente, G. F.; Maniette, Y.; Anglaret, E.; Sauvajol, J.-L., Production of high-density single-walled nanotube material by a simple laser-ablation method. *Chemical physics letters* **1998**, 292, 587-593.
- ¹⁵ Yudasaka, M.; Yamada, R.; Sensui, N.; Wilkins, T.; Ichihashi, T.; Iijima, S., Mechanism of the effect of NiCo, Ni and Co catalysts on the yield of single-wall carbon nanotubes by pulsed Nd: YAG laser ablation. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, 6224-6229.
- ¹⁶ Yacaman, M. J.; Yoshida, M. M.; Rendon, L.; Santiesteban, J. G., Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure. *Applied Physics Letters* **1993**, 62, (2), 202-204.
- ¹⁷ Endo, M.; Takeuchi, K.; Igarashi, S.; Kobori, K.; Shiraiishi, M.; Kroto, H. W., The production and structure of pyrolytic carbon nanotubes (PCNTs). *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **1993**, 54, (12), 1841-1848.
- ¹⁸ Ren, Z. F.; Huang, Z. P.; Xu, J. W.; Wang, J. H.; Bush, P.; Siegal, M. P.; Provencio, P. N., Synthesis of large arrays of well-aligned carbon nanotubes on Glass. *Science* **1998**, 282, 1105-1107.
- ¹⁹ Nikolaev, P.; Bronikowski, M. J.; Bradley, R. K.; Rohmund, F.; Colbert, D. T.; Smith, K. A.; Smalley, R. E., Gas-phase catalytic growth of single-walled carbon nanotubes from carbon monoxide. *Chemical physics letters* **1999**, 313, 91-97.
- ²⁰ Daenen, M.; de Fouw, R. D.; Hamers, B.; Janssen, P. G. A.; Schouteden, K.; Veld, M. A. J., Purification. In *The wonderful world of carbon nanotubes*, Eindhoven University of Technology: 2003; pp 24-29.
- ²¹ n-Tec, <http://www.n-tec.no>.
- ²² Bonard, J.-M.; Stora, T.; Salvetat, J.-P.; Maier, F.; Stockli, T.; Duschl, C.; Forro, M.; de Heer, W. A.; Chatelain, A., Purification and size-selection of carbon nanotubes. *Advanced Materials* **1997**, 9, (10), 827.
- ²³ Images MET et MEB de nanotubes de carbone de la société n-Tec (www.n-tec.no).
- ²⁴ Richard, C. Conception, synthèse et étude d'outils pour la biologie. Assemblage supramoléculaire à la surface de nanotubes de carbone. Université de Paris XI Orsay, 2000.
- ²⁵ Rickling, S. Synthèse et utilisation de nano-objets obtenus à partir de lipides photopolymérisables autour de nanotubes de carbone. Interactions entre tubuline et nanotubes de carbone ou fullérenes. Université Louis Pasteur Strasbourg I, 2004.
- ²⁶ Richard, C.; Balavoine, F.; Schultz, P.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C., Supramolecular self-assembly of lipid derivatives on carbon nanotubes. *Science* **2003**, 300, 775-778.
- ²⁷ Evans, F.; Wennerstrom, H., Chapter 1: Solute and solvents, self-assembly of amphiphiles. In *The colloidal domain - where physics, chemistry and biology meet*, Wiley-VCH: 1999; pp 1 - 43.
- ²⁸ Ringsdorf, H.; Schlarb, B.; Venzmer, J., Molecular architecture and function of polymeric oriented systems : models for the study of organization, surface recognition and dynamics of biomembranes. *Angewandte Chemie International Edition* **1988**, 27, (1), 113-158.
- ²⁹ Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H., Supramolecular nanotube architectures based on amphiphilic molecules. *Chemical Review* **2005**, 105, 1401-1443.
- ³⁰ Holmberg, K.; Jonsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B., Surfactant Micellization. In *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, John Wiley & Sons: 2002; pp 39-66.
- ³¹ Schnur, J. M., Lipid tubules : a paradigm for molecularly engineered structures. *Science* **1993**, 262, 1669-1676.

- ³² Israelachvili, J. N., *Intermolecular and surface forces, with applications to colloidal and biological systems*. Academic Press: 1985.
- ³³ KRUSS-GmbH, Principes de mesure des tensiomètres KRUSS. http://www.kruss.de/messtechnik/tension_superficielle_fr.html.
- ³⁴ Tanford, C., Chapter 6: Micelles. In *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, John Wiley and sons, 1991; p 42.
- ³⁵ Hoffmann, H.; Ulbricht, W., CHAPTER 10 : Rheological Effects in Surfactant Phases. In *Handbook Of Applied Surface And Colloid Chemistry*, Wiley, Ed. 2002; Vol. 2, pp 189-214.
- ³⁶ Manne, S.; Cleveland, J. P.; Gaub, H. E.; Stucky, G. D.; Hansma, P. K., Direct Visualization of surfactant hemmicelles by force microscopy of the electrical double layer. *Langmuir* **1994**, (10), 4409.
- ³⁷ Manne, S.; Gaub, H. E., Molecular organization of surfactants at solid-liquid interfaces. *Science* **1995**, 270, 1480-1482.
- ³⁸ Aksay, I. A.; Manne, S.; Honma, I.; Yao, N.; Zhou, L.; Fenter, P.; Eisenberger, P. M.; Gruner, S. M., Biomimetic pathways for assembling inorganic thin films. *Science* **1996**, 273, 892-898.
- ³⁹ Wanless, E. J.; Ducker, W. A., Organization of sodium dodecyl sulfate at the graphite-solution interface. *Journal of physical Chemistry* **1996**, 100, 3207-3214.
- ⁴⁰ Mioskowski, C.; Rickling, S.; Schultz, P. Macromolecules auto-assembled and photopolymerised around carbon nanotubes - A method for production and application therefor - **Patent WO 2004/092231 A2 / US 2007/0184267 A1**. 2004.
- ⁴¹ Mackiewicz, N., 2005.
- ⁴² Mioskowski, C.; Rickling, S. Macromolécules auto assemblées et photopolymérisées autour de nanotubes de carbone, un procédé pour leur préparation, et leurs applications / WO2004092231A2 - US2007184267A1.
- ⁴³ Lee, J. K.; Kim, Y.-G.; Chi, Y. S.; Yun, W. S.; Choi, I. S., Grafting nitrilotriacetic groups onto carboxylic acid-terminated self-assembled monolayers on gold surfaces for immobilization of histidine-tagged proteins. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 7665-7673.
- ⁴⁴ Schmitt, L.; Dietrich, C.; Tampé, R., Synthesis and characterization of chelator-lipids for reversible immobilization of engineered proteins at self-assembled lipid interfaces. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, 8485-8491.
- ⁴⁵ Du Roure, O.; Debiemme-Chouvy, C.; Malthête, J.; Silberzan, P., Functionalizing surfaces with nickel ions for the grafting of proteins. *Langmuir* **2003**, 19, 4138-4143.
- ⁴⁶ Xu, C.; Xu, K.; Gu, H.; Zhong, X.; Guo, Z.; Zheng, R.; Zhang, X.; Xu, B., Nitrilotriacetic acid-modified magnetic nanoparticles as a general agent to bind histidine-tagged proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 3392-3393.
- ⁴⁷ Xu, C.; Xu, K.; Gu, H.; Zheng, R.; Liu, H.; Zhang, X.; Guo, Z.; Xu, B., Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 9938-9939.
- ⁴⁸ Dorn, I. T.; Neumaier, K. R.; Tampé, R., Molecular recognition of histidine-tagged molecules by metal chelating lipids monitored by fluorescence energy transfer and correlation spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 2753-2763.
- ⁴⁹ Patist, A., CHAPTER 13 : Determining Critical Micelle Concentration. In *Handbook Of Applied Surface And Colloid Chemistry*, Wiley, Ed. 2002; Vol. 2, pp 239-249.
- ⁵⁰ Wegner, G., Solid-state polymerization mechanisms. *Pure & Appl.Chem.* **1977**, 49, 443-454.
- ⁵¹ Kollmar, C., Electronic structure of diradical and dicarbene intermediates in short-chain polydiacetylene oligomers. *Journal of chemical physics* **1993**, 98, (9), 2710-2728.
- ⁵² Itoh, C.; Kondoh, T.; Tanimura, K., Photo-Induced dimer-diradical formation in diacetylene crystals at low temperatures. *Journal of the physical society of Japan* **1999**, 68, (5), 1711-1715.
- ⁵³ Okawa, Y.; Aono, M., Linear chain polymerization initiated by a scanning tunneling microscope tips at designated positions. *Journal of chemical physics* **2001**, 115, (5), 2317-2322.
- ⁵⁴ Sixl, H., Spectroscopy of the intermediate states of the solid state polymerization reaction in diacetylene crystals. *Advances in polymer science* **1984**, 63, 49-90.
- ⁵⁵ Sixl, H.; Kollmar, C.; Huber, R.; Sigmund, E., Theory of the radical-electron configurations and optical excitations in short-chain polydiacetylene oligomers. *Physical review B* **1987**, 36, (5), 2747-2756.
- ⁵⁶ Rouessac, F.; Rouessac, A., Chapitre 8 : Electrophorèse capillaire et électrochromatographie. In *Analyse Chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes*, DUNOD, Ed. 2000; pp 117-130.
- ⁵⁷ Issaq, H. J., Chapter 32 : A history of the use and measurement of affinity interactions in electrophoresis. In *A century of separation science*, Decker, M., Ed. 2002; pp 527-554.
- ⁵⁸ Manz, A.; Pamme, N.; Iossifidis, D., Electrophoresis. In *Bioanalytical chemistry*, Press, I. C., Ed. 2004; pp 47-84.
- ⁵⁹ Mikkelsen, S. R.; Corton, E., Chapter 9 : Principles of Electrophoresis. In *Bioanalytical Chemistry*, Wiley, Ed. 2004; pp 167-190.
- ⁶⁰ Wang, A.; Wu, C.-J.; Chen, S.-H., Gold Nanoparticle-assisted protein enrichment and electroelution for biological samples containing low protein concentration - a prelude of gel electrophoresis. *Journal of proteome research* **2006**, 5, 1488-1492.

- ⁶¹ Rigou, P.; Rezael, H.; Grosclaude, J.; Staudon, S.; Quiquampoix, H., Fate of prions in soil : adsorption and extraction by electroelution of recombinant ovine prion protein from montmorillonite and natural soils. *Environmental science & technology* **2006**, 40, (5), 1497-1503.
- ⁶² Furlong, C. E.; Richter, R. J.; Chapline, C.; Crabb, J. W., Purification of rabbit and human serum paraoxonases. *Biochemistry* **1991**, 30, (42), 10133-10140.
- ⁶³ Odian, G., *Principles of polymerization - Fourth edition*. Wiley-interscience: 2004.
- ⁶⁴ Siyam, T.; Youssef, H. A., Cationic résins prepared by radiation-induced graft copolymerization. *Radiation physics and chemistry* **1999**, 55, (447-450).
- ⁶⁵ Feng, H.; Al-Sheikhly, M.; Silverman, J.; Weiss, D. E.; Neta, P., Polymerization of neat 2-ethylhexyl acrylate induced by a pulsed electron beam. *Journal of polymer science part A : polymer chemistry* **2002**, 41, (1), 196-203.
- ⁶⁶ Feng, H.; Al-Sheikhly, M.; Silverman, J.; Weiss, D. E., The role of pulse frequency and acrylic acid in the radiation-induced bulk polymerization of 2-ethylhexyl acrylate. *Radiation physics and chemistry* **2003**, 67, 347-352.
- ⁶⁷ Patacz, C.; Coqueret, X., electron-beam-initiated polymerization of acrylate compositions - Part 5 . Influence of additives containing heteroatoms on the reactivity of butyl acrylate. *Polymer international* **2001**, 51, (1), 27-32.
- ⁶⁸ Witt, W.; Geers, H.; Aberle, L., Measurement of particule size and stability of nanoparticles in opaque suspensions and emulsions with photon cross correlation spectroscopy (PCCS). *PARTEC* **2004**.
- ⁶⁹ Teixeira, J., Introduction à la diffusion de neutrons. *Collection SFN* **2007**, 8, 1-9.
- ⁷⁰ Auvray, L.; Brulet, A., Diffusion de neutrons aux petits angles appliquée aux études d'interfaces et de systèmes confinés. *Collection SFN* **2007**, 8, 179-205.
- ⁷¹ Cotton, J. P., DNPA : Introduction et variations sur le contraste. In *Diffusion de neutrons aux petits angles*, Journal de physique IV: 1999; Vol. 9, pp 21-49.
- ⁷² Nallet, F., De l'intensité à la structure en physico-chimie des milieux dispersés. In *Diffusion de neutrons aux petits angles*, Journal de physique IV: 1999; Vol. 9, pp 95-107.
- ⁷³ Lairez, D.; Pelta, J., Diffusion de neutrons aux petits angles : applications à l'étude des macromolécules biologiques en solution. *Journal de physique IV* **2004**, 1, 1-25.

CHAPITRE III

NANOBAGUETTES ET
APPLICATIONS
PHARMACEUTIQUES

III-1- Introduction

Un grand nombre de molécules à activité thérapeutique issues des laboratoires de synthèse et en particulier dans le cas des molécules anti-cancéreuses présentent une faible solubilité dans l'eau, provenant des propriétés intrinsèques hydrophobes de la molécule. En effet, ces molécules doivent avoir un certain degré d'hydrophobicité pour pouvoir être internalisées dans les cellules et être efficaces. Le challenge de la vectorisation est donc d'essayer de contourner les problèmes associés à :

- ✓ La solubilité afin d'éviter les risques de toxicité liés à l'agrégation (embolie), de faible absorption par l'organisme.
- ✓ La stabilité des molécules afin d'empêcher une dégradation *in vivo* rapide et une perte d'activité.
- ✓ La pharmacocinétique afin de ralentir l'élimination de la molécule et de limiter la dose administrée.
- ✓ La biodistribution afin de prévenir la distribution de ces molécules dans des tissus sains engendrant des effets secondaires.
- ✓ Le ciblage spécifique (passif ou actif) de tissus malades dans le but de diminuer la toxicité et les effets secondaires.

Actuellement, différents systèmes sont utilisés dans le but de vectoriser des principes actifs, en transportant suffisamment de molécules à travers les différentes barrières biologiques pour atteindre le site d'action de manière efficace (*cf chapitre I*).

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude des nanobagues comme vecteurs de délivrance de médicaments afin de répondre à la problématique de solubilité de certains principes actifs développés par les laboratoires Servier. Au cours de cette étude, des structurations particulières de l'amphiphile **II-4** ont été évaluées dans le but de valider le bénéfice des nanobagues par rapport à des formulations plus simples. Enfin, nous avons étudié la fonctionnalisation de surface par conjugaison de certaines de ces formulations afin de les faire progresser vers des systèmes évolués pour des applications d'adressage.

Ces études ont été conduites en partie dans les locaux de Technologie Servier à Orléans, dans le service de synthèse et en collaboration avec les départements de Galéniques, d'Analyse Structurale, de Pré-Développement Biopharmaceutique ADME et avec la société Biologie Servier.

III-2- Vectorisation de principes actifs hydrophobes dans les nanobagues

Dans cette partie, nous nous proposons d'explorer les capacités particulières des nanobagues à solubiliser des principes actifs hydrophobes et aussi d'évaluer la toxicité de ce nanovecteur.

III-2-1- Structure et propriétés des nanobagues

Les nanobagues sont construites à la surface des nanotubes de carbone à partir d'amphiphiles polymérisés et extraites par une méthode électrochimique développée au cours de cette thèse (*cf chapitre 2*). Les objets obtenus ont une structure définie, avec une coque externe hydrophile et un domaine hydrophobe.

De par la structure de l'amphiphile utilisé, les nanobagues sont des espèces solubles dans l'eau sur une gamme de pH importante. En se basant sur les valeurs des pKa, les anneaux devraient être théoriquement solubles et stables à partir de pH=3, valeur du pKa des acides carboxyliques de la tête NTA à partir de laquelle ils se trouvent sous forme déprotonée (Schéma III-1). Le point isoélectrique se situant dans la zone comprise entre le pKa de l'amine tertiaire (pKa=10) et le pKa des acides carboxyliques, c'est à l'intérieur de cette zone que l'on atteindra la solubilité la plus faible dans l'eau.

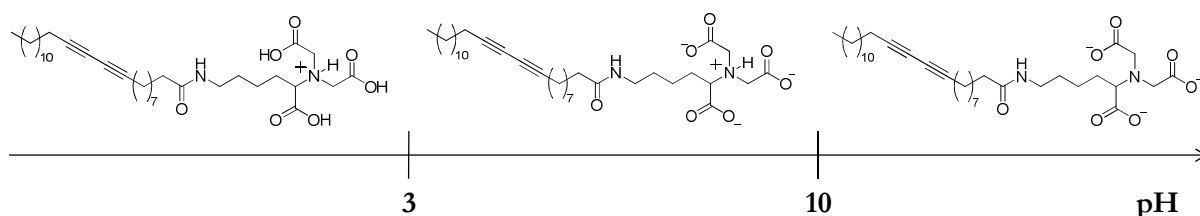


Schéma III-1 – Structure de l'amphiphile II-4 en fonction du pH

Expérimentalement, les nanobagues sont solubles et stables pendant plusieurs mois en solution à des valeurs de pH supérieures à 7. En dessous de cette valeur, un précipité se forme au bout de quelques semaines, en particulier dans le cas de nanobagues stockées dans de l'eau milliQ dont le pH est voisin de 6. Enfin, les nanobagues lyophilisées puis resolubilisées restent solubles et stables dans des solutions aqueuses basiques, malgré une solubilisation lente de ces espèces à des pH inférieurs à 10. Les anneaux sont donc stables à des pH compatibles avec le milieu physiologique et leur utilisation pour des études *in vivo* pourra être envisagée.

Du fait de leur structure amphiphile particulière, les nanobagues devraient avoir la capacité d'inclure des molécules hydrophobes dans leur cœur et ainsi augmenter la solubilité de ces espèces.

III-2-2- Etude préliminaire d'inclusion

Au sein de l'équipe du Dr. Mioskowski, une étude antérieure avait montré qu'il était possible de solubiliser à l'aide de ces anneaux des espèces hydrophobes telles que des colorants (Schéma III-2 – A) ou des fullerènes. Il est également possible d'inclure et de stabiliser des protéines membranaires (Schéma III-2 – B) par solubilisation de leur partie lipophile.¹

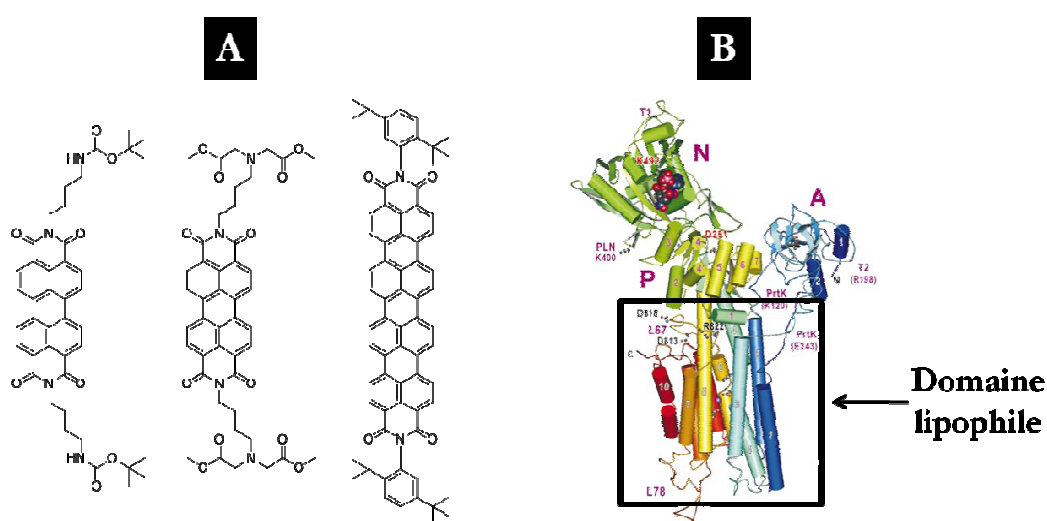
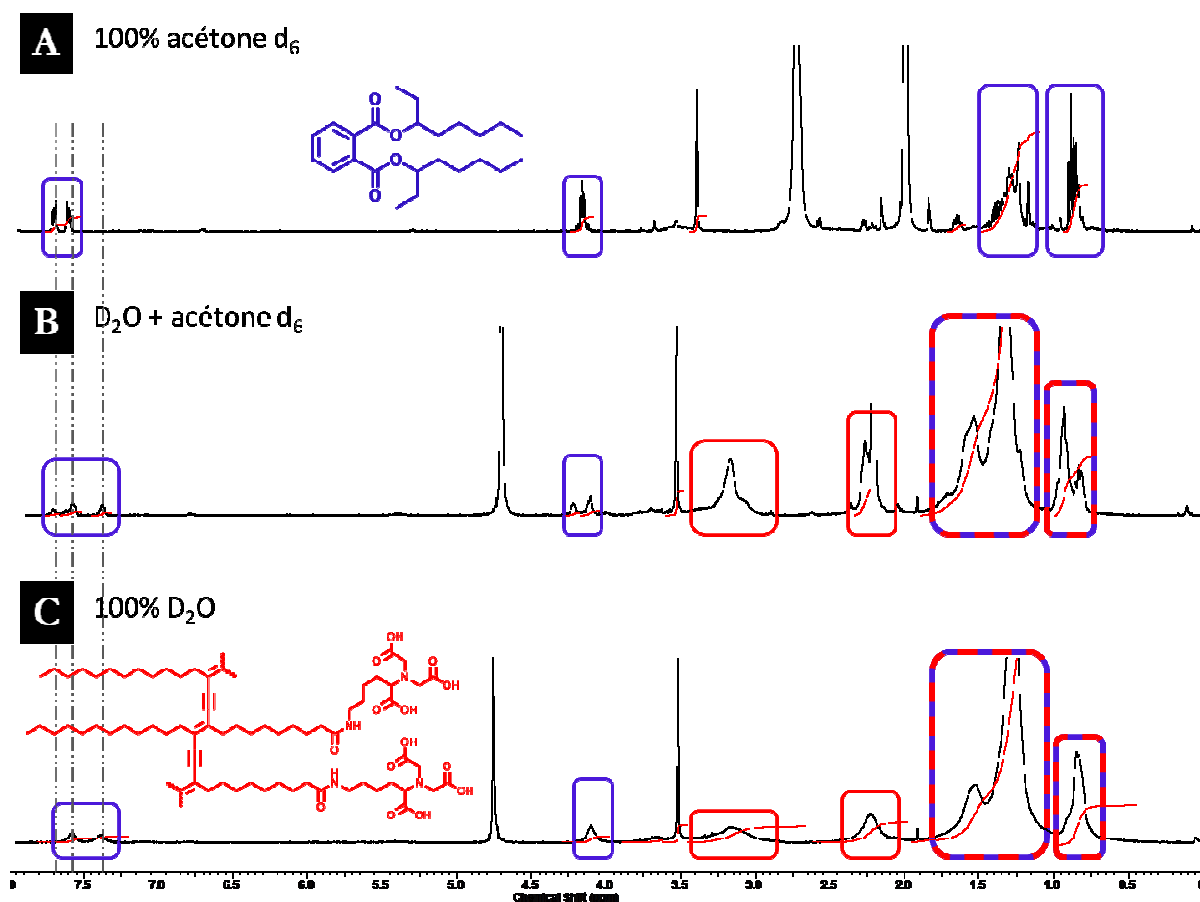


Schéma III-2 – (A) Structures de colorants utilisés pour l'inclusion dans les nanobagues ;
(B) Structure de protéine membranaire

En collaboration avec le département d'Analyse Structurale de Technologie Servier, une étude préliminaire de RMN a été conduite dans le but d'observer le comportement des nanobagues polymériques et de le comparer à celui du monomère **II-4** de départ. L'analyse de ces spectres a mis en évidence différents points importants :

- ✓ Le spectre de la nanobague dans le D₂O (Figure III-1 – C / encadré rouge) présente des déplacements chimiques similaires à ceux observés dans le cas de l'amphiphile **II-4** avec néanmoins une diminution de la résolution du spectre et un élargissement important des pics. Ce phénomène est caractéristique des polymères qui ont des temps de relaxation très courts et donc des spectres moins bien résolus.

- ✓ Le spectre RMN de la nanobague dans le D₂O met en évidence la présence d'un contaminant, le di(éthylhexyl)phthalate (agent plastifiant présent dans le PVC), provenant du plastique du système de dialyse (Figure III-1 – C / encadré bleu). La résolution et la présence de pics larges dans la zone des aromatiques (7,3 à 7,6 ppm) semblent attester de l'inclusion de cette petite molécule hydrophobe dans le cœur de la nanobague puisque ces deux entités relaxent à la même vitesse.
- ✓ Afin de mettre en évidence l'inclusion de ce contaminant dans les anneaux, de l'acétone d₆ a été additionné à la solution de D₂O dans le but de relarguer une partie du contaminant soluble dans l'acétone. Le spectre RMN de cette solution montre un dédoublement des pics du di(éthylhexyl)phthalate avec l'apparition de pics résolus correspondant à la présence de cette molécule en solution dans le mélange acétone-d₆/D₂O (Figure III-1 – B / encadré bleu). A 100% d'acétone-d₆, seul le di(éthylhexyl)phthalate est soluble, et le spectre RMN présente des pics résolus de cette molécule libre en solution (Figure III-1 – A).



Au vu des caractéristiques de la nanobague et de l'étude RMN, il semble que les anneaux soient adaptés pour l'incorporation de substances hydrophobes. Enfin, une molécule modèle hydrophobe a été sélectionnée dans le but d'étudier et d'évaluer la capacité d'encapsulation de ces anneaux.

III-2-3- Molécule modèle : S39625

Un certain nombre de molécules issues de la recherche pharmaceutique présentent une faible solubilité dans l'eau pouvant entraîner des problèmes de toxicité liés à leur précipitation dans l'organisme.² Par exemple, certains principes actifs anti-cancéreux exhibent une faible solubilité du fait de leur caractère hydrophobe intrinsèque qui contribue par ailleurs à leur activité cytotoxique importante.

La solubilité de ces molécules doit donc être modifiée tout en conservant l'activité anti-cancéreuse initiale. Deux approches peuvent être mises en œuvre pour contourner ce problème :

- ✓ La première vise à modifier chimiquement la structure du principe actif par l'introduction de groupements ou de petites molécules hydrosolubles. Cette méthode perturbe généralement l'activité thérapeutique du composé.
- ✓ La seconde approche consiste à solubiliser le principe actif par un agent de solubilisation tel que les nanoparticules ou les liposomes par exemple. Cette dernière technique, que nous explorerons, ne modifie pas l'activité initiale de la molécule.

Dans le cadre de ce travail, l'étude d'évaluation des nanobagues comme vecteur de médicaments a été conduite sur une molécule modèle développée par les laboratoires Servier, dérivée de la camptothécine – le S39625 – qui est un agent anti-cancéreux avec un effet anti tumorale sur le modèle HCT116 (Schéma III-3).

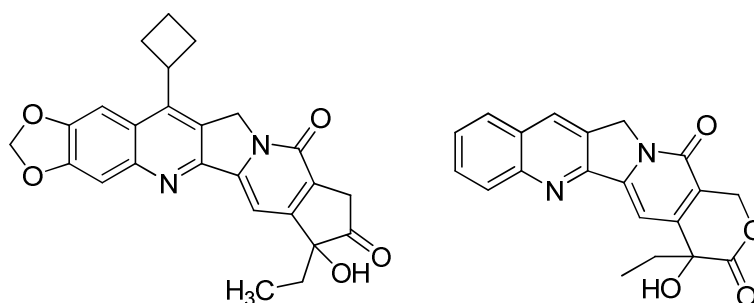


Schéma III-3 – Structures du S39625 (*gauche*) et de la camptothécine (*droite*)

Cette molécule présente un caractère hydrophobe important avec, comme conséquence, une très faible solubilité dans l'eau de **90 ng/mL** (Tableau III-1). Cette caractéristique hydrophobe fait de ce principe actif une molécule modèle adaptée au cadre de notre étude.

Tableau III-1 – Solubilité du S39625 dans différents solvants

Solvant	Solubilité (en mg/mL)	Solvant	Solubilité (en mg/mL)
Eau	0,00009	DMSO	8,3
Méthanol	0,20	DMF	15,3
Acétonitrile	0,26	Dichlorométhane	25,0
Acétone	0,80	CH ₂ Cl ₂ + CH ₃ OH (10%)	95,0

III-2-4- Etude de l'inclusion du S39625 dans les nanobagues

Cette étude a été menée dans le but de trouver les conditions optimales d'encapsulation et d'atteindre un taux d'incorporation (ou d'inclusion) maximal^c. En effet, l'objectif de la vectorisation de médicaments est de transporter un maximum de principe actif avec un minimum de transporteur afin d'administrer majoritairement la molécule active chez le patient et ainsi limiter l'effet toxique relatif du transporteur.

Dans un premier temps, l'inclusion du S39625 dans les nanobagues a été étudiée par une méthode spectrophotométrique (absorption UV) afin de quantifier de façon simple le principe actif inclus dans la nanobague. Dans un deuxième temps, une méthode de mesure chromatographique (HPLC) a permis de confirmer et d'affiner les résultats obtenus par absorption UV.

III-2-4-1- Etalonnage du S39625 en solution organique

La première étape de ce travail a consisté à établir une courbe d'étalonnage du S39625 afin de quantifier le principe actif inclus dans les nanobagues. Le principe actif n'étant pas soluble dans l'eau, les courbes de calibrage ont été réalisées à partir de solutions de S39625 dans le méthanol. Une gamme étalon de S39625 a été préparée et un spectre d'absorption UV a été effectué pour chacune d'elles. Enfin, les courbes d'étalonnage ont été réalisées à trois longueurs d'onde différentes (à 226 nm, 366 nm et 381 nm) correspondant aux trois maximas d'absorption du composé (Figure III-2).

^c Ratio massique (en %) entre médicament et médicament+transporteur $\times 100$ dans la formulation après traitement

Les courbes d'étalonnage du S39625 dans le méthanol vont nous permettre de quantifier le principe actif S39625 inclus dans la solution aqueuse de nanobagues. Cependant, les coefficients d'extinction molaire ϵ (loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon.l.c$) du S39625 en solution dans le méthanol et inclus dans les nanobagues ne doivent pas avoir la même valeur mais, dans le cadre de cette étude, nous émettrons l'hypothèse que ces valeurs sont très proches.

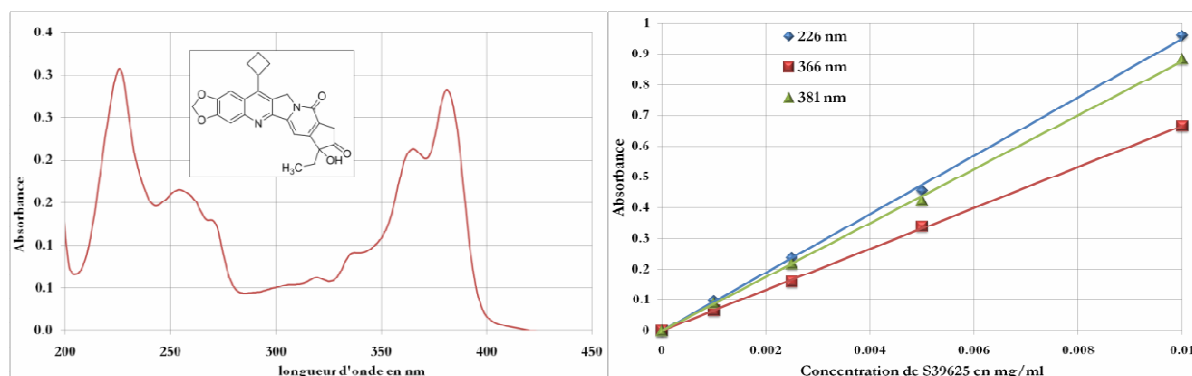


Figure III-2 – (gauche) Spectre d'absorption UV du S39625 dans le méthanol (droite) Courbes d'étalonnage dans le méthanol en fonction de la concentration par absorption UV

III-2-4-2- Etude de la méthode d'inclusion du S39625 dans les nanobagues

Dans la littérature, différentes méthodes ont été développées afin d'optimiser le taux d'inclusion de principes actifs dans différents types de transporteur (cf chapitre I). Certaines de ces méthodes ne sont pas applicables à l'inclusion de S39625 dans les nanobagues telles que les méthodes par dialyse ou d'hydratation de film mince qui nécessitent l'utilisation de solvants organiques permettant la solubilisation simultanée du principe actif et du transporteur.

De ce fait, des méthodes simples d'inclusion ont été testées (Figure III-3) telles que :

- ✓ Méthode « vortex » : inclusion par agitation vortex d'une solution aqueuse de nanobague à 1,5 mg/mL et de principe actif à l'état de poudre pendant 30 minutes.
- ✓ Méthode « vortex/sonication » : inclusion par agitation vortex combinée à des cycles de sonication d'une solution aqueuse de nanobague à 1,5 mg/mL et de principe actif à l'état de poudre pendant 2 heures.
- ✓ Méthode « agitation à 20°C » : inclusion par agitation magnétique à température ambiante pendant 12 heures d'une solution aqueuse de nanobague à 1,5 mg/mL et de principe actif à l'état de poudre.

- ✓ *Méthode « agitation à 50°C »* : inclusion par agitation magnétique à 50°C pendant 12 heures d'une solution aqueuse de nanobague à 1,5 mg/mL et de principe actif à l'état de poudre.
- ✓ *Méthode « évaporation de DCM »* : inclusion par addition du principe actif solubilisé dans du dichlorométhane (DCM) à une solution aqueuse de nanobagues à 1,5 mg/mL chauffée à 50°C.

A l'issue de la séquence d'inclusion, chaque solution est filtrée afin d'éliminer l'excès de principe actif non inclus et un spectre d'absorption UV est réalisé (Figure III-3).

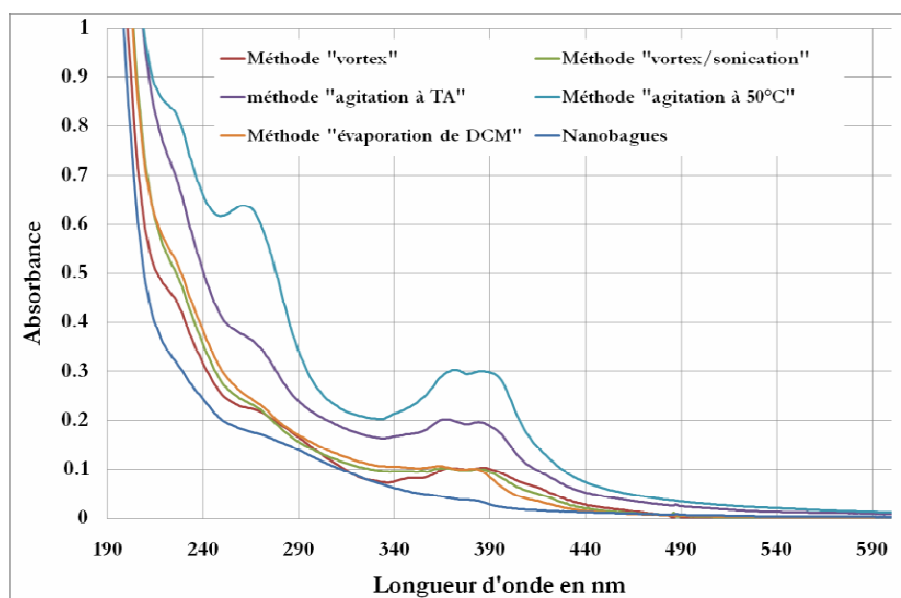


Figure III-3 – Inclusion de S39625 dans les nanobagues par différentes méthodes d'incorporation

Les différents échantillons présentent chacun une incorporation de principe actif dans les nanobagues du fait de l'apparition de pics caractéristiques du S39625 entre 340 et 390 nm (Figure III-3). Cependant, les taux d'incorporation diffèrent selon la méthode utilisée (Tableau III-2).

Les méthodes par vortex, vortex/sonication ou évaporation de dichlorométhane donnent des résultats similaires avec des taux d'inclusion de 0,9% pour une solubilité de 14 µg/mL de principe actif dans l'eau. Par ces méthodes, la solubilité du S39625 est améliorée d'un facteur de 155.

Tableau III-2 – Effet de la méthode d'incorporation sur le taux d'inclusion du S39625 dans les nanobagues

Méthode d'inclusion	Taux d'inclusion ^d du S39625 (en %)	Solubilité du S39625 (en µg/mL)
« Vortex »	0,9	14
« Vortex / Sonication »	0,9	14
« Agitation à 20°C »	2,4	37
« Agitation à 50°C »	3,8	61
« Evaporation de DCM »	0,9	14

La méthode par agitation magnétique pendant 12 heures, du principe actif dans une solution de nanobague à 1,5 mg/mL, a conduit à l'amélioration de la solubilité du S39625 d'un facteur 410 avec une concentration en S39625 de 37 µg/mL et un taux d'incorporation de 2,4%. Ce résultat indique que l'énergie apportée à la solution par agitation (comparée à l'agitation par vortex) est un paramètre important dans le processus d'incorporation du S39625 dans les nanobagues.

Enfin, la méthode par agitation magnétique à 50°C pendant 12 heures (Figure III-4) a mené à l'amélioration du taux d'inclusion de 2,4 à 3,8% avec une solubilité en S39625 de 61 µg/mL. La solubilité du principe actif a été améliorée d'un facteur 675.

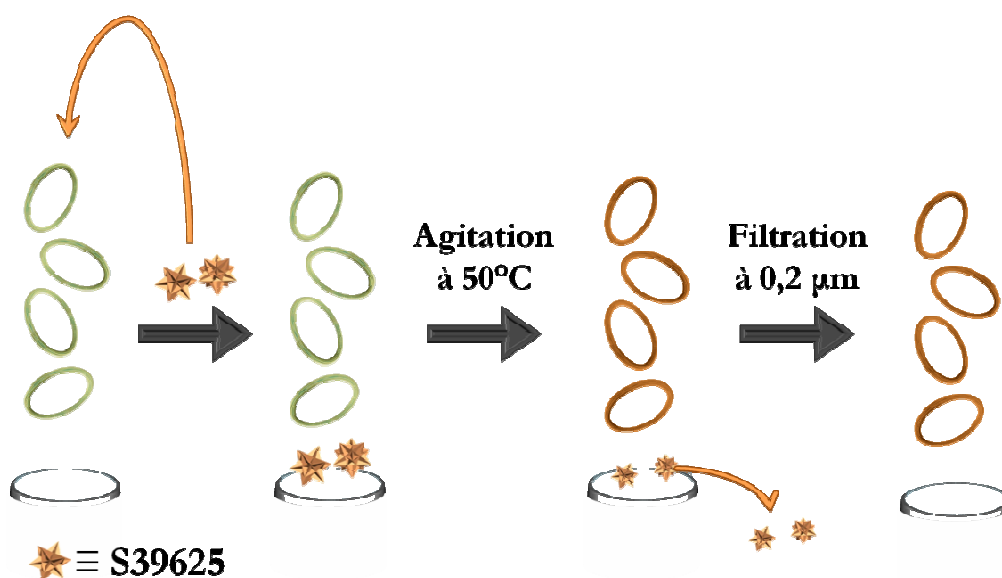


Figure III-4 – Méthode d'inclusion par agitation à 50°C

^d Ratio massique (en %) entre médicament et médicament+transporteur $\times 100$ dans la formulation après traitement

Le phénomène pourrait résulter d'une mobilité accrue des chaînes de polymère induite par la température et facilitant ainsi l'inclusion du principe actif. Par conséquent, la température est un paramètre important pour contrôler le taux d'incorporation du principe actif dans les nanobagues (facteur thermodynamique).

En conclusion, l'inclusion de principe actif dans les nanobagues est contrôlée par l'énergie d'agitation et la température. Le taux d'incorporation a été amélioré par une agitation plus énergétique, une mise en contact plus longue et une température plus élevée.

III-2-4-3- Etude de l'effet d'un co-solvant sur le taux d'incorporation du S39625

Dans cette partie, nous avons voulu étudier l'effet de l'ajout d'un co-solvant organique à la solution de nanobague sur le taux d'inclusion du S39625. Pour ce faire, deux types de solvant organique ont été sélectionnés :

- ✓ Des solvants organiques miscibles à l'eau (et également solvants du S39625) tels que le méthanol, l'acétonitrile ou le DMSO afin d'augmenter la solubilité dans l'eau du principe actif et d'améliorer son taux d'incorporation dans les nanobagues.
- ✓ Des solvants organiques, bon solvant du S39625, tels que le dichlorométhane (25 mg/mL) ou un mélange dichlorométhane/méthanol 50/50 (15 mg/mL).

L'incorporation du S39625 par des solutions de nanobague a été réalisée par la méthode d'agitation à 50°C pendant 12 heures en présence des différents co-solvants. Le co-solvant a été ajouté à la solution de nanobague et de principe actif à l'état de poudre au début du processus d'inclusion. Dans le cas des solvants miscible à l'eau, l'inclusion est conduite en milieu hétérogène solide/liquide, et, dans le cas de bon solvant du S39626, en milieu biphasique liquide.

A l'issue de la séquence d'inclusion, chaque solution a ensuite été filtrée pour éliminer l'excès de principe actif et un spectre d'absorption UV a été enregistré (Figure III-5).

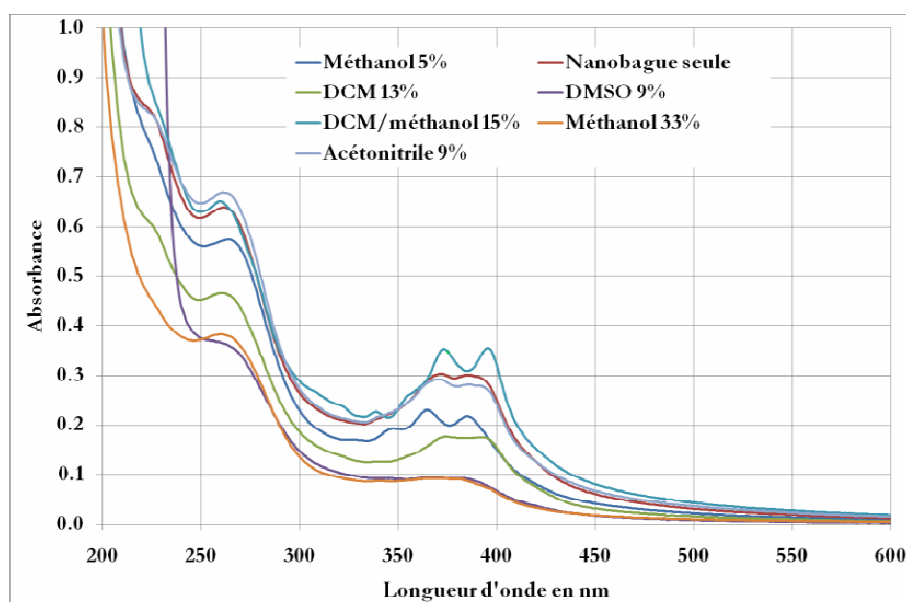


Figure III-5 – Inclusion de S39625 dans les nanobaguettes par la méthode d'agitation à 50°C en présence de différents co-solvants

Chacun des échantillons montre une incorporation de S39625, du fait de la présence des pics caractéristiques de cette molécule mais à des taux d'incorporation différents (Tableau III-3).

Tableau III-3 – Effet de l'ajout d'un co-solvant sur le taux d'inclusion du S39625 dans les nanobaguettes

Solvant (% dans l'eau)	Solubilité du S39625 dans le solvant (en mg/mL)	Taux d'inclusion du S39625 (en %)	Concentration de S39625 / Nanobaguettes ($\mu\text{g/mL}$ / mg/mL)
Méthanol (5%)	0,20 mg/mL	2,8%	41 / 1,43
Méthanol (33%)	0,20 mg/mL	1,2%	12 / 1,00
Acétonitrile (9%)	0,26 mg/mL	4,0%	56 / 1,36
DMSO (9%)	8,30 mg/mL	0,9%	12 / 1,36
DCM (13%)	25,0 mg/mL	2,4%	32 / 1,30
DCM / Méthanol (15%)	15,0 mg/mL	5,5%	72 / 1,25
Nanobague seule	-	3,8%	61 / 1,50

L'analyse des différents échantillons a mis en évidence que l'utilisation de solvants miscibles à l'eau a un effet plutôt négatif sur le taux d'incorporation du principe actif dans les nanobaguettes puisqu'une baisse de celui-ci est observée dans la plupart des cas. De la même façon, l'emploi d'un bon solvant du S39625 tel que le dichlorométhane ne montre aucun effet bénéfique sur les taux d'inclusion.

L'amélioration du taux d'inclusion de S39625 est obtenue par l'utilisation d'un mélange 50/50 de dichlorométhane et de méthanol avec une augmentation du taux d'inclusion à 5,5% (nanobague seule : 3,8%). Ce mélange de co-solvant a la capacité à la fois de solubiliser en partie le principe actif et aussi les nanobagues.

En conclusion, cette étude a mis en évidence l'amélioration du taux d'incorporation du principe actif par l'utilisation d'un co-solvant qui devra à la fois être un bon solvant du principe actif et du transporteur pour induire une meilleure encapsulation dans les nanobagues. Néanmoins, l'utilisation du mélange dichlorométhane/méthanol ne semble pas envisageable pour l'incorporation de molécules thérapeutiques du fait de la toxicité du dichlorométhane et du méthanol.

III-2-4-4- Effet de la concentration des nanobagues sur l'inclusion de S39625

Une dernière étude a consisté à évaluer l'effet de la concentration des solutions de nanobague sur le taux d'incorporation du principe actif. Pour cela, deux solutions de nanobague ont été préparées à deux concentrations différentes (1,5 mg/mL et 10 mg/mL). Elles ont été utilisées pour l'inclusion de S39625 par chauffage à 50°C pendant 12 heures, sans ajout de co-solvant organique. Chaque solution a été filtrée pour éliminer l'excès de principe actif et un spectre d'absorption UV est enregistré (Figure III-6).

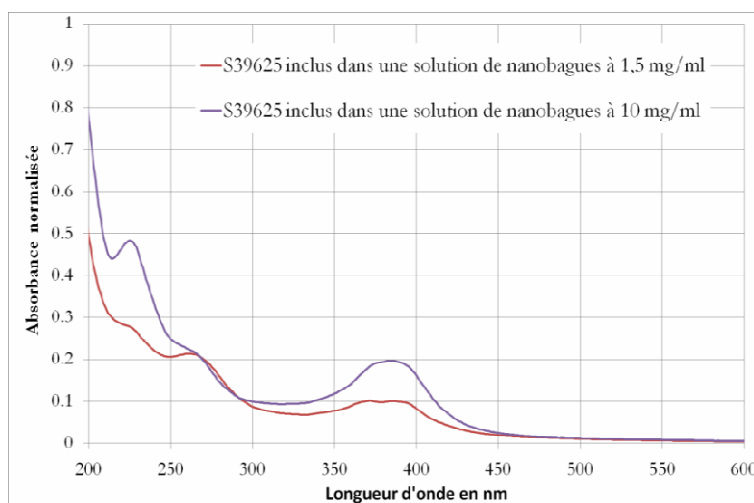


Figure III-6 – Inclusion de S39625 par des solutions de nanobagues à 1,5 mg/mL et 10 mg/mL

L'examen des deux échantillons de S39625 inclus dans les solutions de nanobagues à 1,5 mg/mL et 10 mg/mL a révélé l'effet de la concentration sur le taux d'incorporation du principe actif. En effet, l'augmentation de la concentration en nanobagues a conduit à l'amélioration du taux d'inclusion de 3,8% à 7,1% (Tableau III-4), ainsi qu'à une amélioration de la solubilité dans

l'eau du principe actif par un facteur 8500, avec une concentration de 765 µg/mL, par rapport au principe actif seul. Il peut être remarqué que la solubilité du S39625 n'évolue pas linéairement avec la concentration de la solution en nanobague. En effet, une augmentation de la concentration en nanobague d'un facteur 6,7 conduit à une augmentation de la solubilité du principe actif d'un facteur 12,5.

Tableau III-4 – Effet de la concentration des solutions de nanobague sur le taux d'incorporation

Concentration de la solution de nanobague (en mg/mL)	Taux d'inclusion du S39625 (en %)	Concentration du S39625 (en µg/mL)
1,5	3,8	61
10,0	7,1	765

En résumé, l'inclusion du S39625 dans les nanobagues en solution aqueuse est donc gouvernée par plusieurs paramètres :

- ✓ L'énergie d'agitation fournie lors de l'inclusion du S39625 dans les nanobagues ;
- ✓ la température d'inclusion du S39625 dans les nanobagues – augmentation de la température de 20°C à 50°C permettant une meilleur solubilité du PA ;
- ✓ la concentration de la solution de nanobagues – augmentation de la concentration de 1,5 mg/mL à 10 mg/mL qui permet également une meilleur solubilité du PA.

L'étude par absorption UV de principe actif inclus dans les nanobagues a permis de trouver les conditions optimales d'inclusion ainsi que les taux d'incorporation associés. Néanmoins, les taux d'inclusion doivent être confirmés par une autre méthode car l'hypothèse, suivant laquelle les coefficients d'extinction molaire du S39625 dans le méthanol et inclus dans les nanobagues étaient identiques, n'a pu être confirmée ou infirmée à l'issu de cette étude. De ce fait, une nouvelle méthode de mesure du S39625 doit être mise au point pour permettre de mesurer, dans les mêmes conditions, la quantité de principe actif inclus dans les nanobagues et en solution.

III-2-4-5- Détermination du taux d'inclusion du S39625 par HPLC

Afin d'affiner la valeur du taux d'inclusion du S39625 dans les nanobagues, une méthode HPLC en phase inverse a été mise au point. Cette technique se base sur la différence d'interaction des molécules entre la phase mobile (éluant) et la phase stationnaire (colonne de silice greffée).

Cette différence se répercute sur les temps de rétention de ces molécules. Pour des conditions HPLC données, une même molécule aura toujours le même temps de rétention.

Dans le cadre de cette étude, des conditions standards d'analyse ont été utilisées :

- ✓ Phase stationnaire en phase inverse : colonne de silice greffée RP-18^e munie d'une pré-colonne.
- ✓ Phase mobile : gradient d'eau et d'acétonitrile, de 5% à 100% d'acétonitrile en 30 minutes.

Dans les conditions HPLC en phase inverse, les molécules polaires sortent à des temps de rétention courts car celles-ci sont moins retenues par la phase stationnaire que les molécules non polaires. La détection du S39625 en sortie de colonne est réalisée par un détecteur UV à une longueur d'onde fixe de 385 nm (maximum d'absorption du principe actif / Figure III-2 – *gauche*). Enfin, une étude préliminaire a mis en évidence les nanobagues étaient retenues par la pré-colonne et que le S39625 était rapidement relargué des nanobagues.

Afin de quantifier le S39625 inclus dans les nanobagues, une courbe de calibrage HPLC a été réalisée à partir de solution de S39625 dans l'acétonitrile dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus et qui seront utilisées par la suite (Figure III-7).

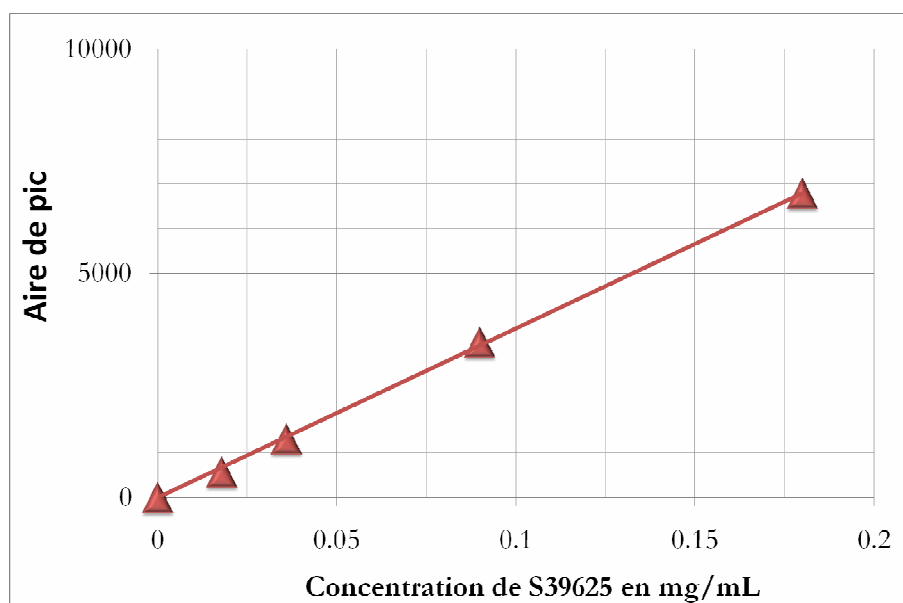


Figure III-7 – Courbe de calibrage en concentration du S39625 par HPLC

L'inclusion du principe actif dans les nanobagues a été effectuée par addition de principe actif dans 1 mL d'une solution de nanobagues à 2,5 mg/mL. Les solutions ont été agitées et

^e Colonne de silice greffée par des groupements diméthyl-octadécylsilane.

chauffées à 50°C dans un carrousel muni d'un système de condensation pendant 12 heures. Les solutions sont ensuite filtrées à froid (filtre 0,2 µm) pour éliminer le principe actif en excès et injectées en HPLC.

Le chromatogramme de la solution de principe actif inclus dans les nanobagues présente un pic majoritaire avec un temps de rétention de 26,6 minutes (Figure III-8 – 2) qui correspond au S39625 en solution dans l'acétonitrile (Figure III-8 – 1) dont le temps de rétention est de 26,7 minutes. Les pics minoritaires présents dans le chromatogramme du principe actif inclus dans les nanobagues proviennent très probablement de la dégradation d'une partie du principe actif en différents sous-produits plus ou moins polaires. Néanmoins, le produit très majoritaire est le S39625.

A partir de la courbe de calibrage du S39625 (Figure III-7), la concentration et le taux d'inclusion du S39625 dans les nanobagues peuvent être déterminés, et donnent les résultats suivants :

Taux d'inclusion du S39625 dans les nanobagues	9,1%
Concentration du S39625 dans l'eau	0,25 mg/mL

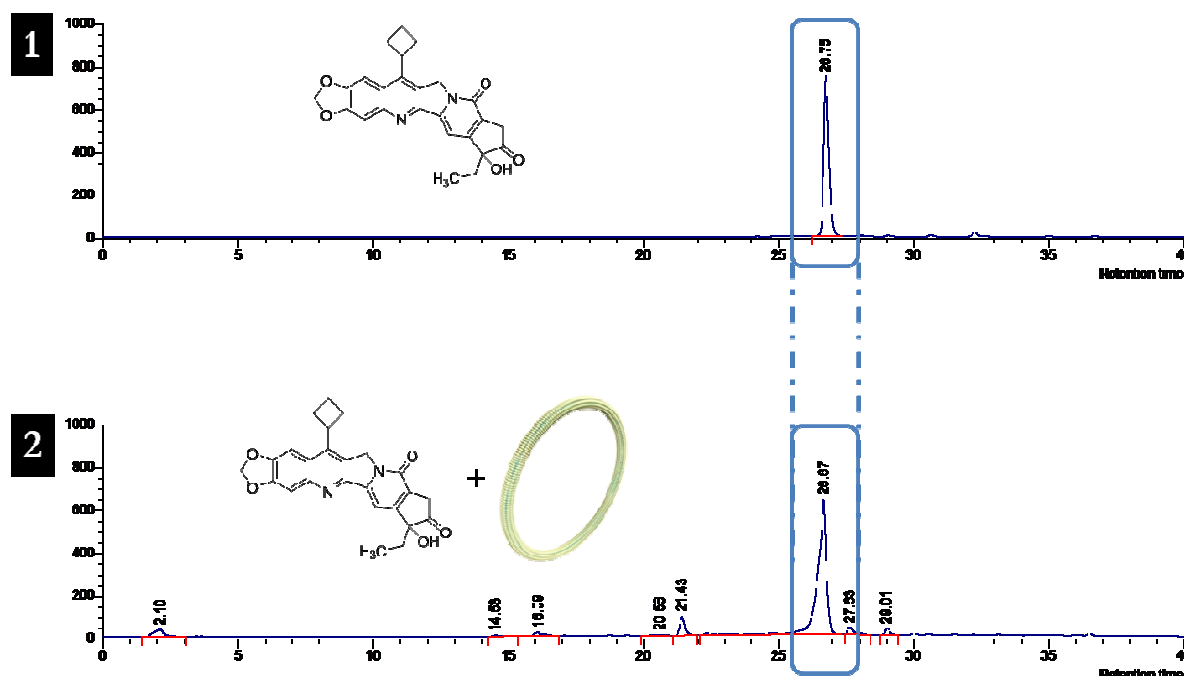


Figure III-8 – Détermination du taux d'inclusion du S39625 dans les nanobagues par HPLC

(1) Chromatogramme du S39625 en solution dans l'acétonitrile ; (2) Chromatogramme du S39625 inclus dans les nanobagues

Les résultats obtenus par HPLC présentent des taux d'inclusion légèrement plus important que ceux déterminés par la méthode d'absorption UV. Cette dernière méthode semble moins précise du fait de la différence de coefficient d'extinction molaire du S39625 solubilisé dans le méthanol et inclus dans les nanobagues, et de l'élargissement des pics du S39625 inclus dans la nanobague. Ces différents facteurs induisent une erreur expérimentale, conduisant à la sous-estimation du taux d'inclusion du S39625 par cette méthode.

III-2-4-6- Comparaison des taux d'inclusion du S39625 avec différentes formulations

Différentes formulations ont déjà été explorées par les laboratoires Servier à Orléans avec pour objectif une solubilisation du S39625 à une concentration d'au moins 0,20 mg/mL.

Différentes voies de solubilisation du S39625 ont été testées :

- ✓ La solubilisation par des mélanges de solvants organiques biocompatibles (éthanol, *N,N*-diméthylacétamide, poly(éthylène glycol) ...) et d'adjuvants (huiles, cyclodextrine, Crémophor ELP, surfactants ...) a permis la solubilisation du S39625 à des concentrations comprises entre 0,01 et 0,2 mg/mL.
- ✓ L'utilisation de liposomes furtifs a permis d'atteindre les solubilités désirées de 0,2 mg/mL.
- ✓ L'utilisation de systèmes micellaires a conduit à l'incorporation de S39625 avec des taux d'inclusion de 2,4%.

La formulation dans les nanobagues a conduit à la solubilisation de S39625 avec des concentrations intéressantes de 0,76 mg/mL et des taux d'incorporation de 9,1%. Toutefois, il est important, en vue d'une application pharmaceutique, de tester la toxicité de la formulation nanobague avant de la comparer avec les différentes formulations existantes.

III-2-5- Etude toxicologique des nanobagues

Une étude préliminaire du profil de sécurité des nanobagues, *in-vitro* et *in-vivo*, a été évaluée par la société Biologie Servier.

Le domaine de sécurité des nanobagues a, dans un premier temps, été évaluée *in vitro* par le test d'AMES II. Ce test consiste à déterminer le potentiel mutagène d'un composé chimique chez différentes souches de *Salmonella Typhimurium*. Ce test rapide est donc utilisé dans le but d'estimer le potentiel cancérigène d'une substance. Les nanobagues n'ont pas présenté de potentiel génotoxique dans le test de mutation génétique *in vitro* sur bactéries AMES II jusqu'à

une concentration de 2,7 mg/ml en absence d'activation métabolique. Le test du micronoyau *in vitro* sur les nanobagues n'a pas montré, lui aussi, de propriétés clastogénique^f ou aneugénique^g sur cellules eucaryotes à l'issue d'une exposition de 3 heures sans activation métabolique. Il est à noter cependant une perte de cellules dans un délai de 21 heures après exposition de 3 heures.

Dans un deuxième temps, le profil de sécurité des nanobagues a été évalué *in vivo*. Les nanobagues ont présenté une bonne tolérance dans des conditions d'évaluation des propriétés pharmacologiques en oncologie chez l'animal. Après administration unique par voie intraveineuse chez la souris B6D2F1 à la dose de 300 mg/kg (sous un volume de 10 mL/kg), aucun effet notable n'a été reporté sur le comportement clinique, la consommation alimentaire ou l'évolution pondérale ainsi qu'à l'issue d'une évaluation anatomopathologique réalisée 4 jours après injection.

Enfin, le profil de sécurité du S39625 formulé dans les nanobagues a ensuite été évalué *in vivo* chez la souris B6D2F1 selon ce même schéma d'administration. La dose pharmacologiquement active de 10 mg S39625/kg, correspondant à 300 mg nanobagues/kg, a été bien tolérée cliniquement et n'induit qu'une perte de poids très modeste au cours des 3 jours suivant l'administration. L'évaluation anatomopathologique des principaux organes et tissus réalisée 4 jours après injection met en évidence les cibles de toxicité précédemment documentées pour cette molécule, en lien avec des effets pharmacologiques exacerbés sur les tissus à renouvellement rapide préférentiellement (moelle osseuse, thymus, rate, muqueuses digestives, ...), sans différence notable avec les modifications reportées pour d'autres formulations de S39625.

III-2-6- Conclusion

L'évaluation des nanobagues comme agent de solubilisation de principes actifs a montré que cette espèce présente des applications prometteuses dans le domaine de la vectorisation de médicaments. En effet, les nanobagues permettent d'inclure une quantité importante de principe actif avec un taux d'inclusion de 9,1% et une concentration dans l'eau de 0,76 mg/mL. Ces taux d'inclusion ainsi que les solubilités du S39625 en solution sont parmi les meilleurs en comparaison de l'expérience acquise à Technologie Servier. Enfin, les études préliminaires de toxicité *in vitro* et *in vivo* n'ont montré aucune toxicité apparente des nanobagues.

^f Propriété d'un agent à rompre en plusieurs segments et à altérer la structure des chromosomes

^g Propriété d'un agent à provoquer des anomalies dans le nombre de chromosomes

III-3- Nouveau système de vectorisation du S39625

L'étude précédente a mis en évidence la capacité des nanobagues à solubiliser des molécules hydrophobes telles que le S39625 avec des taux d'inclusion important de 9,1% avec une solubilité améliorée de 8500 fois.

Malgré cela, et afin de mettre en évidence un effet « nanobague », sur la solubilisation de S39625, qui démontrerait la supériorité de cette structuration en comparaison d'autres structurations alternatives, une étude contrôle a été menée avec différentes structurations plus simples du tensio-actif **II-4**.

Dans un premier temps, nous nous proposons de présenter la structure des différentes organisations de **II-4** en solution aqueuse, avant d'exposer, les différentes études menées sur certains de ces assemblages.

III-3-1- Autoassemblage supramoléculaire de l'amphiphile **II-4** en solution

III-3-1-1- Structuration des amphiphiles en solution

Les molécules amphiphiles sont des espèces chimiques antagonistes, à la fois hydrophiles et hydrophobes, qui ont la propriété de s'organiser spontanément en solution aqueuse sous différentes microstructures (Figure III-9). La forme de ces assemblages est gouvernée par la structure chimique et géométrique du surfactant et des conditions expérimentales (concentration de l'amphiphile, teneur en sels, pH et température). L'architecture de ces structures peut être prédite par la détermination du paramètre d'empilement critique CPP (*cf chapitre 2*).³

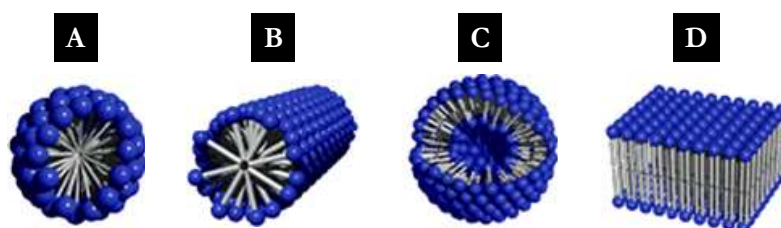


Figure III-9 – Structure des assemblages d'amphiphiles : (A) Micelle sphérique ; (B) Micelle cylindrique ; (C) Vésicule/liposome ; (D) Bicouche

Les amphiphiles chiraux présentent des propriétés particulières d'assemblage supramoléculaire en solution aqueuse. En effet, certains types de tensio-actifs chiraux ont la capacité de former une structure en bicouche, de largeur déterminée, similaire à un ruban. Ces

rubans peuvent évoluer vers une structure en nanotube, par un processus appelé « autoassemblage moléculaire chiral ». ^{4,5}

Ce mécanisme se base sur les interactions chirales entre molécules qui induisent un empilement dans une orientation spécifique, incitant les bicouches d'amphiphile à s'enrouler sur elles-mêmes (Figure III-10). Cet enroulement induit la formation d'un nanotube creux avec les têtes polaires orientées à l'intérieur et à l'extérieur de ce tube.

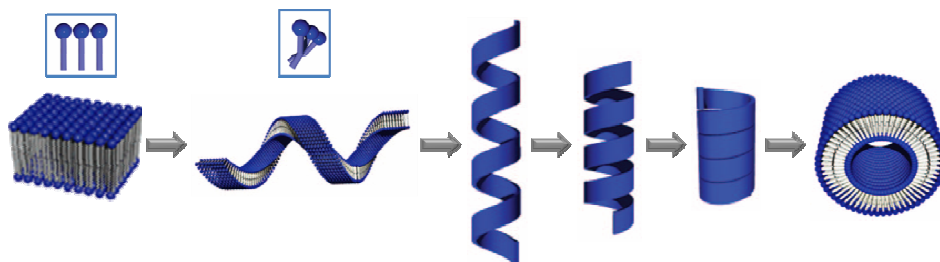


Figure III-10 – Enroulement de bicouche d'amphiphiles chiraux et formation de nanotubes creux

Certains types d'amphiphiles diacétyléniques présentent cette propriété particulière de former des bicouches et des nanotubes organiques. ⁶⁻⁹ Ces tensio-actifs peuvent être polymérisés par irradiation lumineuse à 254 nm. Les polydiacétyléniques formés exhibent des propriétés colorimétriques étonnantes selon la structure de l'assemblage moléculaire qui évolue avec la température. En effet, il a été montré que les polydiacétyléniques donnent une coloration violette pour une structuration en bicouche, à température ambiante, et une coloration rouge pour une structuration en nanotube par élévation de la température qui induit l'enroulement de la bicouche.

Les propriétés particulières des diacétyléniques nous ont conduits à explorer les différentes structurations possibles de l'amphiphile **II-4** qui présente les caractéristiques de chiralité, par son motif L-lysine, et de polymère diacétylénique également.

III-3-1-2- Structurations de l'amphiphile II-4

Cette étude a consisté à mettre en évidence les différentes structurations de l'amphiphile **II-4** selon le pH et la température des solutions. Comme nous l'avons mentionné précédemment, cette molécule est soluble à partir d'un pH égal à 3 (Schéma III-1).

Dans un premier temps, une solution aqueuse de **II-4** à pH=7 (eau milliQ dont le pH a été ajusté à 7) a été préparée puis polymérisée par irradiation lumineuse à 254 nm pendant 4 heures. Au terme de la polymérisation, la solution incolore est devenue violette foncée (Figure III-11). Le chauffage de la solution B à 80°C provoque un nouveau changement de couleur du

violet foncé au rouge clair, après quelques minutes. Le comportement de ce polydiacétylénique semble similaire à ceux décrits dans la littérature.

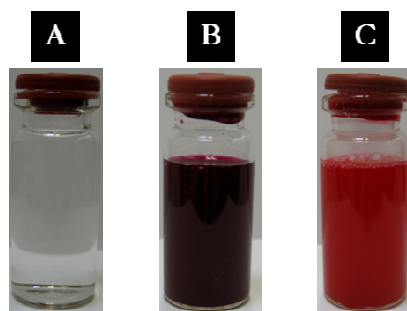


Figure III-11 – (A) Solution de **II-4** non polymérisée à pH=7 (B) Solution de **II-4** polymérisée à température ambiante (C) Solution de **II-4** polymérisée chauffée à 80°C

Pour visualiser ces changements de conformation, les échantillons B et C ont été observés par microscopie électronique à transmission par coloration négative à l'acétate d'uranyle.

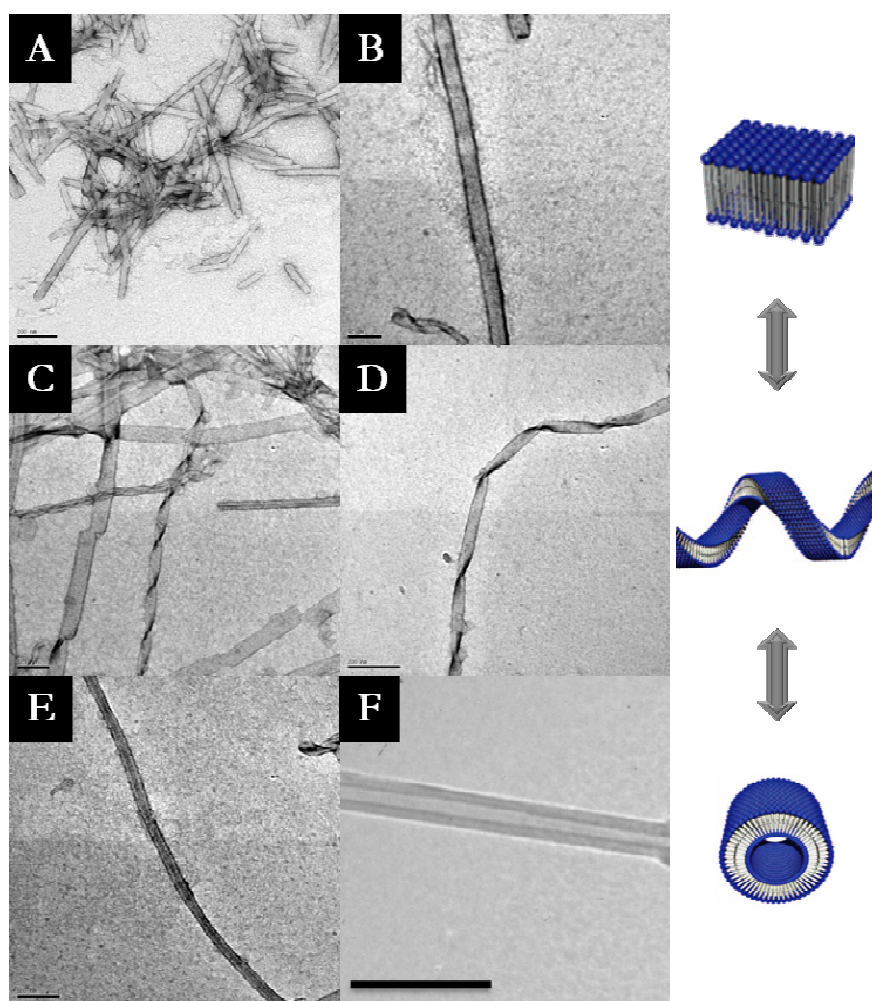


Figure III-12 – (A&B) Images MET de bicouches d'amphiphiles **II-4** (C&D) Images MET d'enroulement de la bicouche par chauffage (E&F) Images MET d'un nanotube de **II-4**
Echelles : (A) 200 nm (B) 50 nm (C) 100 nm (D) 200 nm (E) 100 nm (F) 50 nm

La polymérisation de **II-4** en solution à pH=7 et à température ambiante conduit à une coloration violette des solutions avec une structuration de l'amphiphile sous forme de bicouches (Figure III-12 – *A&B*). Le chauffage de cette solution provoque l'enroulement de cette bicouche (Figure III-12 – *C&D*) pour former une solution de couleur rouge constituée de l'amphiphile sous forme de nanotubes (Figure III-12 – *E&F*). Ce processus est réversible tant que la température de chauffage ne dépasse pas les 100°C pendant plusieurs minutes. Des études ont montré que cette réversibilité était due à des mouvements thermiques et des déformations du système de liaisons hydrogènes entre amphiphiles.¹⁰ Une élévation de la température trop importante peut détruire le système de liaison hydrogène et ainsi rendre la déformation irréversible. Dans ce cas, l'amphiphile garde sa structuration en nanotubes.

La préparation d'une solution incolore de **II-4** à pH=12 et polymérisée par irradiation lumineuse à 254 nm pendant 4 heures provoque une coloration jaune à température ambiante. Le chauffage de cette solution à 80°C ne provoque aucun changement de couleur. La structuration de **II-4** en fonction de la température semble donc différente de celle observée précédemment. L'observation de cet échantillon par microscopie électronique à transmission par coloration négative à l'acétate d'uranyle présente une structuration différente sous forme de micelle sphérique. La valeur du pH a donc une influence déterminante sur l'auto assemblage de **II-4**. Ceci peut s'expliquer par une modification du volume de la tête polaire « NTA » en fonction du pH. La valeur du paramètre d'empilement critique CPP de l'amphiphile à pH=12 doit correspondre à une structuration en micelles sphériques.

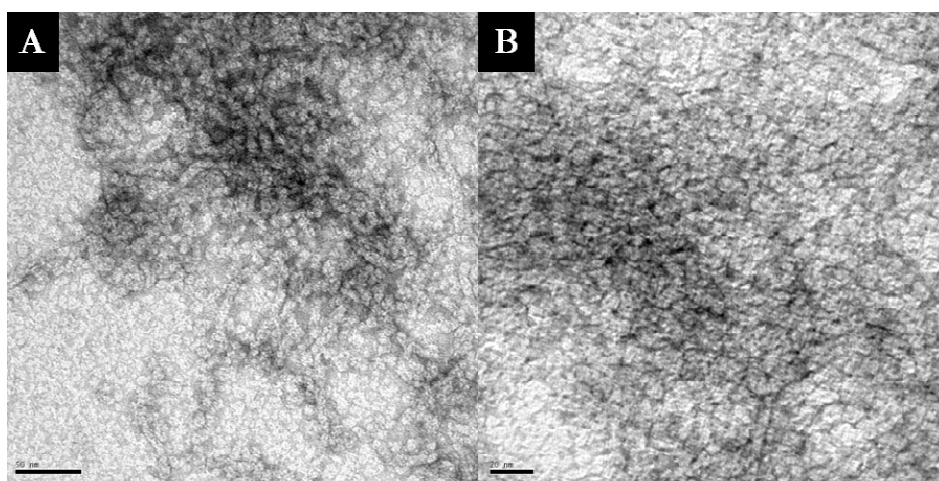


Figure III-13 – Image MET de micelles sphériques polymérisées (*A&B*)
Echelles : (A) 50 nm (B) 20 nm

L'amphiphile **II-4** présente ainsi, selon les conditions du milieu, différentes structurations en micelle sphérique, en bicouche ou en nanotube. Malgré cela, dans la suite de l'étude, nous

exposerons uniquement les résultats des tests d'inclusion menées sur les micelles sphériques du fait de la faible solubilité des arrangements en bicouche et en nanotube.

III-3-2- Préparation et caractérisation des micelles de surfactants **II-4**

Les micelles sphériques sont des arrangements de tensio-actifs obtenus à une concentration supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). Ces organisations de forme sphérique ont une surface hydrophile et un cœur lipophile.

Le tensio-actif **II-4** s'arrange sous forme de micelles sphériques lorsque le pH de la solution aqueuse est supérieur à 10 (valeur du pKa de l'amine tertiaire de l'amphiphile **II-4** / Schéma III-1). Deux phénomènes peuvent intervenir : au-delà du pH=10, le doublet non liant de l'amine tertiaire de la partie hydrophile du surfactant est libéré, conduisant à l'augmentation du volume de la tête polaire, et en dessous de cette valeur de pH, des liaisons hydrogènes peuvent s'établir entre les carboxylates et l'hydrogène de l'amine tertiaire protonée, conduisant à la diminution du volume de la tête « NTA » (Figure III-14).

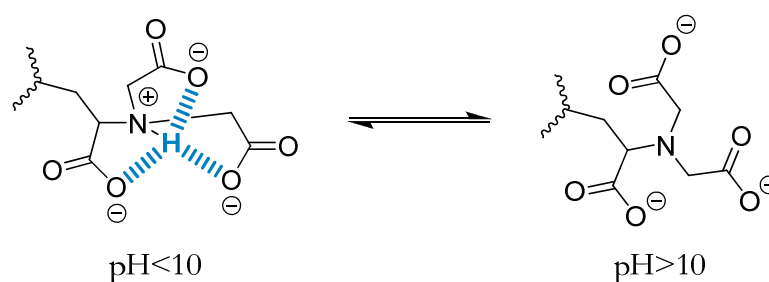


Figure III-14 – Effet du pH sur la structure de la tête « NTA »

Ainsi, le paramètre d'empilement critique (*cf chapitre II-2-1*) est abaissé pour atteindre une valeur caractéristique des micelles sphériques ($CPP < 0,33$). Par la suite, pour des raisons de simplicité, le terme « micelle » fera référence aux micelles sphériques.

Parmi les différents systèmes auto-assemblés, deux types de micelles du surfactant **II-4** ont été plus particulièrement étudiés dans cette partie : la micelle non-polymérisée et la micelle polymérisée (Figure III-15). Cette dernière est préparée par irradiation lumineuse à 254 nm d'une solution aqueuse à pH=12 de **II-4** pendant 5 heures puis le pH est ajusté au pH physiologique par dialyse contre une solution à un pH compris entre 7 et 8.



Figure III-15 – (A) Formation des micelles à $\text{pH} > 10$; (B) Polymérisation des micelles par irradiation lumineuse à 254 nm

La micelle non-polymérisée et la micelle polymérisée ont été caractérisées par différentes techniques telles que l'absorption UV, la diffusion de la lumière ou la diffusion des neutrons aux petits angles.

III-3-2-1- Etude de la polymérisation des micelles

Afin de mettre en évidence la polymérisation de l'amphiphile **II-4**, une étude cinétique a été conduite. Pour ce faire, une solution de micelles de l'amphiphile **II-4** a été préparée à 20 mg/mL puis polymérisée par irradiation lumineuse à 254 nm. Des aliquotes sont prélevés à différents intervalles de temps, et un spectre d'absorption UV est enregistré pour chacun d'eux (Figure III-16-A). Au cours de la polymérisation, les spectres UV montrent une augmentation de l'absorption au dessus de 270 nm, provenant d'un changement de la structure chimique de la micelle. Cette augmentation met donc en évidence la polymérisation des amphiphiles constitutifs de la micelle. De plus, l'augmentation de l'absorbance au dessus de 300 nm rend compte du changement de couleur d'incolore vers le jaune.

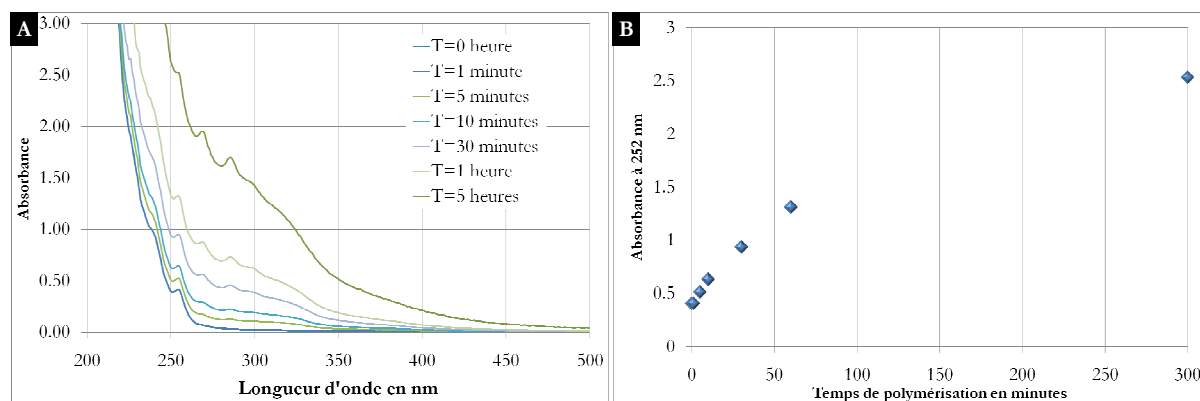


Figure III-16 – (A) Spectres d'absorption UV des différents aliquotes (B) Cinétique de polymérisation de la micelle de **II-4**

La courbe de cinétique de polymérisation de la micelle de **II-4** (Figure III-16-B) met en évidence que la polymérisation par irradiation lumineuse de l'amphiphile **II-4**, structuré sous forme de micelles, est un processus relativement lent et qu'une conversion de la totalité des

amphiphiles **II-4** en polydiacétylénique devrait être atteinte pour des temps de polymérisation au-delà de 5 heures.

III-3-2-2- Caractérisation des micelles par diffusion de la lumière

L'analyse de ces échantillons a été réalisée par granulométrie laser à l'aide de deux appareils, le Nanophox (Société SympaTEC) et le Malvern Zetasizer. Cette technique, basée sur la diffusion quasi élastique de la lumière et la spectroscopie croisée de corrélation de photon, permet de déterminer la distribution en taille d'un échantillon.

Deux types de distribution en taille ont été utilisés au cours de cette étude :

- ✓ une distribution en taille par intensité diffusée qui est déterminée directement à partir des données brutes - cette distribution donne l'intensité diffusée par des particules en fonction de leur taille.
- ✓ une distribution en taille par nombre – cette distribution donne le nombre de particules en fonction de leur taille.

La distribution par intensité est plus sensible aux grosses particules qui diffusent plus que les petites. De ce fait, l'analyse par intensité mettra d'avantage en évidence les particules de grosse taille tandis que l'analyse par nombre fera d'avantage état des petites particules.

Des solutions de micelles non-polymérisées et polymérisées ont été préparées à 1 mg/mL pour l'analyse de taille par l'appareil « Malvern Zetasizer », et à 50 mg/mL pour l'analyse de taille des micelles polymérisées par l'appareil « Nanophox ».

Micelles non-polymérisées

La distribution en taille par intensité diffusée de l'échantillon de micelles non-polymérisées (1 mg/mL) met en évidence la présence de deux populations avec des tailles moyennes de 7,2 et de 210 nm (Figure III-17 – A). L'analyse en nombre met en évidence la présence majoritaire d'une population centrée sur 6,5 nm avec un indice de polydispersité faible (PDI) de 0,5 qui est caractéristique d'objets quasiment monodisperses (Figure III-17 – B). La population à 210 nm est très minoritaire et découle très probablement d'un phénomène d'agrégation puisque la distribution en taille de cette population change avec la concentration.

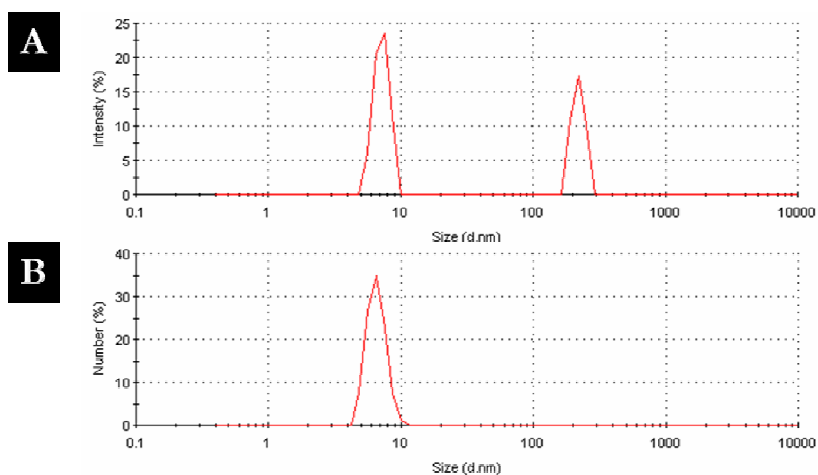


Figure III-17 – (A) Distribution en intensité des micelles non polymérisées (B) Distribution en nombre des micelles non polymérisées

Micelles polymérisées

L'analyse en intensité de l'échantillon de micelles polymérisées à 50 mg/mL par l'appareil « Nanophox » présente deux pics de population à 4,9 et 140 nm (Figure III-18 – B). Comme pour les micelles non-polymérisées, la distribution en taille de la population à 140 nm évolue avec la concentration et résulte très certainement d'un phénomène d'agrégation.

L'analyse en nombre de l'échantillon de micelles polymérisées à 1 mg/mL, par l'appareil « Malvern Zetasizer », a mis en évidence la présence d'une population unique à 5,1 nm avec un faible indice de polydispersité de 0,31 (Figure III-18 – A).

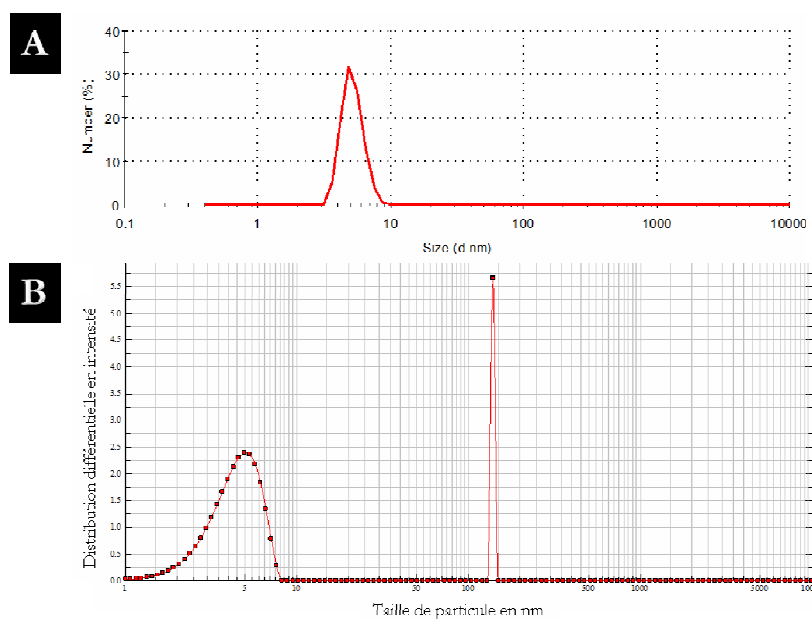


Figure III-18 – (A) Distribution en intensité des micelles polymérisées à 50 mg/mL (Nanophox) (B) Distribution en nombre des micelles polymérisées à 1 mg/mL (Malvern)

En résumé, l'analyse par diffusion de lumière des échantillons de micelles non-polymérisées et polymérisées donne les résultats suivants :

Echantillons	Distribution en nombre	Distribution en intensité
Micelle non polymérisée	6,5 nm	7,2 nm
Micelle Polymérisée	5,1 nm	4,9 nm

Au vu de ces résultats, la polymérisation des micelles semble provoquer la diminution de leur diamètre par rapport aux micelles non-polymérisées. Ce phénomène de contraction peut s'expliquer par le fait que la polymérisation fige l'assemblage des amphiphiles et limite les phénomènes de gonflements, ainsi que les phénomènes dynamiques d'échange de tensio-actif vers la solution ou vers une autre micelle comme dans le cas des micelles non polymérisées.

III-3-2-3- Caractérisation des micelles polymérisées par diffusion des neutrons aux petits angles

La diffusion des neutrons aux petits angles est une méthode de choix pour l'étude des particules sphériques telles que les micelles polymérisées. En effet, cette technique permet de caractériser l'objet dans son ensemble et de déterminer des paramètres importants tels que la masse molaire ou le rayon de la particule.

Les intensités diffusées utilisées lors de l'interprétation des résultats sont en unité absolue. Elles sont obtenues par soustraction du témoin puis correction par un facteur de normalisation (erreur sur l'appareillage).

Les expériences de diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA) ont été effectuées dans l'eau lourde afin d'obtenir un maximum de contraste entre les micelles polymérisées et le solvant. Les mesures sont réalisées à différentes fractions massiques en micelles polymérisées (0,3%, 0,5%, 0,7%, et 1%).

Les courbes de diffusion (Figure III-19) mettent en évidence une augmentation de l'intensité diffusée en fonction de la concentration de l'échantillon.

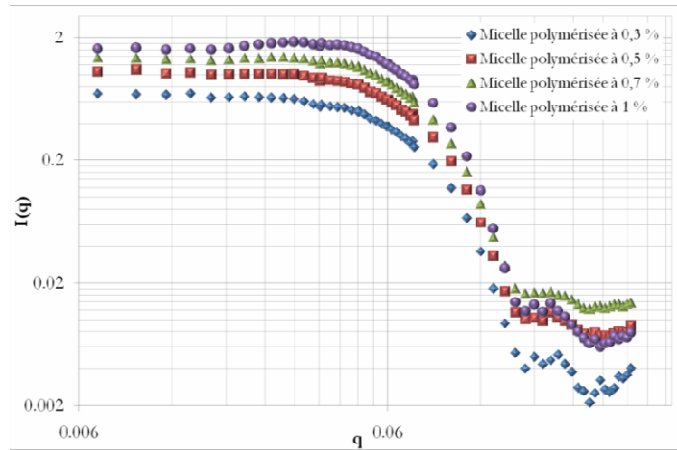


Figure III-19 – Spectres de DNPA des micelles polymérisées à différentes fractions massiques

Dans le domaine de Guinier (pour les petites valeurs de q), le rayon de giration des micelles polymérisées peut être déterminé à l'aide de l'équation suivante :

$$\ln(I(q)) = A - \frac{q^2 R_g^2}{3}$$

Équation III 12

où q est le vecteur d'onde, R_g le rayon de giration et $I(q)$ l'intensité diffusée.

Le tracé du logarithme de l'intensité diffusée en fonction de q^2 permet de déterminer le rayon de giration de l'objet (Figure III-20). La pente de cette droite est égale au carré du rayon de giration sur 3.

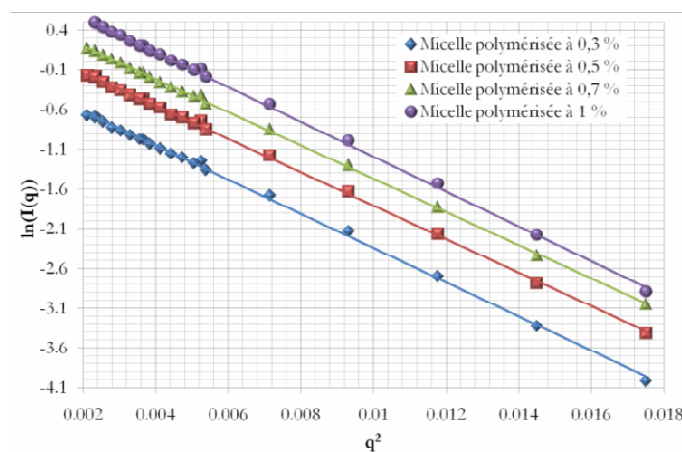


Figure III-20 – Détermination du rayon de giration dans le domaine de Guinier

Les quatre droites présentent une pente quasi identique permettant de calculer une valeur moyenne du rayon de giration de ces objets. Par cette méthode, le rayon de giration obtenu est de $25,3 \pm 1 \text{ \AA}$, correspondant à un rayon de sphère de $32,6 \pm 1,5 \text{ \AA}$.

Dans des systèmes dilués, le facteur de structure d'un objet tend vers 1. L'intensité diffusée, d'un tel système, est fonction du facteur de forme et donc de la taille de l'objet. A l'aide d'un modèle mathématique, la taille des micelles peut être déterminée en modélisant les courbes $I(q)=f(q)$ avec un facteur de forme décrivant une sphère. Le rayon de l'objet peut donc être déterminé par modélisation de chacune des courbes de diffusion (Figure III-21).

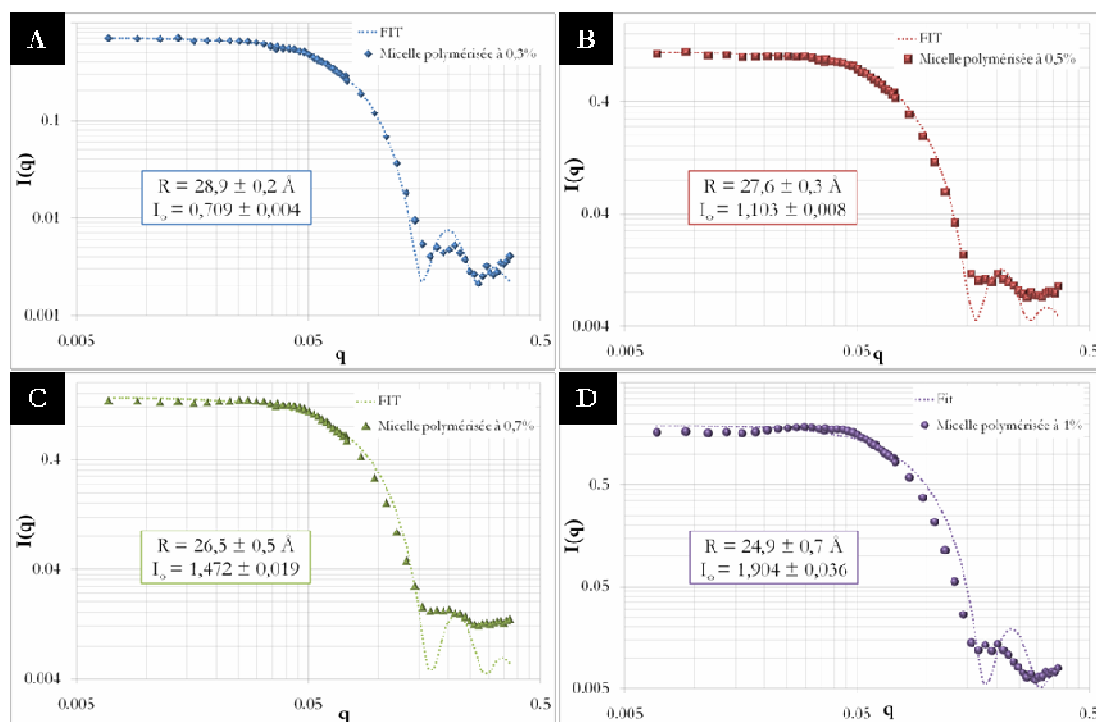


Figure III-21 – Modélisation par un modèle de sphère des courbes de diffusion des échantillons de micelles polymérisées : 0,3% (A), 0,5% (B), 0,7% (C) et 1,0% (D)

On observe que le rayon de la sphère déterminé à partir du modèle de sphère est dépendant de la concentration.

Le rayon des micelles polymérisées diminue de 28,9 à 24,9 Å lorsque la concentration en micelles augmente, ce qui traduit un effet répulsif du système. La surface des micelles polymérisées est en effet chargée négativement. Par conséquent, plus la concentration augmente, plus les effets répulsifs sont importants obligeant alors les micelles à se contracter. Aussi, à partir d'une fraction molaire de 0,7%, on peut observer l'apparition d'un pic de structure aux moyens q , caractéristique des interactions entre particules (Figure III-21 – C & D).

Enfin, il est possible de déterminer la masse apparente des micelles polymérisées par extrapolation à $q \rightarrow 0$ de l'intensité diffusée. L'extrapolation à $q \rightarrow 0$ de l'intensité diffusée peut être écrite de la façon suivante :

$$I(q \rightarrow 0) \cong c \times M_{app} \times (\Delta\rho^2) \times N_A \times (1 - 2 \times M_{app} \times A_2 \times c \dots)$$

Équation III 13

Où c est la concentration, M_{app} la masse molaire, $(\Delta\rho)^2$ le facteur de contraste, N_A le nombre d'Avogadro et A_2 le second coefficient du Viriel.

Le tracé du rapport de l'intensité diffusée à $q=0$ sur la concentration en fonction de la concentration permet de déterminer la masse molaire de la micelle et le signe du coefficient du Viriel (Figure III-22). L'ordonnée à l'origine est égale au produit de la masse molaire, du facteur de contraste et du nombre d'Avogadro.

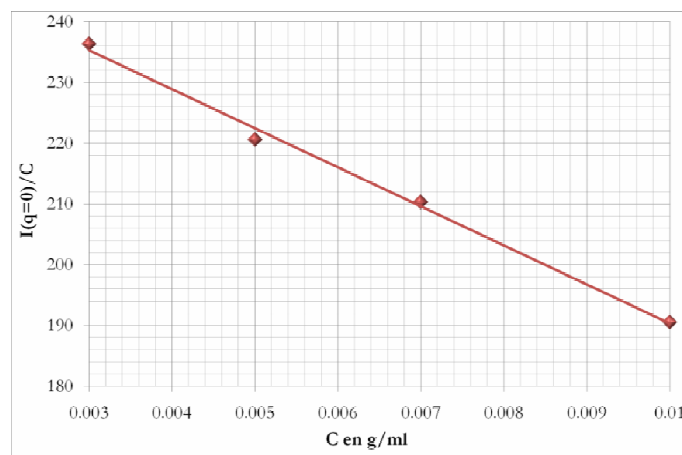


Figure III-22 – Détermination de la masse molaire et du signe du coefficient du Viriel

Par cette méthode, on obtient une masse molaire apparente de **60885 g/mol**. Cette masse nous permet de déterminer un nombre de tensio-actifs par micelle égale à 100 molécules/micelle. La pente de la droite étant négative, le coefficient du Viriel est de signe positif, caractéristique d'un système répulsif.¹¹

La diffusion des neutrons aux petits angles a permis de caractériser les micelles polymérisées :

Domaine de Guinier	$R_g = 25,3 \pm 1 \text{ \AA}$ $R = 32,6 \pm 1,5 \text{ \AA}$
Modélisation par un modèle de sphère	$R = 24,9 \pm 0,7 \text{ \AA}$ à $R = 28,9 \pm 0,2 \text{ \AA}$
Extrapolation à $q = 0$	$M_{app} = 60\ 885 \text{ g/mol}$ $A_2 > 0$, système répulsif

III-3-3- Etude de l'inclusion de principes actifs dans les micelles

Cette étude vise à évaluer la capacité des micelles non-polymérisées et polymérisées à encapsuler des principes actifs hydrophobes afin de pouvoir les comparer avec la formulation nanobague.

III-3-3-1- Etude de l'inclusion du S39625

La première étape de cette étude a consisté à inclure le principe actif S39625 dans les mêmes conditions que celles utilisées dans les nanobagues afin de déterminer et de comparer le taux d'incorporation de ces systèmes micellaires par rapport au système de nanobagues. Pour ce faire, le S39625 a été encapsulé dans des solutions de 10 mg/mL de micelles non-polymérisées et de micelles polymérisées par la méthode « d'agitation et chauffage à 50°C » (Figure III-23).

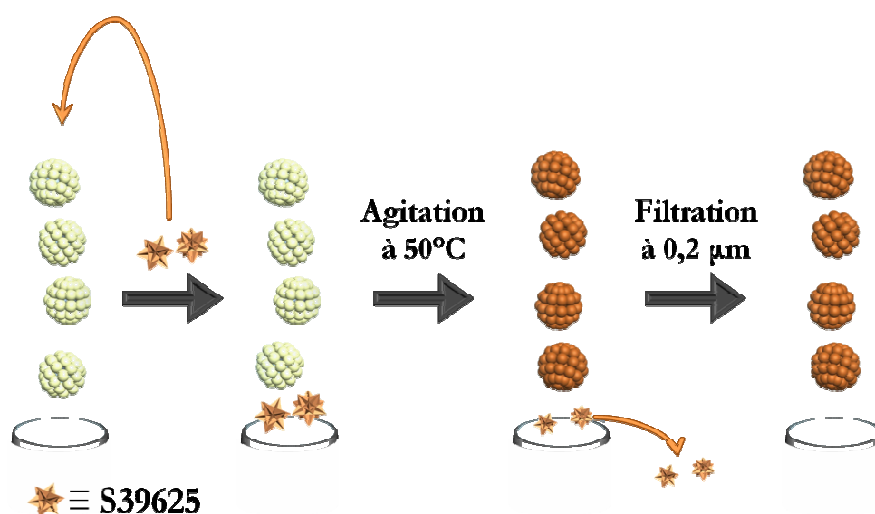


Figure III-23 – Méthode d'inclusion du S39625 dans les micelles

Le taux d'incorporation du S39625 dans les micelles a été déterminé par HPLC, dans les mêmes conditions expérimentales que l'étude menée sur les nanobagues (colonne phase inverse, gradient d'acétonitrile de 5 à 100% en 30 minutes, détection UV à 385 nm). Une courbe d'étalonnage du S39625 dans l'acétonitrile a été réalisée comme précédemment (*cf. partie III-2-4-5*). Dans ces conditions d'HPLC et avec une nouvelle colonne en phase inverse (RP-18), le principe actif, S39625, présente un temps de rétention de 25,8 minutes (Figure III-24 – 1).

Les micelles seules (non-polymérisées et polymérisées) ont, dans un premier temps, été analysées dans le but de mettre en évidence qu'aucun pic n'était détecté sur les chromatogrammes à 385 nm (Figure III-24 – 2).

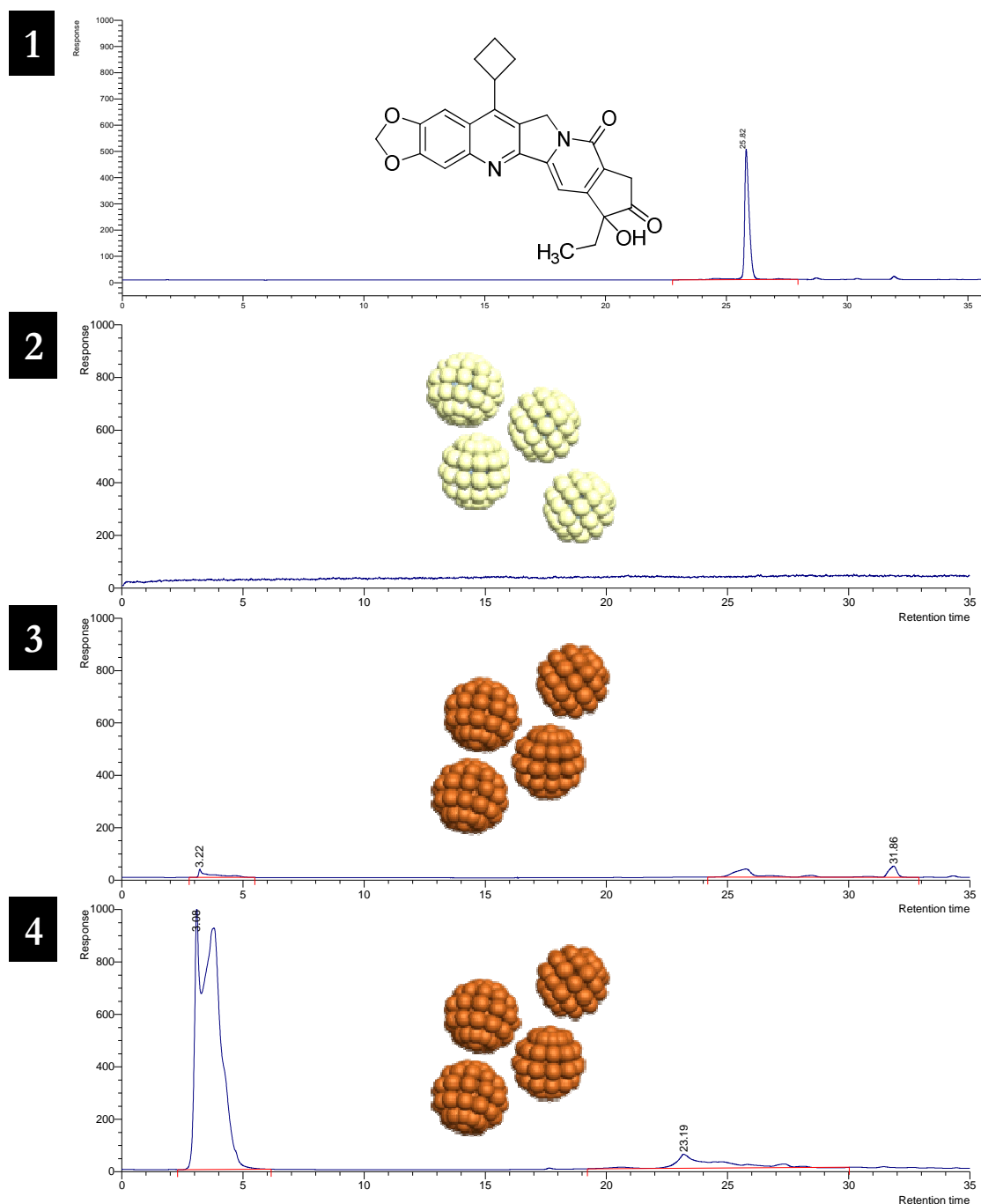


Figure III-24 – (1) Chromatogramme du S39625 dans l'acétonitrile (2) Chromatogramme des micelles non-polymérisées/polymérisées (3) Chromatogramme du S39625 inclus dans les micelles non-polymérisées (4) Chromatogramme du S39625 inclus dans les micelles polymérisées

Le chromatogramme du S39625 inclus dans les micelles non-polymérisées présente trois pics à 3,2 minutes, 25,8 minutes et 31,9 minutes (Figure III-24 – 3). Ces pics étant observés à 385 nm, les espèces détectées ne peuvent être que le principe actif S39625 ou un produit dérivé de cette molécule. De ce fait, à l'aide des courbes étalons du S39625 et de l'aire du pic à 25,8 minutes, le taux d'incorporation du principe actif dans les micelles non-polymérisées est compris entre 1,7 et 3,3%.

A la longueur d'onde utilisée pour la détection, seul le S39625 ou un de ses produits éventuels de dégradation sont détectés. L'observation d'un pic large à un temps de rétention très faible (Figure III-24 – 4) en comparaison de celui du principe actif seul en solution dans l'acétonitrile (25,8 minutes), tend à prouver que le S39625 traverse la colonne en étant toujours inclus dans la micelle polymérisée. Cette forte diminution du temps de rétention montre en effet que l'hydrophobicité du S39625 est fortement masquée par la surface très hydrophile de la micelle et également que l'association S39625/micelles polymérisées est particulièrement robuste.

Les temps de rétention du S39625 encapsulé dans les micelles polymérisées et solubilisé dans l'acétonitrile étant très différents, de nouvelles conditions HPLC ont été mises au point afin de mesurer le principe actif dans les mêmes conditions. Ainsi, le gradient de solvant a été remplacé par un régime isocratique en acétonitrile pur. L'acétonitrile est un solvant dissociant qui ne favorise pas l'auto assemblage en micelle. De plus, ce solvant est un des meilleurs solvants du S39625, et son utilisation en tant qu'éluant permet de s'assurer du relargage très rapide du principe actif et de son élution comme une entité libre.

Le chromatogramme du S39625 solubilisé dans l'acétonitrile présente un pic à 5,2 minutes (Figure III-25 – 1). Celui du S39625 inclus dans la micelle polymérisée présente deux pics à 4,0 minutes et 4,9 minutes (Figure III-25 – 2).

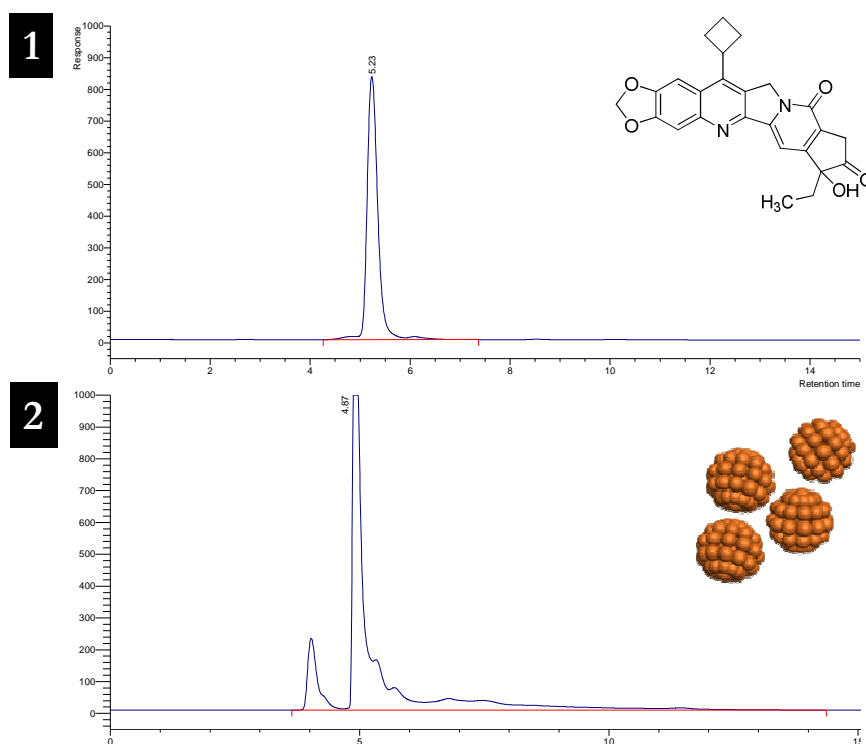


Figure III-25 – (1) chromatogramme du S39625 solubilisé dans l'acétonitrile (2) chromatogramme du S39625 inclus dans les micelles polymérisées

Les temps de rétention des pics du S39625 inclus dans les micelles polymérisées ne coïncidant pas avec ceux de la référence, l'analyse de ces deux pics a été menée par spectroscopie de masse afin de déterminer la nature des espèces séparées. L'analyse des spectres de masse de ces deux pics a mis en évidence la présence du principe actif S39625 et de produits de dégradation de celui-ci (Schéma III-4). Cette analyse montre que la méthode d'inclusion utilisée par chauffage à 50°C n'est pas adaptée pour des principes actifs sensibles, comme pour certains lots de S39625 plus sensibles que d'autres, et que le procédé d'incorporation devra être amélioré. Néanmoins, le taux d'inclusion dans les micelles polymérisées du S39625 et de ses produits de dégradation a été estimé par intégration des deux pics. Le taux d'incorporation de ces molécules dans les micelles polymérisées est de 48% pour une concentration dans l'eau de 9,0 mg/mL. Ces valeurs, comparées à celles obtenues avec les nanobagues, montrent une nette amélioration de la solubilité et de la capacité d'encapsulation par les micelles polymérisées. En effet pour une concentration en amphiphile identique (10 mg/mL), la solubilité et donc la capacité d'encapsulation sont améliorées d'un facteur 12 (de 0,76 mg/mL à 9 mg/mL)

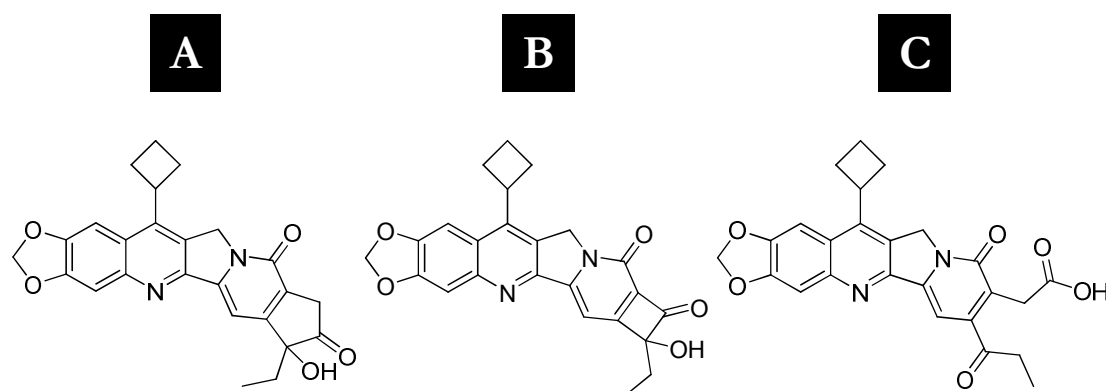


Schéma III-4 – Structures des produits observées par spectroscopie de masse

(A) S39625 (B) produit de dégradation par réduction de cycle du S39625 (C) produit de dégradation par ouverture de cycle du S39625

Les taux d'inclusion mesurés par HPLC sont très importants, cinq fois supérieurs au système nanobague, mais doivent cependant être confirmés par d'autres méthodes d'analyse.

Le taux d'incorporation du S39625 a été évalué par une nouvelle méthode basée sur la différence de masse entre un échantillon de micelles polymérisées seul et un échantillon de micelles polymérisées contenant le principe actif inclus (méthode de « *mass balance* »). Pour ce faire, à partir d'une même solution de micelles polymérisées, le processus d'inclusion est mené en parallèle sur deux échantillons : un avec ajout de principe actif et l'autre sans (Figure III-26 – A & B). Les solutions sont filtrées, lyophilisées puis pesées pour déterminer la quantité de principe

actif inclus. Cette quantité est donnée par la différence de masse entre ces deux échantillons (Figure III-26 – C).

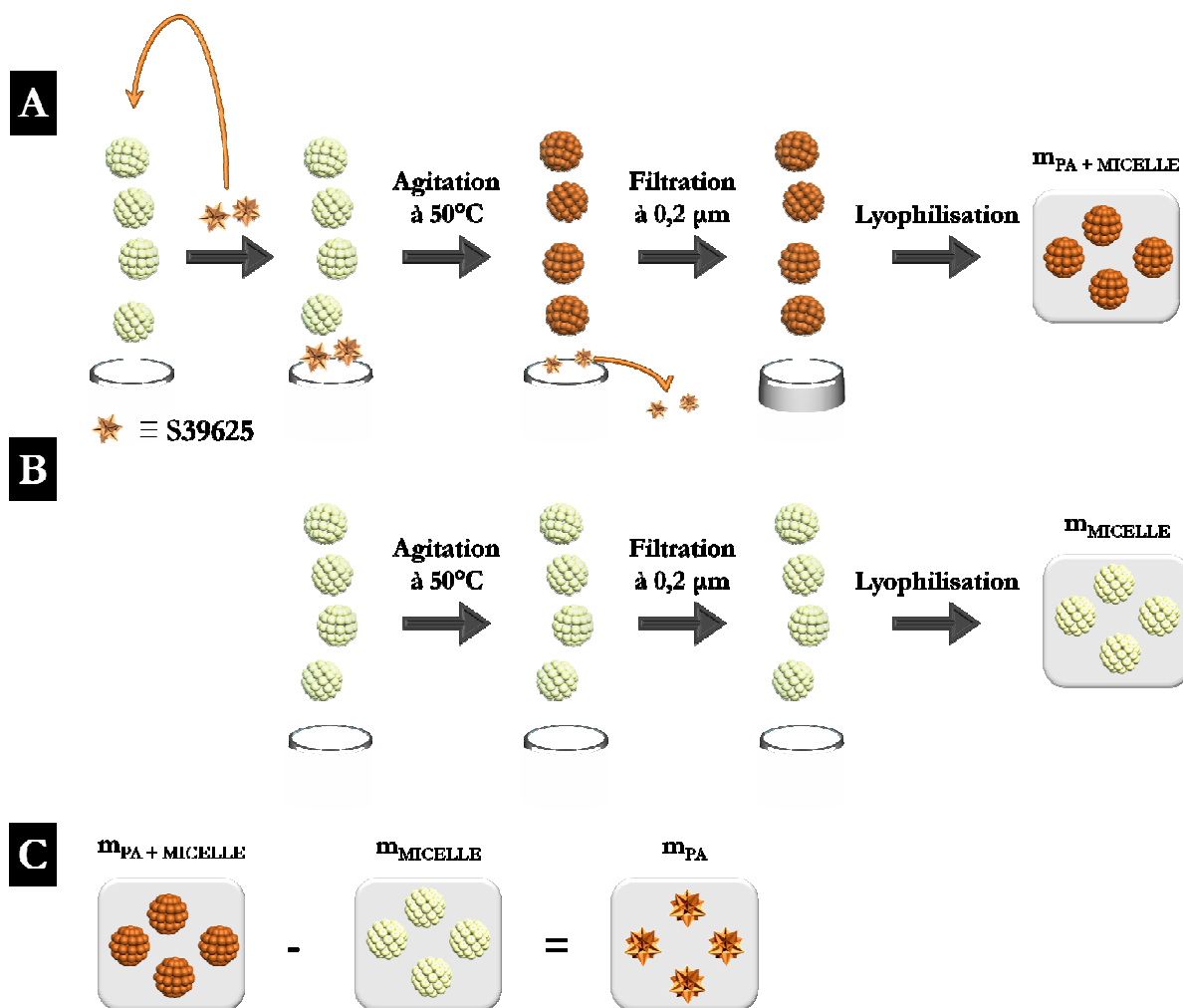


Figure III-26 – Principe de détermination du taux d'inclusion par la méthode de « mass balance »

Le taux d'inclusion déterminé par cette méthode est identique à celui mesuré par la méthode HPLC de 48%. Néanmoins, des études complémentaires doivent être conduites sur des molécules plus stables afin de confirmer ces résultats.

III-3-3-2- Etude de l'inclusion de principes actifs hydrophobes

Au vu des résultats d'inclusion obtenus avec le principe actif S39625, des tests d'inclusion ont été menés sur des principes actifs hydrophobes des laboratoires Servier, le S42909 et le S44563, sur une molécule active hydrophobe de référence, le paclitaxel, et sur une molécule très hydrophobe, le pyrène (Schéma III-5).

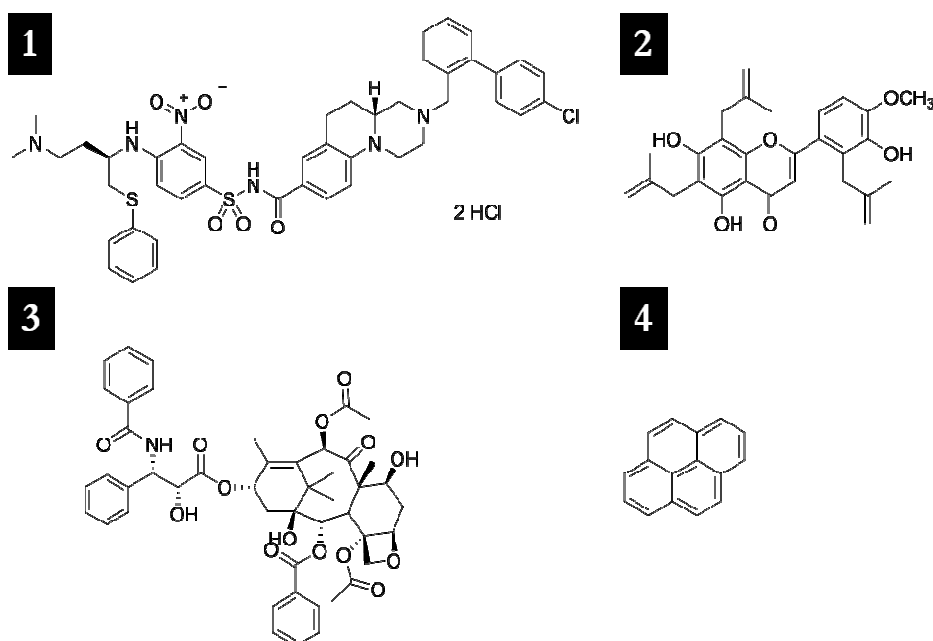


Schéma III-5 – Structures des principes actifs utilisés : (1) S44563, (2) S42909, (3) Paclitaxel, (4) Pyrène

L'inclusion de ces principes actifs a été menée avec des solutions de micelles polymérisées à 10 mg/mL par la méthode de chauffage à 50°C pendant 12 heures, et le taux d'incorporation a été déterminé, dans un premier temps, par la méthode de « *mass balance* » (Figure III-26).

L'ensemble des résultats présente une forte incorporation des molécules hydrophobes dans les micelles polymérisées avec des taux d'inclusion supérieurs à 24% et une augmentation de la solubilité des principes actifs dans l'eau de 30 000 à 500 000 fois (Tableau III-5).

Tableau III-5 – Résultats d'inclusion de molécules hydrophobes dans les micelles polymérisées obtenus par la méthode de « *mass balance* »

Principe Actif Molécule	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau de la molécule (en µg/mL)	Taux d'inclusion massique ^h (en %)	Taux d'inclusion molaire ⁱ (en %)	Nombre de molécules par micelle ^j	Solubilité dans l'eau (en mg/mL)
<i>S 39625</i>	430	0,09	48	56	125	9,00
S 44563	912	2,00	45	36	56	8,30
S 42909	462	0,20	24	29	42	3,15
Paclitaxel	853	0,40	31	25	33	4,55
Pyrène	202	0,01	34%	63%	167	5,25

^h Ratio massique (en %) entre médicament et médicament+transporteur $\times 100$ dans la formulation après traitement

ⁱ Ratio molaire (en %) entre médicament et médicament+Amphiphile **II-4** $\times 100$ dans la formulation après traitement

^j Ratio molaire entre médicament et Amphiphile **II-4** \times nombre d'amphiphile/micelle (100 molécules)

Dans un deuxième temps, les taux d'inclusion molaire et massique des principes actifs dans les micelles polymérisées (S42909, S44563 et paclitaxel) ont été déterminés par RMN. Pour réaliser les expériences RMN, chacun des échantillons a été lyophilisé puis solubilisé :

- ✓ en milieu aqueux dans du $D_2O/NaOD$ afin d'observer le comportement du principe actif inclus dans les micelles polymérisées dans l'eau (du NaOD est ajouté afin de maintenir un pH basique de 12) ;
- ✓ en milieu organique dans du $DMSO-d_6$, qui est un solvant dissociant, pour déterminer le taux d'inclusion du principe actif dans les micelles polymérisées (afin de solubiliser les micelles polymérisées dans le DMSO, la solution aqueuse récupérée en fin de processus d'inclusion doit être acidifiée puis lyophilisée).

Le spectre RMN du complexe PA/Micelle dans le $D_2O/NaOD$ (Figure III-27 – B) présente uniquement des pics larges et peu résolus de la micelle. Aucun pic du S42909 n'est détecté dans la région des aromatiques.

Dans le $DMSO-d_6$, ce même échantillon présente des pics fins et résolus des deux espèces (Figure III-27 – C). Cette observation met en évidence les interactions fortes entre la micelle et le S42909. En effet, le principe actif relaxe à la même vitesse que la micelle lorsqu'il se trouve inclus dans celle-ci. De ce fait, le S42909 se trouve masqué par la micelle en milieu aqueux. Dans le $DMSO-d_6$, les deux espèces sont solubilisées indépendamment et la micelle polymérisée n'interfère pas (ou très peu) avec le principe actif. Ainsi, l'intégration des pics caractéristiques de ces deux espèces permet de déterminer le taux d'inclusion molaire du S42909 dans les micelles polymérisées.

Les intégrations des pics donnent un taux d'inclusion molaire de 42%. Cette valeur est supérieure à celle déterminée par la méthode de « *mass balance* ». Cette étude RMN a permis de mettre en évidence les interactions fortes entre les chaînes lipophiles de l'amphiphile et le principe actif.

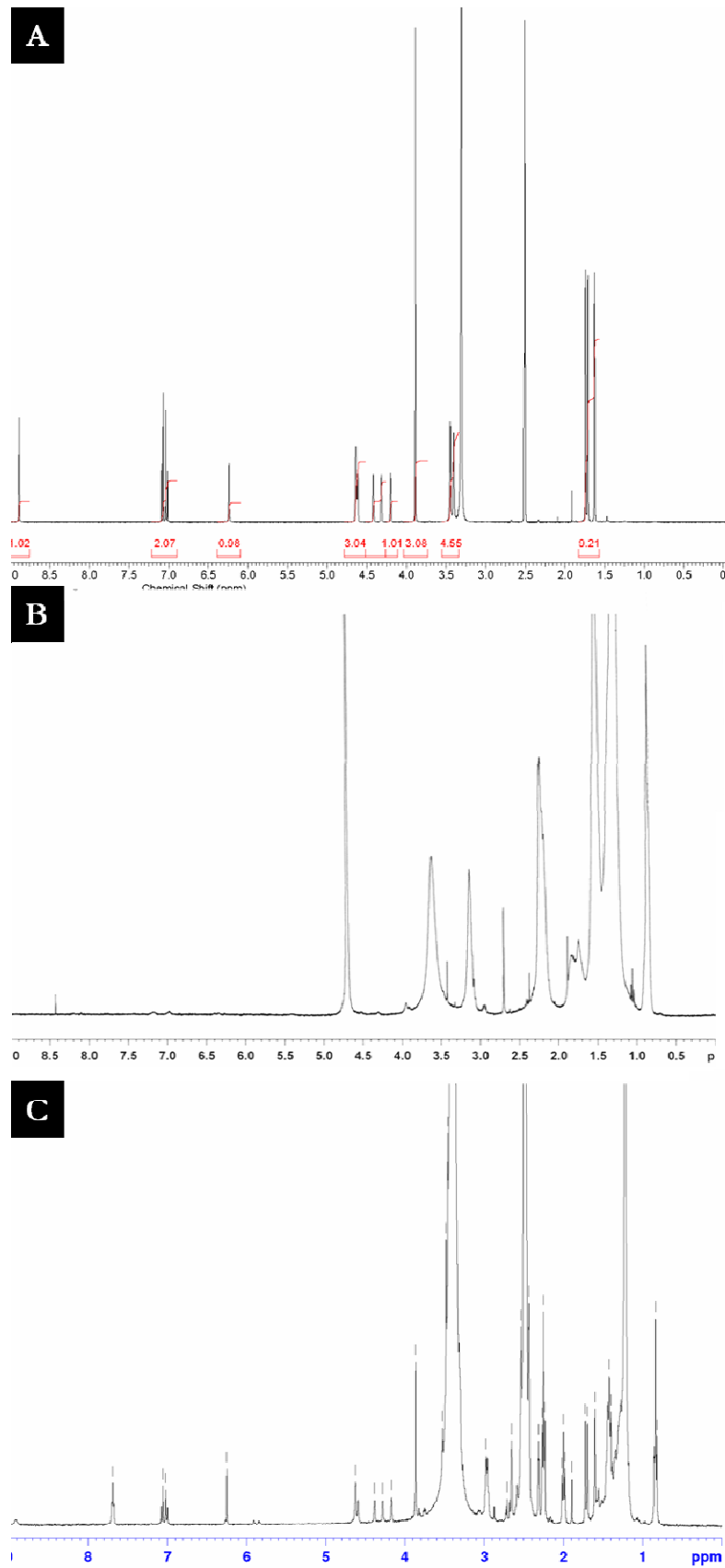


Figure III-27 – (A) Spectre RMN dans le DMSO-d₆ du S42909 (B) Spectre RMN dans le D₂O du S42909 inclus dans les micelles polymérisées (C) Spectre RMN dans le DMSO-d₆ du S42909 inclus dans les micelles polymérisées

L'étude RMN a également été menée sur le S44563 et le paclitaxel qui montre les mêmes particularités et propriétés que celles observées pour le S42909. De la même façon, les taux d'inclusion molaire mesurés sont plus importants que ceux déterminés par la méthode de « *mass balance* » (Tableau III-6). Enfin, les spectres RMN ne montrent pas de dégradation des principes actifs, ce qui prouve que la méthode d'inclusion par agitation à 50°C est adaptée pour des molécules stables.

Tableau III-6 - Résultats d'inclusion de principes actifs dans les micelles polymérisées obtenus par RMN

Principe actif	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau de la molécule (en µg/mL)	Taux d'inclusion molaire (en %)	Taux d'inclusion massique (en %)	Nombre de molécules par micelle
S 44563	912	2,00	50	59	100
S 42909	462	0,20	42	34	71
Paclitaxel	853	0,40	37	33	79

III-3-3-3- Conclusion

L'étude d'inclusion menée sur les micelles a mis en évidence l'effet de la polymérisation de la micelle sur la capacité d'incorporation de principe actif. Les micelles doivent être polymérisées afin que ce nanovecteur ait la capacité d'inclure une quantité très importante de principes actifs. Un taux d'incorporation de S39625 par ce transporteur de 48% a été obtenu, 5 fois supérieures à celui obtenu avec la formulation nanobague.

L'étude d'inclusion complémentaire menée sur différents principes actifs a confirmé l'aptitude de ce nanovecteur à solubiliser différents types de molécules hydrophobes avec de forts taux d'inclusion. Les travaux réalisés sur une molécule de référence, le paclitaxel, nous a permis de comparer les valeurs des taux d'incorporation avec les données de la littérature. Les micelles polymérisées de l'amphiphile **II-4** ont permis d'inclure cette molécule à un taux d'inclusion de 33%. Dans la littérature, des taux d'inclusion du Paclitaxel compris entre 6,7 et 14,3% ont été atteints avec différents types de vésicules,¹² des taux d'incorporation compris entre 0,2 et 27% avec des nanoparticules,¹³⁻¹⁶ et des taux d'inclusion compris entre 0,2 et 25% avec les micelles de polymères.¹⁷⁻¹⁹ Les micelles polymérisées se présentent donc comme un nanovecteur avec un pouvoir de solubilisation remarquable qui a permis de solubiliser des principes actifs de structures et de poids moléculaires différents.

De plus, les solutions de micelles polymérisées avec du principe actif inclus restent stables pendant au moins 2 mois car aucune précipitation n'a été observée visuellement au terme de cette période.

III-3-4- Etude d'accumulation/élimination *in vivo* des micelles polymérisées

Les micelles polymérisées sont des systèmes organisés, nanométriques et monodisperses qui présentent des propriétés remarquables d'encapsulation de principes actifs hydrophobes. Pour les applications pharmaceutiques, plusieurs paramètres primordiaux doivent être testés afin de valider une formulation. Un de ces paramètres est la distribution du transporteur dans l'organisme afin de déterminer son mode d'excrétion et les zones d'accumulation de celui-ci.

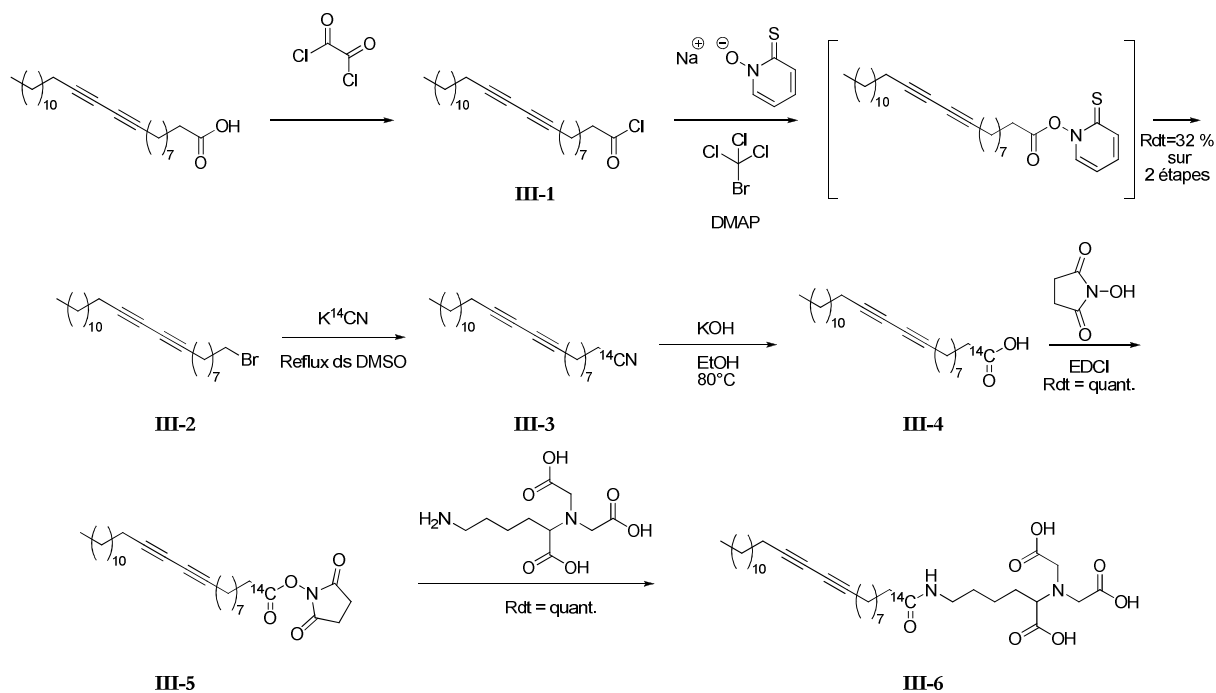
Ainsi, une première étude d'accumulation/élimination, préalable à une étude de biodistribution proprement dite, a été mise en place afin d'observer le comportement *in vivo* de ce transporteur. Cette étude a été menée dans les laboratoires de Technologie Servier à Orléans dans le département de pré-développement biopharmaceutique ADME.

Pour réaliser cette étude, l'amphiphile **II-4** a été radiomarké au carbone 14 afin de synthétiser la micelle polymérisée radiomarkée pour une étude de pistage par autoradiographie chez le rat.

III-3-4-1- Synthèse de l'amphiphile **III-6** et des micelles polymérisées radiomarkées au ¹⁴C

Cette synthèse a été menée dans notre service en collaboration avec Olivier Loreau du laboratoire de marquage au carbone 14. La stratégie de synthèse du composé **III-6** (Schéma III-6) consiste à partir de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque à réaliser le marquage isotopique de la fonction acide avant de coupler ce dernier avec la tête « NTA ».²⁰

Pour ce faire, l'acide 10,12-pentacosadiynoïque réagit avec le chlorure d'oxalyle pour donner le chlorure d'acide **III-1**. Le dérivé bromé **III-2** est obtenu par la bromo-décarboxylation de Barton.²¹ Le chlorure d'acide **III-1** est estérifié par le *N*-oxyde de 2-mercaptopyridine en présence de DMAP au reflux du bromotrichlorométhane pour conduire à un diène intermédiaire. Ce dernier se décompose et réagit par voie radicalaire avec le bromotrichlorométhane pour fournir le composé bromé **III-2** avec un rendement de 32% sur les deux étapes. Le nitrile **III-3** est obtenu par substitution nucléophile du brome de **III-2** par le cyanure de potassium marqué au carbone 14. La réaction est menée à 80°C dans le DMSO. L'hydrolyse de **III-3** dans un mélange d'éthanol et d'hydroxyde de potassium à 80°C conduit à l'acide [1-¹⁴C]-10,12-pentacosadiynoïque **III-4**.


 Schéma III-6 – Synthèse de l'amphiphile **III-6** radiomarqué au ^{14}C

L'acide **III-4**, dilué au cinquième par de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque froid, est ensuite activé par le NHS en présence d'EDCI pour donner l'acide activé **III-5**. L'amphiphile **III-6** est obtenu par couplage peptidique dans le DMF en présence de triéthylamine entre l'acide activé **III-5** et la tête « NTA » **II-2** avec un rendement quantitatif sur les 2 dernières étapes. Le composé **III-6** est obtenu avec une activité spécifique de 7,6 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

L'administration des micelles polymérisées chez le rat s'effectue à une dose de 4 MBq/kg (108 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$) et 100 mg/kg pour un volume d'administration de 2,5 mL/kg. Pour ce faire, une solution à 40 mg/mL est nécessaire avec une activité volumique de 40 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$.

Une première solution de micelles a été préparée à partir d'un mélange des amphiphiles **II-4** et **III-6**, afin d'obtenir une solution à 40 mg/mL avec une activité volumique de 80 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. Cette solution a été ensuite polymérisée par irradiation UV à 254 nm pendant 5 heures. L'activité volumique a été ensuite ajustée à 40 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ par dilution d'un facteur 2 par une solution « froide » de micelles polymérisées à une concentration de 40 mg/mL.

Enfin, l'osmolalité de la solution (mesure du nombre de mole de soluté par kilogramme de solvant) a été ajustée à 300 mmOs/kg afin de se placer dans les conditions physiologiques nécessaires pour une administration intraveineuse des micelles polymérisées chez le rat.

III-3-4-2- Etude de l'accumulation/élimination des micelles polymérisées chez le rat

L'étude de l'accumulation/élimination des micelles polymérisées radiomarquées au carbone 14 chez le rat a été conduite dans le département de pré-développement biopharmaceutique ADME en collaboration avec Antoine Lhumeau, Jean-Marie Delbos et Claire Boursier.

Cette étude a été menée sur 3 rats males de type Wistar. Une dose unique de 100 mg/kg de micelles polymérisées [¹⁴C] a été administrée par voie intraveineuse (bolus) à chacun des rats, et les animaux ont été euthanasiés à 10 minutes et 24 heures. En revanche, le dernier est décédé avant son euthanasie à 48 heures. Les urines des rats 24 h et 48 heures ont été récoltées afin de mesurer leur activité par scintillation liquide. La quantification des niveaux de radioactivité dans les tissus a été effectuée par radioluminographie^k de sections spécifiques des rats 1 (10 minutes) et 2 (24 heures), obtenues par cryomicrotomie (Figure III-28).

L'analyse des radioluminogrammes du rat 1 (10 minutes après administration) met en évidence une distribution généralisée de radioactivité dans le corps du rat due à une concentration élevée de micelles polymérisées dans le sang. Des niveaux élevés de radioactivité ont été détectés dans certains tissus tels que les poumons, les reins et ses substances médullaires, le foie, les glandes adrénales ou la rate (Tableau III-7).

L'analyse des radioluminogrammes du rat 2 (24 heures après injection) révèle une concentration de radioactivité élevée dans le foie, la paroi de l'intestin, la rate, les glandes adrénales, les reins et la moelle osseuse (Tableau III-7).

^k Limite de détection : 16,5 Bq/g correspondant à 453 ng eq/g / Limite de quantification : 55,2 Bq/g correspondant à 1512 ng eq/g

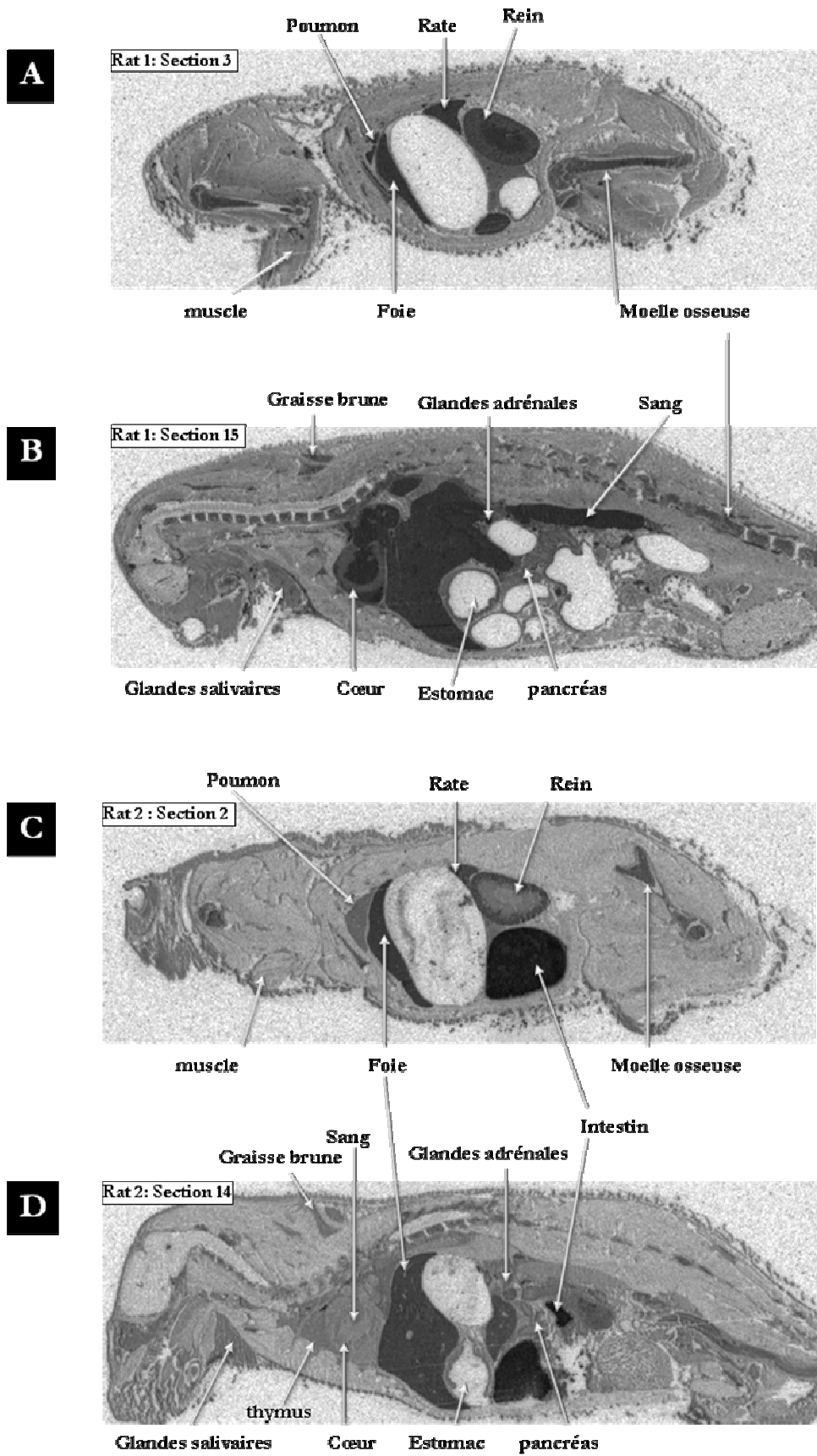


Figure III-28 – (A&B) Radioluminogramme du rat 1 (10 min) – (C&D) et du rat 2 (24 h)

Tableau III-7 – Distribution tissulaire de la radioactivité totale en fonction du temps après administration intraveineuse de micelles polymérisées marquées au carbone 14 chez le rat Wistar

Time (h)	0.17	24	$t_{1/2}$ (2 pts) (h)
Tissues/organs			
ADRENAL GLANDS	4.17	1.44	15.5
BLOOD	5.89	0.268	5.35
BONE MARROW	2.58	1.01	17.7
BONE MINERAL	0.0703	0.0549	67.0
BRAIN	0.117	0.0276	11.5
BROWN FAT	1.73	0.353	10.4
FAT	0.106	0.0860	79.8
HEART	2.48	0.337	8.29
INTESTINE WALL	1.06	1.72	NC
KIDNEY CORTEX	2.63	1.40	26.3
KIDNEY CORTICOMEDULLA	2.67	0.524	10.2
KIDNEY MEDULLA	4.35	0.278	6.01
LACHRYMAL GLAND	0.618	0.550	142
LIVER	4.28	2.43	29.3
LUNG	5.27	0.599	7.60
OESOPHAGUS WALL	0.193		NC
PANCREAS	1.34	0.551	18.6
PITUITARY GLAND	1.10	0.740	41.7
PROSTATE			NC
SALIVARY GLANDS	0.976	0.517	26.0
SEMINAL VESICLES	0.0150	0.198	NC
SKELETAL MUSCLE	0.238	0.0677	13.2
SKIN	0.295	0.176	31.9
SPINAL CORD	0.142	0.0566	18.0
SPLEEN	3.64	1.66	21.1
STOMACH WALL	0.283	0.152	26.4
TESTIS	0.151	0.177	NC
THYMUS	0.420	0.417	1865
THYROID GLAND	1.46	0.304	10.6
URINARY BLADDER WALL			NC
UVEAL TRACT	0.616	0.232	16.9

NC: not calculated

L'ensemble des résultats montre que la radioactivité est principalement éliminée avec un temps de demi-vie allongé. Le comptage par scintillation liquide des urines du rat 2 révèle une excrétion par voie rénale de 5% de la dose injectée en 24 heures. Cependant, après 24 heures, le radioluminogramme du rat 2 présente de la radioactivité dans le système gastro-intestinal démontrant que les micelles polymérisées (ou métabolites) sont éliminées par voie biliaire.

III-3-5- Conclusion

L'étude sur les micelles a été conduite afin de contrôler et de déterminer la capacité de ce système à solubiliser des principes actifs, et à le comparer avec le système des nanobagues. L'étude d'inclusion de S39625 dans les micelles non-polymérisées a montré un taux d'inclusion compris entre 1,7 et 3,3%, bien inférieur à celui obtenu dans les nanobagues de 9,1%. En

revanche, le système des micelles polymérisées semble très performant du fait de sa capacité importante de solubilisation de principe actif avec un taux d'inclusion en S39625 de 48%, et une concentration finale dans l'eau de 9 mg /mL. Cette capacité d'inclusion a été confirmée par des études complémentaires sur d'autres molécules hydrophobes, qui ont montré des taux d'inclusion importants comparables à ceux obtenu avec le S39625. Enfin, les résultats de l'étude d'accumulation/élimination sur les micelles polymérisées tendent à montrer que cette espèce aurait un temps de demi-vie plasmatique d'environ 5,35 heures. Par ailleurs, une accumulation de long terme dans l'organisme aurait été un élément rédhibitoire pour continuer le développement de ces entités. Or, il s'avère que les micelles polymérisées sont excrétés de l'organisme, même si le processus est relativement lent. Vu la structure du polymère, il n'est pas attendu que l'élimination se fasse par une dégradation métabolique, mais elle peut être due à la petite taille ainsi qu'à la charge du système.

La voie d'excrétion des micelles polymérisées ne semble pas se faire préférentiellement par la voie rénale qui montre une faible élimination (5% en 24 heures), mais plutôt par la voie biliaire. Néanmoins, cette étude a mis en évidence une accumulation des micelles polymérisées dans le foie, la paroi de l'intestin, la rate et la moelle osseuse. Une étude de distribution d'un complexe micelles polymérisées « froides »/S39625 marquée au ¹⁴C est en cours de réalisation pour vérifier l'influence de tels vecteurs sur la distribution du principe actif.

III-4- Fonctionnalisation des nanobagues et des micelles polymérisées

Les micelles polymérisées comme les nanobagues exhibent des capacités d'incorporation de principe actif importantes permettant d'améliorer de façon remarquable la solubilité de ces molécules. Du fait de leur distribution hépatosplénique, ces transporteurs pourraient être assimilés à des nanovecteurs de première génération. Ces nanovecteurs doivent être modifiés par des ligands à reconnaissance moléculaire pour les faire évoluer vers des vecteurs intelligents et sélectifs afin d'identifier de façon spécifique des antigènes ou des récepteurs surexprimés à la surface de cellules cibles telles que les cellules cancéreuses ou infectieuses.

Pour cela, les nanovecteurs doivent être fonctionnalisés par des ligands spécifiques dont l'accroche à la surface du vecteur se fait par un couplage chimique.

Dans cette partie, nous nous proposons d'étudier, qualitativement, la fonctionnalisation de surface des nanobagues et des micelles polymérisées. Dans un premier temps, un fluorophore modèle a été greffé à la surface de ces transporteurs afin de valider le mode d'accroche. Dans un

deuxième temps, un ligand spécifique de récepteur surexprimé à la surface de cellules cancéreuses, l'acide folique, a été greffé sur les micelles polymérisées.

III-4-1- Fonctionnalisation par le 4-amino-3-hydroxy-1-sulfonatenaphthalène

La première partie de ce travail a consisté à étudier la fonctionnalisation des nanobagues et des micelles polymérisées par un fluorophore hydrophile, le 4-amino-3-hydroxy-1-sulfonatenaphthalène (Schéma III-7). Ce fluorophore a une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et une longueur d'onde d'émission de 455 nm.

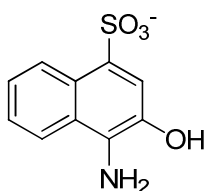


Schéma III-7 – Structure chimique du 4-amino-3-hydroxy-1-sulfonatenaphthalène

L'accroche du fluorophore s'effectue par un couplage peptidique dans l'eau à pH basique (pH=12) avec comme agent de couplage le dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Ce greffage a été réalisé en fort excès de fluorophore (50 équivalents) et d'agent de couplage (100 équivalents), et les échantillons ont été purifiés de deux manières différentes : par dialyse contre de l'eau à pH=12 dans le cas des nanobagues et par colonne d'exclusion de taille (séphadex) pour les micelles polymérisées.

La fonctionnalisation des nanobagues et des micelles polymérisées a été suivie par spectroscopie à fluorescence afin de mettre en évidence le greffage du fluorophore à la surface de ces deux nanovecteurs. Les spectres de fluorescence (normalisés) des nanobagues et micelles polymérisées fonctionnalisées (Figure III-29) montrent une évolution du pic de fluorescence du 4-amino-3-hydroxy-1-sulfonatenaphthalène, avec un shift bathochrome de fluorescence de 455 nm pour le fluorophore seul en solution vers 476 nm pour les nanobagues et 492 nm pour les micelles polymérisées.

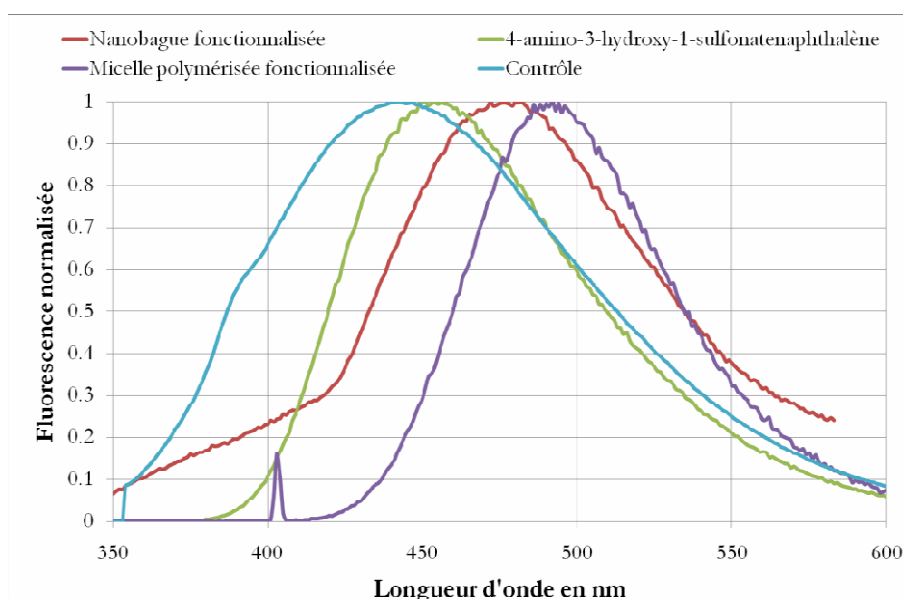


Figure III-29 – Spectres de fluorescence du 4-amino-3-hydroxy-1-sulfonatenaphtalène, des nanobagues et des micelles polymérisées fonctionnalisées par le fluorophore, et de l'échantillon de contrôle (excitation à 345 nm)

Les shifts de fluorescence d'un fluorophore apparaissent lors d'un changement de structure chimique de celui-ci ou d'une modification de l'environnement.

Afin de montrer que ces shifts proviennent d'un changement de structure chimique et non d'un changement simple d'environnement, une expérience de contrôle a été réalisée dans les mêmes conditions de concentration et de pH. Ainsi, des micelles polymérisées non-greffées ont été mises en mélange avec du 4-amino-3-hydroxy-1-sulfonatenaphtalène, et un spectre de fluorescence a été enregistré (Figure III-29). Ce dernier montre un shift hypsochrome de fluorescence du fluorophore. Ce contrôle met en évidence que le shift de fluorescence des échantillons de nanobagues et de micelles polymérisées provient bien du greffage covalent du fluorophore à la surface des deux nanovecteurs.

III-4-2- Fonctionnalisation par de l'acide folique

L'utilisation de transporteurs possédant un site de reconnaissance spécifique des cellules tumorales et permettant également la délivrance d'une quantité importante de principes actifs semble être nécessaire pour le développement de nouveaux systèmes de délivrance de médicaments efficaces.

Le récepteur folate étant surexprimé à la surface des cellules cancéreuses, l'acide folique a été très largement utilisé pour le ciblage spécifique de cellules cancéreuses du cerveau, du rein, du sein, des ovaires et des poumons.^{22,23}

Dans cette deuxième partie, nous nous proposons d'étudier la fonctionnalisation de la surface des micelles polymérisées par l'acide folique. Pour réaliser l'étape de couplage, l'acide folique a été modifié afin d'introduire une fonction amine permettant le greffage de cette molécule à la surface des micelles polymérisées (Schéma III-8).

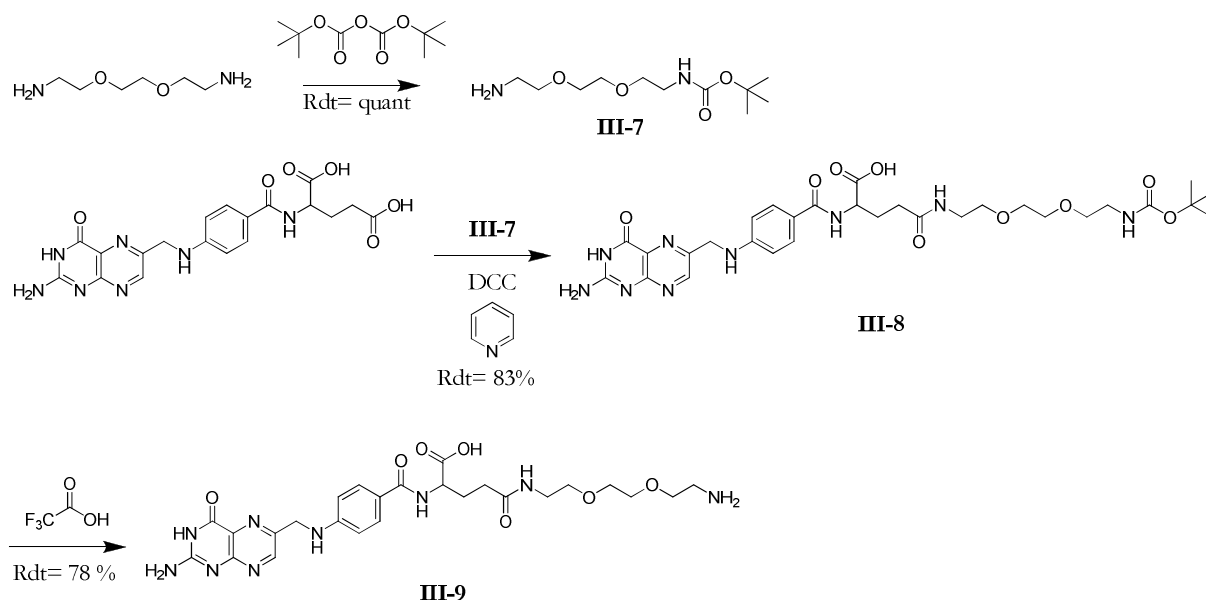


Schéma III-8 – Schéma de synthèse du dérivé aminé de l'acide folique

Le carbamate III-7 est obtenu par monoprotection d'une amine du 1,8-diamino-3,6-dioxaoctane par le di-tert-butyl-pyrocarbonate (Boc₂O) avec un rendement quantitatif par rapport au Boc₂O. Le couplage peptidique entre l'acide folique et le carbamate III-7 en présence de DCC et de pyridine conduit au dérivé peptidique de l'acide folique III-8 avec un rendement de 83%. La déprotection de III-8 par l'acide trifluoroacétique fournit le dérivé aminé de l'acide folique III-9 avec un rendement de 78%, soit un rendement global sur 3 étapes de 65%.

Le greffage de l'amine III-9 à la surface des micelles polymérisées s'effectue par un couplage peptidique dans l'eau à pH basique (pH=12) avec de la DCC comme agent de couplage. Ce greffage a été réalisé en fort excès de III-9 (50 équivalents) et d'agent de couplage (100 équivalents). L'échantillon a été purifié par filtration puis par colonne d'exclusion de taille (séphadex).

La fonctionnalisation des micelles polymérisées par l'amine III-9 a été suivie par spectroscopie d'absorption UV et par spectroscopie à fluorescence afin de mettre en évidence le greffage de cette molécule à la surface des micelles.

Les spectres d'absorption (Figure III-30 – A) montrent que la molécule III-9 est bien présente à la surface des micelles polymérisées du fait de la présence du pic à 285 nm. Les

spectres de fluorescence (normalisés) des micelles polymérisées fonctionnalisées (Figure III-30 – B) montrent une évolution des pics de fluorescence de la molécule **III-9** à 360 nm et 450 nm. En effet, l'intensité des pics de fluorescence de la molécule **III-9** greffée à la surface de la micelle évolue, avec une augmentation et un shift des pics à 360 nm et 450 nm.

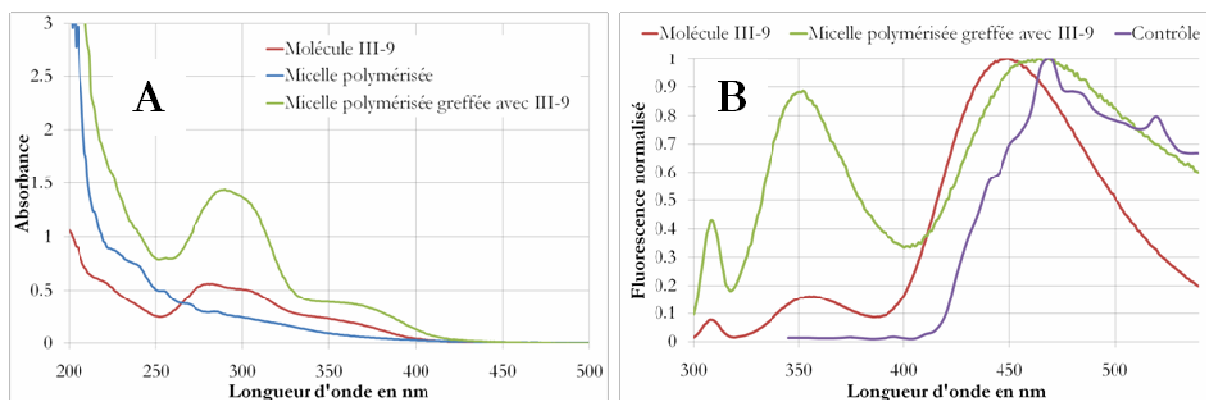


Figure III-30 – (A) Spectres d'absorbance de l'amine **III-9**, de la micelle polymérisée et des micelles polymérisées fonctionnalisées par l'amine **III-9** (B) Spectres de fluorescence de l'amine **III-9**, des micelles polymérisées fonctionnalisées par l'amine **III-9**, et de l'échantillon de contrôle (excitation à 280nm)

L'expérience de contrôle, réalisée dans les mêmes conditions de concentration et de pH, a montré une disparition du pic de fluorescence à 360 nm et un shift de la fluorescence du pic à 450 nm. Ce contrôle met en évidence que la molécule **III-9** est greffée de façon covalente à la surface des micelles polymérisées. Des études comparatives de distribution des micelles polymérisées greffées ou non par l'acide folique pourront être envisagées.

III-4-3- Conclusion

Cette étude a mis en évidence la possibilité de fonctionnaliser la surface des nanobagues et des micelles polymérisées par des couplages peptidiques dans l'eau de fluorophore et de ligands spécifiques. La fonctionnalisation de surface de ces espèces devrait permettre de faire évoluer ces nanovecteurs de « 1^{ère} génération » vers des nanovecteurs de « 3^{ème} génération », furtifs et permettant le ciblage spécifique de cellules tumorales.

III-5- Conclusion

Les études menées sur les nanobaguettes ont permis de montrer que ces nanovecteurs possèdent les caractéristiques requises pour leur utilisation comme agent de vectorisation de médicaments. Ces nanovecteurs ont la capacité d'inclure des principes actifs à des taux d'inclusion substantiels de 9,0% et d'augmenter de façon importante la solubilité de ces molécules dans l'eau. De plus, ces espèces n'ont montré aucune toxicité *in vitro* et *in vivo* apparente lors des études préliminaires de toxicité.

Les études de contrôle menées sur les micelles non-polymérisées et polymérisées ont mis en évidence la différence de comportement de ces espèces vis-à-vis de la polymérisation. En effet, les micelles non-polymérisées ont montré des taux d'incorporation de principe actif inférieurs à ceux observés avec les nanobaguettes. En revanche, les micelles polymérisées présentent une capacité d'incorporation de molécules hydrophobes remarquable avec des taux d'inclusion importants suivant les molécules utilisées, compris entre 25% et 50%. Enfin, l'étude d'accumulation/élimination des micelles polymérisées a mis en évidence un temps de demi-vie plasmatique probable de ces espèces de 5,35 heures, un mode d'excrétion par voie biliaire, et une accumulation de ces nanovecteurs dans certains tissus tels que le foie, la paroi de l'intestin, la rate ou la moelle osseuse. Des études de doses maximales tolérées par voie intraveineuse et par voie orale sont par ailleurs en cours.

Enfin, les nombreuses fonctions acides, se trouvant à la surface des nanobaguettes et des micelles polymérisées, permettent la fonctionnalisation de ces nanovecteurs par des fluorophores ou des ligands spécifiques. L'accroche de molécules d'intérêt à la surface de ces nanovecteurs devrait permettre de les faire évoluer vers des nanovecteurs de « 3^{ème} génération », furtifs et spécifiques des cellules cancéreuses.

- ¹ Rickling, S. Synthèse et utilisation de nano-objets obtenus à partir de lipides photopolymérisables autour de nanotubes de carbone. Interactions entre tubuline et nanotubes de carbone ou fullérenes. Université Louis Pasteur Strasbourg I, 2004.
- ² Allen, T. M.; Cullis, P. R., Drug delivery systems : entering the mainstream. *Science* **2004**, 303, 1818-1822.
- ³ Israelachvili, J. N., *Intermolecular and surface forces, with applications to colloidal and biological systems*. Academic Press: 1985.
- ⁴ Schnur, J. M., Lipid tubules : a paradigm for molecularly engineered structures. *Science* **1993**, 262, 1669-1676.
- ⁵ Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H., Supramolecular nanotube architectures based on amphiphilic molecules. *Chemical Review* **2005**, 105, 1401-1443.
- ⁶ Svenson, S.; Messersmith, P. B., Formation of polymerizable phospholipid nanotubules and their transformation into a gel network. *Langmuir* **1999**, 15, 4464-4471.
- ⁷ Song, J.; Cisar, J. S.; Bertozzi, C. R., Functional self assembly bolamphiphilic polydiacetylenes as colorimetric scaffolds. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 8459-8465.
- ⁸ Schnur, J. M.; Ratna, B. R.; Selinger, J. V.; Singh, A.; Jyothi, G.; Easwaran, K. R. K., Diacetylenic lipid tubules : experimental evidence for a chiral molecular architecture. *Science* **1994**, 264, 945-947.
- ⁹ Lee, S. B.; Koepsel, R.; Stolz, D. B.; Warriner, H. E.; Russel, A. J., Self assembly of biocidal nanotubes form a single chain diacetylene amine salt. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (13400-13405).
- ¹⁰ Dautel, O. J.; Robitzner, M.; Lère-Porte, J.-P.; Serein-Spirau, F.; Moreau, J. E., Self-organized ureido substituted diacetylenic organogel. Photopolymérisation of one-dimensionnal supramolecular assemblies to give conjugated nanofibers. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 16213-16223.
- ¹¹ Cotton, J. P., DNPA : Introduction et variations sur le contraste. In *Diffusion de neutrons aux petits angles*, Journal de physique IV: 1999; Vol. 9, pp 21-49.
- ¹² Li, S.; Byrne, B.; Welsh, J.; Palmer, A. F., Self-assembled-b-poly(ethylene oxide) polymersomes as paclitaxel carriers. *Biotechnology progress* **2007**, 23, 278-285.
- ¹³ Liang, H. F.; Chen, S.-C.; Chen, M.-C.; Lee, P.-W.; Chen, C.-T.; Sung, H.-W., Paclitaxel-loaded poly(glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system against cultured HepG2 cells. *Bioconjugate chemistry* **2006**, 17, 291-299.
- ¹⁴ Bae, K. H., Oil-encapsulating PEO-PPO-PEO/PEG shell cross-linked nanocapsules for target-specific delivery of paclitaxel. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 650-656.
- ¹⁵ Lim, H. J.; Nam, H. Y.; Lee, B. H.; Kim, D. J.; Ko, J. Y.; Park, J.-S., A novel technique for loading of paclitaxel-PLGA nanoparticles onto ePTFE vascular grafts. *Biotechnology progress* **2007**, 23, (693-697).
- ¹⁶ Richard, R. E.; Schwarz, M.; Ranade, S.; Chan, A. K.; Matyjaszewski, K.; Sumerlin, B., Evaluation of acrylate-based block copolymers prepared by atom transfer radical polymerization as matrices for paclitaxel delivery from coronary stents. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 3410-3418.
- ¹⁷ Lee, S. C.; Huh, K. M.; Lee, J.; Cho, Y. C.; Galinsky, R. E.; Park, K., Hydrotropic polymeric micelles for enhanced paclitaxel solubility : in vitro and in vivo characterization. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 202-208.
- ¹⁸ Shuai, X.; Merdan, T.; Schaper, A. K.; Kissel, T., Core-cross-linked polymeric micelles as paclitaxel carriers. *Bioconjugate chemistry* **2004**, 15, 441-448.
- ¹⁹ You, J.; Du, Y.-Z.; Yuan, H., Polymeric micelles with glycolipid-like structure and multiple hydrophobic domains for mediating molecular target delivery of paclitaxel. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 2450-2456.
- ²⁰ Loreau, O.; Maret, A.; Poullain, D.; Chardigny, J. M.; Sébédio, J. L.; Beaufrère, B.; Noel, J. P., Large scale preparation of (9Z,12E)-[1-¹³C]-octadeca-9,12-dienoic acid, (9Z,12Z,15E)-[1-¹³C]-octadeca-9,12,15-trienoic acid and their [1-¹³C]all-cis isomers. *Chemistry and physics of lipids* **2000**, 106, 65-78.
- ²¹ Barton, D. H. R.; Crich, D.; Motherwell, W. B., A practical alternative to the Hunsdiecker reaction. *Tetrahedron letters* **1983**, 24, 4979-4982.
- ²² Andrieux, K.; Desmaele, D.; D'Angélo, J.; Couvreur, P., Nanotechnologies et nouveaux médicaments. *L'actualité chimique* **2003**, 135-138.
- ²³ Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmaele, D.; Hoebeke, J.; Renoir, M.; D'Angélo, J.; Cattel, L.; Couvreur, P., Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *Journal of pharmaceutical sciences* **2000**, 89, (11), 1452-1464.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la synthèse et à l'évaluation d'anneaux amphiphiles comme agents de vectorisation de principes actifs.

A partir de travaux antérieurs réalisés au laboratoire, un premier tensio-actif comportant un seul motif polymérisable a été synthétisé afin de concevoir des « nanobagues ». L'extraction de ces nanobagues, arrangées à la surface de nanotubes multifeuillets, a été réalisée par électrophorèse/électroélution qui s'est avérée être une technique de séparation altérante pour de nombreux anneaux.

Pour résoudre ce problème, deux solutions ont été étudiées :

- ✓ Une première a consisté à synthétiser un surfactant doublement polymérisable qui nous a permis d'obtenir des anneaux plus robustes après réticulation.
- ✓ Dans un même temps, nous avons développé une nouvelle méthode de séparation des anneaux, plus douce et non dénaturante.

La caractérisation de la structure des nanobagues a été réalisée à l'aide de différentes techniques et en particulier par diffusion des neutrons aux petits angles. L'analyse des anneaux indique un diamètre en solution de 100 nm, pour une épaisseur de 7 à 8 nm. La masse molaire d'une nanobague a été estimée à 5 120 000 g/mol ce qui correspond à 8300 molécules. La structuration de la nanobague en anneau à cavité centrale hydrophobe ou en tore avec un domaine micellaire hydrophobe a été abordée en fin de chapitre et quelques éléments de réponse ont été apportés.

Une évaluation des nanobagues a permis de montrer que ces nanovecteurs possèdent les caractéristiques requises pour une utilisation comme agent de vectorisation de médicaments. Ces nanovecteurs ont la capacité d'inclure des principes actifs à des taux d'inclusion de 9% et d'augmenter de façon importante la solubilité de ces molécules dans l'eau. De plus, ces espèces n'ont montré aucune toxicité apparente *in vitro* et *in vivo* lors des études préliminaires.

Des expériences contrôles, menées sur des micelles polymérisées en absence de nanotubes de carbone, ont mis en évidence des taux d'incorporation de molécules hydrophobes remarquables compris entre 25% et 50%. Enfin, une étude d'accumulation / élimination des micelles polymérisées indique un mode d'excrétion par voie biliaire, et une accumulation de ces nanovecteurs dans certains tissus tels que le foie, la paroi de l'intestin, la rate ou la moelle osseuse.

Les travaux menés sur les micelles polymérisées ont montré que ces transporteurs pouvaient être assimilés à des nanovecteurs de « 1^{ère} génération » avec une capacité de solubilisation remarquable. La modification de la structure du monomère devrait permettre de changer la distribution du transporteur *in vivo*, par introduction par exemple de groupements poly(éthylène glycol). Nous avons montré que le greffage de la surface des micelles polymérisées était possible. La fonctionnalisation de surface de ces transporteurs devrait permettre de les faire évoluer vers des systèmes plus performants, avec des propriétés de ciblage par greffage de ligands spécifiques. Enfin, un mécanisme de dépolymérisation induit par voie chimique ou enzymatique pourrait être mis au point afin d'activer la libération du principe actif. Cette destruction programmée permettra d'accélérer la métabolisation de la nanobague et de faciliter son élimination.

PARTIE EXPERIMENTALE

|

I- Généralités

Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'appareil utilisé est un TGA 92 de la société SETARAM. Le programme de température est le suivant : de 25 à 450°C avec une montée en température de 10°C/min.

Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC)

L'appareil est un TA instruments Q1000 de la société Thermal Analysis. Le programme de température est le suivant : de -50 à 400°C avec une montée en température de 10°C/min, palier de 10 min à -50°C.

Chromatographie sur colonne ouverte

Elles sont réalisées en utilisant du gel de silice Merck (230-400 mesh).

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les plaques utilisées sont de type Silice Merck 60 F₂₅₄ d'épaisseur 0,25 mm sur support de verre. Les révélations sont effectuées par des rayonnements ultraviolets à 254 nm et/ou 365 nm, ainsi que par immersion dans une solution éthanolique 5% d'acide phosphomolybdique ou de permanganate de potassium. Le facteur de rétention frontale (R_f) est indiqué, ainsi que la nature de l'éluant utilisé.

Chromatographie liquide haute pression (HPLC)

La Chaîne HPLC est une chaîne Shimadzu comprenant deux pompes à solvant LC-10AS, utilisant un four à colonne CTA-10AC, un système de contrôle SCL-10A et un injecteur automatique SIL-10A XI.

Le suivi de l'absorbance s'effectue par un détecteur UV-visible Shimadzu SPD-10A. Le logiciel utilisé pour l'acquisition des chromatogrammes est le logiciel fourni par Shimadzu.

Les colonnes utilisées pour l'analyse des échantillons est une colonne MERCK 50995, LiCrospher 100 RP 18.

Dialyse

Les membranes de dialyse utilisées sont commercialisées par la société SPECTRUM :

- Spectra/por 3 – porosité 3 500 Da
- Spectra/por 4 – porosité 12 000 – 14 000 Da
- Spectra/por 7 – porosité 25 000 Da et 50 000 Da

Diffusion de la lumière (DLS)

L'analyseur granulométrique laser est un NANOFOX de la société Sympatec GmbH, System-Partikel-Technik. Ce système est basé sur la diffusion dynamique de la lumière et la corrélation de photons.

L'analyseur par diffusion de la lumière est un Zetasizer Nano Serie de la société Malvern.

Electrophorèse sur gel d'agarose

L'appareillage d'électrophorèse est un système Biorad Sub-cell Model 192 avec un générateur de courant Biorad Power Pac 300.

Le gel d'agarose à 0,25% est formé par solubilisation à chaud d'agarose dans une solution tampon avant d'être coulé dans un moule.

Electroélution

L'appareillage d'électroélution a été conçu au laboratoire, et utilise un générateur de courant Biorad Power Pac 300.

Microscopie électronique en transmission

Les clichés ont été réalisés sur un microscope Philips CM12 dont la tension d'accélération des électrons est de 100 kV. Les grilles de microscopie sont en cuivre 300 mesh et recouvertes d'un film de carbone.

Nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone mono paroi synthétisés par la méthode HiPCO proviennent de la société CNI (Carbon Nanotechnologies Incorporated, Etats-Unis). Ils présentent un diamètre compris entre 0,7 et 1,4 nm et contiennent de 11% de catalyseur.

Les nanotubes de carbone DWNTs synthétisés par la méthode CCVD (catalytic chemical vapor deposition) proviennent de la société Nanocyl (Belgique). Les nanotubes présentent un diamètre compris entre 3 et 5 nm et contiennent moins de 10% de catalyseur.

Les nanotubes de carbone MWNTs synthétisés par la méthode de l'arc électrique proviennent de la société n-Tec (Norvège). La pureté est supérieure à 95%. Le diamètre des nanotubes est de 25 nm en moyenne.

Photochimie

Les réactions photochimiques ont été initiées à l'aide des lampes suivantes :

- UV Heraeus à moyenne pression de mercure couvrant une large gamme de longueur d'onde, munie d'un tube à immersion en quartz et d'un tube de réfrigération en quartz ou en verre,
- UV Heraeus à basse pression de mercure (254 nm),
- Fisher Bioblock Scientific monochromatique (365 nm).

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre à ondes pulsées BRUKER AVANCED 400 dont les fréquences de résonance du proton et du carbone sont 400,133 MHz et 100,624 MHz, respectivement.

Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au solvant de référence pour la RMN ^1H et ^{13}C .

La numérotation utilisée pour l'attribution des différents signaux correspond à celle indiquée sur la structure du produit et ne suit pas nécessairement les règles de nomenclature.

Le déplacement chimique (δ) en ppm est suivi entre parenthèses de la multiplicité du signal, de l'intégration, de l'attribution et de la constante de couplage (en Hertz) si elle est mesurable.

Les multiplicités des signaux sont indiquées à l'aide des lettres suivantes :

s : singulet	q : quadruplet
d : doublet	qi : quintuplet
t : triplet	m : massif

Scintillation liquide

Compteur par scintillation liquide Wallac 1409 utilisant le programme 1414 WinSpectral et de cocktail de scintillation Zinsser Analytic Unisafe 1.

Solvants anhydres

Les expériences sensibles à l'humidité et/ou à l'air ont été réalisées dans des montages secs (chauffés sous vide) sous atmosphère d'azote ou d'argon.

Les solvants anhydres sont soit achetés, soit préparés par distillation sous azote en présence de leur agent de dessiccation respectif (sodium pour l'éther diéthylique et le THF, hydrure de calcium pour le dichlorométhane).

Sonication

La dispersion par sonication est réalisée à l'aide d'une sonde à ultrasons Branson Sonifier 450 (60 W, 20 kHz) ou d'un bain à ultrasons Branson 5210 (19 W, 47 kHz).

Spectroscopie de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un appareil SPEX FluoroMax-4 de chez Horiba Jobin-Yvon.

Spectrométrie de masse (SM)

En mode électrospray couplé au temps de vol, les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Mariner™ ESI TOF (PerSeptive Biosystems).

Spectroscopie infrarouge FT-IR (Fourier Transformed Infrared)

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer System 2000 FT-IR. Le traitement des spectres est effectué avec le programme IR Data Manager. Les échantillons liquides sont placés entre deux pastilles de NaCl. Une pastille de KBr est préparée pour les échantillons solides. Les nombres d'onde des bandes IR sont exprimés en cm^{-1} à leur maximum d'intensité. Dans la description des spectres, l'intensité et le type de raies sont indiqués à l'aide des abréviations suivantes : F, m, f signifiant respectivement raie forte, moyenne et faible.

Spectroscopie infrarouge de réflexion totale atténuée ATR-IR (Attenuated Total Reflectance Infrared)

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Vertex 70 (IRTF) Bruker muni d'une platine "Miracle" Pike avec mono-réflexion sur diamant et un détecteur MCT (Mercure, Cadmium, Tellure) refroidi à l'azote liquide. Les spectres ont été enregistrés avec 256 scans dans la gamme 4000-600 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} . Le rapport bruit sur signal est de 0,25/1000. Le logiciel d'acquisition et de traitement est "OPUS".

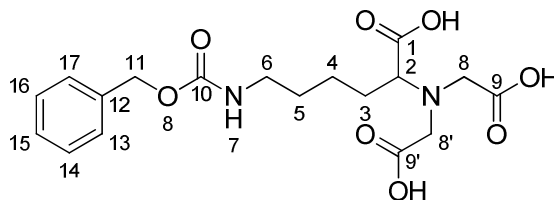
Spectroscopie UV-Vis

Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectromètre VARIAN CARRY 50 Scan UV-Vis, à l'aide du logiciel Cary Win UV.

II- Synthèse organique

II-1- Résultats expérimentaux du Chapitre II

Acide 6-benzyloxycarbonylamino-2-(bis-carboxyméthyl-amino)-hexanoïque, II-1



Formule brute : $C_{18}H_{24}N_2O_8$

Masse Molaire : 396,39 g/mol

Rendement : quantitatif

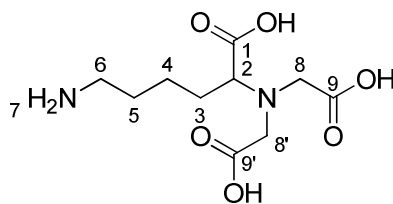
10,82 g (134 mmol, 4 éq.) d'acide bromoacétique sont solubilisés dans 120 mL d'une solution de soude 1N. A cette solution refroidie à 0°C, une solution de 5,39 g (78 mmol, 1 éq.) de Z-lysine dans 30 mL de soude 1N est additionnée goutte à goutte en 30 minutes. La solution est laissée à température ambiante pendant 2 heures puis chauffée 12 heures à 50°C. La solution est ensuite refroidie à 0°C puis acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 37% jusqu'à précipitation totale de la molécule. Le précipité blanc est ensuite filtré puis séché sous vide en présence de P_2O_5 .

RMN 1H (DMSO- d_6 , δ en ppm) : 7,25-7,40 (m, 5H, H_{13} - H_{17}) ; 7,21 (t, 1H, H_7 , $J=5,5$ Hz) ; 4,98 (s, 2H, H_{11}) ; 3,46 (m, 4H, H_8 - H_8') ; 3,33 (t, 1H, H_2 , $J=7,2$ Hz) ; 2,85-3,05 (m, 2H, H_6) ; 1,15-1,65 (m, 6H, H_3 - H_4 - H_5)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , δ en ppm) : 174,5 (1C, C_1) ; 174,0 (1C, C_9 - C_9') ; 156,5 (1C, C_{10}) ; 137,6 (1C, C_{12}) ; 128,7 (2C, C_{14} - C_{16}) ; 128,0 (3C, C_{13} - C_{15} - C_{17}) ; 65,4 (1C, C_2) ; 64,9 (1C, C_{11}) ; 59,8 (1C, C_8) ; 54,2 (1C, C_6) ; 29,5-29,6 (2C, C_3 - C_5) ; 23,4 (1C, C_4)

MASSE (m/z) : (ESI+) 397 [M+H] $^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3364 (F) ; 3042 (f) ; 2935 (f) ; 1721 (F) ; 1523 (f) ; 1278 ; 1131 ; 1013 ; 905 ; 742 ; 683

Acide 6-amino-2-(bis-carboxyméthyl-amino)-hexanoïque, **II-2**

Formule brute : $C_{10}H_{18}N_2O_6$

Masse Molaire : 262,26 g/mol

Rendement : 50%

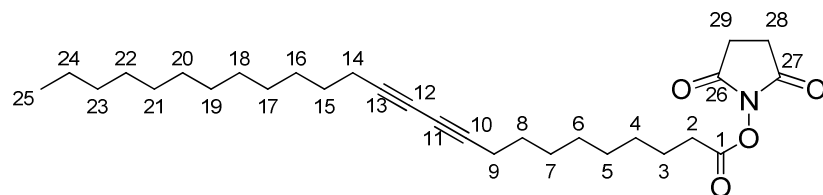
7,6 g de d'acide 6-benzyloxycarbonylamino-2-(bis-carboxyméthyl-amino)-hexanoïque, **II-2**, (19,2 mmol, 1 éq.) sont solubilisés dans 200 mL de méthanol auquel est ajoutée 300 mg de palladium sur charbon activé (10%). Le ballon est purgé quatre fois à l'azote et quatre fois à l'hydrogène. La solution est laissée à température ambiante sous hydrogène pendant 12 heures. Le précipité formé est filtré puis solubilisé à nouveau dans de l'eau. Le catalyseur est éliminé par une dernière filtration. La solution est concentrée et du méthanol est ajouté pour faire précipiter le produit. Le solide blanc est filtré et séché sous vide.

RMN 1H (D_2O , δ en ppm) : 3,75-3,9 (m, 5H, $H_2-H_8-H_{8'}$) ; 2,89 (t, 2H, H_6 , $J=7,2$ Hz) ; 1,4-1,9 (m, 6H, $H_3-H_4-H_5$)

RMN ^{13}C (D_2O , δ en ppm) : 171,9 (1C, C_1) ; 170,1 (2C, $C_9-C_{9'}$) ; 67,6 (1C, C_2) ; 55,1 (2C, $C_8-C_{8'}$) ; 38,9 (1C, C_6) ; 26,3 (2C, C_3-C_5) ; 22,9 (1C, C_4)

MASSE (m/z) : (ESI+) 263 $[M+H]^+$, 285 $[M+Na]^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3498 (F) ; 3324 (m) ; 2996 (m) ; 2975 (f) ; 1750 (F) ; 1634 ; 1401 ; 1263 ; 1159 ; 984 ; 876 ; 751

Pentacosa-10,12-diynoate de 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yle, **II-3**

Formule brute : $C_{29}H_{45}NO_4$

Masse Molaire : 471,67 g/mol

Rendement : quantitatif

1,00 g d'acide pentacosa-10,12-diynoïque (2,7 mmol, 1 éq.), 0,78 g *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N*'-éthylcarbodiimide (4,1 mmol, 1,5 éq.) et 0,50 g de *N*-hydroxysuccinimide (4,8 mmol, 1,8 éq.) sont solubilisés dans 50 mL de dichlorométhane. La solution est laissée 12 heures sous agitation à température ambiante sous azote. Un lavage à l'eau est effectué après réaction puis la phase organique est séchée puis évaporée pour donner un solide blanc.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 2,7-2,9 (m, 4H, H_{28} - H_{29}) ; 2,58 (t, 2H, H_2 , $J=7,2$ Hz) ; 2,22 (t, 4H, H_9 - H_{14} , $J=7,2$ Hz) ; 1,72 (q, 2H, H_3 , $J=7,2$ Hz) ; 1,49 (t, 2H, H_4 , $J=7,2$ Hz) ; 1,2-1,42 (m, 28H, H_5 à H_8 - H_{15} à H_{24}) ; 0,86 (t, 3H, H_{25} , $J=7,2$ Hz)

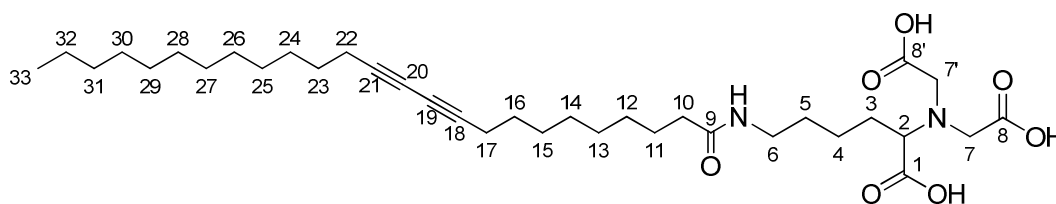
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 169,2 (2C, C_{26} - C_{27}) ; 168,5 (1C, C_1) ; 77,6 (1C, C_{13}) ; 77,3 (1C, C_{10}) ; 65,3 (1C, C_{12}) ; 65,2 (1C, C_{11}) ; 31,8 (1C, C_2) ; 28,1 à 30,7 (16C, C_4 à C_8 - C_{15} à C_{23} - C_{28} - C_{29}) ; 24,4 (1C, C_3) ; 22,5 (1C, C_{24}) ; 18,9 (2C, C_9 - C_{14}) ; 13,9 (1C, C_{25})

MASSE (m/z) : (*ESI*+) 472 [$M+H$] $^+$; 494 [$M+Na$] $^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3508 (f) ; 3341 (f) ; 2922 (F) ; 2851 (F) ; 1814 (F) ; 1784 (F) ; 1743 (F) ; 1531 (f) ; 1466 (m) ; 1413 (m) ; 1368 (m) ; 1320 (f) ; 1305 (f) ; 1250 (m) ; 1209 (F) ; 1126 (f) ; 1069 (F) ; 992 (m) ; 861 (m) ; 810 (m) ; 724 (m) ; 653 (m)

Acide 2-(bis-carboxyméthyl-amino)-6-pentacosa-10,12-diynoyle-amino-hexanoïque,

II-4



Formule brute : $C_{35}H_{58}N_2O_7$

Masse Molaire : 618,84 g/mol

Rendement : 76%

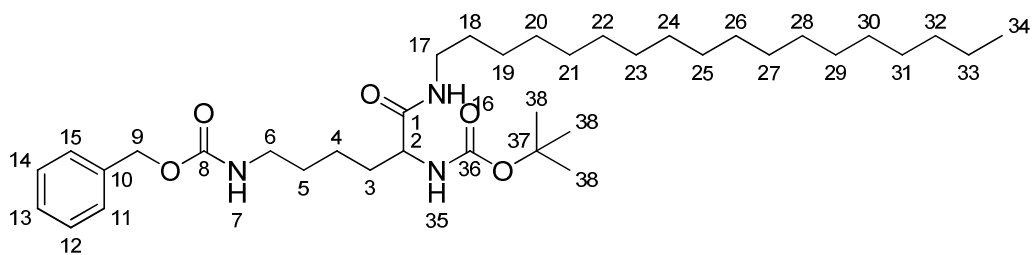
1,00 g d'acide 6-amino-2-(bis-carboxyméthyl-amino)-hexanoïque, **II-2**, (3,8 mmol, 1,2 éq.) et 3,1 mL de triéthylamine (22,3 mmol, 7 éq.) sont dispersés dans 100 mL de diméthylformamide et de l'eau est ajouté au goutte à goutte jusqu'à solubilisation totale du solide blanc. 1,44 g de pentacosa-10,12-diynoate de 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yle, **II-3**, solubilisés dans 50 mL de diméthylformamide sont additionnés. La solution est laissée à température ambiante pendant 12 heures puis le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans de l'eau puis acidifié avec de l'acide chlorhydrique 37% jusqu'à précipitation totale. Le solide (légèrement rosé) est filtré puis lavé à l'eau avant d'être séché soit sous vide en présence de P_2O_5 soit lyophilisé.

RMN 1H (DMSO, δ en ppm) : 7,68 (t, 1H, NH, $J=5,6$ Hz) ; 3,39-3,50 (q, 4H, H_7-H_7' , $J=17,6$ Hz – $J'=25,6$ Hz) ; 2,97 (m, 2H, H_6) ; 2,24 (t, 4H, $H_{17}-H_{22}$, $J=6,8$ Hz) ; 2,00 (t, 2H, H_{10} , $J=7,2$ Hz) ; 1,1 à 1,6 (m, 38H, H_3 à H_5-H_{11} à $H_{16}-H_{23}$ à H_{32}) ; 0,82 (t, 3H, H_{33} , $J=7,2$ Hz)

RMN ^{13}C (DMSO, δ en ppm) : 174,3 (1C, C_1) ; 173,6 (2C, C_8-C_8') ; 172,2 (1C, C_9) ; 78,0 (2C, $C_{18}-C_{21}$) ; 65,7 (1C, C_2) ; 64,7 (2C, $C_{19}-C_{20}$) ; 53,7 (2C, C_7-C_7') ; 38,6 (1C, C_6) ; 35,8 (1C, C_{10}) ; 28,0 à 31,7 (16C, C_5-C_{11} à $C_{16}-C_{23}$ à C_{31}) ; 25,7 (1C, C_3) ; 23,5 (1C, C_4) ; 22,5 (1C, C_{32}) ; 18,7 (2C, $C_{17}-C_{22}$) ; 14,3 (1C, C_{33})

MASSE (m/z) : (ESI+) 619 $[M+H]^+$; 641 $[M+Na]^+$ (ESI-) 617 $[M-H]^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3323 (m) ; 2925 (f) ; 2853 (f) ; 1929 (f) ; 1732 (m) ; 1645 (m) ; 1546 (m) ; 1464 (m) ; 1425 (m) ; 1256 (m) ; 983 (f) ; 892 (f) ; 720 (m)

6-(benzyloxycarbonylamino)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-6**

Formule brute : $C_{37}H_{65}N_3O_5$
Masse Molaire : 631,93 g/mol
Rendement : 78%
CCM : $R_f = 0,35$ (CH_2Cl_2 / CH_3OH : 95 / 5)

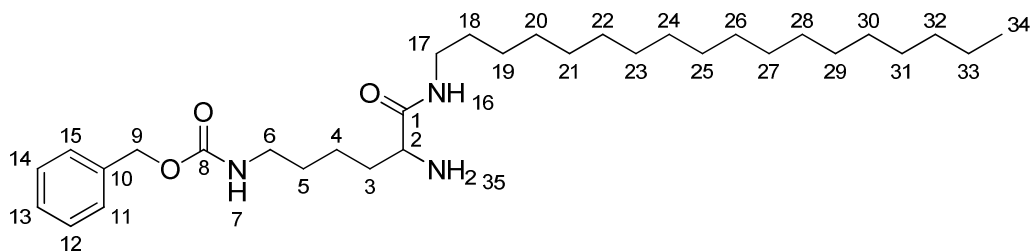
0,51 g (1,0 éq.) d'acide 6-(benzyloxycarbonylamino)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)hexanoïque et 0,23 g (1,5 éq.) de *N*-hydroxysuccinimide sont solubilisés dans 27 mL de dichlorométhane, auquel est ajouté 0,41 g (1,5 éq.) de dicyclohexylcarbodiimide (DCC). La solution est laissée 12 heures sous agitation à température ambiante sous azote. Un lavage à l'eau est effectué après réaction, puis la phase organique est séchée puis évaporée pour donner un solide blanc.

Le solide blanc est solubilisé dans 25 mL de dichlorométhane, auquel est ajouté 0,41 g (1,1 éq.) d'octadécylamine et 0,15 g (1,2 éq.) de triéthylamine. La solution est laissée 12 heures sous agitation à température ambiante sous azote. Un lavage à l'eau est effectué après réaction puis la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée pour donner un solide blanc. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 7,29 (m, 5H, H_{11} à H_{15}) ; 6,74 (m, 1H, H_{16}) ; 5,51 (m, 1H, H_{35}) ; 5,28 (m, 1H, H_7) ; 5,04 (m, 2H, H_9) ; 4,06 (m, 1H, H_2) ; 3,13 (m, 4H, H_6 - H_{17}) ; 1,1-1,8 (m, 47H, H_3 à H_5 - H_{18} à H_{33} - H_{38}) ; 0,85 (t, 3H, H_{34})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 171,8 (1C, C_1) ; 156,5 (1C, C_{36}) ; 155,7 (1C, C_8) ; 136,5 (1C, C_{10}) ; 128,4 (2C, C_{11} - C_{15}) ; 128,0 (3C, C_{12} - C_{13} - C_{14}) ; 79,9 (1C, C_{37}) ; 66,6 (1C, C_9) ; 54,5 (1C, C_2) ; 39,4 (2C, C_6 - C_{17}) ; 22,4 à 31,9 (22C, C_3 à C_5 - C_{18} à C_{33} - C_{38}) ; 14,1 (1C, C_{34})

MASSE (m/z) : (ESI+) 632 [M+H]⁺

6-(benzyloxycarbonylamino)-hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-7**

Formule brute : $C_{32}H_{57}N_3O_3$

Masse Molaire : 531,81 g/mol

Rendement : 80%

CCM : $R_f = 0,21$ ($CH_2Cl_2 / CH_3OH : 95 / 5$)

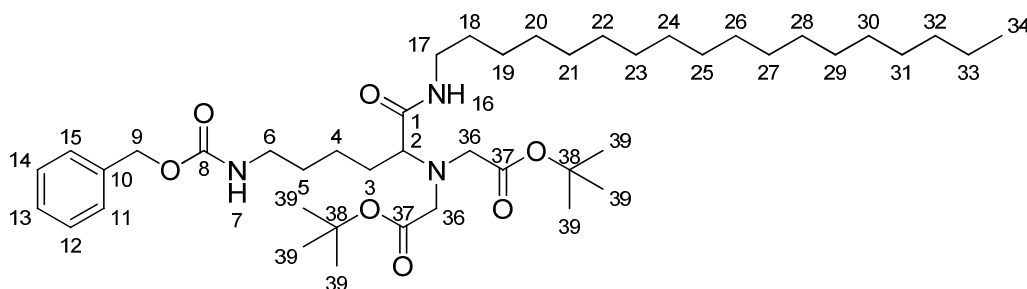
650 mg de 6-(benzyloxycarbonylamino)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-6**, sont solubilisés dans 20 mL de dichlorométhane et 20 mL d'acide trifluoroacétique. La solution est agitée à température ambiante sous azote pendant 4 heures puis est évaporée. Le résidu est repris dans du dichlorométhane et neutralisé par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium, évaporée puis purifiée par chromatographie sur colonne de silice.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 8,27 (m, 2H, H_{35}) ; 7,97 (m, 1H, H_{16}) ; 7,27 (m, 5H, H_{11} à H_{15}) ; 5,34 (m, 1H, H_7) ; 5,04 (m, 2H, H_9) ; 4,06 (m, 1H, H_2) ; 3,34 (m, 2H, H_{17}) ; 3,09 (m, 2H, H_6) ; 1,83 (m, 2H, H_{18}) ; 1,1-1,6 (m, 36H, H_3 à H_5 - H_{19} à H_{33}) ; 0,89 (t, 3H, H_{34})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 168,9 (1C, C_1) ; 156,8 (1C, C_8) ; 136,4 (1C, C_{10}) ; 127,5 à 128,4 (5C, C_{11} à C_{15}) ; 66,5 (1C, C_9) ; 53,8 (1C, C_2) ; 39,9 (2C, C_6 - C_{17}) ; 22,5 à 31,9 (19C, C_3 à C_5 - C_{18} à C_{33}) ; 14,1 (1C, C_{34})

MASSE (m/z) : (*ESI*+) 532,3 $[M+H]^+$; 554,3 $[M+Na]^+$; 1063,6 $[2M+H]^+$

2-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-6-(benzyloxycarbonylamino)-hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-8**



Formule brute : $C_{44}H_{77}N_3O_7$

Masse Molaire : 759,58 g/mol

Rendement : 92%

CCM : $R_f = 0,40$ ($CH_2Cl_2 / CH_3OH : 95 / 5$)

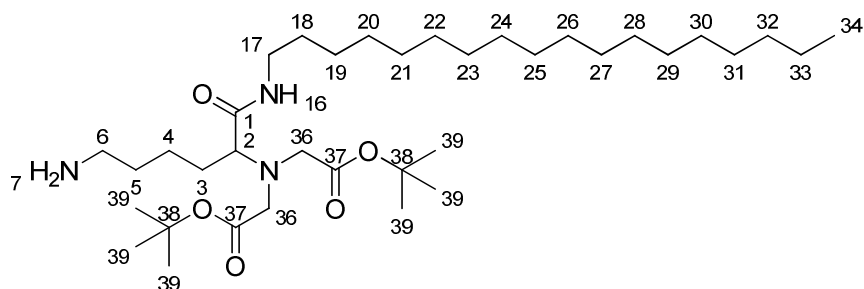
440 mg (1,0 éq.) de 6-(benzyloxycarbonylamino)-hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-7**, sont dispersés dans 30 mL d'acétonitrile auquel est ajouté 1,74 g (10 éq.) de bromoacétate de *tert*-butyle et 1,20 g (10 éq.) de diisopropyléthylamine. Le milieu réactionnel est à 80°C pendant 12 heures. La solution est ensuite évaporée, reprise dans du dichlorométhane et extraite avec de l'eau. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium, évaporée et purifiée par chromatographie sur colonne de silice.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 8,20 (m, 1H, H_{16}) ; 7,35 (m, 5H, H_{11} à H_{15}) ; 5,09 (s, 2H, H_9) ; 5,00 (m, 1H, H_7) ; 3,37 (q, 4H, H_{36} , $J=17,6$ Hz – $J'=30,4$ Hz) ; 3,17 à 3,24 (m, 5H, H_2 - H_6 - H_{17}) ; 1,24 à 1,65 (m, 56 H, H_3 à H_5 - H_{18} à H_{33} - H_{39}) ; 0,88 (t, 3H, H_{34} , $J=6,8$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 173,3 (1C, C_1) ; 171,4 (1C, C_{37}) ; 156,4 (1C, C_8) ; 136,7 (1C, C_{10}) ; 127,8 à 128,4 (5C, C_{11} à C_{15}) ; 81,4 (2C, C_{38}) ; 66,3 (2C, C_9 - C_2) ; 53,6 (2C, C_{36}) ; 40,6 (1C, C_6) ; 39,2 (1C, C_{17}) ; 22,6 à 31,9 (25C, C_3 à C_5 - C_{18} à C_{33} - C_{39}) ; 14,0 (1C, C_{34})

MASSE (m/z) : (ESI^+) 782 [$M+Na$] $^+$

6-amino-2-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-9**



Formule brute : $C_{36}H_{71}N_3O_5$
Masse Molaire : 625,54 g/mol
Rendement : 74%
CCM : Rf = 0,05 (CH_2Cl_2 / CH_3OH : 95 / 5)

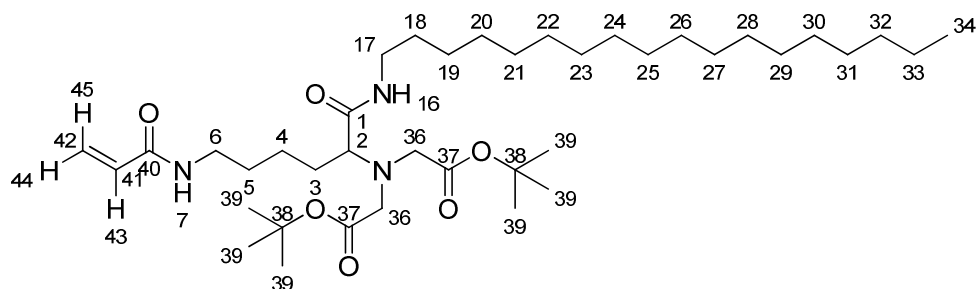
1,34 g de 2-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-6-(benzyloxycarbonylamino)-hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-8**, sont solubilisés dans 60 mL de méthanol auquel est ajoutée une pointe de spatule de palladium sur charbon activé (10%). Le ballon est purgé quatre fois à l'azote et quatre fois à l'hydrogène. La solution est laissée à température ambiante sous hydrogène pendant 12 heures. La solution est filtrée, évaporée et purifiée par chromatographie sur colonne de silice.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 8,29 (t, 1H, H_{16} , $J=5,6$ Hz) ; 5,09 (m, 2H, H_7) ; 3,32 (s, 4H, H_{36}) ; 3,25 (m, 1H, H_2) ; 3,15 (m, 2H, H_{17}) ; 2,96 (m, 2H, H_6) ; 1,75 (m, 2H, H_{18}) ; 1,40 à 1,60 (m, 24H, H_3 à H_5 - H_{39}) ; 1,15 à 1,35 (m, 30H, H_{19} à H_{33}) ; 0,84 (t, 3H, H_{34} , $J=6,8$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 173,5 (1C, C_1) ; 171,2 (2C, C_{37}) ; 81,4 (2C, C_{38}) ; 66,0 (1C, C_2) ; 53,7 (2C, C_{36}) ; 50,0 (1C, C_6) ; 39,4 (1C, C_{17}) ; 22,5 à 31,8 (25C, C_3 à C_5 - C_{18} à C_{33} - C_{39}) ; 13,9 (1C, C_{34})

MASSE (m/z) : (ESI+) 626 $[M+H]^+$; 648 $[M+Na]^+$

6-(acryloyle-amino)-2-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-10**



Formule brute : $C_{39}H_{73}N_3O_6$

Masse Molaire : 679,55 g/mol

Rendement : quantitatif

CCM : $R_f = 0,42$ (CH_2Cl_2 / CH_3OH : 95 / 5)

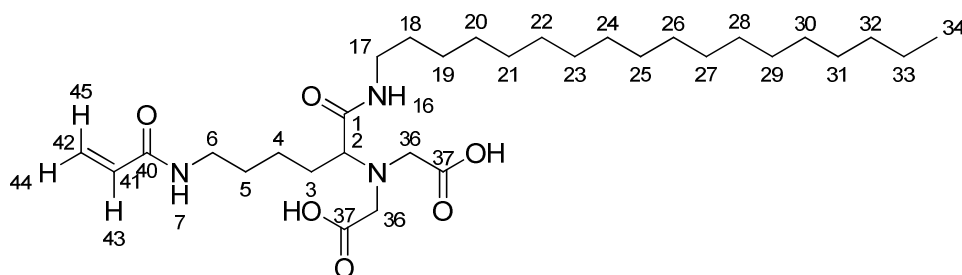
200 mg (1 éq.) de 6-amino-2-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-9**, sont solubilisés dans 10 mL de dichlorométhane anhydre. A cette solution est ajoutée 215 mg (5 éq.) de diisopropyléthylamine et 60 mg (2 éq.) de chlorure d'acryloyle. La solution est laissée sous agitation à température ambiante sous azote pendant 6 heures. La solution est extraite deux fois avec 10 mL d'eau, et la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, évaporée et purifiée par chromatographie sur colonne de silice.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 8,21 (m, 1H, H_{16}) ; 6,32 (m, 1H, H_7) ; 6,26-6,30 (dd, 1H, H_{45} , $J=1,6$ Hz – $J'=17,4$ Hz) ; 6,10-6,17 (dd, 1H, H_{43} , $J=10,4$ Hz – $J'=17,4$ Hz) ; 5,58-5,61 (dd, 1H, H_{44} , $J=1,6$ Hz – $J'=10,4$ Hz) ; 3,20 à 3,44 (m, 9H, H_2 - H_6 - H_{17} - H_{36}) ; 1,81 (m, 2H, H_{18}) ; 1,40 à 1,55 (m, 24H, H_3 - H_4 - H_5 - H_{39}) ; 1,1 à 1,35 (m, 30H, H_{20} à H_{33}) ; 0,87 (t, 3H, H_{34} , $J=6,8$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 173,1 (1C, C_1) ; 171,2 (2C, C_{37}) ; 165,1 (1C, C_{40}) ; 131,5 (1C, C_{41}) ; 126,2 (1C, C_{42}) ; 81,4 (2C, C_{38}) ; 66,0 (1C, C_2) ; 53,7 (2C, C_{36}) ; 40,8 (1C, C_6) ; 39,4 (1C, C_{17}) ; 22,6 à 31,8 (25C, C_3 à C_5 - C_{18} à C_{33} - C_{39}) ; 14,0 (1C, C_{34})

MASSE (m/z) : (ESI+) 680 [M+H]⁺

6-(acryloyle-amino)-2-(bis-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-11**



Formule brute : $C_{31}H_{57}N_3O_6$

Masse Molaire : 567.42 g/mol

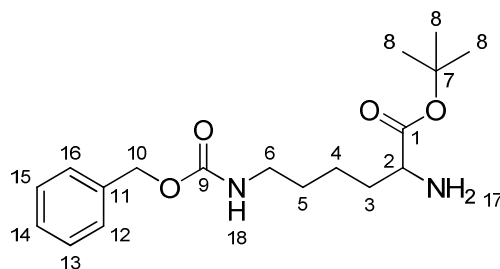
Rendement : 85%

200 mg de 6-(acryloyle-amino)-2-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexanoate de 1-amino-octadécyle, **II-10**, sont solubilisés dans 10 mL de dichlorométhane et 5 mL d'acide trifluoroacétique. La solution est agitée à température ambiante sous azote pendant 6 heures puis évaporée. Le résidu est solubilisé dans une solution de soude 1N puis acidifié avec de l'acide chlorhydrique concentré. Le précipité blanchâtre est centrifugé, lavé avec une solution d'acide chlorhydrique 1N puis séché sous vide en présence de P_2O_5 .

RMN 1H ($CDCl_3$ / CD_3OD , δ en ppm) : 6,55-6,61 (dd, 1H, H_{43} , $J=10,4$ Hz – $J'=16,8$ Hz) ; 6,35-6,45 (d, 1H, H_{45} , $J=16,8$ Hz) ; 5,84-5,92 (d, 1H, H_{44} , $J=10,4$ Hz) ; 4,10 à 4,40 (m, 4H, H_{36}) ; 3,76 (m, 1H, H_2) ; 3,10 à 3,50 (m, 4H, H_6 - H_{17}) ; 1,10 à 2,00 (m, 38 H, H_3 à H_5 - H_{18} à H_{33}) ; 0,87 (t, 3H, H_{34} , $J=6,4$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$ / CD_3OD , δ en ppm) : 173,5 (1C, C_1) ; 172,7 (2C, C_{37}) ; 166,9 (1C, C_{40}) ; 131,2 (1C, C_{41}) ; 126,6 (1C, C_{42}) ; 67,3 (1C, C_2) ; 54,6 (2C, C_{36}) ; 40,4 (1C, C_6) ; 39,4 (1C, C_{17}) ; 22,7 à 30,5 (25C, C_3 à C_5 - C_{18} à C_{33} - C_{39}) ; 14,0 (1C, C_{34})

MASSE (m/z) : (ESI-) 566 [M-H]⁺

2-amino-6-benzyloxycarbonylamino-hexanoate de *tert*-butyle, **II-12**

Formule brute : $C_{18}H_{28}N_2O_4$

Masse Molaire : 336,20 g/mol

Rendement : 68%

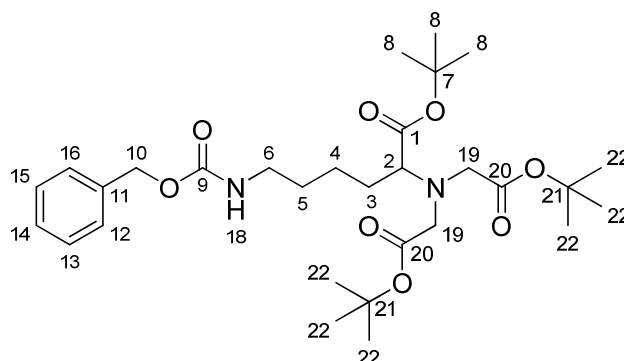
5,00 g de Z-lysine sont additionnés dans une bombe à hydrogénation, 100 mL de dioxane et 2 mL d' H_2SO_4 concentré sont ajoutés. La solution est refroidie à $-15^\circ C$ puis 50 mL d'isobutène condensé sont ajoutés. Le récipient est ensuite fermé et la solution agitée à température ambiante sous pression pendant 12 heures. En fin de réaction, l'isobutène est prudemment éliminé, et la solution est versée dans 300 mL de soude 1N et 500 mL d'éther. La phase aqueuse est extraite 3 fois avec 100 mL d'éther. Les 4 fractions sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées. Le produit récupéré est pur sous forme d'une huile légèrement jaune.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 7,33 (m, 5H, H_{12} à H_{16}) ; 5,10 (m, 2H, H_{10}) ; 4,91 (m, 1H, H_{18}) ; 3,27 (t, 1H, H_2 , $J=6,8$ Hz) ; 3,18 (m, 2H, H_6) ; 1,35 à 1,75 (m, 15H, H_3 à H_5-H_8)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 175,2 (1C, C_1) ; 156,4 (1C, C_9) ; 136,6 (1C, C_{11}) ; 127,9 à 128,3 (5C, C_{12} à C_{16}) ; 80,8 (1C, C_7) ; 66,9 (1C, C_{10}) ; 54,7 (1C, C_2) ; 40,79 (1C, C_6) ; 34,4 (1C, C_3) ; 29,6 (1C, C_5) ; 27,9 (3C, C_8) ; 22,7 (1C, C_4)

MASSE (m/z) : (ESI+) 337 [M+H] $^+$

6-benzyloxycarbonylamino-2-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexanoate de *tert*-butyle, **II-13**



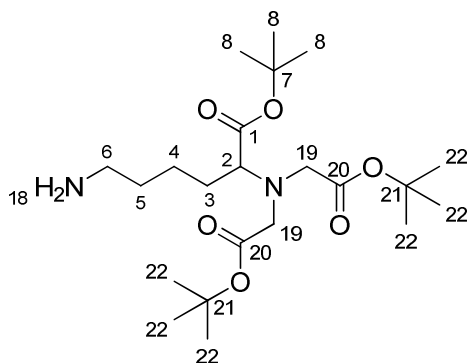
Formule brute :	$C_{30}H_{48}N_2O_8$
Masse Molaire :	564.7 g/mol
Rendement :	90%
CCM :	Rf = 0,61 (EtOAc / Hexane : 1 / 1)

2,81 (1 éq.) g de 2-amino-6-benzyloxycarbonylamino-hexanoate de *tert*-butyle, **II-12**, sont solubilisés dans 100 mL d'acétonitrile, auquel 6,52 g (4 éq.) du bromoacétate de *tert*-butyle et 5,40 g (5 éq.) de diisopropyléthylamine sont ajoutés. La solution est laissée sous agitation 12 heures à 80°C sous azote. La solution est ensuite évaporée puis de l'éther est ajouté au résidu. Le précipité formé est filtré. Le filtrat est évaporé puis purifié par chromatographie sur colonne de silice.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 7,30 (m, 5H, H_{12} à H_{16}) ; 5,20 (m, 1H, H_{18}) ; 5,05 (s, 2H, H_{10}) ; 3,41 (q, 4H, H_{19} , $J=17,2$ Hz, $J'=25,2$ Hz) ; 3,26 (t, 1H, H_2 , $J=7,2$ Hz) ; 3,15 (m, 2H, H_6) ; 1,30 à 1,70 (m, 33H, H_3 à H_5 - H_8 - H_{22})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 172,3 (1C, C_1) ; 170,6 (2C, C_{20}) ; 156,4 (1C, C_9) ; 136,7 (1C, C_{11}) ; 127,8 à 128,3 (5C, C_{12} à C_{16}) ; 80,9 (1C, C_7) ; 80,5 (2C, C_{21}) ; 66,3 (1C, C_{10}) ; 65,0 (1C, C_2) ; 53,8 (2C, C_{19}) ; 40,7 (1C, C_6) ; 30,0 (1C, C_3) ; 29,1 (1C, C_5) ; 28,1 (3C, C_8) ; 28,0 (6C, C_{22}) ; 22,9 (1C, C_4)

MASSE (m/z) : (ESI+) 565 $[M+H]^+$

6-amino-2-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexanoate de *tert*-butyle, **II-14**

Formule brute : $C_{22}H_{42}N_2O_6$

Masse Molaire : 430,5 g/mol

Rendement : quantitatif

7,10 g de 6-benzyloxycarbonylamino-2-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexanoate de *tert*-butyle, **II-13**, sont solubilisés dans 200 mL de méthanol auquel est ajouté 500 mg de palladium sur charbon activé (10%). Le ballon est purgé quatre fois à l'azote et quatre fois à l'hydrogène. La solution est laissée à température ambiante sous hydrogène pendant 12 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration. La solution est ensuite évaporée. Le produit pur est récupéré sous forme d'une mousse blanche.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 3,45 (q, 4H, H_{19} , $J=17,2$ Hz – $J'=29,6$ Hz) ; 3,28 (t, 1H, H_2 , $J=7,6$ Hz) ; 2,66 (t, 2H, H_6 , $J=6,4$ Hz) ; 1,20 à 1,60 (m, 33H, H_3 à H_5 - H_8 - H_{22})

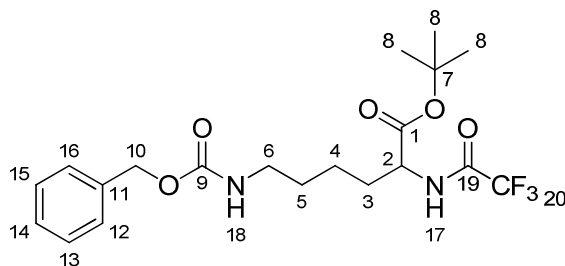
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 172,3 (1C, C_1) ; 170,6 (2C, C_{20}) ; 80,9 (1C, C_7) ; 80,5 (2C, C_{21}) ; 65,2 (1C, C_2) ; 53,6 (2C, C_{19}) ; 41,9 (1C, C_6) ; 33,5 (1C, C_5) ; 30,5 (1C, C_3) ; 28,1 (3C, C_8) ; 28,0 (6C, C_{22}) ; 23,2 (1C, C_4)

MASSE (m/z) : (ESI+) 431 [M+H] $^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3382 (f) ; 2978 (m) ; 2932 (m) ; 2867 (m) ; 1743 (F) ; 1726 (F) ; 1591 (f) ; 1478 (f) ; 1458 (f) ; 1392 (m) ; 1368 (m) ; 1291 (f) ; 1253 (f) ; 1221 (f) ; 1145 (F) ; 1036 (f) ; 987 (f) ; 848 (f) ; 734 (f)

6-benzyloxycarbonylamino-2-trifluorocarbonylamino-hexanoate de *tert*-butyle,

II-15



Formule brute : $C_{20}H_{27}F_3N_2O_5$

Masse Molaire : 432.4 g/mol

Rendement : quantitatif

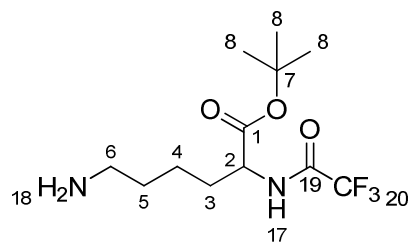
3,97 g (1,0 éq.) de 2-amino-6-benzyloxycarbonylamino-hexanoate de *tert*-butyle, **II-12**, sont solubilisés dans 40 mL de dichlorométhane anhydre, auquel est ajouté 2,60 g (1,05 éq.) d'anhydride trifluoroacétique. La solution est agitée sous azote à température ambiante pendant 3 heures. La solution est évaporée puis repris dans 20 mL de dichlorométhane. La solution est extraite 2 fois avec 30 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée pour donner un solide blanc.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 7,25 à 7,35 (m, 5H, H_{12} à H_{16}) ; 5,10 (s, 2H, H_{10}) ; 5,00 (m, 1H, H_{18}) ; 4,44 (m, 1H, H_2) ; 3,16 (m, 2H, H_6) ; 1,20 à 2,00 (m, 15H, H_3 à H_5 - H_8)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 169,5 (1C, C_1) ; 156,0 à 157,0 (q, 1C, C_{19}) ; 156,0 (1C, C_9) ; 137,2 (1C, C_{11}) ; 127,5 à 128,3 (5C, C_{12} à C_{16}) ; 111,4-114,2-117,2-120,0 (1C, C_{20} , $J=280$ Hz, $J'=580$ Hz) ; 81,1 (1C, C_7) ; 65,0 (1C, C_{10}) ; 53,3 (1C, C_2) ; 40,2 (1C, C_6) ; 29,4 (1C, C_3) ; 28,8 (1C, C_5) ; 27,4 (3C, C_8) ; 22,7 (1C, C_4)

MASSE (m/z) : (ESI+) 455 [$M+Na$] $^+$; 887 [$2M+Na$] $^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3363 (F) ; 3331 (F) ; 2952 (m) ; 2874 (m) ; 1708 (F) ; 1534 (F) ; 1465 (m) ; 1391 (m) ; 1373 (m) ; 1306 (F) ; 1261 (F) ; 1205 (F) ; 1152 (F) ; 1011 (m) ; 842 (m) ; 752 (m) ; 731 (m) ; 628 (m)

6-amino-2-trifluorocarbonylamino-hexanoate de *tert*-butyle, **II-16**

Formule brute : $C_{12}H_{21}F_3N_2O_3$

Masse Molaire : 298.3 g/mol

Rendement : quantitatif

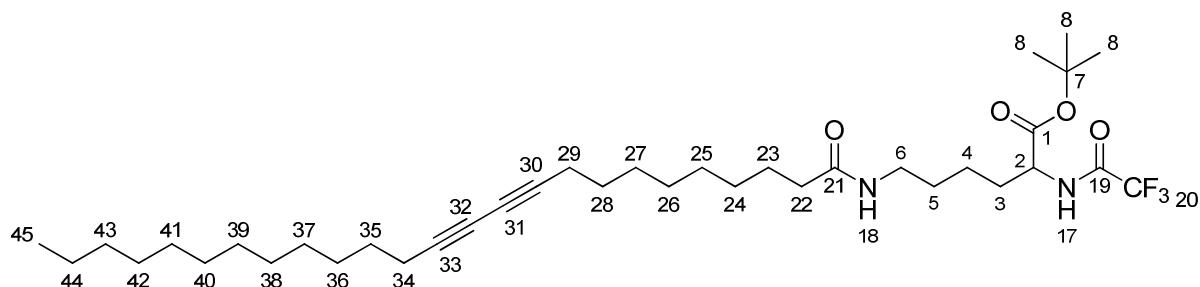
1,97 g de 6-benzyloxycarbonylamino-2-trifluorocarbonylamino-hexanoate de *tert*-butyle, **II-15**, sont solubilisés dans 50 mL de méthanol auquel est ajouté 280 mg de palladium sur charbon activé (10%). Le ballon est purgé quatre fois à l'azote et quatre fois à l'hydrogène. La solution est laissée à température ambiante sous hydrogène pendant 12 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration. La solution est ensuite évaporée. Le produit pur est récupéré sous forme d'un solide blanc.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 4,41 (m, 1H, H_2) ; 2,93 (m, 2H, H_6 , $J=7,2$ Hz) ; 1,20 à 2,00 (m, 15H, H_3 à H_5 - H_8)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 169,9 (1C, C_1) ; 156,5 à 158,0 (q, 1C, C_{19}) ; 114,2-115,0-117,1-117,9 (1C, C_{20} , $J=80$ Hz – $J'=290$ Hz) ; 83,4 (1C, C_7) ; 53,1 (1C, C_2) ; 39,3 (1C, C_6) ; 30,9 (1C, C_3) ; 27,9 (3C, C_8) ; 27,0 (1C, C_5) ; 22,0 (1C, C_4)

MASSE (m/z) : (ESI+) 299 $[M+H]^+$

6-(pentacosa-10,12-diynoamino)-2-trifluorocarbonylamino-hexanoate de *tert*-butyle, **II-17**



Formule brute : $C_{37}H_{61}F_3N_2O_4$

Masse Molaire : 654.8 g/mol

Rendement : 85%

CCM : Rf = 0,35 (CH₂Cl₂ / CH₃OH : 95 / 5)

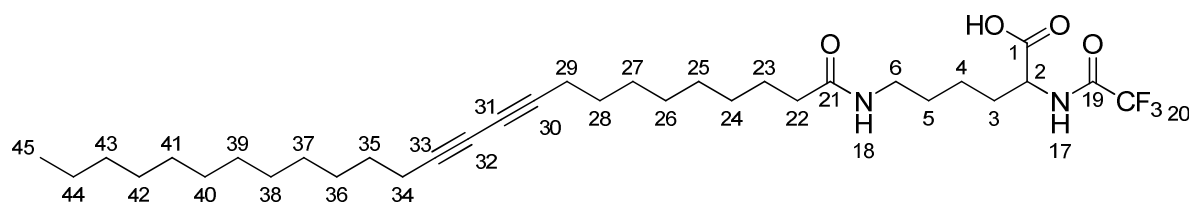
1,32 g (1,0 éq.) de pentacosa-10,12-diynoate de 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yle, **II-3**, 1,31 g (1,5 éq.) de 6-amino-2-trifluorocarbonylamino-hexanoate de *tert*-butyle, **II-16** et 1,89 g (5 éq.) de diisopropyléthylamine sont solubilisés dans 50 mL de dichlorométhane anhydre. La solution est laissée sous agitation à température sous azote pendant 12 heures. Un lavage à l'eau est effectué après réaction puis la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, évaporée et purifiée par chromatographie sur colonne de silice.

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 7,17 (m, 1H, H₁₇) ; 5,56 (m, 1H, H₁₈) ; 4,42 (q, 1H, H₂, J=7,6 Hz, J'=14,8 Hz) ; 3,25 (q, 2H, H₆, J=6,8 Hz – J'=10,4 Hz) ; 2,23 (t, 4H, H₂₉-H₃₄, J=6,8 Hz) ; 2,14 (t, 2H, H₂₂, J=7,6 Hz) ; 1,2 à 2,0 (m, 47H, H₃ à H₅-H₂₃ à H₂₈-H₃₅ à H₄₄) ; 0,88 (t, 3H, H₄₅, J=7,2 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 173,5 (1C, C₂₁) ; 169,8 (1C, C₁) ; 156,0 à 158,0 (q, 1C, C₁₉) ; 83,2 (1C, C₇) ; 78 (2C, C₃₀-C₃₃) ; 65,2 (2C, C₃₁-C₃₂) ; 52,9 (1C, C₂) ; 38,5 (1C, C₆) ; 36,7 (1C, C₂₂) ; 25,6 à 31,8 (20C, C₃-C₅-C₈-C₂₃ à C₂₈-C₃₅ à C₄₃) ; 22,6 (1C, C₄) ; 21,9 (1C, C₄₄) ; 19,1 (2C, C₂₉-C₃₄) ; 14,0 (1C, C₄₅)

MASSE (m/z) : (ESI+) 655 [M+H]⁺

Acide 6-(pentacosa-10,12-diynoamino)-2-trifluorocarbonylamino-hexanoïque,
II-18



Formule brute : $C_{33}H_{53}F_3N_2O_4$

Masse Molaire : 598.4 g/mol

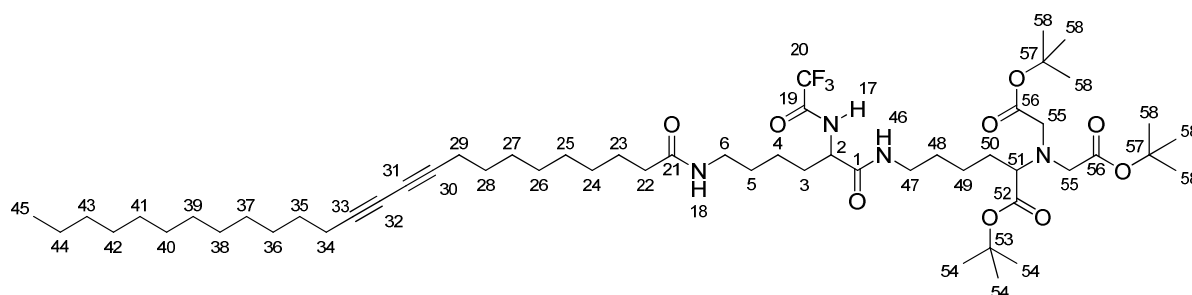
Rendement : 90%

2,09 g de 6-(pentacosa-10,12-diynoamino)-2-trifluorocarbonylamino-hexanoate de *tert*-butyle, **II-17**, sont solubilisés dans 50 mL de dichlorométhane anhydre auquel est ajouté 5 mL d'acide trifluoroacétique. La solution est laissée 6 heures sous azote à température ambiante. Le solvant est évaporé, puis le résidu est repris plusieurs fois par du dichlorométhane et évaporé pour éliminer l'acide trifluoroacétique. Le produit récupéré est sous forme d'huile brune.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 7,52 (m, 1H, H_{17}) ; 6,37 (m, 1H, H_{18}) ; 4,64 (m, 1H, H_2) ; 3,03 (m, 2H, H_6) ; 2,10 (t, 4H, H_{29} - H_{34} , $J=6,8$ Hz) ; 2,00 (t, 2H, H_{22} , $J=7,6$ Hz) ; 1,2 à 2,0 (m, 38H, H_3 à H_5 - H_{23} à H_{28} - H_{35} à H_{44}) ; 0,74 (t, 3H, H_{45} , $J=7,2$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 176,8 (1C, C_{21}) ; 173,7 (1C, C_1) ; 158,3 à 157,1 (q, 1C, C_{19}) ; 111,2-114,1-116,9-119,8 (q, 1C, C_{20}) ; 77,6 (2C, C_{30} - C_{33}) ; 65,2 (2C, C_{31} - C_{32}) ; 52,5 (1C, C_2) ; 39,3 (1C, C_6) ; 36,0 (1C, C_{22}) ; 25,7 à 31,9 (20C, C_3 - C_5 - C_{23} à C_{28} - C_{35} à C_{43}) ; 22,6 (1C, C_4) ; 21,9 (1C, C_{44}) ; 19,0 (2C, C_{29} - C_{34}) ; 14,0 (1C, C_{45})

MASSE (m/z) : (*ESI+*) 599 $[M+H]^+$

6-(pentacosa-10,12-diynoylamino)-1-[6-*tert*-butoxycarbonyl-5-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexane-1-aminocarbonyl]-2-trifluorocarbonylamino-hexane, **II-20**

Formule brute : $C_{55}H_{93}F_3N_4O_9$

Masse Molaire : 1011.3 g/mol

Rendement : 70%

CCM : Rf = 0,42 (CH_2Cl_2 / CH_3OH : 92 / 8)

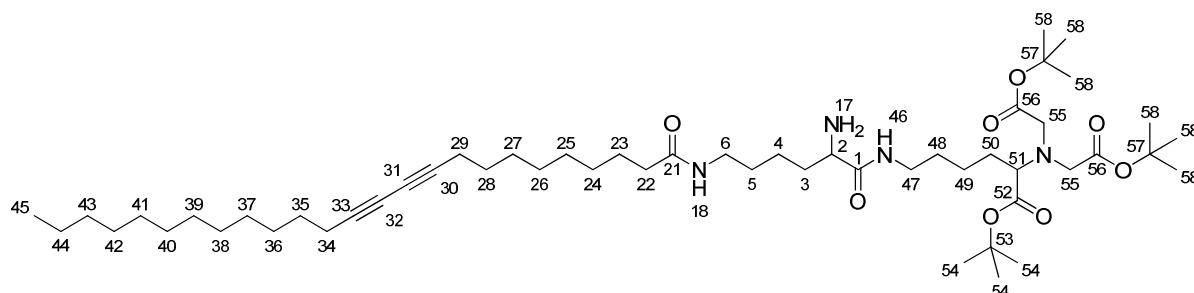
330 mg d'acide 6-(pentacosa-10,12-diynoylamino)-2-trifluorocarbonylamino-hexanoïque, **II-18**, 95 mg (1,5 éq.) de *N*-hydroxysuccinimide et 160 mg de *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide sont solubilisés dans 20 mL de dichlorométhane. La solution est laissée 12 heures sous agitation à température ambiante sous azote. Un lavage à l'eau est effectué après réaction, puis la phase organique est séchée puis évaporée. Le résidu, **II-19**, est solubilisé dans 20 mL de dichlorométhane anhydre auquel est ajouté 308 mg de 6-amino-2-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexanoate de *tert*-butyle, **II-14**, et 280 mg de triéthylamine. La solution est laissée 12 heures sous agitation à température ambiante sous azote. Un lavage à l'eau est effectué après réaction. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, évaporée puis purifiée par chromatographie sur colonne de silice.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 7,08 (m, 1H, H_{17}) ; 6,10 (m, 1H, H_{18}) ; 5,65 (1H, H_{46}) ; 4,60 (m, 1H, H_2) ; 3,10 à 3,60 (m, 9H, H_6 - H_{47} - H_{51} - H_{55}) ; 2,22 (t, 4H, H_{29} - H_{34} , $J=6,8$ Hz) ; 2,15 (m, 2H, H_{22}) ; 1,2 à 2,0 (m, 71H, H_3 à H_5 - H_{23} à H_{28} - H_{35} à H_{44} - H_{48} à H_{50} - H_{54} - H_{58}) ; 0,87 (t, 3H, H_{45} , $J=7,2$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 173,4 (2C, C_1 - C_{21}) ; 169,8 (3C, C_{52} - C_{56}) ; 156,0 à 158 (1C, C_{19}) ; 111,0 à 120,0 (1C, C_{20}) ; 83,6 (1C, C_{53}) ; 83,2 (2C, C_{57}) ; 78,0 (2C, C_{30} - C_{33}) ; 65,1 (2C, C_{31} - C_{32}) ; 52,6-52,9 (4C, C_2 - C_{51} - C_{55}) ; 38,5-39,3 (2C, C_6 - C_{47}) ; 36,7 (1C, C_{22}) ; 31,8 (2C, C_3 - C_{50}) ; 27,8 à 30,0 (25C, C_5 - C_{24} à C_{28} - C_{35} à C_{43} - C_{48} - C_{54} - C_{58}) ; 25,6 (1C, C_{23}) ; 21,9-22,6 (3C, C_4 - C_{44} - C_{49}) ; 19,1 (2C, C_{29} - C_{34}) ; 14,0 (1C, C_{45})

MASSE (m/z) : (*ESI*⁺) 1012 [$M+H$]⁺

2-amino-6-(pentacosa-10,12-diynoylamino)-1-[6-*tert*-butoxycarbonyl-5-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexane-1-aminocarbonyl]-hexane, **II-21**



Formule brute : $C_{53}H_{94}N_4O_8$

Masse Molaire : 914,7 g/mol

Rendement : 80%

CCM : $R_f = 0,23$ ($CH_2Cl_2 / CH_3OH : 90 / 10$)

1,58 g (1,0 éq.) de 6-(pentacosa-10,12-diynoylamino)-1-[6-*tert*-butoxycarbonyl-5-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexane-1-aminocarbonyl]-2-trifluorocarbonylamino-hexane, **II-20**, sont solubilisés dans 80 mL d'éthanol, auquel est ajouté 1,18 g (20 éq.) de borohydrure de sodium. La solution est laissée sous agitation pendant 12 heures sous azote. La solution est évaporée et du dichlorométhane est ajouté. Un lavage à l'eau est effectué et la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, évaporée puis est purifiée par chromatographie sur colonne de silice.

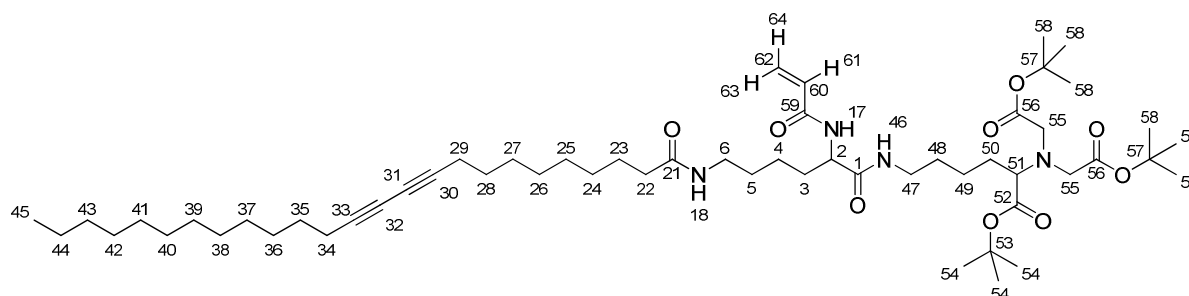
RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 3,10 à 3,50 (m, 10H, $H_2-H_6-H_{47}-H_{51}-H_{55}$) ; 2,20 (t, 4H, $H_{29}-H_{34}$, $J=6,8$ Hz) ; 2,11 (t, 2H, H_{22} , $J=7,2$ Hz) ; 1,1 à 1,9 (m, 71H, H_3 à H_5-H_{23} à $H_{28}-H_{35}$ à $H_{44}-H_{48}$ à $H_{50}-H_{54}-H_{58}$) ; 0,84 (t, 3H, H_{45} , $J=6,8$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 173,2 (1C, C_1) ; 172,4 (1C, C_{21}) ; 170,7 (1C, C_{52}) ; 170,5 (2C, C_{56}) ; 80,8 (1C, C_{53}) ; 80,6 (2C, C_{57}) ; 78,0 (2C, $C_{30}-C_{33}$) ; 65,2 (2C, $C_{31}-C_{32}$) ; 53,7 (4C, $C_2-C_{51}-C_{55}$) ; 38,9 (2C, C_6-C_{47}) ; 36,6 (1C, C_{22}) ; 31,8 (2C, C_3-C_{50}) ; 27,5 à 30,0 (25C, C_5-C_{24} à $C_{28}-C_{35}$ à $C_{43}-C_{48}-C_{54}-C_{58}$) ; 25,7 (1C, C_{23}) ; 22,5 (3C, $C_4-C_{44}-C_{49}$) ; 19,0 (2C, $C_{29}-C_{34}$) ; 14,0 (1C, C_{45})

MASSE (m/z) : (ESI^+) 915,6 $[M+H]^+$; 937,6 $[M+Na]^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3306 (m) ; 3087 (f) ; 2929 (F) ; 2856 (m) ; 2241 (f) ; 1727 (F) ; 1649 (m) ; 1547 (m) ; 1458 (m) ; 1392 (f) ; 1368 (m) ; 1253 (m) ; 1223 (m) ; 1146 (F) ; 1077 (f) ; 987 (f) ; 912 (m) ; 848 (m) ; 733 (F)

2-acryloylamino-6-(pentacos-10,12-diynoylamino)-1-[6-*tert*-butoxycarbonyl-5-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexane-1-aminocarbonyl]-hexane, **II-22**



Formule brute : $C_{56}H_{96}N_4O_8$

Masse Molaire : 968,7 g/mol

Rendement : 92%

CCM : Rf = 0,39 (CH_2Cl_2 / CH_3OH : 90 / 10)

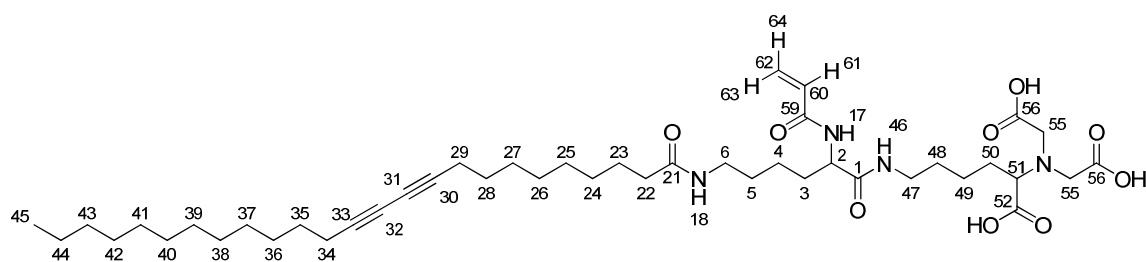
640 mg (1 éq.) de 2-amino-6-(pentacos-10,12-diynoylamino)-1-[6-*tert*-butoxycarbonyl-5-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexane-1-aminocarbonyl]-hexane, **II-21**, sont solubilisés dans 40 mL de dichlorométhane anhydre et 700 μ l de diisopropyléthylamine, auquel est ajouté, à 0°C, 127 mg de chlorure d'acryloyle (2 éq.). La solution est laissée sous agitation à température ambiante sous azote pendant 4 heures. La solution est évaporée à sec puis purifiée par chromatographie sur colonne de silice.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 6,55 (dd, 1H, H_{63} , $J=1,2$ Hz – $J'=16,8$ Hz) ; 6,27 (m, 2H, H_{18} - H_{40}) ; 6,15 (dd, 1H, H_{64} , $J=10,8$ Hz, $J'=16,8$ Hz) ; 6,06 (dd, 1H, H_{61} , $J=1,2$ Hz – $J'=10,8$ Hz) ; 5,63 (m, 1H, H_{17}) ; 3,10 à 3,50 (m, 10H, H_2 - H_6 - H_{47} - H_{51} - H_{55}) ; 2,21 (t, 4H, H_{29} - H_{34} , $J=6,8$ Hz) ; 2,14 (t, 2H, H_{22} , $J=7,2$ Hz) ; 1,20 à 1,70 (m, 71H, H_3 à H_5 - H_{23} à H_{28} - H_{35} à H_{44} - H_{48} à H_{50} - H_{54} - H_{58}) ; 0,85 (t, 3H, H_{45} , $J=6,8$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 172,5 (1C, C_1) ; 172,2 (1C, C_{21}) ; 171,9 (1C, C_{52}) ; 170,4 (2C, C_{56}) ; 164,6 (1C, C_{59}) ; 132,1 (1C, C_{60}) ; 125,5 (1C, C_{62}) ; 80,6 (1C, C_{53}) ; 80,3 (2C, C_{57}) ; 78,2 (2C, C_{30} - C_{33}) ; 64,9-65,7 (2C, C_{31} - C_{32}) ; 53,6 (3C, C_{51} - C_{55}) ; 52,8 (1C, C_2) ; 38,6-38,8 (2C, C_6 - C_{47}) ; 35,8 (1C, C_{22}) ; 31,7 (2C, C_3 - C_{50}) ; 28,0 à 30,1 (25C, C_5 - C_{24} à C_{28} - C_{35} à C_{43} - C_{48} - C_{54} - C_{58}) ; 25,7 (1C, C_{23}) ; 22,5 (3C, C_4 - C_{44} - C_{49}) ; 18,7 (2C, C_{29} - C_{34}) ; 14,3 (1C, C_{45})

MASSE (m/z) : (ESI+) 969 [M+H]⁺

2-acryloylamino-6-(pentacosyl-10,12-diyndoylamino)-1-[6-carboxy-5-(bis-carboxyméthyl-amino)-hexane-1-aminocarbonyl]-hexane, **II-23**



Formule brute : $C_{44}H_{72}N_4O_9$

Masse Molaire : 801,5 g/mol

Rendement : 90%

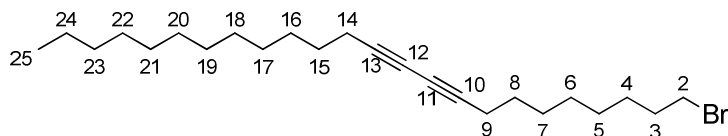
525 mg de 2-acryloylamino-6-(pentacosyl-10,12-diyndoylamino)-1-[6-*tert*-butoxycarbonyl-5-(bis-*tert*-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexane-1-aminocarbonyl]-hexane, **II-22**, sont solubilisés dans 60 mL de dichlorométhane anhydre et 5 mL d'acide trifluoroacétique. La solution est laissée sous agitation à température ambiante sous azote. La solution est évaporée à sec puis le résidu est redispersé dans du méthanol puis évaporé. Le produit est récupéré sous forme d'une poudre blanchâtre.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 6,31 (dd, 1H, H_{63} , $J'=17,4$ Hz) ; 6,20 (m, 2H, H_{18} - H_{46}) ; 6,03 (dd, 1H, H_{64} , $J=10,4$ Hz – $J'=17,4$ Hz) ; 5,78 (dd, 1H, H_{61} , $J=10,4$ Hz) ; 5,61 (m, 1H, H_{17}) ; 3,48 à 3,51 (m, 4H, H_{55}) ; 3,08 à 3,15 (m, 6H, H_2 - H_6 - H_{47} - H_{51}) ; 2,16 (t, 4H, H_{29} - H_{34} , $J=6,8$ Hz) ; 2,07 (t, 2H, H_{22} , $J=6,8$ Hz) ; 1,10 à 1,80 (m, 44H, H_3 à H_5 - H_{23} à H_{28} - H_{35} à H_{44} - H_{48} à H_{50}) ; 0,80 (t, 3H, H_{45} , $J=6,8$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 174,1 (1C, C_{52}) ; 173,6 (1C, C_1) ; 172,7 (1C, C_{21}) ; 172,4 (2C, C_{56}) ; 164,6 (1C, C_{59}) ; 132,3 (1C, C_{60}) ; 125,0 (1C, C_{62}) ; 78,1 (2C, C_{30} - C_{33}) ; 65,2 (2C, C_{31} - C_{32}) ; 53,7 (3C, C_{51} - C_{55}) ; 52,6 (1C, C_2) ; 39,0 (2C, C_6 - C_{47}) ; 36,2 (1C, C_{22}) ; 31,6 (1C, C_3) ; 27,8 à 30,3 (17C, C_5 - C_{24} à C_{28} - C_{35} à C_{43} - C_{48} - C_{50}) ; 25,7 (1C, C_{23}) ; 22,4 (3C, C_4 - C_{44} - C_{49}) ; 19,1 (2C, C_{29} - C_{34}) ; 14,0 (1C, C_{45})

MASSE (m/z) : (ESI-) 800 $[M-H]^+$

II-2-Résultats expérimentaux du Chapitre III

1-bromotétracososa-9,11-diyne, **III-2**

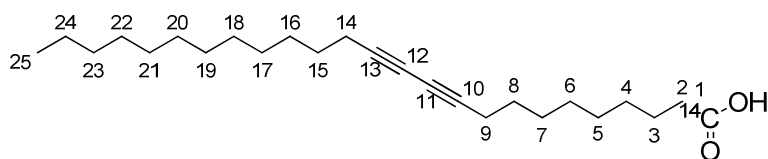
Formule brute :	$C_{24}H_{41}Br$
Masse Molaire :	408.2 g/mol
Rendement :	32% sur 2 étapes
CCM :	Rf = 0,16 (Cyclohexane : 100%)

1 g (1 éq.) d'acide pentacososa-10,12-diynoïque est solubilisé dans 10 mL de toluène. A cette solution est ajoutée goutte à goutte 1,69 g (5 éq.) de chlorure d'oxalyle à 0°C. La solution est laissée à température ambiante sous N_2 pendant 12 heures. La solution est évaporée à sec et le résidu est repris 3 fois avec 50 mL de toluène anhydre afin d'éliminer les traces de chlorure d'oxalyle pour conduire au composé **III-1**.

126,0 mg (0,4 éq.) de DMAP, 477,8 mg (1,2 éq.) de *N*-oxyde de 2-mercaptopyridine sont solubilisés dans 15 mL de bromotrichlorométhane. La solution est chauffée au reflux et **III-1** dans 5 mL de bromotrichlorométhane sont ajoutés à la solution au reflux. Après l'addition, la réaction est laissée 1 heure au reflux puis refroidie à température ambiante. La solution est diluée dans 50 mL de diéthyléther puis 50 mL d'une solution aqueuse de chlorure de sodium saturée est ajoutée. La phase aqueuse est extraite avec 2 fois 50 mL de diéthyléther. Les phases organiques sont combinées et séchées sur sulfate de magnésium, évaporées puis sont purifiées par chromatographie sur colonne de silice.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 3,40 (t, 2H, H_2 , $J=6,8$ Hz) ; 2,24 (t, 4H, H_9-H_{14} , $J=6,8$ Hz) ; 1,85 (q, 2H, H_3 , $J=6,8$ Hz) ; 1,2 à 1,6 (m, 30H, H_4 à H_8-H_{15} à H_{24}) ; 0,89 (t, 3H, H_{25} , $J=6,8$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 78,2 (2C, $C_{10}-C_{13}$) ; 65,2 (2C, $C_{11}-C_{12}$) ; 33,9 (1C, C_2) ; 32,7 (1C, C_3) ; 31,8 (1C, C_{23}) ; 26,7 à 29,6 (13C, C_4 à C_8-C_{15} à C_{22}) ; 22,6 (1C, C_{24}) ; 19,1 (2C, C_9-C_{14}) ; 14,0 (1C, C_{25})

Acide [1-¹⁴C]-pentacosa-10,12-diynoïque, **III-4**

Formule brute : $C_{25}H_{42}O_2$

Masse Molaire : 376,3 g/mol

Rendement : 66% sur 2 étapes

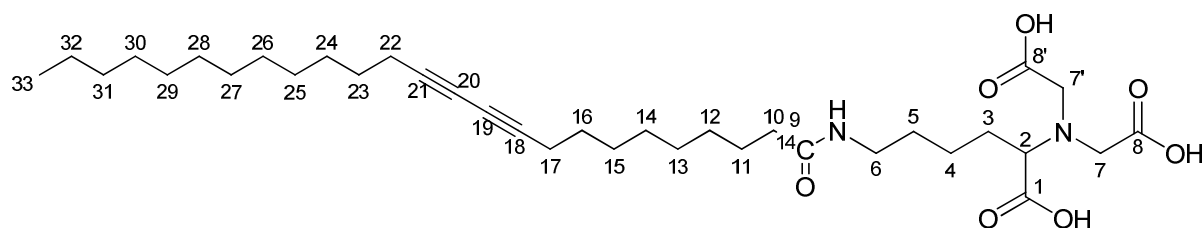
82,1 mg (1 éq.) de **III-2** et 36,2 mg (2,7 éq.) de cyanure de potassium marqué au carbone 14 sont solubilisés dans 10 mL de DMSO. La solution est laissée à 80°C sous argon pendant une nuit. La solution est ensuite diluée dans 20 mL de diéthyléther et 30 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite 2 fois avec du diéthyléther. Les fractions organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, évaporées puis sont purifiées par chromatographie sur colonne de silice (hexane 90 / diéthyléther 10).

GC/MS : r.t.=19,40 minutes / m/z=356 M⁺

Le produit purifié **III-3** est solubilisé dans un mélange de 10 mL d'éthanol et 10 mL d'hydroxyde de potassium à 40%. La solution est chauffée pendant 6 heures à 80°C, puis refroidie à température ambiante. De la glace est ajoutée à la solution puis le milieu réactionnel est acidifié avec de l'acide chlorhydrique à pH=1. La phase aqueuse est extraite 3 fois avec du diéthyléther. Les fractions organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, évaporées puis sont purifiées par chromatographie sur colonne de silice (hexane 85 / diéthyléther 15 / acide acétique 1).

Comptage par scintillation liquide : 140 μ Ci/mg

Acide 2-(bis-carboxyméthyl-amino)-6-[1-¹⁴C]-pentacosa-10,12-diynoïlamino-hexanoïque, **III-5**



Formule brute : $C_{35}H_{58}N_2O_7$

Masse Molaire : 620,4 g/mol

Rendement : quantitatif sur 2 étapes

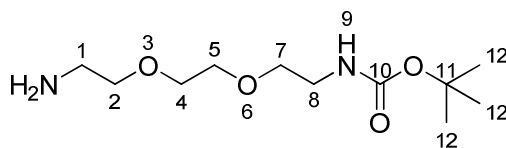
25 mg de l'acide [1-¹⁴C]-pentacosa-10,12-diynoïque, **III-4**, et 225 mg de l'acide pentacosa-10,12-diynoïque sont solubilisés dans 25 mL de dichlorométhane anhydre. A cette solution est ajoutée 116 mg (1,5 éq.) de NHS et 195 mg (1,5 éq.) d'EDCA. La solution est agitée à température ambiante sous argon pendant 12 heures. Une extraction à l'eau est effectuée et la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée pour donner un solide rosé, **III-5**.

230 mg (1,3 éq.) d'acide 6-amino-2-(bis-carboxyméthyl-amino)-hexanoïque, **II-2**, sont solubilisés dans 30 mL de DMF, 2 mL (1 éq.) d'eau et 1 mL de triéthylamine. A cette solution est ajouté le composé **III-5** solubilisé dans 10 mL de DMF. La solution est laissée sous agitation pendant 12 heures à température ambiante. Le solvant est évaporé à sec, et le résidu est repris dans 30 mL d'eau. La solution est ensuite acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 35% jusqu'à pH = 1. Le précipité est centrifugé et lavé 2 fois avec 20 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le solide est finalement séché dans un dessiccateur pour donner un solide orange.

Comptage par scintillation liquide : 7,6 μ Ci/mg

MASSE (m/z) : (ESI-) 617 (100%) $[M-H]^+$; 618 (26,3%) $[M-H]^+$; 619 (5,2%) $[M-H]^+$

RMN ¹H (DMSO-d₆, δ en ppm) : 7,7 (t, 1H, NH) ; 3,50 (q, 4H, H₇-H_{7'}) ; 3,35 (t, 1H, H₂) ; 2,95 (m, 2H, H₆) ; 2,25 (t, 4H, H₁₇-H₂₂) ; 2,00 (t, 2H, H₁₀) ; 1,1 à 1,7 (m, 38H, H₃ à H₅-H₁₁ à H₁₆-H₂₃ à H₃₂) ; 0,83 (t, 3H, H₃₃)

8-(*tert*-butyl-carbamate)-3,6-dioxaoctamine , **III-7**

Formule brute : $C_{11}H_{24}N_2O_4$

Masse Molaire : 248.2 g/mol

Rendement : quantitatif

CCM : Rf = 0,15-0,2 (CH_2Cl_2 / CH_3OH / Et_3N : 44 / 30 / 6)

18,0 g (6,7 éq.) de 1,8-diamino-3,6-dioxooctane sont solubilisés dans 100 mL de dioxane. 4,37 g de di-*tert*-butyl-pyrocarbonate (Boc_2O) sont solubilisés dans 40 mL de dioxane et ajoutés goutte à goutte à la solution de 1,8-diamino-3,6-dioxooctane sur une période de 5 heures. La solution est laissée sous agitation à température 5 heures supplémentaires avant d'être évaporée. L'huile jaune récupérée est solubilisée dans 50 mL de dichlorométhane auquel est ajoutée 50 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite avec 3 fois 50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, évaporées puis sont purifiées par chromatographie sur colonne de silice.

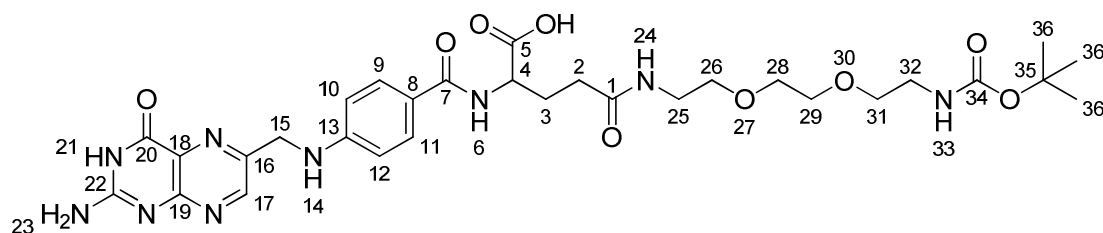
RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 5,16 (m, 1H, H_9) ; 3,62 (m, 4H, H_4-H_5) ; 3,53 (m, 4H, H_3-H_6) ; 3,30 (m, 2H, H_2) ; 2,86 (m, 2H, H_7) ; 1,59 (m, 2H, $-NH_2$) ; 1,42 (s, 9H, H_{12})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 155,8 (1C, C_1) ; 78,7 (1C, C_{11}) ; 73,1 (1C, C_2) ; 70,0 (3C, $C_4-C_5-C_7$) ; 41,5 (1C, C_1) ; 40,0 (1C, C_7) ; 28,2 (3C, C_{12})

MASSE (m/z) : (ESI^+) 249 [$M+H$] $^+$; 271 [$M+H$] $^+$; 289 [$M+K$] $^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3364 (F) ; 2976 (F) ; 2931 (F) ; 2871 (F) ; 1705 (F) ; 1520 (F) ; 1455 (m) ; 1392 (m) ; 1366 (F) ; 1278 (F) ; 1252 (F) ; 1174 (F) ; 1119 (F) ; 1042 (f) ; 926 (f) ; 865 (f) ; 781 (f)

Acide 2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)méthylamino)benzamido)-5-(8-(*tert*-butyl-carbamate)-3,6-dioxaocetylamine)-5-oxopentanoïque, **III-8**



Formule brute : $C_{30}H_{41}N_9O_9$

Masse Molaire : 671,3 g/mol

Rendement : 83%

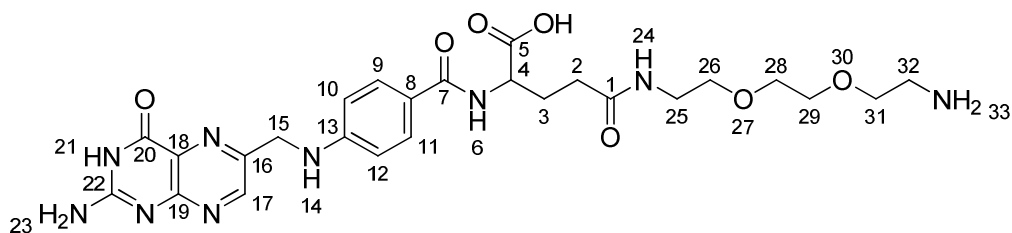
1,61 g (1 éq.) d'acide folique, 1,21 g (1,3 éq.) de 8-(*tert*-butyl-carbamate)-3,6-dioxaocetylamine, **III-7**, 2,0 g (2,7 éq.) de DCC sont solubilisés dans 65 mL de DMSO et 32 mL de pyridine. La solution est agitée sous azote pendant 24 heures à température ambiante. La solution est filtrée puis versée dans 1 litre de diéthyléther à 0°C. Le précipité jaune est extrait par centrifugation puis lavé plusieurs fois à l'éther.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 8,64 (m, 1H, H_{17}) ; 7,66 (m, 2H, H_9 - H_{11}) ; 6,62 (m, 2H, H_{10} - H_{12}) ; 4,47 (m, 2H, H_{15}) ; 4,35 (m, 1H, H_4) ; 3,88 (m, 1H, H_{14}) ; 3,46 (m, 4H, H_{28} - H_{29}) ; 3,35 (m, 4H, H_{26} - H_{31}) ; 3,18 (m, 2H, H_{32}) ; 3,04 (m, 2H, H_{25}) ; 1,35 (s, 9H, H_{36})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 174,6 (1C, C_5) ; 172,2 (1C, C_1) ; 166,6 (1C, C_7) ; 156,0 (2C, C_{20} - C_{34}) ; 154,3 (1C, C_{22}) ; 153,7 (1C, C_{13}) ; 151,1 (2C, C_{16} - C_{17}) ; 148,9 (1C, C_{19}) ; 129,4 (2C, C_9 - C_{11}) ; 128,3 (1C, C_{18}) ; 121,7 (1C, C_8) ; 111,5 (2C, C_{10} - C_{12}) ; 77,9 (1C, C_{35}) ; 69,3 à 69,9 (4C, C_{26} - C_{28} - C_{29} - C_{31}) ; 53,1 (1C, C_4) ; 50,0 (1C, C_{15}) ; 46,3 (2C, C_{25} - C_{32}) ; 31,9 (1C, C_2) ; 28,6 (3C, C_{36}) ; 25,8 (1C, C_3)

MASSE (m/z) : (ESI+) 672 [M+H]⁺

Acide 2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)méthylamino)benzamido)-5-(8-amino-3,6-dioxaoctylamino)-5-oxopentanoïque, **III-9**



Formule brute : $C_{25}H_{33}N_9O_7$

Masse Molaire : 571,2 g/mol

Rendement : 78%

510,8 mg de la molécule **III-8** est solubilisé dans 4 mL d'acide trifluoroacétique et le milieu réactionnel est agité pendant 2 heures sous azote. La solution est ensuite évaporée puis le résidu est repris dans 0,5 mL de DMSO et versé dans 150 mL de diéther. Le précipité jaune obtenu est filtré et séché.

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 8,69 (m, 1H, H_{17}) ; 7,63 (m, 2H, H_9 - H_{11}) ; 6,61 (m, 2H, H_{10} - H_{12}) ; 4,52 (m, 2H, H_{15}) ; 4,33 (m, 1H, H_4) ; 3,85 (m, 1H, H_{14}) ; 3,55 (m, 4H, H_{28} - H_{29}) ; 3,43 (m, 4H, H_{26} - H_{31}) ; 3,18 (m, 2H, H_{32}) ; 2,96 (m, 2H, H_{25})

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ en ppm) : 174,5 (1C, C_5) ; 172,3 (1C, C_1) ; 166,8 (1C, C_7) ; 153,7 (1C, C_{20}) ; 152,0 (1C, C_{22}) ; 150,9 (1C, C_{13}) ; 149,6 (2C, C_{16} - C_{17}) ; 148,2 (1C, C_{19}) ; 129,4 (2C, C_9 - C_{11}) ; 128,2 (1C, C_{18}) ; 121,8 (1C, C_8) ; 111,6 (2C, C_{10} - C_{12}) ; 69,2 à 70,0 (4C, C_{26} - C_{28} - C_{29} - C_{31}) ; 53,2 (1C, C_4) ; 49,9 (1C, C_{15}) ; 46,1 (2C, C_{25} - C_{32}) ; 31,9 (1C, C_2) ; 25,7 (1C, C_3)

MASSE (m/z) : (ESI+) 572 [M+H]⁺

III- Synthèse des nanobagues et encapsulation de principe actif

III-1- Procédure générale d'assemblage d'amphiphile à la surface de MWNTs

L'amphiphile (200mg) est solubilisé dans 40 mL de tampon TRIS/Glycine/SDS (TRIS 25 mM, glycine 190 mM et SDS 3,5 mM avec un pH=8). A cette solution est ajouté 1,0 g de nanotubes multifeuillets n-TEC. Le mélange est ensuite soniqué pendant 10 minutes à l'aide d'une sonde de sonication. La suspension obtenue est dialysée 2 jours à l'aide d'une membrane de dialyse de porosité 25000 Da, puis irradiée sous une lampe UV à 254 nm pendant 5 heures. Les nanotubes bagués sont ensuite centrifugés puis lavés avec le tampon. Cette phase de lavage permet d'éliminer l'excès de lipide en solution sous forme micellaire. Les nanotubes bagués sont ensuite suspendus dans le tampon d'électrophorèse ou d'électroélution et soniqués à la sonde de sonication pendant quelques minutes pour redisperser les nanotubes.

III-2- Procédure d'extraction par électrophorèse et électroélution

III-2-1- Extraction par électrophorèse sur gel d'agarose

Préparation du gel d'agarose

1 g d'agarose est solubilisé dans 400 mL de tampon TRIS/glycine/SDS par chauffage pendant 2 minutes au microonde. La solution d'agarose est refroidie à 50°C et coulée dans un moule avec un peigne de 26 puits. Le gel d'agarose est stocké au réfrigérateur pendant une nuit avant utilisation.

Séparation des nanobagues des nanotubes de carbone

Le gel d'agarose est incéré dans le système d'électrophorèse horizontale et la cuve remplie de tampon TRIS/glycine/SDS. 100 µL de la solution de nanotubes recouverts de nanobagues sont introduits dans chacun des puits. Le courant est mis en circulation, à une intensité constante de 30 mA, pendant 1h30. Au terme de la séparation, une bande jaune est visible au $\frac{3}{4}$ du gel d'agarose. Cette dernière est découpée pour extraire les nanobagues du gel d'agarose par électroélution.

III-2-2- Extraction par électroélution des nanobagues

Le gel d'agarose est placé dans le compartiment du système d'électroélution (Système conçu au laboratoire), du côté du pôle négatif. Le courant est mis en circulation, à une tension constante de 100 volts, pendant 2 heures. Par la suite, le sens de circulation du courant est inversé pendant 1 minute et les nanobagues sont récupérées dans le compartiment du côté du pôle positif.

III-2-3- Purification des nanobagues

La solution de nanobagues est dialysée à l'aide d'une membrane de dialyse de porosité 25000 Da contre une solution basique à pH=8 pendant 3 jours. La solution est ensuite utilisée sans plus de traitements ou lyophilisée.

III-3- Procédure d'extraction par électroélution directe

III-3-1- Extraction par le système d'électroélution directe

La solution de nanotubes bagués, contenant une quantité de 500 mg de MWNTs, est placée dans le compartiment du côté du pôle négatif (volume d'environ 100 mL) et du tampon d'électroélution dans la partie du côté du pôle positif (volume d'environ 15 mL). Les deux compartiments de la cuve d'électroélution sont remplis de tampon TRIS/glycine/SDS/NaCl (TRIS 25 mM, glycine 190 mM, SDS 3,5 mM et NaCl 140mM avec un pH=8).

Le courant est mis en circulation, à une intensité constante de 100 mA. La polarité des électrodes est inversée toutes les 30 minutes pendant 8 heures, et la dernière élution est laissée dans le sens normal de migration pendant une heure. Une inversion de polarité d'une minute est nécessaire avant de récupérer les nanobagues en solution. Les solutions de nanobagues, situées dans le compartiment de récupération, sont prélevées et remplacées par du tampon, deux à trois fois au cours du processus d'extraction.

III-3-2- Purification des nanobagues

Les solutions de nanobagues sont dialysées à l'aide d'une membrane de dialyse de porosité 25 000 Da contre une solution basique à pH=8 pendant 3 jours. Ces solutions sont ensuite

centrifugées à 15000 G pendant 20 minutes dans le but d'éliminer les reliquats de nanotubes de carbone. Ces solutions peuvent être utilisées sans plus de traitements ou lyophilisées.

III-4- Procédure d'encapsulation de principe actif

Selon la concentration des solutions de nanobagues, la quantité de principe actif devra être ajustée. De ce fait, nous donnerons un exemple d'inclusion de S39625 par les nanobagues.

A 1 mL d'une solution de nanobagues à 10 mg/mL à pH=8, 10 mg de S39625 sont ajoutés. La solution est agitée, à l'aide d'un barreau aimanté dans un pilulier fermé, et chauffée à 50°C pendant 12 heures. La solution est ensuite refroidie à température ambiante et filtrée à l'aide d'un filtre d'une porosité de 0,2 µm. Par la suite, cette solution peut être analysée par spectroscopie d'absorbance UV ou HPLC.

III-5- Caractérisations complémentaires des nanobagues

III-5-1- Spectroscopie de masse MALDI TOF

Une étude de spectroscopie de masse en mode MALDI TOF a été menée en collaboration avec Tristan Renaud de Technologie Servier et Pierre Guenot de l'université de Rennes. Cette étude a été conduite sur un spectromètre UltraFlex MALDI Mass spectrometer de la société Bruker Daltonics. Différentes conditions et différentes matrices (Acide 2,5-Dihydroxybenzoïque, 2,5-Dihydroxyacetophenone, Dithranol, Acide Hydroxypicolinique, et sans matrice) ont été testées. Malheureusement, la masse molaire de la nanobague n'a pu être déterminée. Seule la masse du monomère a été observée. Il semblerait que la masse molaire très élevée de la nanobague empêche l'expulsion de fragments ionisés de la nanobague par le rayon laser vers l'accélérateur à haut voltage.

III-5-2- Spectroscopie infra-rouge de réflexion totale atténuée (ATR-IR)

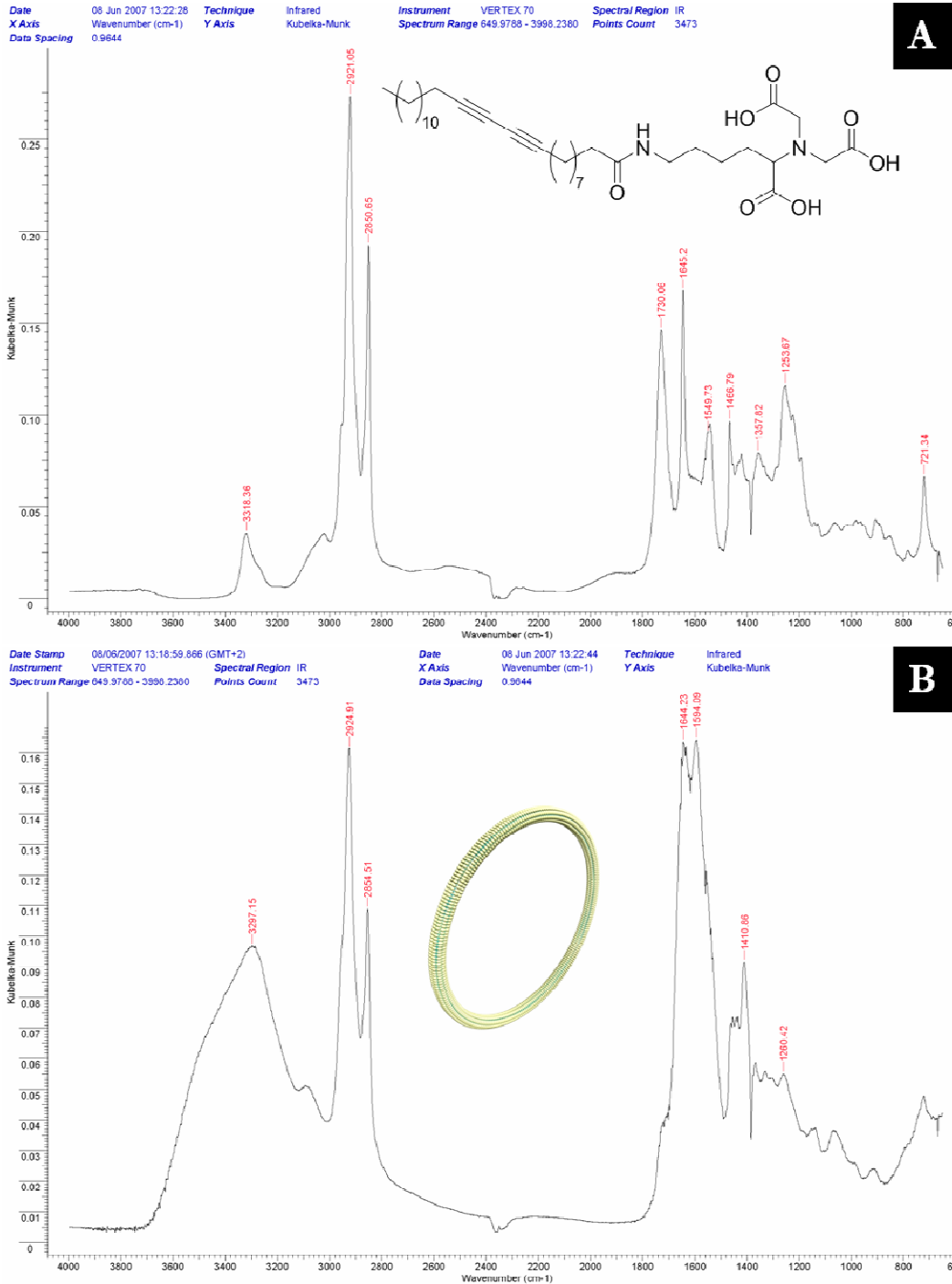


Figure 1 – (A) Spectre ATR IR de l'amphiphile II-4 - (B) Spectre ATR IR de nanobague

IV-Synthèse de micelles polymérisées et encapsulation de principes actifs

IV-1- Synthèse de micelles polymérisées

La synthèse de micelles polymérisées de l'amphiphile **II-4** s'effectue par solubilisation du tensio-actif dans une solution aqueuse de soude à pH=12. Cette dernière est soniquée à l'aide d'une sonde de sonication pendant 5 minutes et polymérisée par irradiation lumineuse à 254 nm pendant 4 heures.

Pour les tests d'inclusion et les études *in vivo*, le pH de ces solutions doit être proche de celui du milieu physiologique. Pour ce faire, les solutions de micelles polymérisées ont été dialysées pour ajuster le pH à des valeurs comprises entre 7 et 8.

L'amphiphile **II-4** étant très soluble, des solutions de micelles polymérisées ont été préparées avec des concentrations allant jusqu'à 100 mg/mL.

IV-2- Procédure d'encapsulation

Selon la concentration des solutions de micelles polymérisées, la quantité de principe actif devra être ajustée. De ce fait, nous donnerons un exemple d'inclusion de S39625 par les micelles polymérisées.

A 2 mL d'une solution de micelles polymérisées à 10 mg/mL à pH=8, 50 mg de S39625 sont ajoutés. La solution est agitée, à l'aide d'un barreau aimanté dans un pilulier fermé, et chauffée à 50°C pendant 12 heures. La solution est ensuite refroidie à température ambiante et filtrée à l'aide d'un filtre d'une porosité de 0,2 µm. Par la suite, cette solution peut être analysée par HPLC, par RMN et par la méthode de « *mass balance* ».

IV-3- Etude RMN de l'inclusion de principes actifs (*chapitre III-3-3-2*)

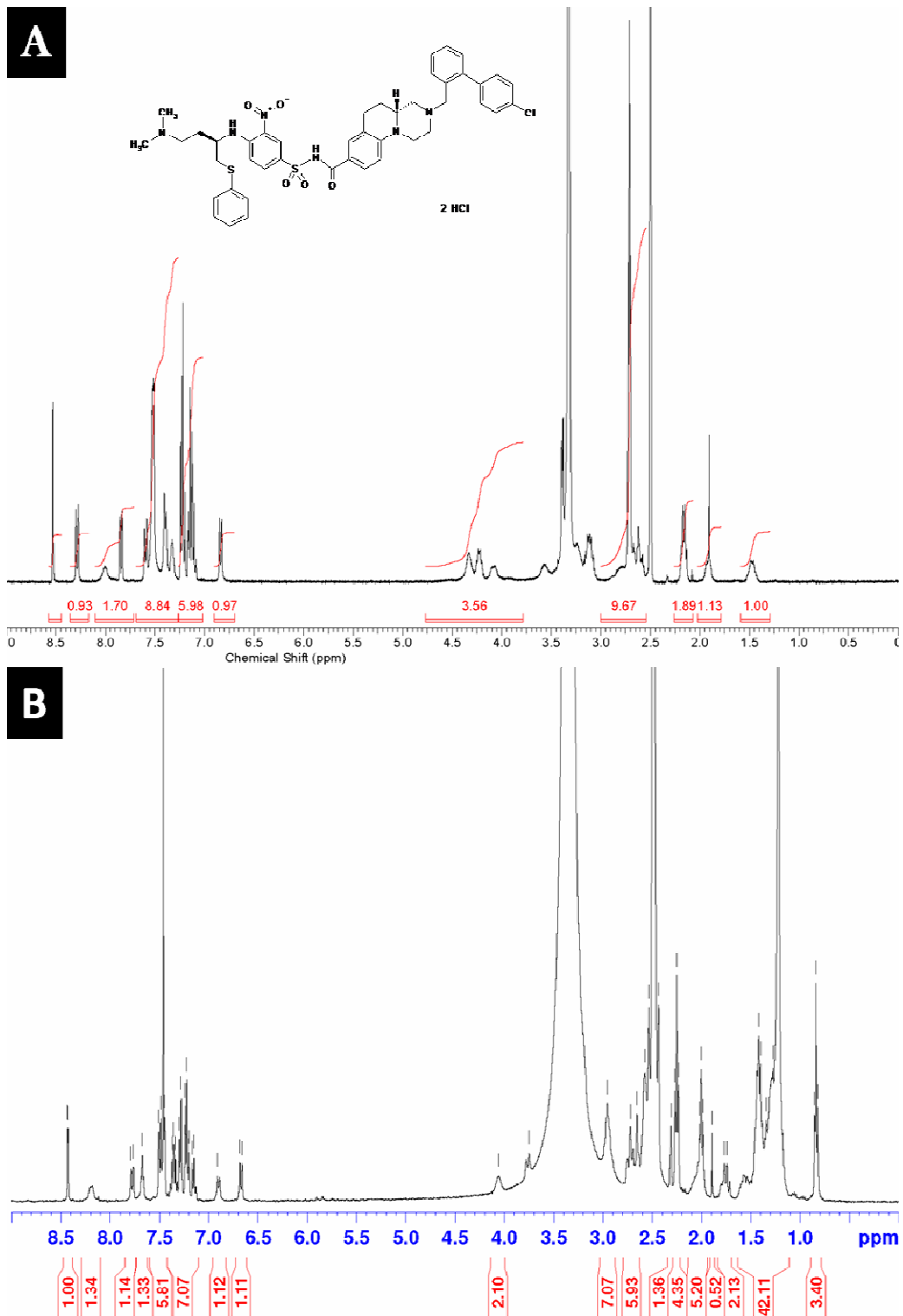


Figure 2- (A) Spectre RMN dans le DMSO-d₆ du S444563 (B) Spectre RMN dans le DMSO-d₆ du S44563 inclus dans les micelles polymérisées

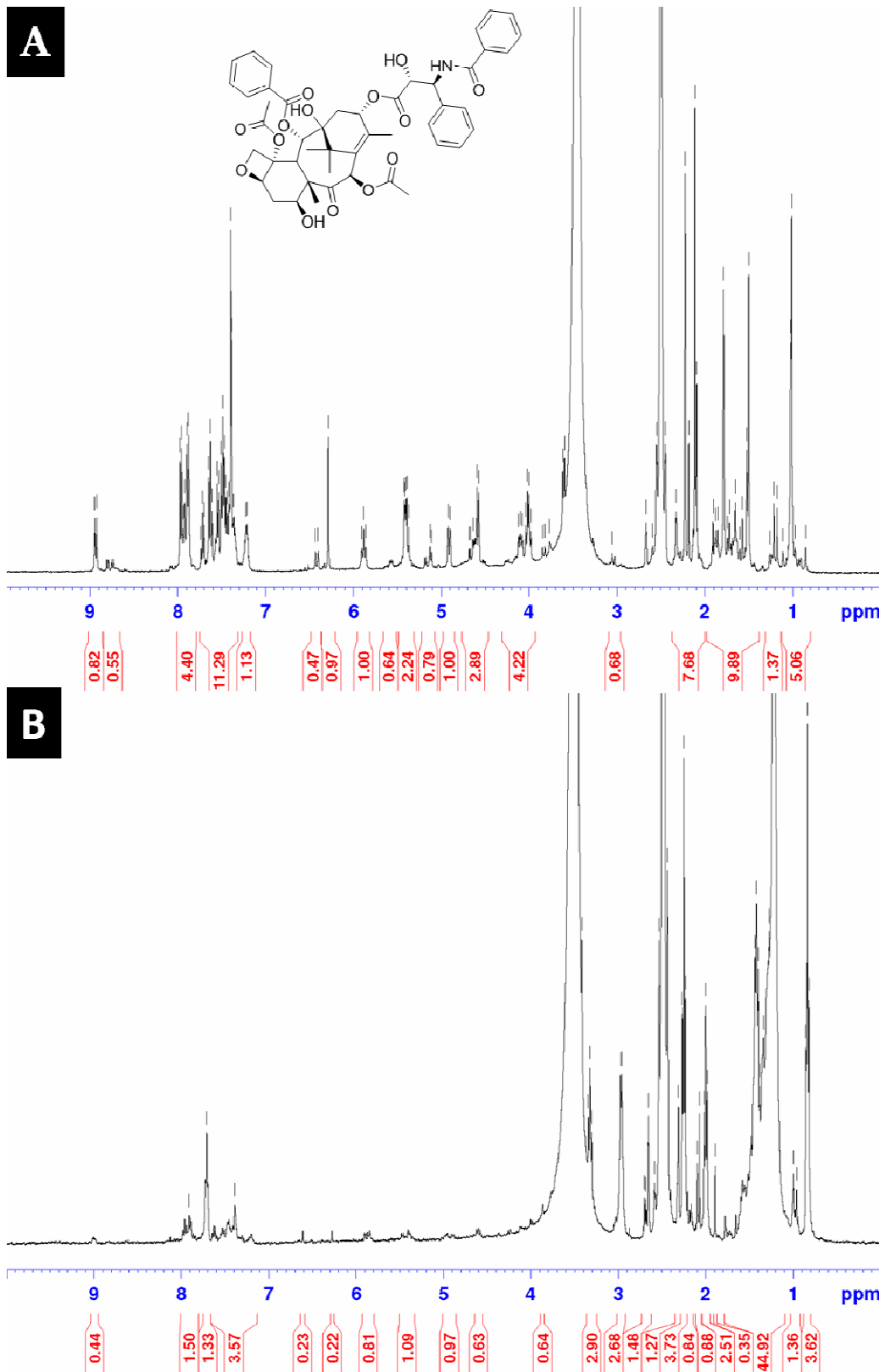


Figure 3 – (A) Spectre RMN dans le DMSO-d₆ du paclitaxel (B) Spectre RMN dans le DMSO-d₆ du paclitaxel inclus dans les micelles polymérisées

Title : EVALUATION OF NANORINGS FOR DRUG DELIVERY

Abstract :

During this thesis work, we took an interest in the synthesis and the evaluation of amphiphilic nanorings constructed on the surface of carbon nanotubes as vectors for drug delivery.

At first, we have studied the structure and the synthesis method of self-assembled amphiphilic molecules on carbon nanotubes. These self-assemblies lead to the formation of water soluble nanorings with a hydrophobic domain. In this study, we have synthesized several amphiphilic molecules to obtain strong nanorings and developed a new separation procedure to improve nanoring extraction. The characterization of the nanoring structure has been realized by various techniques and particularly by small angle neutron scattering.

Also, we have evaluated the nanorings as vectors for pharmaceutical applications. This nanovector exhibits the required characteristics for drug delivery such as the capability to incorporate a large amount of hydrophobic drugs and to increase their water solubility. Finally, the nanorings have showed no in-vitro nor in-vivo toxicities during preliminary toxicological studies.

Keywords : Carbon nanotubes, self-assembly, nanorings, amphiphilic, drug, encapsulation

Titre : EVALUATION DE NANOBAGUES COMME VECTEURS DE DELIVRANCE DE MEDICAMENTS

Résumé :

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse et à l'évaluation d'anneaux de tensio-actifs construits à la surface de nanotube de carbone comme agents de vectorisation de principe actifs.

Dans un premier temps, nous avons étudié la structure et le mode de synthèse d'amphiphiles auto-assemblés sur support de nanotube de carbone. Ces auto-assemblages conduisent à la formation de nanobagues hydrosolubles possédant un domaine hydrophobe. Au cours de cette étude, nous avons synthétisé différents amphiphiles afin d'obtenir des anneaux robustes et développé un système de séparation des nanobagues afin d'améliorer leur extraction. La caractérisation de la structure en nanobagues a été réalisée à l'aide de différentes techniques et en particulier par diffusion des neutrons aux petits angles.

Enfin, une évaluation des nanobagues nous a permis de montrer que ces nanovecteurs possèdent les caractéristiques requises pour une utilisation comme agent de vectorisation de médicaments. Ces nanovecteurs ont la capacité d'inclure des principes actifs à des taux d'inclusion importants et d'augmenter de façon significative la solubilité de ces molécules dans l'eau. De plus, ces espèces n'ont montré aucune toxicité apparente *in vitro* et *in vivo* lors d'études préliminaires.

Mots Clefs : Nanotube de carbone, auto-assemblage, nanobague, amphiphile, médicament, encapsulation